

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické chemie**



**Syntéza a studium reaktivity derivátů odvozených od 4-(aryldiazenyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu a piperazinu**

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor:	Eva Schütznerová
Studijní obor:	Organická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Petr Cankař, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Viktor Krchňák, CSc.
Termín odevzdání práce:	2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 4.7.2013

Eva Schütznerová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. za cenné rady a vedení. Dále děkuji vedoucímu Katedry organické chemie PřF UPOL doc. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za umožnění zahraniční stáže a stáží ve farmaceutických firmách v ČR i zahraničí, prof. Ing. Pavlu Hradilovi, CSc. za počáteční podporu v syntéze Dmb-hydrazinu, Ing. Martinu Greplovi, Ph.D. za měření HRMS spekter, doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za měření biologické aktivity, Mgr. Igoru Popovi, Ph.D. za měření NMR spekter acylpyrazolů a prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. za krystalografická měření. Děkuji všem svým kolegům z Katedry organické chemie PřF UPOL za přátelskou atmosféru a rovněž za rady a pomoc, zejména však MSc Pilar Ventosa, Ph.D., Davidu Tran, Ph.D., RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D., Mgr. Barboře Lemrové, Ing. Robertu Kaplánkovi, Ph.D. a Dr. Cleopatre Neagoie. Zvláštní poděkování patří RNDr. Viktoru Krchňákovi, CSc. za jeho vedení na zahraniční stáži na Univerzitě Notre Dame a za seznámení se syntézou na pevné fázi a kombinatoriální chemií. Rovněž děkuji jeho ženě za přátelské přijetí a pomoc. Za příjemnou atmosféru a rady na Univerzitě Notre Dame vděčím také kolegům Dr. Rohitovi Tiwari a Dr. Sereně Carosso. Jaroslavu Zajíčkovi, Ph.D. (ND, USA) děkuji za měření 2D NMR spekter bicyklů a za výuku měření na NMR spektrometru. Dr. Allenu G. Oliver (ND, USA) za krystalografii bicyklů. Děkuji mé rodině.

## Projekty:

Tato práce vznikla za podpory Univerzity Palackého (Olomouc) a University Notre Dame (Indiana, USA), grantů: IGA PrF\_2011\_019 a PrF\_2012\_015, granty MŠMT ČR (KONTAKT) ME09057, CZ.1.07/2.4.00/31.0130, GAČR P207/12/0473.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Eva Schütznerová
Název práce:	Syntéza a studium reaktivity derivátů odvozených od 4-(aryldiazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3,5-diaminu a piperazinu
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra organické chemie, PřF UPOL
Vedoucí práce:	RNDr. Petr Cankař, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Viktor Krchňák, CSc.
Rok obhajoby práce:	2013

### Abstrakt:

Práce je zaměřena na syntézu a studium pyrazolů a bicyklů. Byly studovány acylační reakce pyrazolu **1** v roztoku a spolu s pyrazolem **25** na pevné fázi. V roztoku byly připraveny tři typy acyl pyrazolů, kde byl substituent navázán na pyrazolový dusík endocyklický, exocyklický nebo na fenolické hydroxyskupině. K acylacím je nejreaktivnější endocyklický dusík, další izomery lze získat s použitím protektivních skupin Dmb a Boc. Tyto izomery lze od sebe rozlišit alkalickou hydrolýzou. Nejzajímavější výsledky z hlediska inhibice CDK poskytly pyrazoly substituované na aminoskupině (**47a-e**). Na pevné fázi byla připravena menší knihovna pyrazolů. Navzdory použití protektivních skupin se i zde pyrazoly díky mezomerii navazovaly přednostně přes endocyklický dusík. Ve stereoselektivní syntéze (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyklo [3.2.1]oktanového typu bicyklických sloučenin na pevné fázi byla použita metodika tandemové cyklické iminiové tvorby a následné nukleofilní adice. Cyklický iminiový ion byl prekurzorem vedoucím k bicyklům se dvěma chirálními uhlíky **2** nebo k olefinické struktuře **89**. Byl studován poměr mezi deriváty **2** a **89** v závislosti na substituci a stabilitě bicyklu **2** v kyselém prostředí.

Klíčová slova:	pyrazoly, acylace, protektivní skupiny, inhibice CDK, pevná fáze, tandem cyklizace iminiového iontu a nukleofilní adice
Počet stran:	177
Počet externích příloh:	3
Jazyk:	Čeština

## Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Mgr. Eva Schütznerová  
Title: Synthesis and study of reactivity of derivatives based on 4-(aryldiazenyl)-1*H*-pyrazole-3,5-diamine and piperazine  
Type of thesis: Ph.D. Thesis  
Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University  
Supervisor: RNDr. Petr Cankař, Ph.D.  
Consultant: RNDr. Viktor Krchňák, CSc.  
The year of presentation: 2013

### Abstract:

The presented thesis is focused on the synthesis of pyrazoles and bicycles. The acylation reactions of pyrazole **1** were studied in solution and together with the pyrazole **25** also in solid phase. In solution, 3 types of acyl pyrazoles were prepared, where the substituent was attached to endocyclic or exocyclic nitrogen of pyrazole or to phenolic hydroxy group. The endocyclic nitrogen is the most reactive position to the acylation, the other isomers can be obtained by use of protecting groups Dmb and Boc. These isomers can be distinguished from each other by alkaline hydrolysis. The pyrazoles substituted on the amino group (**47a-e**) provided the most interesting results in CDK inhibition. On the solid phase, we synthesized a small library of the pyrazoles. Despite the use of protecting groups, the pyrazoles were attached preferably to the endocyclic nitrogen due to mesomery. In the polymer supported stereoselective synthesis of the (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyclo-[3.2.1]octane bridged scaffold, tandem iminium ion cyclization-nucleophilic addition reactions were applied. The cyclic iminium ion was a precursor leading to bicycles with two chiral carbons **2** or to olefin **89**. The influence of substituents and the acid stability to the ratio of **9** and **89** were studied.

Keywords: pyrazoles, acylation, protecting groups, CDK inhibition, solid phase, tandem iminium ion cyclization-nucleophilic addition reactions

Number of pages: 177  
Number of external appendices: 3  
Language: Czech

*Poznámka autora – interpunkce a zkratky:*

*Abychom zjednodušili výsledky publikované v mezinárodních časopisech, zachovali jsme anglické číslování v této práci. Desetinná čísla jsou oddělena tečkou místo čárky.*

*Používáme vědecké a technické výrazy, které se normálně používají ve formě zkratk. Pokud není česká verze, používáme anglickou zkratku.*

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>6</b>
2.1 Pyrazoly .....	6
2.2 Bicykly .....	6
<b>3 Teoretická část</b> .....	<b>7</b>
3.1 Využití methoxybenzylových skupin PMB a Dmb v syntéze pěti a šestičetných dusíkatých heterocyklů .....	7
3.2 Para methoxybenzyl (PMB) chránící skupina .....	8
3.2.1 PMB – metody navázání .....	8
3.2.2 PMB – možnosti štěpení .....	21
3.2.3 Využití PMB-protektce v konceptu ortogonalita .....	34
3.3 2,4-Dimethoxybenzyl (Dmb) .....	35
3.3.1 Dmb – metody navázání .....	35
3.3.2 Dmb – možnosti odstranění .....	45
3.3.3 Příklady použití Dmb protektivní skupiny v kombinaci s Boc skupinou .....	53
<b>4 Výsledky a diskuse</b> .....	<b>58</b>
4.1 Prekurzory pyrazolů .....	58
4.1.1 Syntéza 2,4-dimethoxybenzylhydrazinu (Dmb-NHNH <sub>2</sub> ) 6 .....	59
4.1.2 Syntéza 2,4,6-trimethoxybenzylhydrazinu (TMB-NHNH <sub>2</sub> ) 7 .....	63
4.1.3 Syntéza (4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)karbonohydrazonoyl dikyanidu (TIPS-hydrazonu) 8 .....	64
4.1.4 Syntéza pyridin-4-ylkarbonohydrazonoyl dikyanidu (pyridin-hydrazonu) 9 .....	65
4.2 Nesubstituované a chráněné pyrazoly .....	66
4.2.1 Pyrazoly nesubstituované na endocyklickém dusíku (TIPS-pyrazol 24, pyridin-pyrazol 25) .....	68
4.2.2 Syntéza PMB-pyrazolu (26) a jeho Boc (27) a Fmoc (28) derivátů .....	68
4.2.3 Syntéza Dmb-pyrazolů (29, 30, 32) a jejich Boc, Fmoc, silyl a Nosyl deriváty .....	71
4.2.4 Studium Boc substituce nesubstituovaného pyrazolu (1) .....	73
4.3 Acylované pyrazoly .....	76
4.3.1 Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu (40a-e) .....	78
4.3.2 Acyl na fenolické hydroxy skupině pyrazolu .....	81
4.3.3 Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na amino skupině) .....	86
4.4 Acylované pyrazoly na pevné fázi .....	91
4.4.1 Výstavba pyrazolu 1 na pevné fázi .....	91
4.4.2 Navázání pyrazolu na pevnou fázi .....	94

4.4.3	Syntéza knihovny pyrazolů .....	96
4.5	Bicykly.....	105
4.5.1	Syntéza chemické knihovny, studium vlivů na formaci bicyklu.....	106
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>122</b>
6.1	Prekurzory pyrazolů .....	122
6.1.1	(2,4-Dimethoxybenzyl)hydrazin hydrochlorid (6) .....	122
6.1.2	(4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)karbonohydrasonoyl dikyanid (8).....	123
6.1.3	Pyridin-4-karbonohydrasonoyl dikyanid (9).....	124
6.2	Volné a chráněné pyrazoly .....	124
6.2.1	4-((4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3,5-diamin (24; TIPS-pyrazol) .....	124
6.2.2	4-(Pyridin-4-yl)diazenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3,5-diamin (25, pyridin-pyrazol) .....	125
6.2.3	4-((3,5-Diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)diazenyl)fenolu (26; Pmb-pyrazol).....	125
6.2.4	(9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)methyl 4-((3,5-diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl karbonát (28; PMB-Fmoc-pyrazol).....	125
6.2.5	Obecný postup pro reakci DmbNHNH <sub>2</sub> ×HCl s příslušným hydrazonem.....	126
6.2.6	Obecný postup pro reakci příslušného pyrazolu s Boc anhydridem.....	127
6.2.7	Obecný postup pro Nosylaci amino skupiny pyrazolů .....	130
6.3	Acylované pyrazoly v roztoku.....	131
6.3.1	Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu.....	131
6.3.2	Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na aminoskupině) .....	135
6.3.3	Acyl na fenolické hydroxy skupině pyrazolu.....	144
6.4	Acylované pyrazoly na pevné fázi.....	151
6.4.1	Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu.....	153
6.4.2	Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na aminoskupině) .....	156
6.5	Bicykly.....	156
6.5.1	(1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-(9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)methyl 3-(2-amino-2-oxoethyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane-8-carboxylate 2(1,1,1).....	159
6.5.2	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,2).....	159
6.5.3	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-2-oxo-8-tosyl-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,3) .....	160
6.5.4	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,4).....	160
6.5.5	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,5).....	160



6.5.6	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,6).....	161
6.5.7	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,7).....	161
6.5.8	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((2,4-dinitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,8).....	161
6.5.9	2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-7-methyl-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,2,4).....	162
6.5.10	( <i>S</i> )-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamido)propanamide 2(2,1,4) .....	162
6.5.11	2-(2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((2,4-dinitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamido)-3-(4-hydroxyphenyl)propanamide 2(2,1,8) .	162
6.5.12	(1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-3-(3-aminopropyl)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-one 2(3,1,4).....	163
6.5.13	(1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-3-(2-hydroxyethyl)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-one 2(4,1,4).....	163
6.5.14	<i>N</i> -(3-aminopropyl)-2-((1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-8-((2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(5,1,7).....	163
6.5.15	( <i>S</i> )-(9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)methyl 4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(hydroxymethyl)-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-1(2 <i>H</i> )-carboxylate 89(1,1,1) .....	164
6.5.16	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,2).....	164
6.5.17	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-2-oxo-4-tosyl-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,3) .....	164
6.5.18	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,4).....	165
6.5.19	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,5).....	165
6.5.20	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,6).....	165
6.5.21	( <i>S</i> )-2-(3-(hydroxymethyl)-4-(4-methoxybenzoyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamide 89(1,1,10) .....	166
6.5.22	( <i>S</i> )-2-(2-(( <i>S</i> )-3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2 <i>H</i> )-yl)acetamido)-3-(4-hydroxyphenyl)propanamide 89(2,1,4) 166	
6.5.23	( <i>S</i> )-1-(2-hydroxyethyl)-3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-3,4-dihydropyrazin-2(1 <i>H</i> )-one 89(4,1,4) .....	166
6.5.24	2-methoxy-4-tosylmorpholine 94 .....	167
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>168</b>

## Seznam zkratek

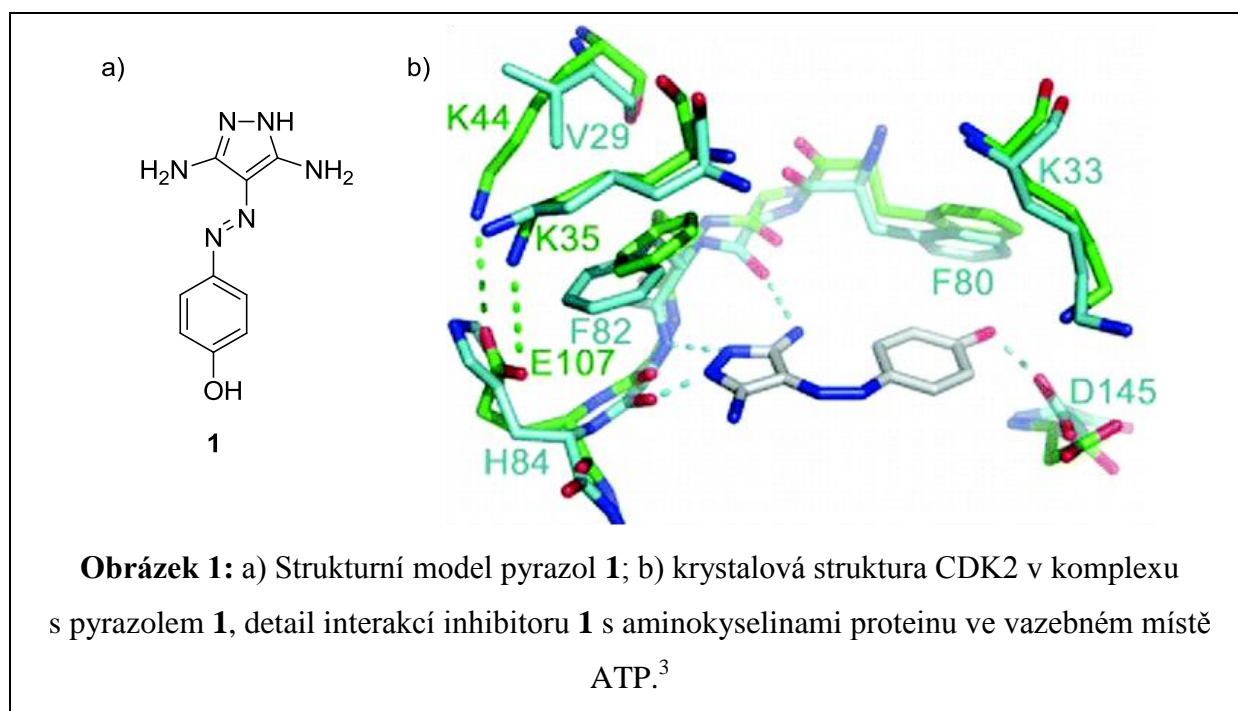
Ac	acetyl
AK	aminokyselina
Ala	alanin
Ar	aryl
ATP	adenosin trifosfát
BAL	Backbone Amide Linker, pryskyřice BAL
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
BTC	bis(trichlormethyl)karbonát, trifosgen
Bz	benzoyl
CAN	hexanitratocéričitan amonný
CAN508	pyrazol <b>1</b> (4-((3,5-diamino-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)diazenyl)fenol)
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CDK	cyklin-dependentní kinasy (např. CDK2, CDK9)
COSY	CORrelation SpectroscopY, 2D NMR
Cys	cystein
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DDQ	2,3-dichlor-5,6-dikyan-1,4-benzochinon
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -dimethylaminopyridin
Dmb	2,4-dimethoxybenzyl
DME	dimethoxyethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPA	difenylfosforyl azid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EE	ethoxyethyl

eq	ekvivalent
Et	ethyl
Fmoc	Fluorenylmethyloxykarbonyl
Fmoc-Osu	9 <i>H</i> -Fluorenylmethyl <i>N</i> -sukcinimidyl karbonát
For	formyl
Gly	glycin
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HBTU	<i>O</i> -benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation, 2D NMR
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, High-Pressure Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation, 2D NMR
IC <sub>50</sub>	maximální (50%) inhibiční koncentrace (IC) substance
<i>i</i> -Pr	isopropyl
LAH	lithium aluminium hydrid, hydrid lithný
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometr
MCF7	buněčné linie rakoviny prsu
Me	methyl
MOM	methoxymetyler
MoOPH	oxodiperoxymolybden-pyridin-hexamethylfosforamid
Ms	mesyl
MW	mikrovlnné záření
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -butyl
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
NI	nebylo izolováno
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
NR	nereaguje

Ns, Nos	4-nitrobenzensulfonyl, 2-nitrobenzensulfonyl
On	overnight, přes noc
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program, zobrazení molekulární struktury determinované pomocí rentgenové difrakce
PG	protecting group, chránící skupina
Ph	fenyl
PMB	<i>para</i> -methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluensulfonát
Pro	prolin
rt	room temperature, laboratorní teplota
SEM	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl
Ser	serin
TBAB	tetrabutylammonium bromid
TBAF	tetrabutylammonium fluorid
TBAI	tetrabutylammonium jodid
TBDMS	<i>tert</i> -butyl dimethyl silyl
<i>t</i> -Bu	terciární butyl
TEA	triethylamin
TES	triethylsilan
TFA	kyselina trifluoroctová
TFAA	trifluoracetanhydrid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonin
TIPS	triisopropylsilyl
TLC	Thin Layer Chromathography, tenkovrstvá chromatografie
TMB	2,4,6-trimethoxybenzyl
TMSOTf	trimethylsilyl trifluormethansulfonát
Ts, Tos	tosyl
Tyr	tyrosin
V. L.	výchozí látka
Wee1 kinasy	klíčový regulátor buněčného cyklu
XPhos	2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenyl
X-ray	rentgenostrukurní analýza

# 1 Úvod

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou nezbytnou součástí regulačního komplexu buněčného cyklu. Deregulace může mít za následek nádorová onemocnění. V poslední době se CDK inhibitory staly potenciálním cílem farmaceutického průmyslu ve vývoji nových protinádorových léčiv.<sup>1,2</sup> 4-(Fenyldiazenyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diamin (**1**, CAN508, Obrázek 1a) byl vybrán jako modelová sloučenina pro disertační práci, protože jeho deriváty byly identifikovány jako ATP-kompetitivní inhibitory cyklin-dependentních kinas CDK2 a CDK9, samotný pyrazol **1** z nich dosahoval nejlepších výsledků.<sup>3</sup> Cílem této práce byla taková obměna účinné struktury, která by vedla k derivátům se srovnatelnými nebo ještě lepšími inhibičními vlastnostmi. Pyrazoly jsou dlouhodobým tématem výzkumu Katedry organické chemie UP v Olomouci.



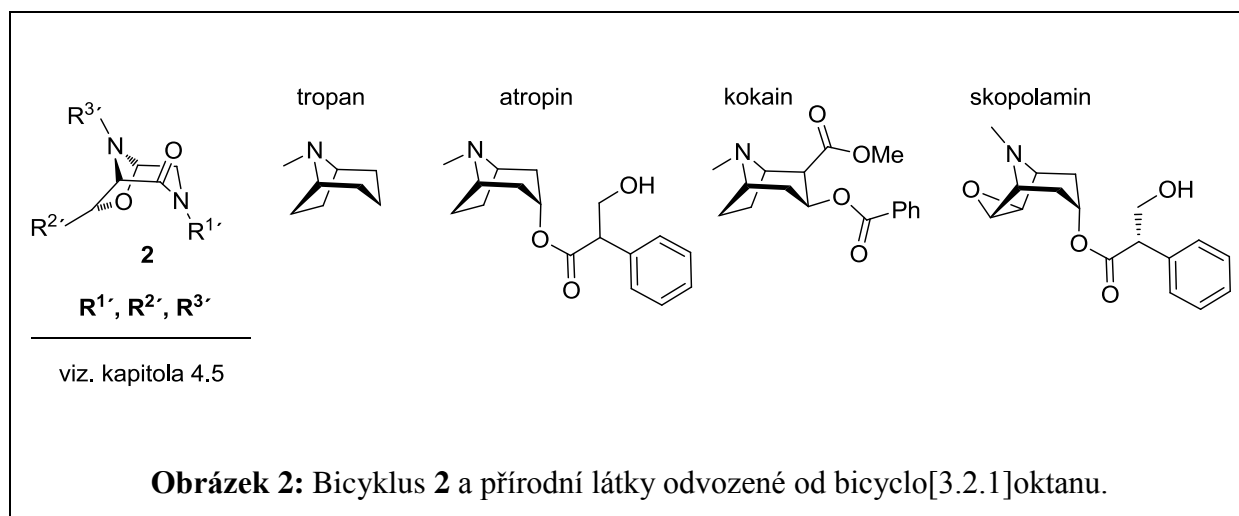
Krystalová struktura komplexu pyrazolu **1** s CDK2 (Obrázek 1b) naznačuje, jakým způsobem zapadá pyrazol do aktivního místa. Bylo usouzeno, že pro úspěšnou inhibici musí být endocyklický pyrazolový dusík volný, na jedné amino skupině může být menší substituent, zatímco na druhá amino skupina může nést i objemnější substituent.

Pyrazol **1** obsahuje více funkčních skupin podobné reaktivity, což ztěžuje jeho regioselektivní substituci. Navíc představuje složitý tautomerní systém, důsledkem čehož lze obtížně určit polohu substituentu pomocí NMR spektroskopie. Z toho důvodu byla pozornost v této

závěrečné práci věnována studiu zavedení protektivních skupin do molekuly pyrazolu (kapitola 4.2), které by zajistily jednoznačný směr acylačních reakcí. Acylační reakce s použitím různých činidel byly studovány na nesubstituovaných a chráněných pyrazolech v roztoku (kapitola 4.3) i na pevné fázi (kapitola 4.4). V rámci syntézy knihovny pyrazolů na pevné fázi (kapitola 4.4) byly studovány pyrazoly obsahující piperazinový heterocyklus.

Syntéza derivátů piperazinu byla studována i v následující kapitole popisující bicyklické sloučeniny (kapitola 4.5). Na syntézu peptidomimetik na pevné fázi je zaměřena spolupráce Katedry organické chemie UP s Univerzitou Notre Dame v Indianě, USA.

Bicyklické sloučeniny (**2**, Obrázek 2), svou strukturou připomínající tropanové alkaloidy jako je tropan, atropin, kokain a skopolamin,<sup>4,5</sup> byly vystavěny na pevné fázi s použitím amino kyselin (kapitola 4.5). Pozornost syntéze látek mimikujících látky přírodní byla věnována z toho důvodu, že zde existuje velká pravděpodobnost zajímavé biologické aktivity. Přírodní látky byly pro tradiční medicínu vždy důležité a i v současnosti jsou středem zájmu farmaceutického průmyslu. Řada léčiv byla navržena na základě přírodních látek, například v léčbě rakoviny struktura přes 60% léčiv je přírodního původu.<sup>6,7</sup>



Strukturální analýza prokázala, že dosud připravené knihovny látek mají často nedostatek  $sp^3$ -hybridizovaných uhlíků a chirálních center oproti léčivům a přírodním látkám.<sup>8</sup> Proto byl tento výzkum zaměřen na syntézu sloučenin, které obsahují  $sp^3$  uhlíky (3D architektura) a jsou chirální.

V kapitole 4.5 byl studován vliv substituentů  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  na formaci bicyklu **2** a stabilita tohoto bicyklu v kyselém prostředí.

## 2 Cíl práce

### 2.1 Pyrazoly

- 1.) Studium acylačních reakcí pyrazolu **1**
  - a) acylace na endocyklický dusík = na pyrazol do polohy 1
  - b) acylace na exocyklický dusík = na amino skupinu pyrazolu
  - c) acylace fenolické skupiny pyrazolu
  - d) nalezení jednoduché metody pro rozlišení těchto izomerů
  - e) volba acylačního činidla (acyl-chlorid, karboxylová kyselina a aktivační činidlo, další možnosti), vliv použitého acylačního činidla na výslednou polohu substituentu
  
- 2.) Volba vhodných protektivních skupin, studium možností deprotektce
  - a) za účelem přípravy acyl-pyrazolů, lišících se polohou acylu
  - b) za účelem ukotvení pyrazolu na pevnou fázi přes konkrétní funkční skupinu (endocyklický/exocyklický dusík)
  
- 3.) Biologická aktivita připravených pyrazolů, studium vlivu substituentu
  
- 4.) Pyrazoly na pevné fázi
  - a) převedení syntézy pyrazolu **1** z roztoku do syntézy na pevné fázi
  - b) volba vhodné strategie pro navázání pyrazolů (**1**, **25**) na pevnou fázi a syntéza knihovny

### 2.2 Bicykly

- 1.) Optimalizace syntézy peptidomimetik typu (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyklo[3.2.1]oktanu na pevné fázi
- 2.) Návrh cílových látek, syntéza knihovny
- 3.) Studium vlivu substituentů na formaci bicyklu
- 4.) Studium stability bicyklických sloučenin v kyselém prostředí

## 3 Teoretická část

### 3.1 Využití methoxybenzylových skupin PMB a Dmb v syntéze pěti a šestičetných dusíkatých heterocyklů

Pokud chceme, aby multifunkční sloučenina reagovala selektivně v jednom reaktivním místě, je třeba ostatní reaktivní centra dočasně zablokovat. Za tím účelem bylo vyvinuto a stále se vyvíjí mnoho protektivních skupin. Využívá se jich v syntéze komplexních organických struktur.<sup>9</sup>

Snad první, kdo využil dočasné ochrání funkční skupiny a její následné odmaskování, byl Emil Fischer v syntéze sacharidů.<sup>10</sup> První moderní protektivní skupinou byl benzyloxykarbonyl PhCH<sub>2</sub>OCO vyvinutý Bergmannem a Zervasem.<sup>11</sup> S využitím této chránící skupiny mohli syntetizovat peptidy, které dříve nebyly synteticky dostupné. Chránící skupinu zavedli do molekuly amino kyseliny prostřednictvím příslušného chloridu a štěpení provedli katalytickou hydrogenací, kdy se karbobenzoxy skupina odbourávala ve formě toluenu a oxidu uhličitého. Stanovili základní charakteristiky, které musí chránící skupina splňovat: 1.) snadné navázání na funkční skupinu; 2.) stabilní k širokému spektru reakčních podmínek; 3.) snadné odstranění na konci syntetického procesu, případně když chceme chráněnou funkční skupinu modifikovat.

Barany *et al.*<sup>12,13</sup> zavedl nový koncept „ortogonalita“. Protektivní skupiny můžeme zařadit do ortogonálních setů, jedná se o nezávislé třídy, které je možné odstranit konkrétním mechanismem. Například protektivní skupiny štěpené bazicky, kysele, působením fluoridových iontů... Tento koncept umožňuje protekci různých funkčních skupin různými protektivními skupinami v rámci jedné molekuly a v průběhu syntézy je pak možné odmaskovat jen jednu v přítomnosti ostatních protektivních skupin, přičemž ostatní funkční skupiny zůstanou chráněné. Zpočátku bylo používání protektivních skupin úzce spjata s peptidovou syntézou, rychle se ale ujalo i v syntéze nepeptidových molekul.

Zavedení a odstranění vhodné protektivní skupiny vyžaduje pečlivé syntetické plánování, aby se dosáhlo ortogonalita mezi chránícími skupinami přítomnými v molekule. V této dizertační práci byla použita řada protektivních skupin, které lze štěpit rozdílným mechanismem. Byly použity methoxybenzylové skupiny 4-methoxybenzoyl (PMB) a 2,4-dimethoxybenzoyl (Dmb), *tert*-butoxykarbonyl (Boc) jako kysele labilní chránící skupiny; bazicky labilní fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) a 4-nitrobenzensulfonyl (4-Nos), jehož deprotekcí zajišťuje merkaptoethanol v přítomnosti báze; silylové skupiny triisopropylsilyl (TIPS) a *tert*-



butyldimethylsilyl (TBDMS), které se odstraňují nejčastěji fluoridovými ionty. Tato kapitola je se zaměřena na používání methoxybenzylových skupin při chránění dusíku heterocyklických sloučenin, zejména pěti a šestičlenných.

V syntéze potenciálně biologicky aktivních heterocyklických sloučenin je vhodná volba protektivních skupin zásadním problémem. Pro chránění dusíkatých heterocyklických sloučenin se běžně užívá tvorby *N*-sulfonyl derivátů (tosyl<sup>14</sup>), karbamátů (Boc<sup>15</sup>), *N*-alkylů (*N*-benzyl<sup>16</sup>), amidů (formyl<sup>17</sup>) a dalších. Univerzální protektivní skupina neexistuje. Každá má své pro a proti a vždy je třeba zvažovat všechny aspekty reakce, stabilitu dané skupiny i podmínky deprotektce. V přípravě řady triazolů,<sup>18</sup> imidazolů<sup>19</sup> a pyrazolů<sup>20</sup> byla pro chránění heterocyklického dusíku použita *p*-methoxybenzylová (PMB, resp. MPM = methoxyphenylmethyl, také MBn = methoxybenzyl) skupina. Vedle chránění amino skupiny se PMB používá také k chránění hydroxy skupiny alkoholů<sup>21</sup> a fenolů,<sup>22</sup> dále k ochraně thiolů<sup>23</sup> a karboxylových kyselin.<sup>24</sup> Spolu s jejím analogem obsahujícím o jednu methoxy skupinu víc (2,4-dimethoxybenzyl = 2,4-Dmb) jsme si tyto dvě protektivní skupiny zvolili i pro naši syntézu, kde jsme je použili pro chránění pyrazolového endocyklického dusíku. Proto je na PMB (kapitola 1.2) a Dmb (kapitola 1.3) v této části práce zaměřena pozornost.

## **3.2 Para methoxybenzyl (PMB) chránící skupina**

Tato kapitola se věnuje metodám zavedení PMB do molekuly, dále možnostem jejího odstranění a na závěr je uveden příklad uplatnění PMB v konceptu ortogonalit.

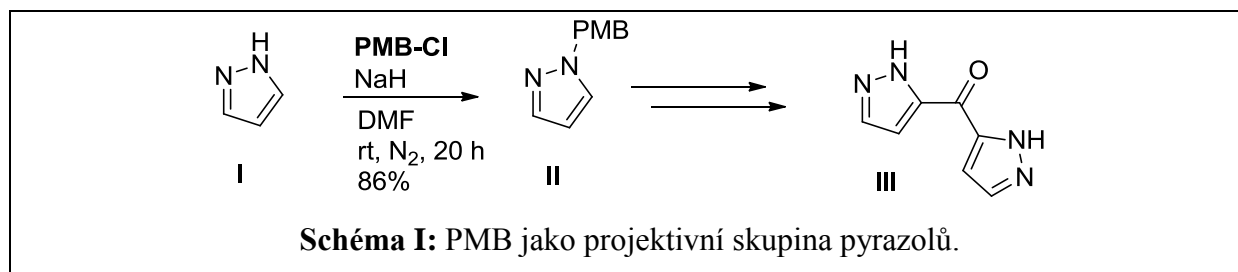
### **3.2.1 PMB – metody navázání**

V této části jsou uvedeny možnosti navázání PMB skupiny na heterocyklický dusík případně na prekurzor, ze kterého se heterocyklus tvoří následně. Tato kapitola je rozdělena podle použitého činidla. Nejčastějším zdrojem PMB chránící skupiny pro zavedení do molekuly heterocyklu jsou halogenidy - chlorid (PMB-Cl) a bromid (PMB-Br), možné je použít také hydroxyderivát (PMB-OH), dále jsou to deriváty dusíku - amin (PMB-NH<sub>2</sub>), hydrazin (PMB-NHNH<sub>2</sub>), který umožňuje vznik heterocyklu kondenzací, azid (PMB-N<sub>3</sub>) a kapitolu uzavírá příklad reduktivní aminace aldehydu (PMB-CHO).

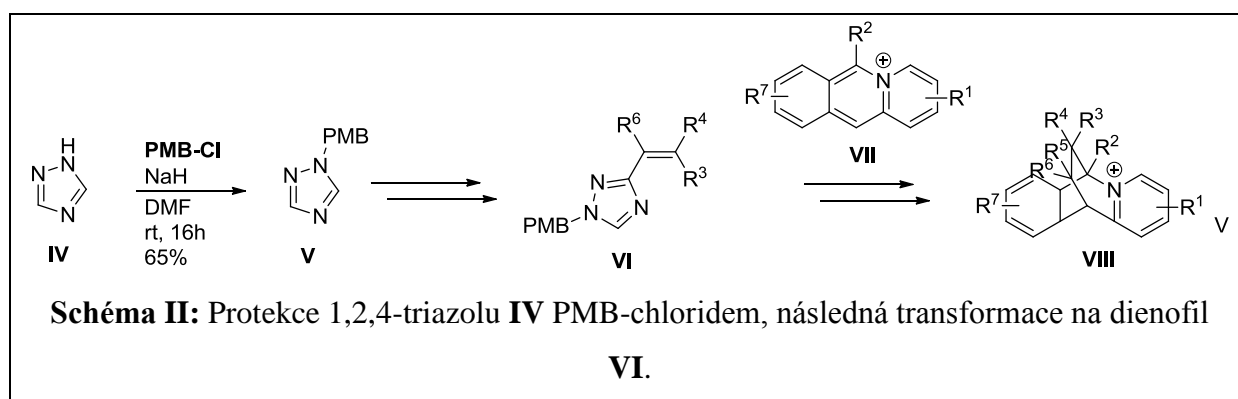
#### **3.2.1.1 PMB-chlorid**

4-Methoxybenzylová skupina se osvědčila jako protektivní skupina v syntéze di(1*H*-pyrazol-5-yl)methanonu **III** (Schéma I) lépe než za tímto účelem běžně užívané chránící skupiny (Me, Bn, Ph, SEM, Tos).<sup>20</sup> Umožnila totiž regiospecifickou reakci s lithiem do polohy 5 pyrazolu

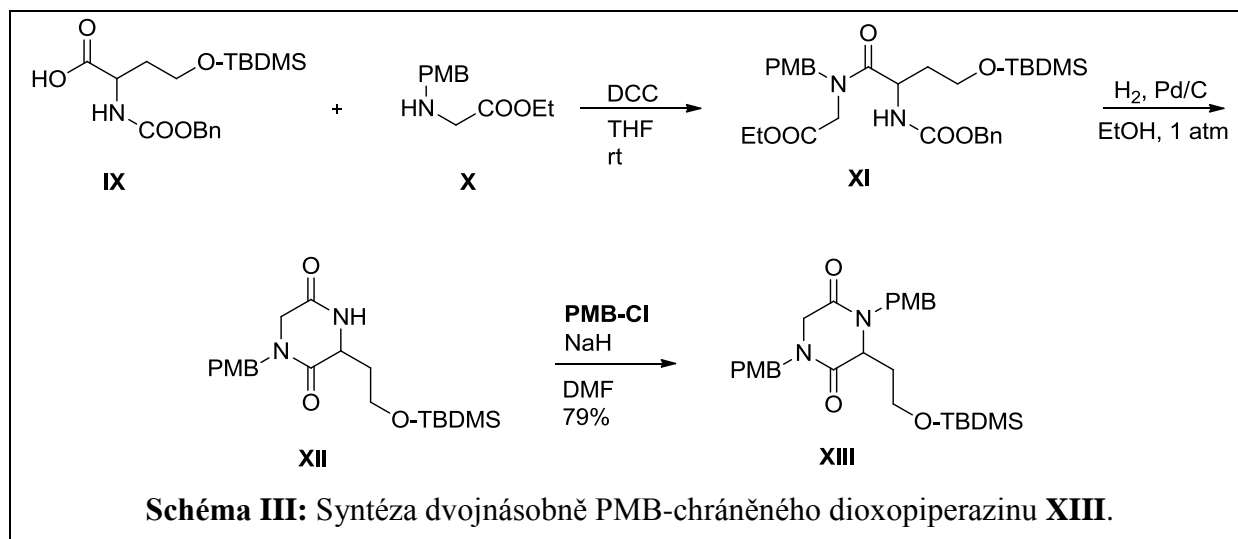
**II**, byla dostatečně reaktivní k vybraným elektrofilům (například urethanu) a zároveň její odstranění vyžadovalo relativně mírné podmínky. Do molekuly pyrazolu **I** byla zavedena reakcí s PMB-chloridu, v přítomnosti silné báze hydridu sodného.



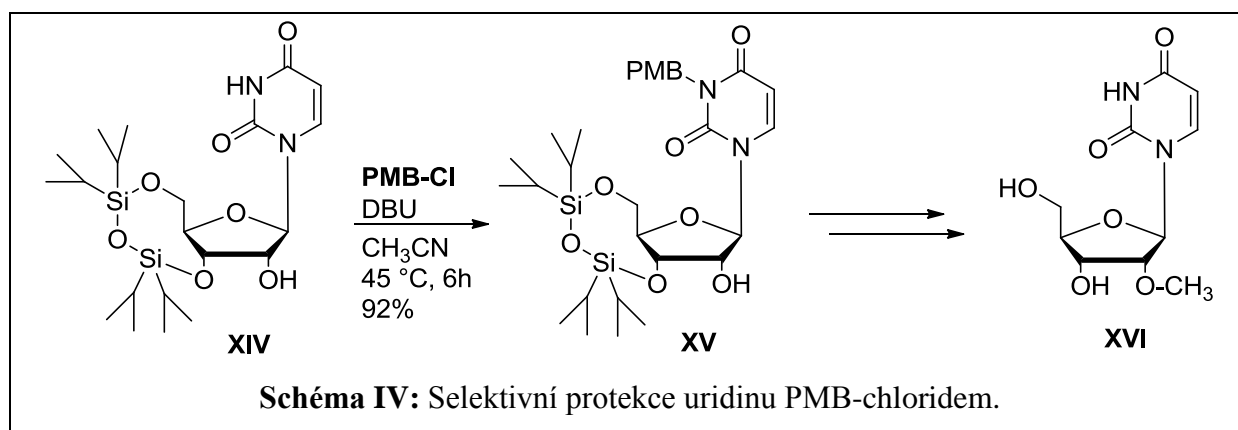
Tento způsob zavedení chránicí skupiny byl úspěšně aplikován i na 1,2,4-triazol **IV** (Schéma II).<sup>25</sup> I zde byl jako báze zvolen hydrid sodný. PMB-chráněný 1,2,4-triazol **V** pak byl použit v Diels-Alderově syntéze sloučenin typu **VIII** (substituent R<sup>5</sup>), kde ve formě **VI** představoval dienofil reagující s dienem **VII**. Vedle 1,2,4-triazolu autoři uvádějí i imidazol a indol, které rovněž chránili reakcí s PMB-chloridem.



Také v případě syntézy funkcionalizovaných bicyckých dioxopiperazinů (Schéma III) byl pro zavedení PMB chránicí skupiny do molekuly dioxopiperazinu **XII** použit výše uvedený protokol, tedy PMB-chlorid, hydrid sodný, za vzniku dvojnásobně PMB-chráněného heterocyklu **XIII**.<sup>26</sup> První PMB chránicí skupina však byla vnesena reakcí PMB-glycin ethyl esteru **X** s chráněnou 2-amino-4-hydroxybutanovou kyselinou **IX**.

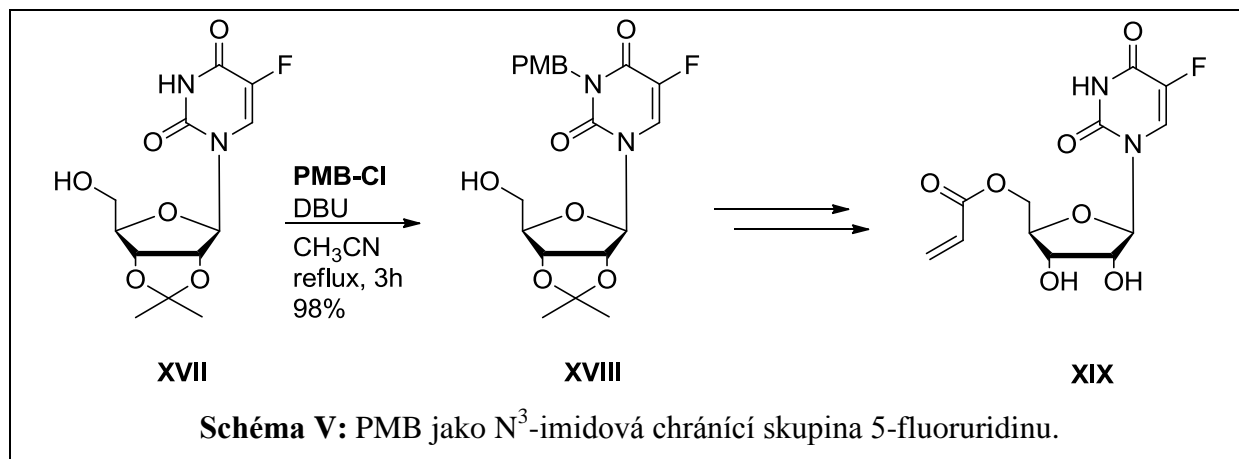


V syntéze 2'-*O*-methyluridinu **XVI** (Schéma IV) byla použita efektivní protekce N<sup>3</sup>-imidové skupiny uridinu pomocí PMB.<sup>27</sup> Tato chránící skupina se vážala selektivně na volný dusík uridinu, přičemž hydroxy skupina ribózy v poloze 2 zůstala netknutá, v následujícím kroku byla methylována methyl jodidem. V předběžném studiu této reakce byla zkoušena nejprve reakce uridinu **XIV** s PMB-bromidem v přítomnosti DIEA jako báze, ale produkt **XV** nevznikal. Když byl jako báze použit uhlíčan draselný, vznikala směs derivátu **XV** a PMB-derivátu na hydroxy skupině. Při použití DBU jako báze se podařilo dosáhnout selektivní alkylace na dusík (80%), při změně činidla z bromidu na PMB-Cl se zvýšil výtěžek **XV** (92%).

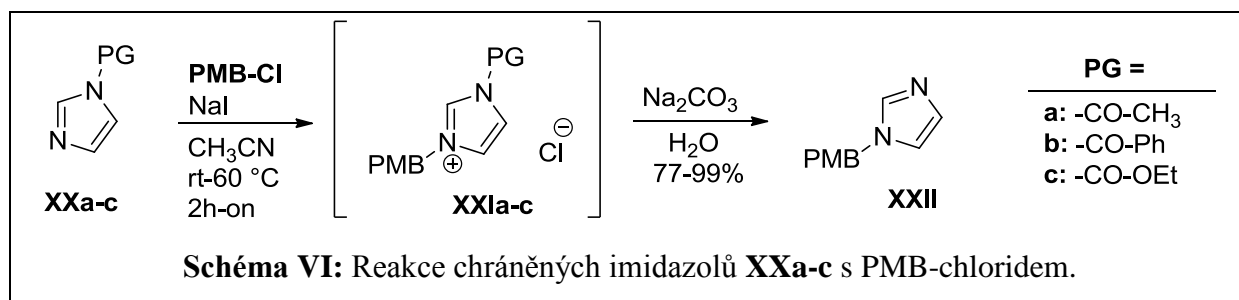


PMB protektivní skupina se v nukleotidové chemii osvědčila díky možnosti mírného odstranění.<sup>28</sup> *N*-glykosidová vazba je totiž kysle labilní a chránění hydroxy skupiny v poloze 5 pomocí akryloylu je zase bazicky labilní. Z těchto důvodů byla PMB v tomto případě vhodnější než chránící skupiny jako je benzoyl,<sup>29</sup> 2-(4-nitrofenyl)ethyl,<sup>30</sup> 2-(4-nitrofenylsulfonyl)ethyl,<sup>31</sup> fenyl<sup>32</sup> a 2-(methoxy)ethoxymethyl.<sup>33</sup> Další významnou výhodou

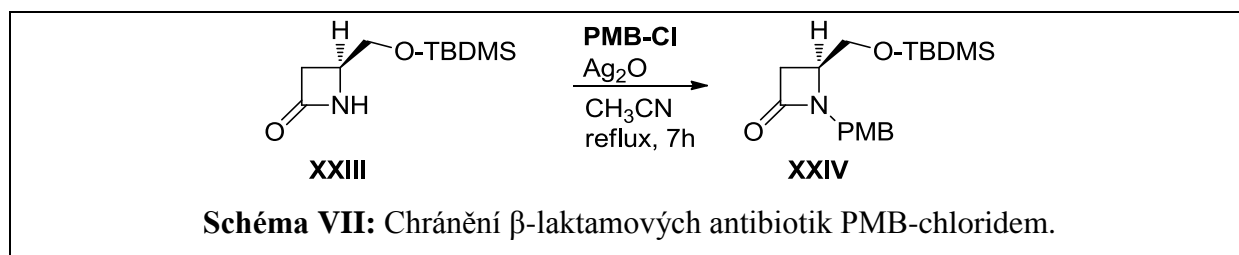
PMB je možnost selektivního zavedení v přítomnosti volné hydroxy skupiny s použitím báze DBU. V syntéze 5'-*O*-akryloyl-5-fluoruridinu **XIX** (Schéma V) tedy bylo chránění N<sup>3</sup>-imidového dusíku dosaženo reakcí s PMB-chloridem v přítomnosti DBU, autoři však uvádí i možnost použití PMB-bromidu spolu s DIEA jako bázi.



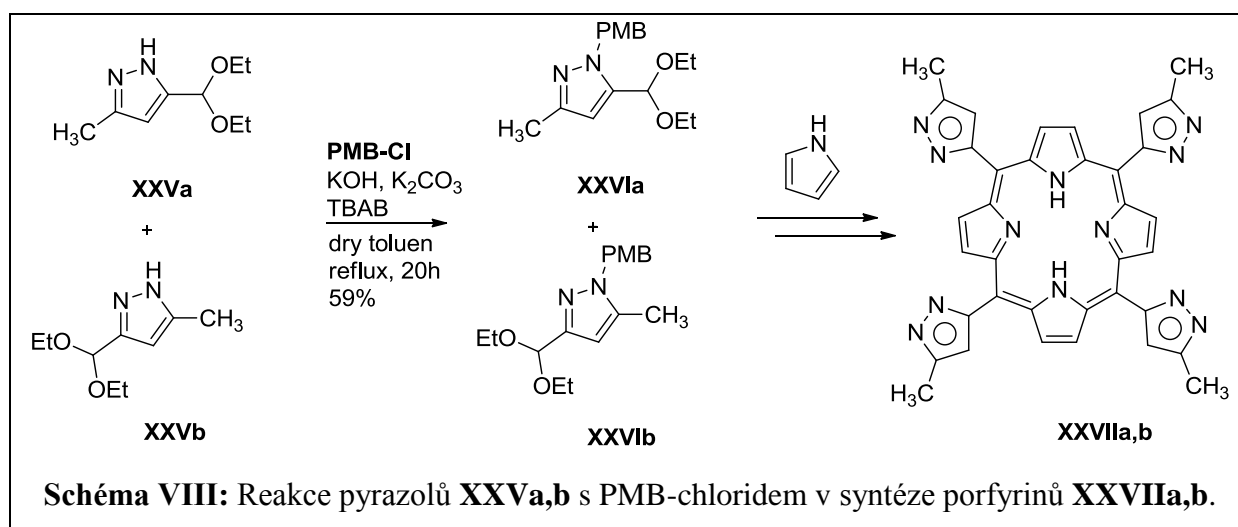
Protože reakce imidazolů s různými halogenidy vede nejen k alkylationi N<sup>1</sup> dusíku, ale také ke tvorbě 1,3-disubstituovaných imidazolium solí, byla pro regioselektivní syntézu 1-substituovaných imidazolů zvolena následující metodika (Schéma VI).<sup>19</sup> Imidazol byl nejprve regioselektivně *N*-acylován (protektivní skupiny: 1-acetyl (**XXa**), 1-benzoyl (**XXb**), 1-ethoxykarbonyl (**XXc**)), kvarternizován (**XXIa-c**) a deacylován (**XXII**).



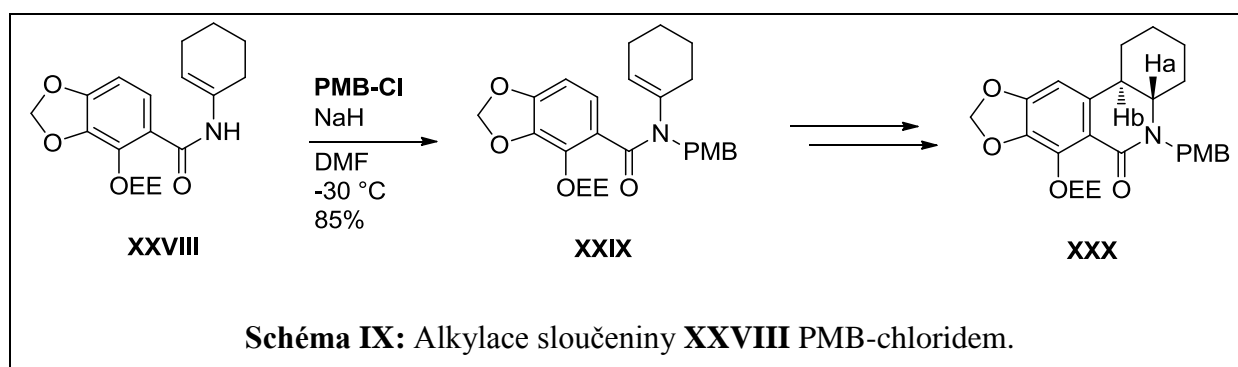
V syntéze  $\beta$ -laktamových antibiotik byla PMB skupina použita pro chránění heterocyklického dusíku, projektivní skupina byla zavedena reakcí **XXIII** s PMB-chloridem a oxidem stříbrným v acetonitrilu (Schéma VII).<sup>34</sup>



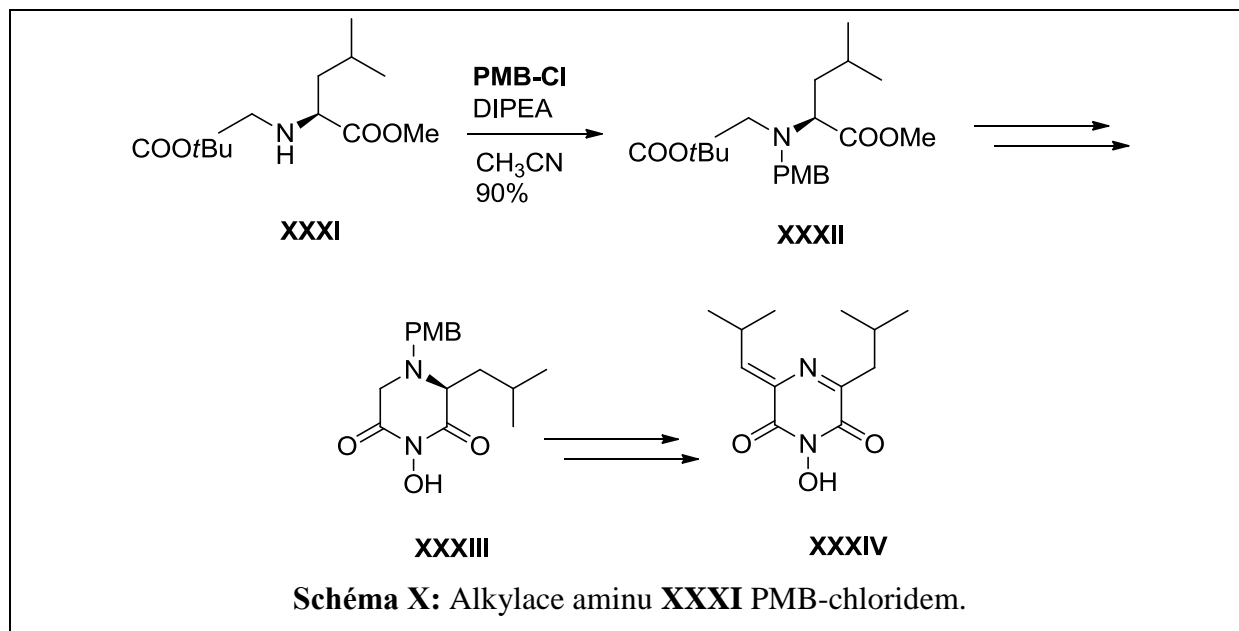
V syntéze prvních známých pyrazoloporfyrinů (**XXVIIa,b**; Schéma VIII)<sup>35</sup> s volnými NH skupinami pyrazolu byla chránící skupina PMB navázána příslušným chloridem, v přítomnosti bázi hydroxidu a uhličitanu draselného a kvarterní amoniové soli tetrabutylammonium bromidu (TBAB) hrajícího roli katalyzátoru. Cílové pyrazoly obsahující čtyři NH-pyrazoly představují kombinaci vlastností protonového transferu obou přítomných sloučenin – porfyrinů, které zabezpečují intramolekulární protonový transfer, a *N*-nesubstituovaných pyrazolů, které umožňují intramolekulární protonový transfer. Za účelem získání takovýchto sloučenin byla vybrána protektivní skupina PMB, která vydržela podmínky syntézy porfyrinu, zůstala navázána na pyrazolu, a poté byla ochráněna. Bez chránící skupiny by pyrazol-aldehydy polymerizovaly.



Při syntetických studiích Pankratistatinu<sup>36</sup> byla sloučenina **XXVIII** (Schéma IX) alkylována PMB-chloridem v přítomnosti báze NaH, hydroxy skupina byla chráněna ethoxyethylem (EE). Následujícím sledem reakcí byl uzavřen přikondenzovaný piperidinový cyklus (**XXX**).

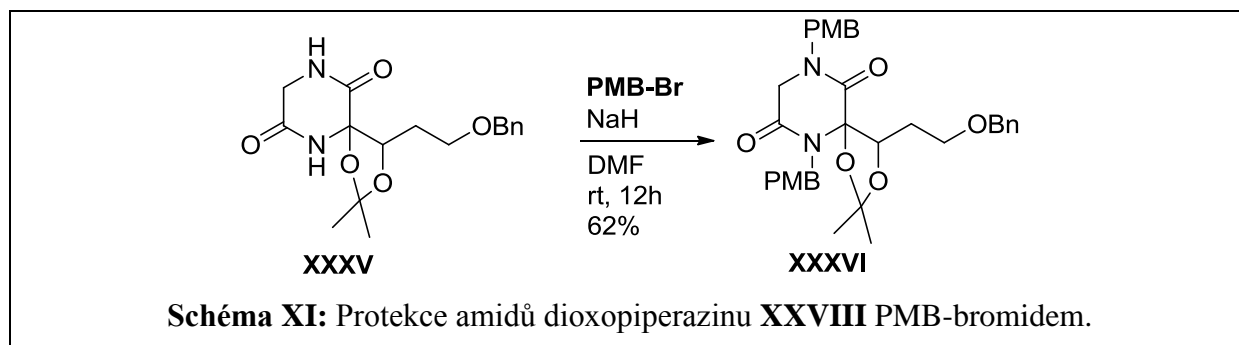


V totální syntéze Flutimidu (**XXXIV**, Schéma X), nového inhibitoru viru chřipky,<sup>37</sup> byl dusík sloučeniny **XXXI** alkylován působením PMB-chloridu s bází diisopropylethylaminem. Následovalo uzavření piperazinového cyklu (**XXXIII**) a dalším sledem reakcí byl získán Flutimid (**XXXIV**).

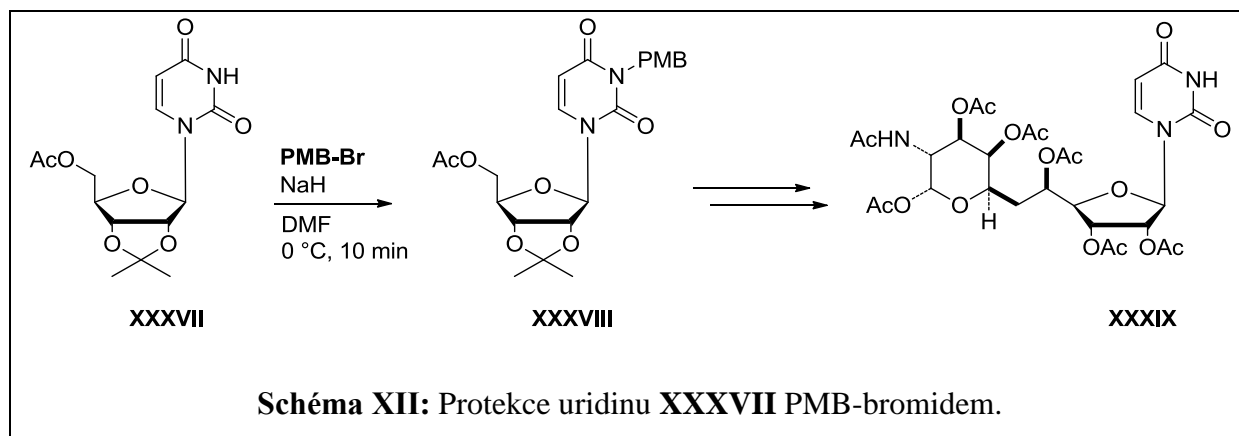


### 3.2.1.2 PMB-bromid

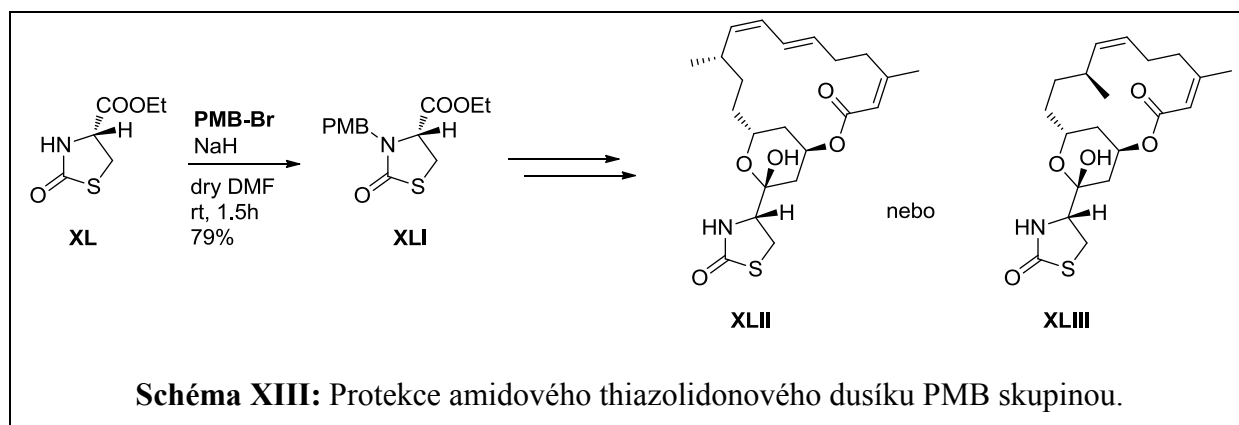
Příprava klíčového intermediátu pro syntézu bicyklomycinu zahrnovala ochranu dioxopiperazinu na dusících (Schéma XI). Podobně jak bylo popsáno v předchozí kapitole o PMB-chloridu, i bromid vyžaduje přítomnost silné báze, zde autoři zvolili hydrid sodný.<sup>38</sup>



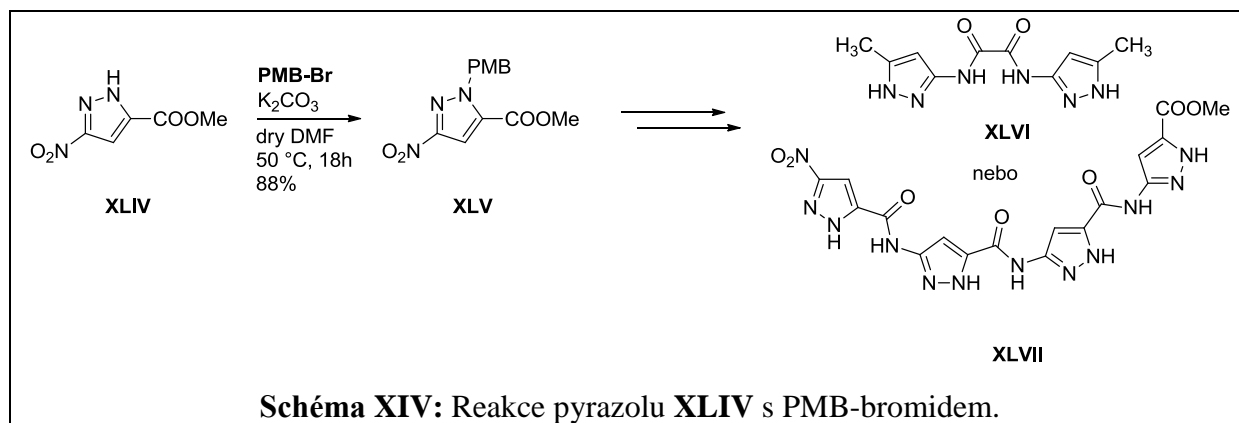
Pro protekci imidového dusíku uracilu u sloučeniny **XXXVII** (Schéma XII) při syntéze různě chráněných podjednotek Tunicamycinu byl vybrán klasický protokol: PMB-bromid a hydrid sodný jako báze.<sup>39</sup>



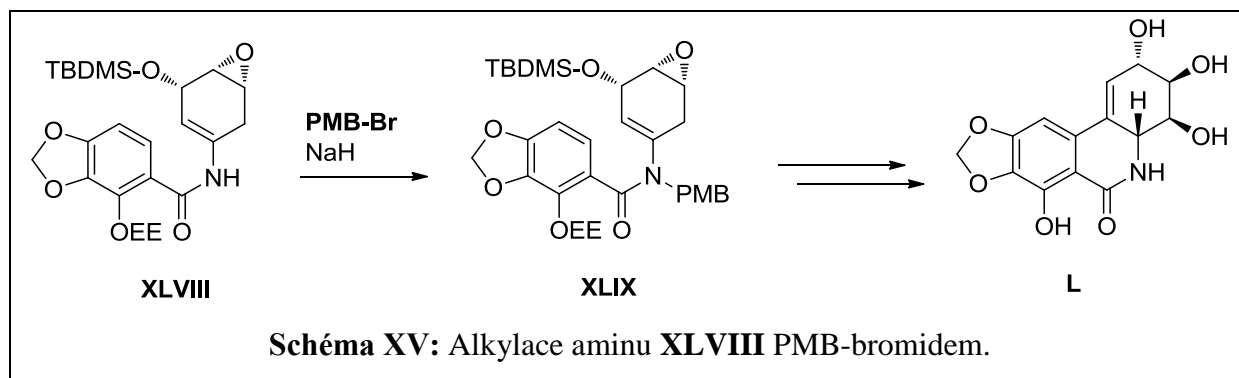
Klíčovou stavební jednotkou v syntéze Latrunculinu A (**XLII**) a B (**XLIII**) je keton **XL** (Schéma XIII), u nějž byl thiazolidinový dusík ochráněn PMB působením PMB-Br v přítomnosti NaH.<sup>40</sup>



Za účelem zvýšení vazebných sil mezi  $\beta$ -skládaným listem a peptidovým substrátem byla připravena druhá a třetí generace receptorových molekul.<sup>41</sup> Jednalo se o dva aminopyrazoly kovalentně spojené dikarboxylovým raménkem (např. **XLVI**, Schéma XII) a nové aminopyrazolové nepřírodní aminokyseliny (např. **XLVII**). Dimery a oligomery byly připraveny ze stejné výchozí látky – *N*-chráněného pyrazolu **XLV**, na který byla PMB chránicí skupina zavedena v přítomnosti báze uhličitanu draselného.

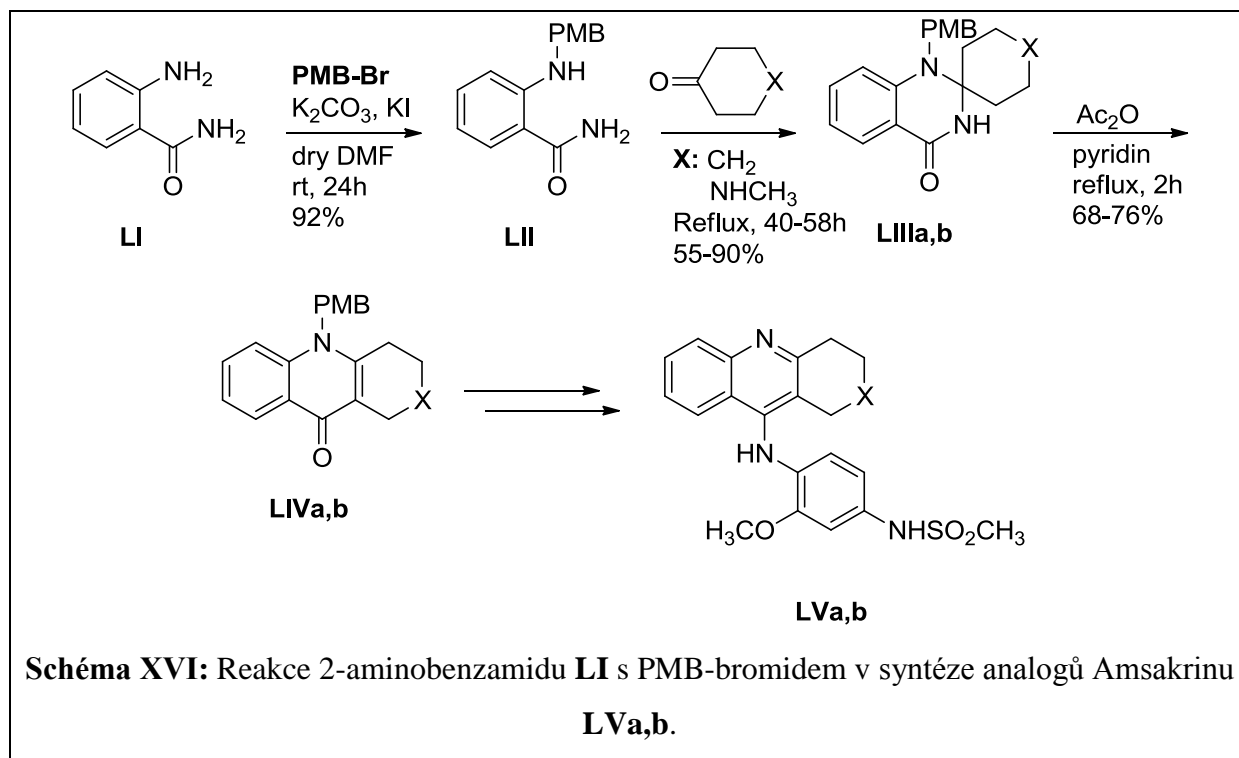


V totální syntéze Narciklasinu (**L**, Schéma XV) ochránili Rigby *et al.*<sup>42</sup> klíčový intermediát **XLVIII** alkylační reakcí s PMB-bromidem v přítomnosti báze hydridu sodného.



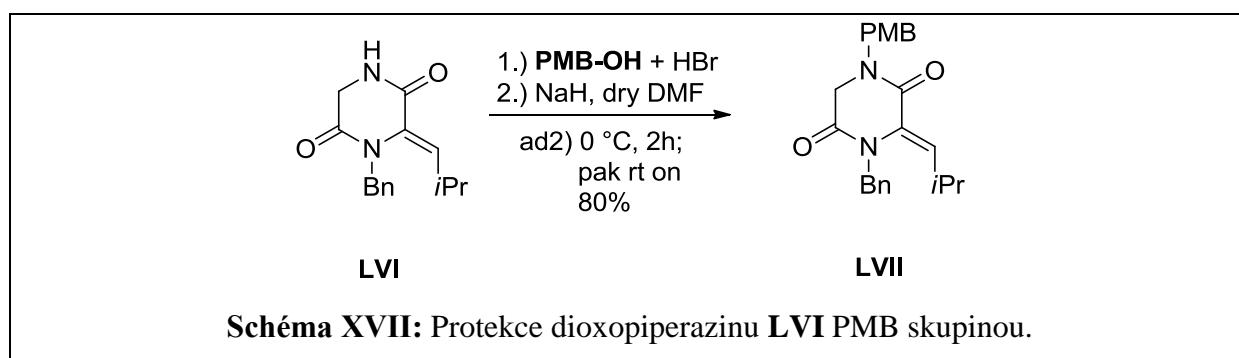
Při syntéze tetrahydroderivátu (**LVa**, Schéma XVI) a jeho aza analogu (**LVb**) odvozených od Amsakrinu, u něž byla zjištěna protinádorová aktivita, byl klíčovým syntetickým intermediátem hexahydroakridinon **LIVa**. Byl připraven ze spirosloučeniny **LIIIa**. PMB-ochránící skupina byla na heterocyklický dusík zavedena ve stádiu 2-aminobenzamidu (**LI**), který reagoval s PMB-bromidem.<sup>43</sup>



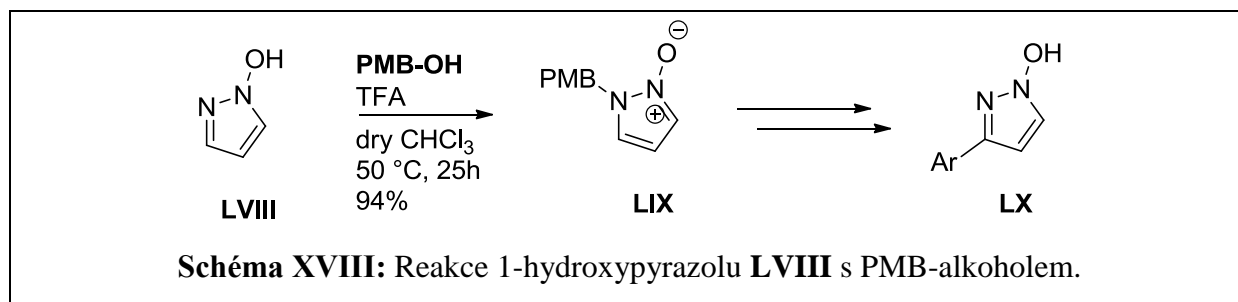


### 3.2.1.3 PMB-alkohol

Pro benzoylaci 2,5-dioxopiperazindionu (**LVI**, Schéma XVII) byl PMB-alkohol kvantitativně převeden působením koncentrované bromovodíkové kyseliny na nestabilní PMB-bromid. Ten už reagoval se sloučeninou **LVI** za standardních podmínek v přítomnosti báze hydridu sodného.<sup>44</sup>

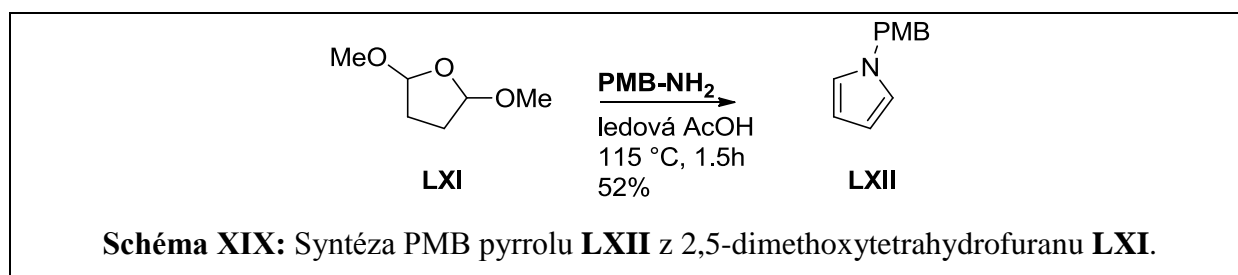


V syntéze 3-arylovaných 1-hydroxypyrazolů (**LX**, Schéma XVIII) použili Eskildsen *et al.*<sup>45</sup> selektivní *N*-alkylace 1-hydroxypyrazolu (**LVIII**) 4-methoxybenzyl alkoholem (PMB-OH) v kyselém prostředí a vyhnuli se tak práci s karcinogenním<sup>46</sup> a nestabilním PMB-Br.

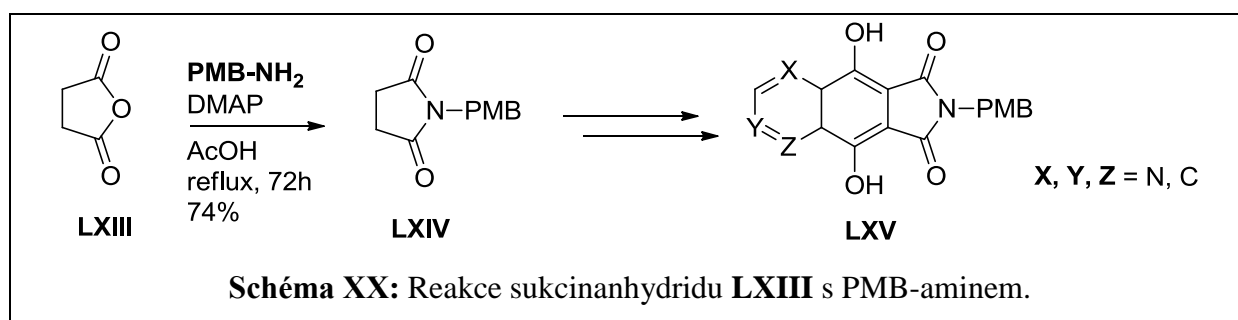


### 3.2.1.4 PMB-amin

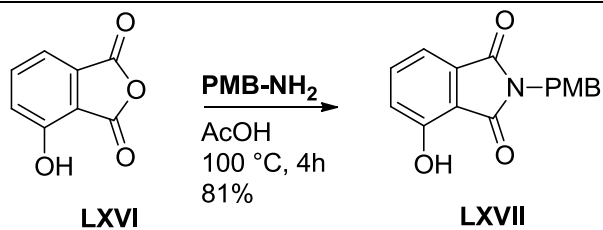
Při studiu Friedel-Crafts acylačních reakcí pyrrolů připravili Taylor<sup>47</sup> *et al.* PMB-chráněný pyrrol (**LXII**, Schéma XIX) z 2,5-dimethoxytetrahydrofuranu (**L**) Clausen-Kaasovou variantou Paal-Knorrovy pyrrolové syntézy.<sup>48</sup>



V syntéze bicyckých ftalimidových analogů (**LXV**, Schéma XX) reagoval sukcinahydrid (**LXIII**) s různými aminy, například PMB-NH<sub>2</sub> (ale také se 2-methoxybenzyl aminem), v kyselině octové hrající roli rozpouštědla a s katalytickým množstvím DMAP.<sup>49</sup>

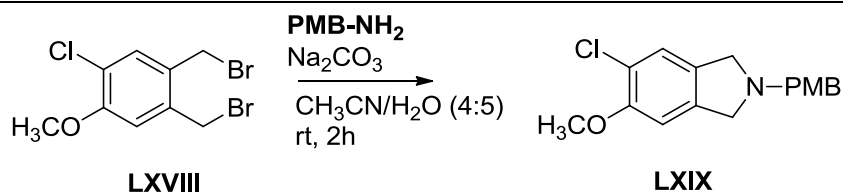


V syntéze *N*-benzoylizoindolinových derivátů jako analgetik reagoval 3-hydroxyftalanhydrid (**LXVI**, Schéma XXI) s PMB-NH<sub>2</sub> v kyselině octové za vzniku PMB-chráněného derivátu (**LXVII**).<sup>50,51</sup>



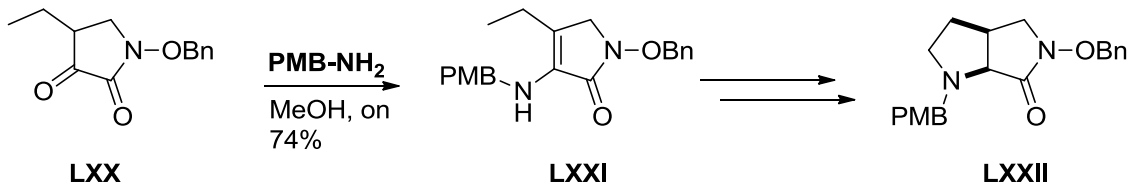
**Schéma XXI:** Reakce 3-hydroxyftalanhydridu **LXVI** s PMB-aminem.

Stejní autoři použili jako výchozí materiál také brom-derivát **LXVIII** (Schéma XXII).



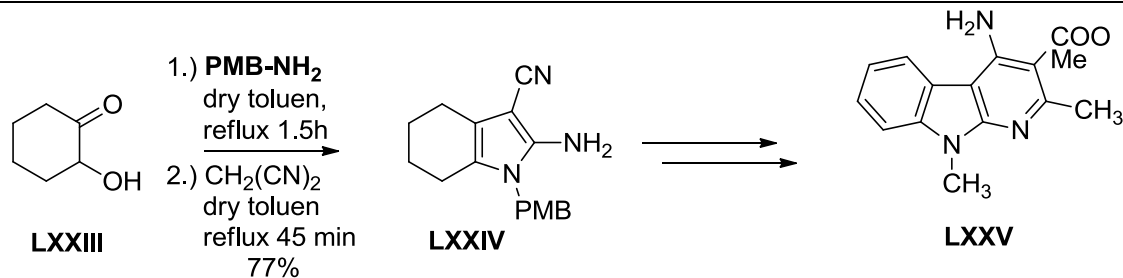
**Schéma XXII:** Reakce dibromderivátu **LXVIII** s PMB-aminem.

Rowley *et al.*<sup>52</sup> převedli 1-(benzyloxy)-4-ethylpyrrolidin-2,3-dion (**LXX**, Schéma XXIII) na PMB-derivát (**LXXI**) reakcí s PMB-aminem v methanolu. Derivát **LXXI** existoval výhradně ve formě enamin tautomeru. Syntéza dále pokračovala výstavbou bicyklu **LXXII**.



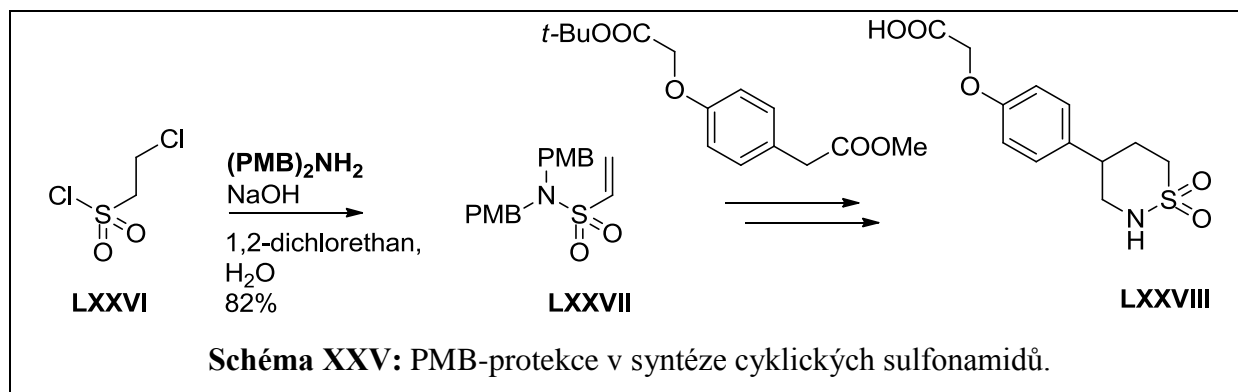
**Schéma XXIII:** Reakce 1-(benzyloxy)-4-ethylpyrrolidin-2,3-dionu **LXXI** s PMB-aminem.

Forbes *et al.*<sup>53</sup> použili v syntéze pyrido[2,3-*b*]indolů PMB jako chránící skupinu pro indolový dusík. Sloučeninu **LXXIV** (Schéma XXIV) vystavěli s použitím metodologie podle Rotha.<sup>54</sup>



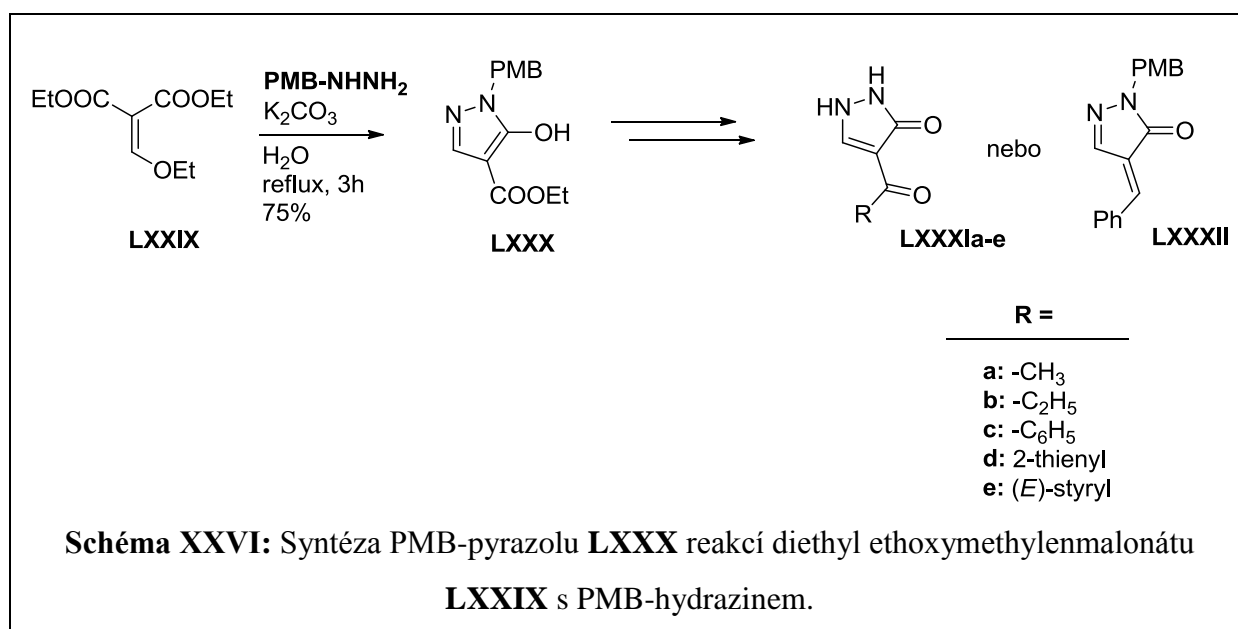
**Schéma XXIV:** Reakce 2-hydroxycyklohexanonu **LXXIII** s PMB-aminem, následná reakce s malononitrilem.

Vinyl sulfonamid (**LXXVII**, Schéma XXV) připravili autoři reakcí bis(4-methoxybenzyl)aminu s chlorethansulfonyl chloridem (**LXXVI**). Heterocyklus uzavírali až po odštěpení chránicí skupiny PMB.<sup>55</sup>

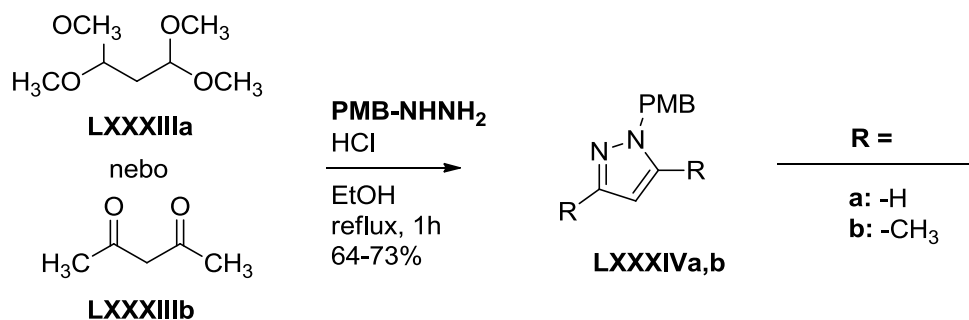


### 3.2.1.5 PMB-hydrazin

Eller *et al.*<sup>56</sup> představili PMB jako univerzální chránicí skupinu v syntéze *N*-nesubstituovaných pyrazolonů (**LXXXIa-e**, Schéma XXVI). Heterocyklus vystavěli z diethyl ethoxymethylenmalonátu (**LXXIX**) a PMB-hydrazinu, který získali reakcí hydrazinu s PMB-chloridem.



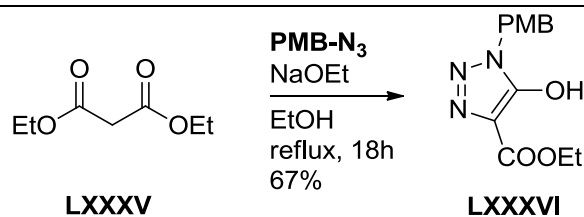
V syntéze porfyrinů<sup>35</sup> byly klíčové PMB-chráněné pyrazoly (**LXXXIVa,b**, Schéma XXVII) připraveny také reakcí β-dikarbonylové sloučeniny (**LXXXIIIb**), resp. tetramethoxypropanu (**LXXXIIIa**) s PMB-hydrazinem.



**Schéma XXVII:** Reakce tetramethoxypropanu **LXXXIIIa** nebo pentan-2,4-dionu **LXXXIIIb** s PMB-hydrazinem.

### 3.2.1.6 PMB-azid

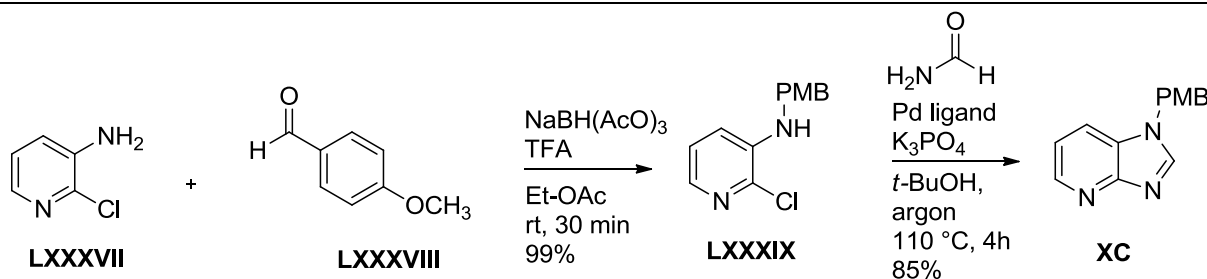
V syntéze různých *N*-nesubstituovaných *v*-triazolů prezentovali Buckle *et al.*<sup>18</sup> PMB jako univerzální protektivní skupinu těchto heterocyklů. PMB-chráněný triazol (**LXXXVI**, Schéma XXVIII) připravili kondenzací diethyl-malonátu (**LXXXV**) s PMB-azidem, který získali reakcí PMB-chloridu s azidem sodným.



**Schéma XXVIII:** Kondenzace diethyl-malonátu **LXXXV** s PMB-azidem.

### 3.2.1.7 PMB-aldehyd

Imidazo[4,5-*b*]pyridin (**XC**, Schéma XXIX) připravili Rosenberg *et al.*<sup>57</sup> Pd-katalyzovanou reakcí formamidu s PMB-chráněným derivátem **LXXXIX**, na nějž byla chránicí skupina PMB navázána reduktivní aminací PMB-aldehydu s 2-chlorpyridin-3-aminem (**LXXXVII**).



**Schéma XXIX:** Reduktivní aminace PMB-aldehydu **LXXXVIII** s aminem **LXXXVII**, následná dostavba přikondenzovného heterocyklu **XC**.

### 3.2.2 PMB – možnosti štěpení

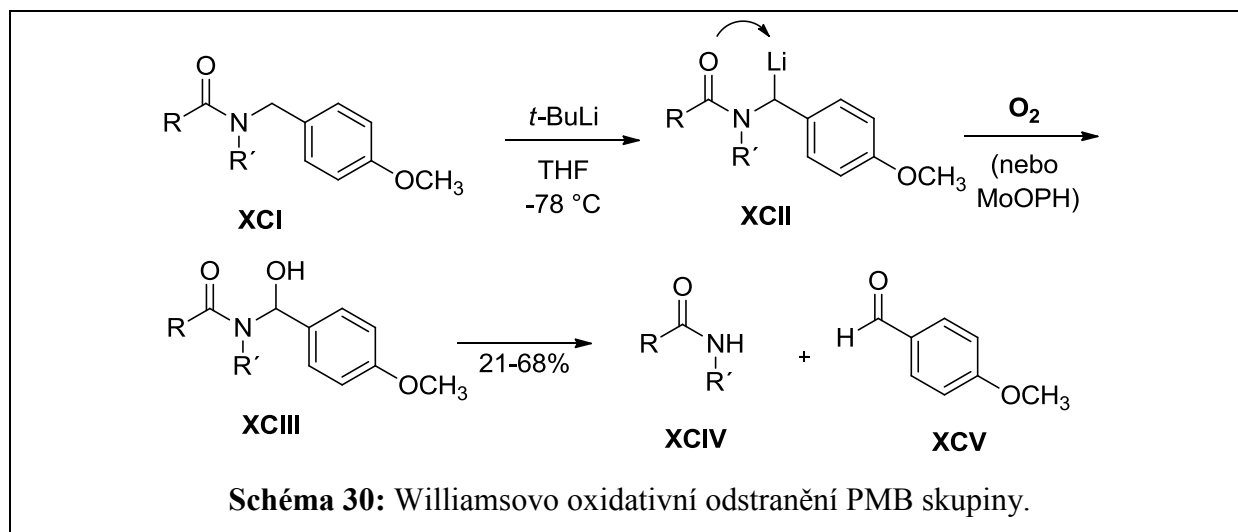
Metody štěpení PMB z heterocyklu je možné rozdělit do tří velkých skupin – metody oxidativní, reduktivní a kyselá solvolýza. Vhodná volba deproteckce je úzce spjata se samotným substrátem, jak bude ilustrováno následujícími příklady.

#### 3.2.2.1 Oxidativní metody

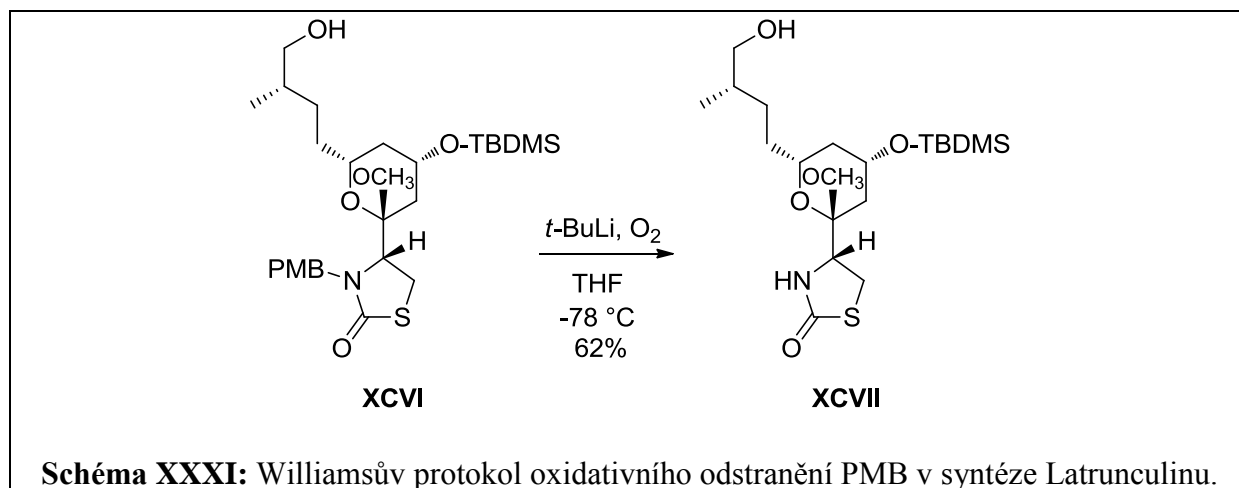
Patří sem oxidační činidla jako kyslík, který je nedílnou součástí Williamsova protokolu odbourání PMB, peroxidisíran draselný, hexanitratocéričitán amonný (CAN) a 2,3-dichlor-5,6-dikyanobenzochinon (DDQ).

##### 3.2.2.1.1 Williamsův protokol

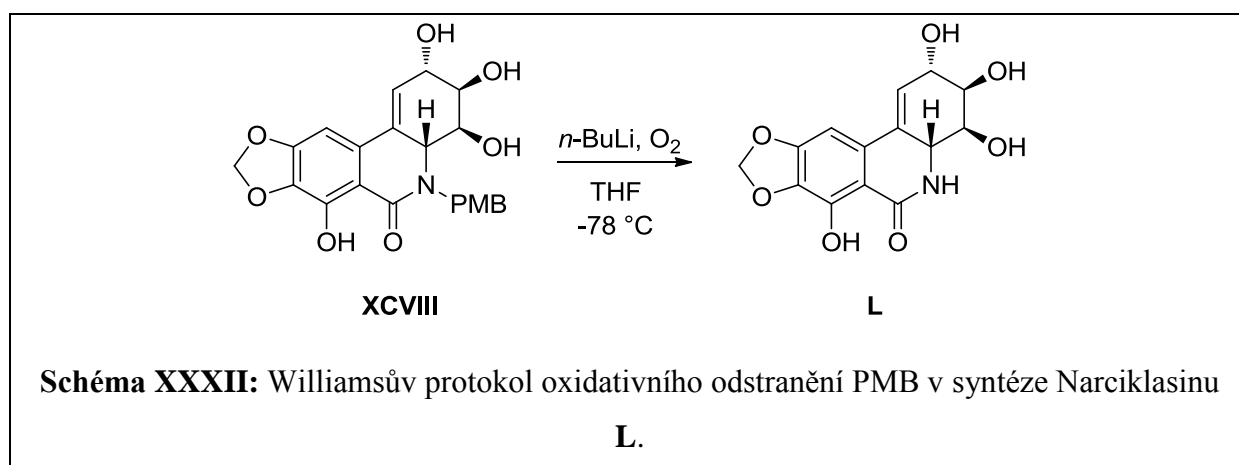
Protože se Williams *et al.*<sup>58</sup> nedařila deproteckce PMB-amidů dosud popsány reduktivními, oxidativními nebo solvolytickými metodami, navrhli novou metodu odstranění PMB chránící skupiny. Mechanismus této metody je naznačen na obecném vzorci sloučeniny **XCI** (autoři uvádějí jednoduché struktury, kde R = Ph, R' = CH<sub>3</sub>, ale také složitější, kdy R, R' tvoří bohatě substituovaný dioxopiperazin, Schéma XXX).



Williamsův protokol použili Smith *et al.*<sup>40,59</sup> v totální syntéze Latrunculinu (Schéma XXXI).

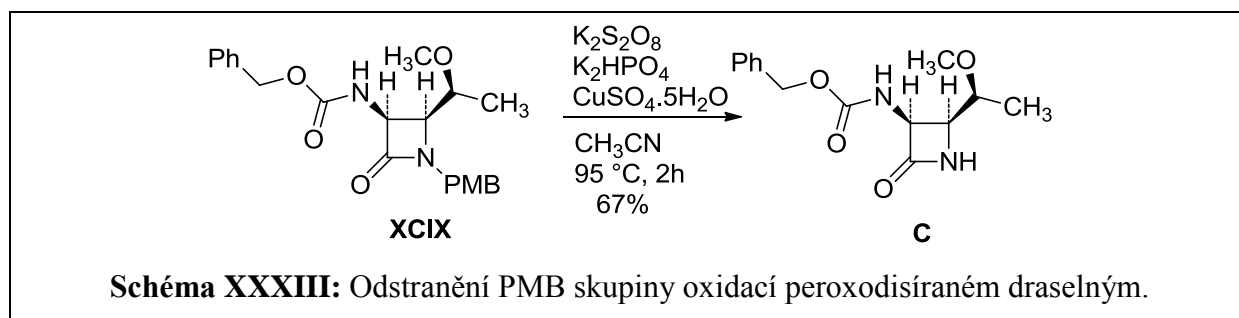


Když v totální syntéze Narciklasinu (**L**, Schéma XXXII) jiné oxidativní metody selhaly, uspěli autoři reakcí s *n*-BuLi a následnou oxidací kyslíkem.<sup>42</sup>



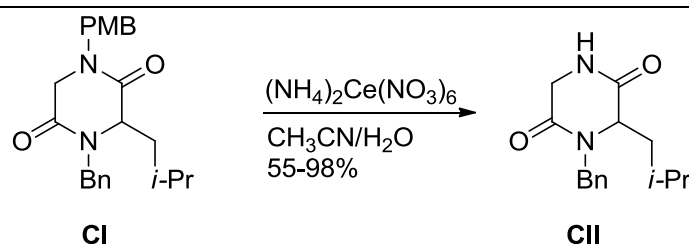
### 3.2.2.1.2 Oxidace peroxodisíranem draselným

PMB protektivní skupina byla z derivátu azetidinu (**XCIX**, Schéma XXXIII) odstraněna působením peroxodisíranu draselného.<sup>34</sup>



### 3.2.2.1.3 Hexanitratocéričitan amonný (CAN)

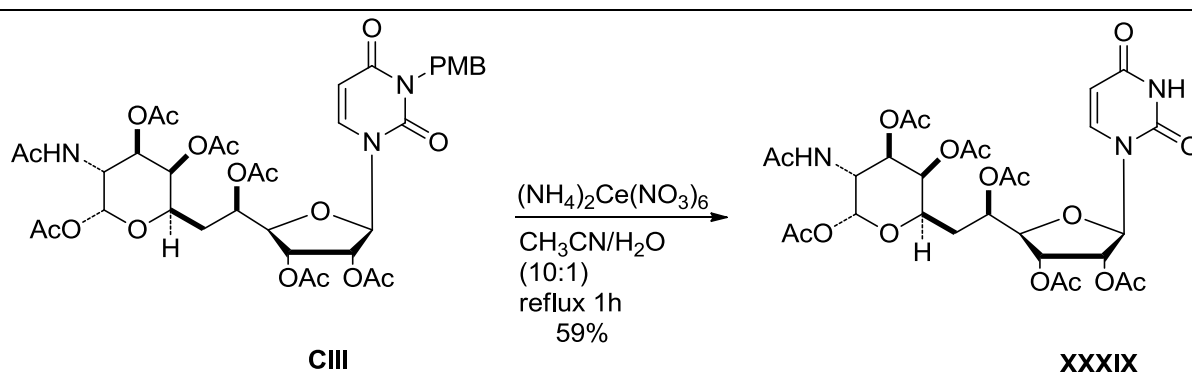
Při studiu možností oxidativního odstranění PMB skupiny z piperazin-2,5-dionů vyzkoušeli Yoshimura *et al.*<sup>60</sup> a Yamaura *et al.*<sup>44</sup> použití 2,3-dichlor-5,6-dikyanobenzochinonu (DDQ) za různých podmínek. Požadovaný produkt **CII** (Schéma XXXIV) získali však až reakcí s oxidem chromitým v prostředí kyseliny octové. Výtěžek činil 41%. Při použití CAN rovněž došlo k odštěpení PMB ze sloučeniny **CI**. Autoři optimalizovali koncentraci CAN a podařilo se jim tak zvýšit výtěžek **CII** až na 98%. Při štěpení PMB z dalších substrátů ověřili, že se jedná o selektivní činidlo (benzyl a vinyl zůstaly reakcí s CAN nedotčeny).



**Schéma XXXIV:** Selektivní deprotektace PMB působením CAN na dioxopiperazin **CI**.

Stejní autoři použili CAN pro odštěpení PMB ze substituovaného piperazin-2,5-dionu také v chirální syntéze Bicyklomycinu.<sup>61</sup>

Deprotektaci imidového dusíku uracilu u sloučeniny **CIII** (Schéma XXXV) provedli Danishefsky *et al.*<sup>39</sup> působením CAN ve vodném acetonitrilu.

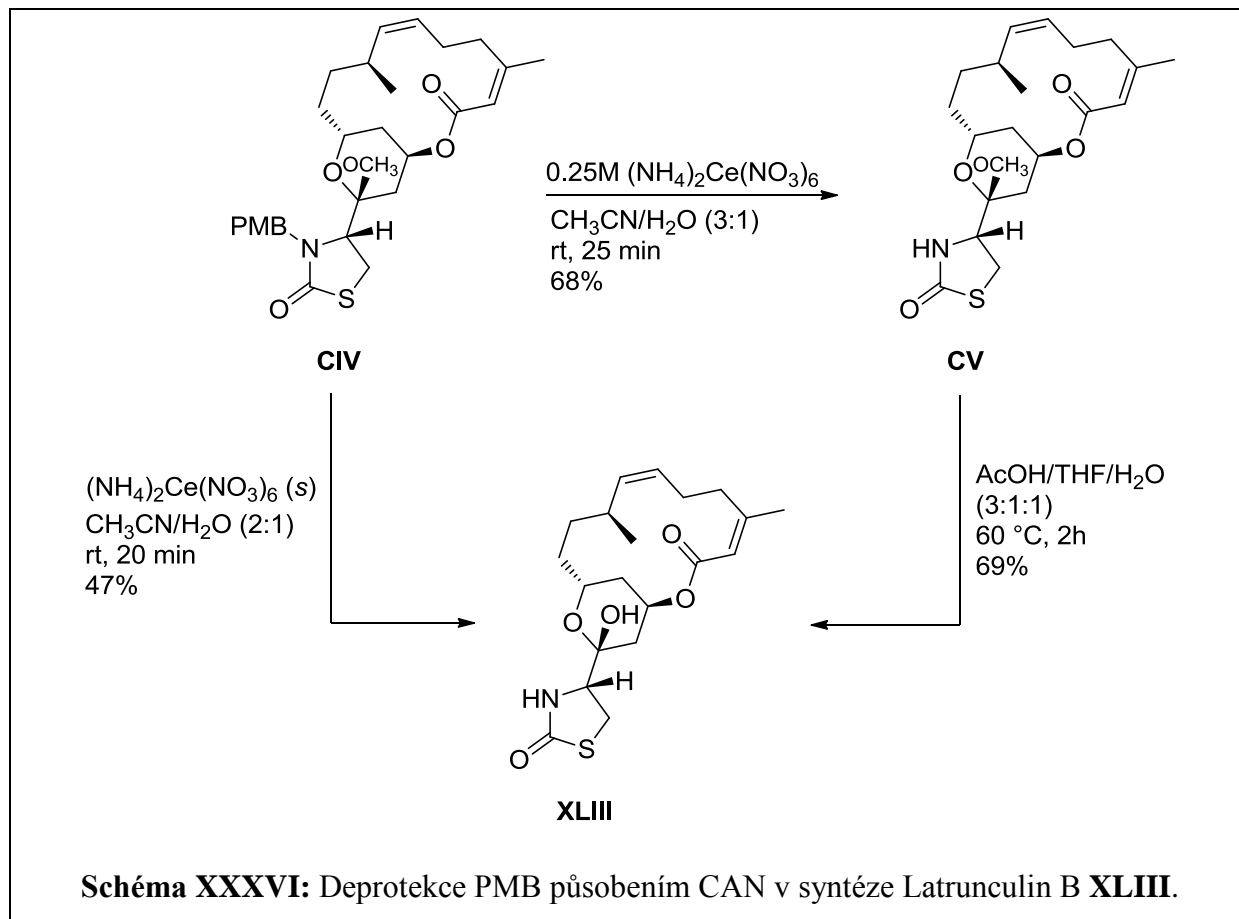


**Schéma XXXV:** Selektivní deprotektace PMB působením CAN v syntéze Tunikamycinu.

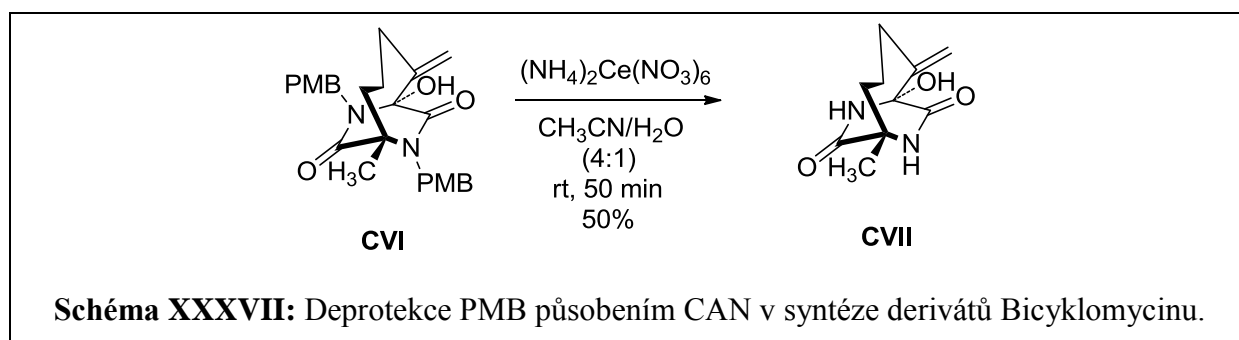
Když Smith *et al.*<sup>40</sup> syntetizovali Latrunculin B (**XLIII**, Schéma XXXVI), používali nejdříve k chránění amidového dusíku benzyl a 3,4-dimethoxybenzyl (3,4-Dmb), ale deprotektace byla obtížná. Oproti tomu skupina PMB byla snadno odštěpitelná působením CAN. Při použití



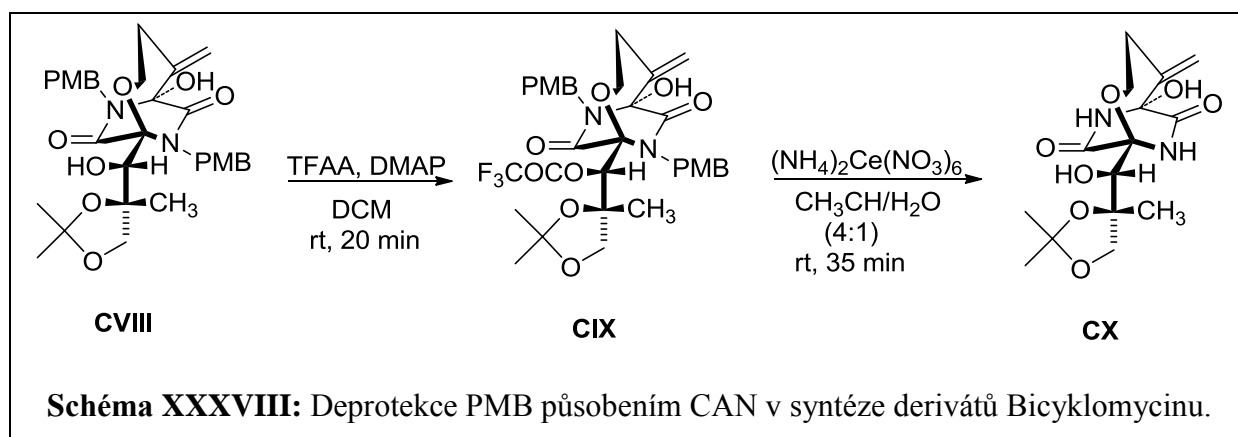
zředěného roztoku CAN bylo třeba provést ještě acetalovou hydrolyzu (**CV**). Když však do roztoku sloučeniny **CIV** ve směsi rozpouštědel acetonitril/voda přidali pevný CAN, běžela deprotektace přímo na produkt **XLIII**.



Zajímavé bylo štěpení PMB z bicyckých sloučenin typu **CVI** (Schéma XXXVII). Williams *et al.*<sup>62</sup> při syntéze derivátů Bicyklomycinu připravili různé bicycké sloučeniny chráněné na amidových dusících skupinou PMB. V případě sloučeniny **CVI** bylo možné PMB oxidativně odštěpit působením CAN, ovšem když byl můstek o dva uhlíky kratší, docházelo k rozkladu.

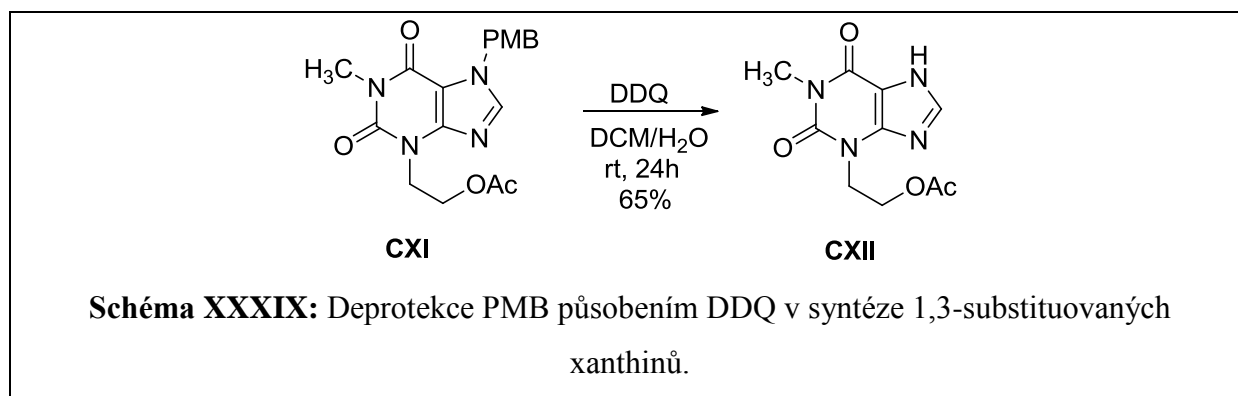


Pro čistý průběh odštěpení PMB u derivátu **CVIII** (Schéma XXXVIII) působením CAN museli Williams *et al.*<sup>63</sup> nejprve zabránit v reaktivitě sekundárnímu hydroxyly, čehož dosáhli reakcí s trifluoracetanhydridem.

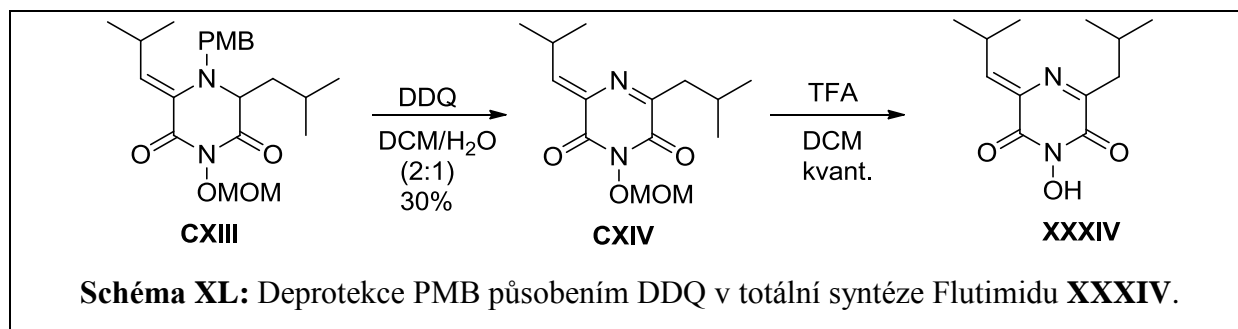


#### 3.2.2.1.4 2,3-Dichlor-5,6-dikyanobenzochinon (DDQ)

Od 7-PMB chráněného derivátu xanthinu (**CXI**, Schéma XXXIX) byla protektivní skupina odštěpena za oxidativních podmínek působením DDQ za vzniku 1,3-substituovaného xanthinu. 7-PMB xanthiny umožňují přípravu 9-substituovaných purinů, kde by PMB chránící skupina byla odštěpena po N<sup>9</sup>-alkylaci.<sup>64</sup>



Při syntéze Flutimidu (**XXXIV**) byly dusíky pyrazin-2,6(1*H*,3*H*)-dionu (**CXIII**, Schéma XL) chráněny PMB a methoxymetylerem (MOM). Deprotekci provedli Singh *et al.*<sup>37</sup> ve dvou krocích – nejprve odštěpili PMB působením oxidačního činidla DDQ, zároveň došlo k oxidaci vazby C=N. Následovala reakce s TFA, která odštěpila zbývající chránící skupinu.

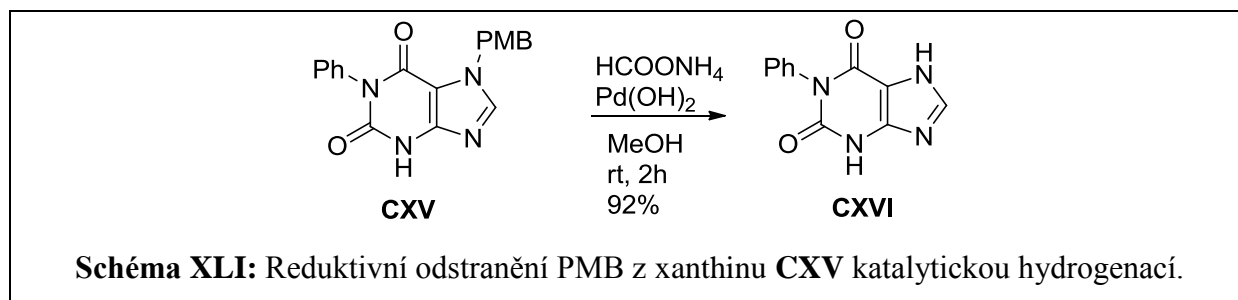


### 3.2.2.2 Reduktivní metody

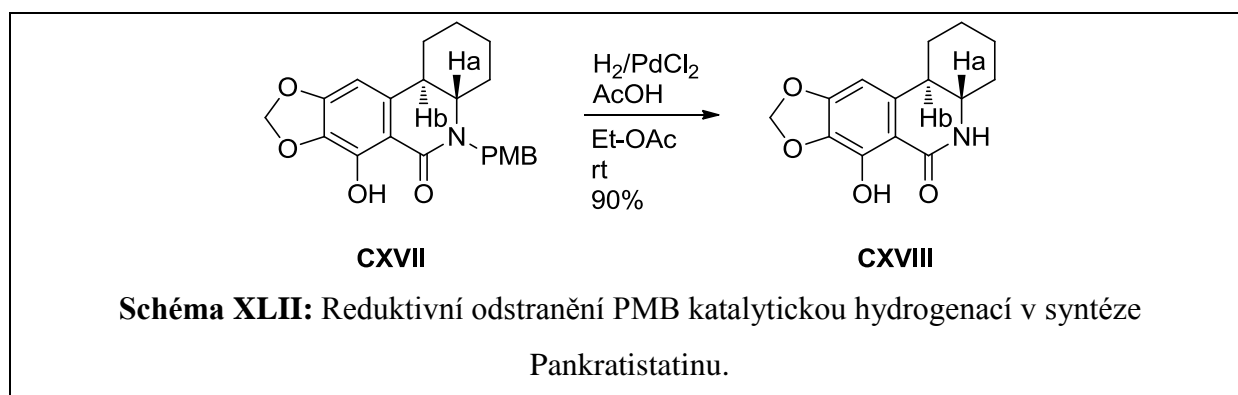
Patří sem především hydrogenolýza za přítomnosti katalyzátoru obsahujícího paladium, dále se jedná o redukci sodíkem v kapalném amoniaku.

#### 3.2.2.2.1 Katalytická hydrogenolýza

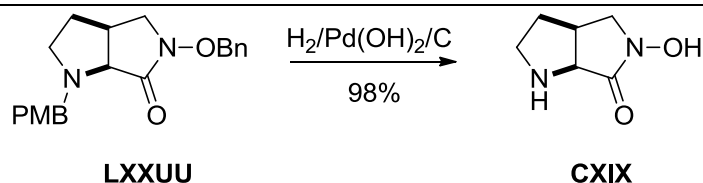
Zavialov *et al.*<sup>64</sup> odstraňovali chránící PMB skupinu z xanthinu nejen působením oxidačního činidla DDQ, ale i katalytickou hydrogenací (Schéma XLI).



Hydrogenolýza PMB-chráněné sloučeniny **CXVII** (Schéma XLII) poskytla fenantridon **CXVIII**.<sup>36</sup>

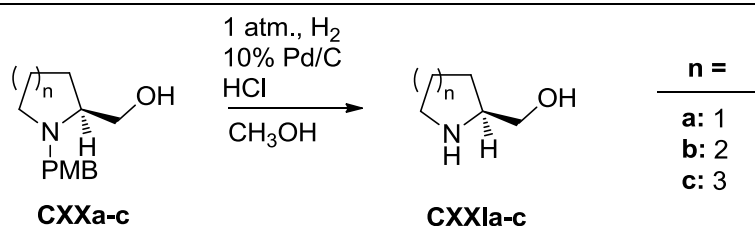


Deprotekci obou chránících skupin v molekule **LXXII** (Schéma XLIII) provedli Rowley *et al.*<sup>52</sup> v jednom syntetickém kroku - hydrogenolýzou na Pearlmanově katalyzátoru.



**Schéma XLIII:** Odstranění PMB hydrogenolýzou na Pearlmannově katalyzátoru.

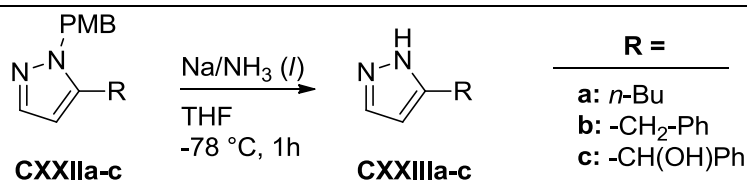
U šesti až sedmi členných heterocyklů obsahujících dusík (**CXXa-c**, Schéma XLIX) odstranili Trost *et al.*<sup>65</sup> PMB-chránící skupinu katalytickou hydrogenací.



**Schéma XLIV:** Odstranění PMB u derivátů **CXXa-c** katalytickou hydrogenací.

### 3.2.2.2 Redukce sodíkem v kapalném amoniaku

Subramanyam *et al.*<sup>20</sup> nabídli zajímavé srovnání štěpení PMB působením TFA a reduktivní odbourání sodíkem (Schéma XLV). V případě syntézy různých 5-substituovaných pyrazolů se tak ukázalo, jak moc záleží na konkrétním substrátu při volbě deprotektivního činidla.



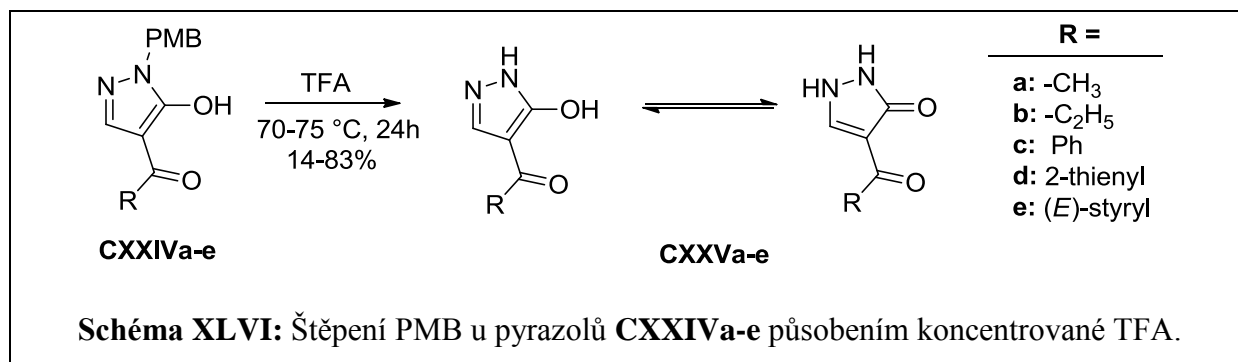
**Schéma XLV:** Odstranění PMB působením sodíku v kapalném amoniaku.

### 3.2.2.3 Kyselá solvolýza

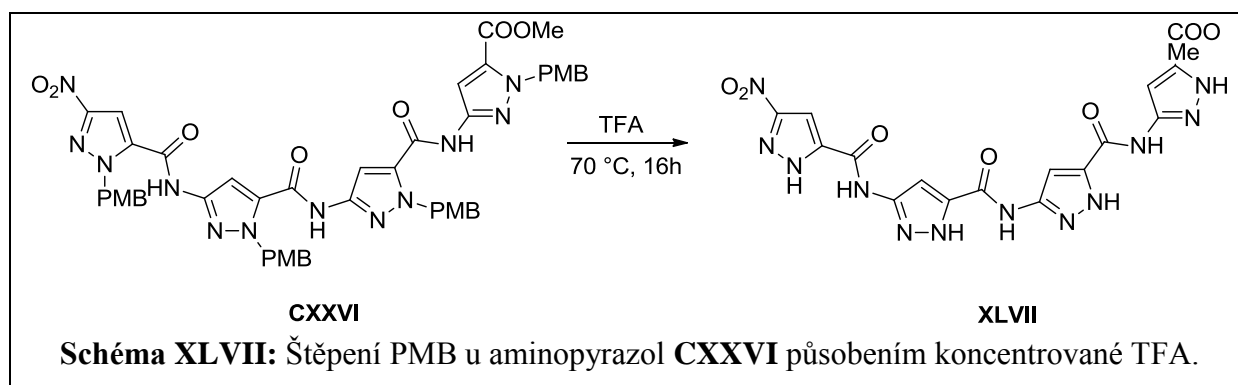
Pro odstranění PMB-protektivní skupiny z heterocyklů literatura uvádí jako velmi častou metodu působení kyseliny trifluoroctové. Méně časté je použití minerálních kyselin, například kyseliny chlorovodíkové. Do této kapitoly jsme zařadili také Lewisovskou kyselinu chlorid hlinitý v kombinaci s anisolem.

### 3.2.2.3.1 Štěpení působením trifluoroctové kyseliny (TFA)

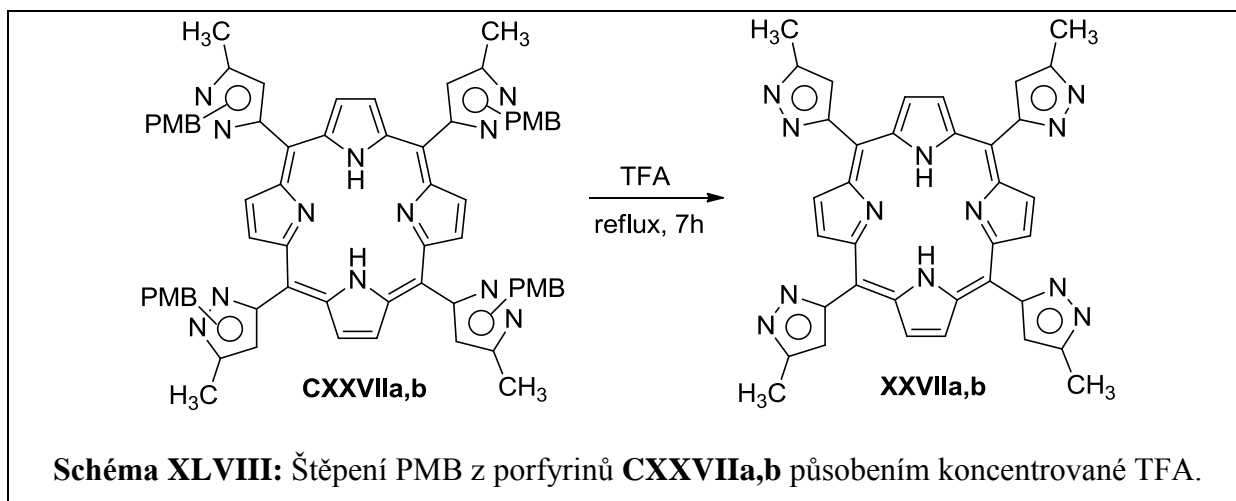
Z PMB-chráněných acyl derivátů pyrazolu (**CXXIVa-e**, Schéma XLVI) získali Eller *et al.*<sup>56</sup> příslušné pyrazolony (**CXXVa-e**) záhřevem v koncentrované TFA. Když použili systém TFA/anisol za refluxování v dichlorethanu, nedošlo k úplné deprotekcí a rovněž odstraňování anisolu je obtížné. Když se se podobné podmínky odmaskování (TFA, 75 °C) pokusili aplikovat na odpovídající *N*-benzyl substituované 4-acylpyrazolony, k deprotekcí nedošlo.



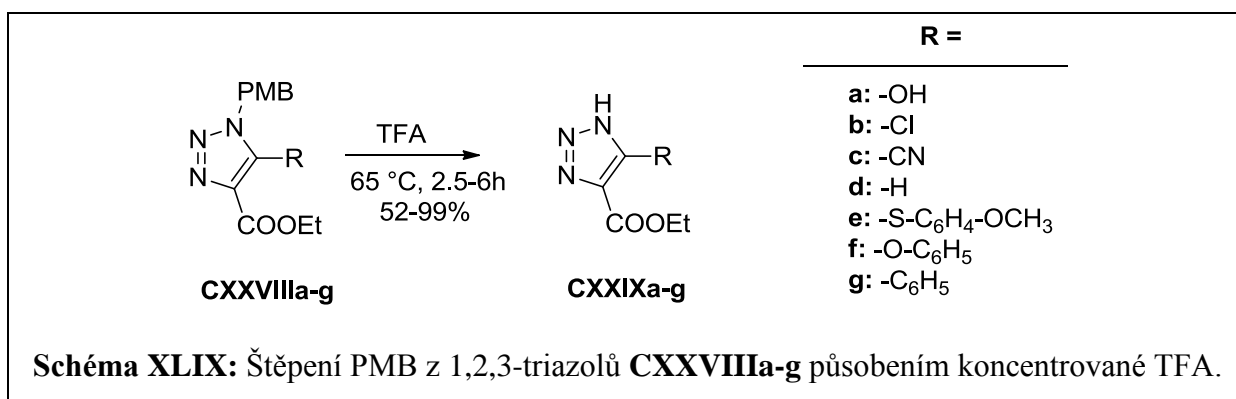
Všechny PMB-chránící skupiny na oligomeru aminopyrazolu (**CXXVI**, Schéma XLVII) byly působením TFA odštěpeny v jediném kroku.<sup>41</sup>



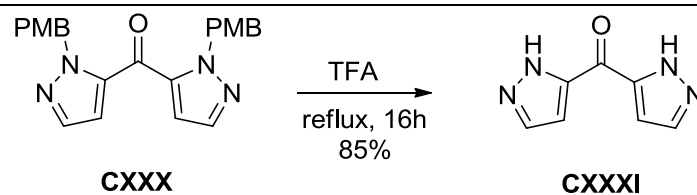
K odštěpení PMB skupiny z  $N^1$ -substituovaných porfyrinů použili autoři<sup>35</sup> dvě procedury – oxidativním štěpením působením CAN získali nerozpustnou látku, zřejmě komplex s CAN. Štěpením kyselinou trifluoroctovou se podařilo připravit produkt **XXVIIa,b** (Schéma XLVIII).



Buckle *et al.*<sup>18</sup> opět potvrdili rezistenci benzylové skupiny k záhřevu v TFA, ani po 48 hodinách nedošlo k jejímu odštěpení. Naproti tomu PMB skupinu za těchto podmínek odštěpili v závislosti na substrátu za 2.5 – 6 hodin (**CXXVIIIa-g**, Schéma XLIX). Autoři se zabývali stabilitou PMB skupiny a zjistili, že PMB substituent je stabilní za řady standardních reakčních podmínek – záhřev v alkalickém roztoku, vodné kyselině, vůči oxidačním činidlům (KMnO<sub>4</sub>), Lewisovy kyseliny (AlCl<sub>3</sub>) za chlazení, různé nukleofily (CN<sup>-</sup>, ArS<sup>-</sup>, ArO<sup>-</sup>) a za podmínek mírné katalytické hydrogenolýzy.



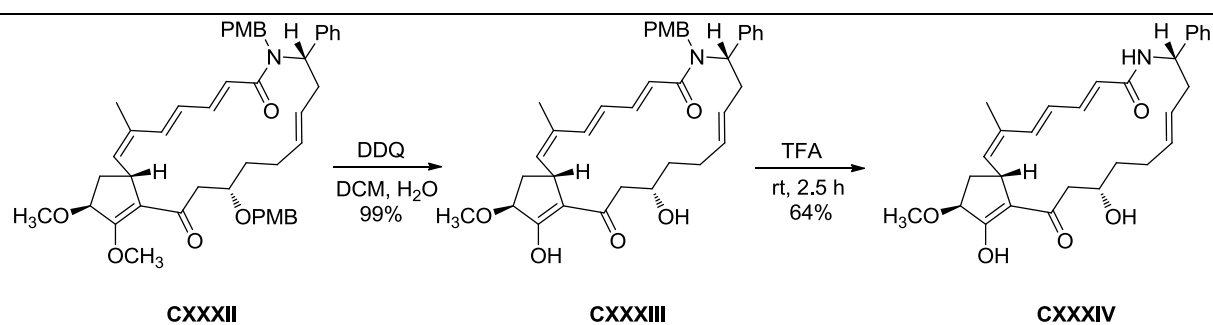
Při studiu možností deprotektce PMB z derivátu **CXXX** (Schéma L) vyzkoušeli Subramanyam *et al.*<sup>20</sup> mnoho metod běžně používaných pro odstranění PMB z alkoholů (DDQ, CAN, Ph<sub>3</sub><sup>+</sup>BF<sub>4</sub><sup>-</sup>). V odmaskování derivátu **CXXX** všechny tyto metody selhaly. Až reflux v TFA vedl ke snadnému odštěpení PMB.



**Schéma L:** Štěpení PMB skupin z derivátu **CXXX** působením koncentrované TFA.

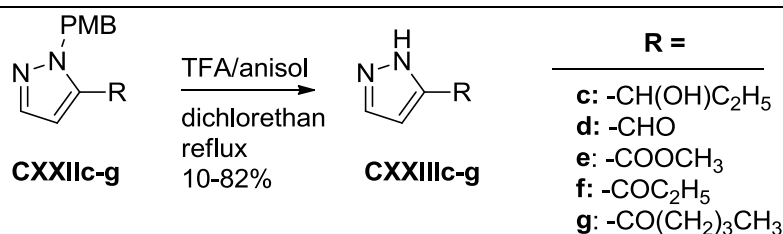
Deprotekci PMB z indolu, imidazolu, 1,2,4-triazolu refluxováním v TFA po dobu 18 hodin provedli také autoři patentu.<sup>66</sup>

V totální syntéze makrocyklu Hitachimycinu (**CXXXIV**, Schéma LI) použili autoři<sup>67</sup> PMB k protekci amidického dusíku (**CXXXII**) a hydroxy skupiny. Deprotekci chránících skupin provedli ve dvou krocích – nejprve oxidativně odmaskovali hydroxy skupiny působením DDQ a poté následovalo odštěpení PMB z amidu.



**Schéma LI:** Deprotekce *N*-PMB u derivátu **CXXXIII** působením koncentrované TFA.

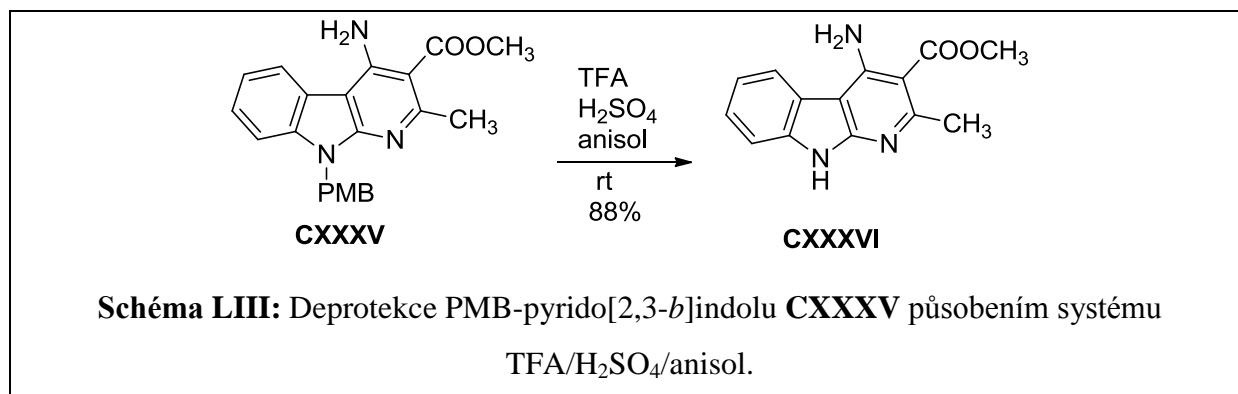
Subramanyam *et al.*<sup>20</sup> vedle reduktivního odstranění PMB z pyrazolu **CXXIIa-c** sodíkem štěpili tuto chránící skupinu u derivátů **CXXIIc-g** (Schéma LII) také systémem TFA/anisol.



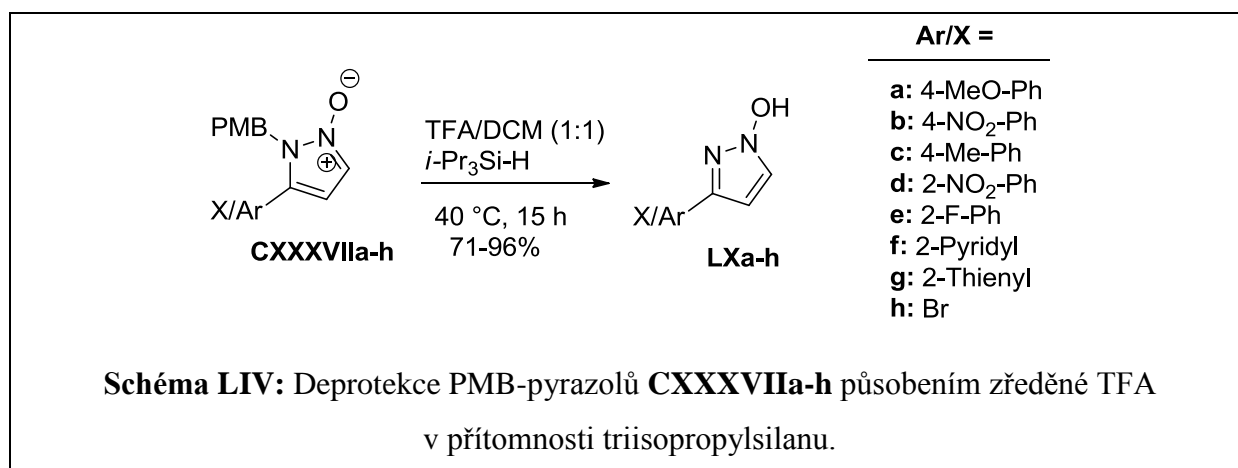
**Schéma LII:** Deprotekce PMB-pyrazolů **CXXIIc-g** systémem TFA/anisol.

Aromatizace prekurzoru sloučeniny **CXXV** (Schéma LIII) dosáhli Forbes *et al.*<sup>53</sup> reakcí s DDQ při teplotě 120 °C. Je zajímavé, že PMB skupina zůstala těmito podmínkami

nedotčena. Deprotekci derivátu **CXXXV** provedli autoři působením kyseliny TFA v přítomnosti koncentrované kyseliny sírové a anisolu. Deprotekci *N*-benzylového analogu **CXXXV** uskutečnili chloridem hlinitým v benzenu za refluxování.



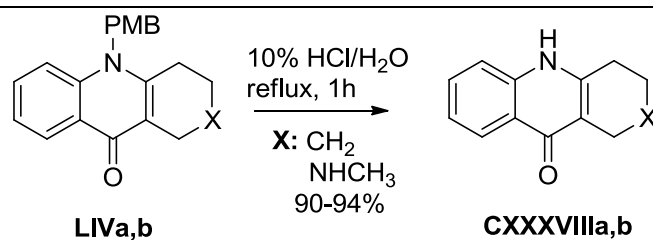
Eskildsen *et al.*<sup>45</sup> zkoušeli deprotekcí PMB aryl-substituovaných, brom-substituovaných sloučenin **CXXXVIIa-h** (Schéma LIV) působením silné minerální kyseliny (konc. HCl, konc. HBr, konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Výsledkem byly bohaté reakční směsi, které vznikaly v důsledku elektrofilní substituce PMB-kationtu. Z toho důvodu provedli štěpení systémem TFA/DCM s přidavkem triisopropylsilanu hrajícího roli „scavengeru“, který zachytil PMB-kationty.



### 3.2.2.3.2 Štěpení silnou minerální kyselinou

U derivátů **LIVa,b** (Schéma LV) provedli Yamato *et al.*<sup>43</sup> deprotekcí PMB působením zředěné kyseliny chlorovodíkové za vzniku derivátů **CXXXVIIIa,b**.

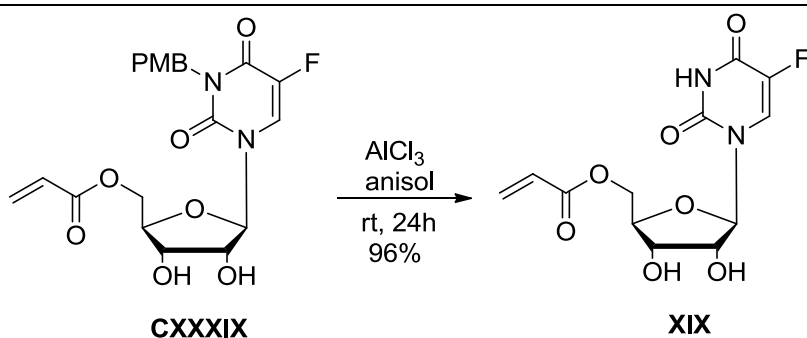




**Schéma LV:** Deprotekce PMB-derivátů **LIVa,b** působením zředěné kyseliny chlorovodíkové.

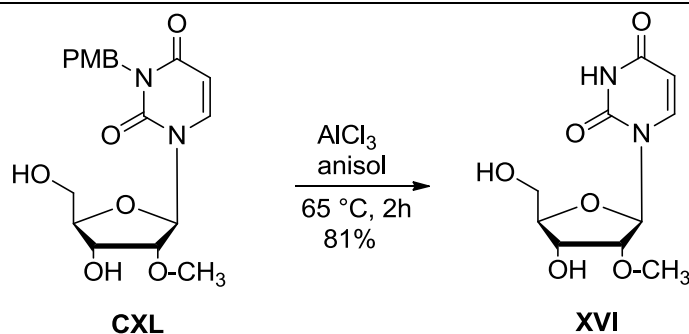
### 3.2.2.3.3 Lewisova kyselina $\text{AlCl}_3$ s anisolem

Systém  $\text{AlCl}_3$ -anisol se běžně používal pro deproteci benzyl esterů.<sup>68</sup> Akiyama *et al.*<sup>28</sup> ho však použili pro odmaskování  $\text{N}^3$ -benzylu u 5-fluoruridinů, např. **CXXXIX** (Schéma LVI). Odštěpení PMB bylo možné za laboratorní teploty přes noc, zatímco když použili CAN, docházelo k rozkladu.



**Schéma LVI:** Deprotekce PMB skupiny působením systému  $\text{AlCl}_3$ -anisol.

Dalším příkladem použití mírných podmínek deprotece systémem  $\text{AlCl}_3$ -anisol je opět z uridinové chemie od stejných autorů.<sup>27</sup> Derivát **XVI** (Schéma LVII) získali reakcí sloučeniny **CXL** s kombinací  $\text{AlCl}_3$ -anisol za relativně mírných podmínek, které neměly vliv na *N*-glykosidovou vazbu.



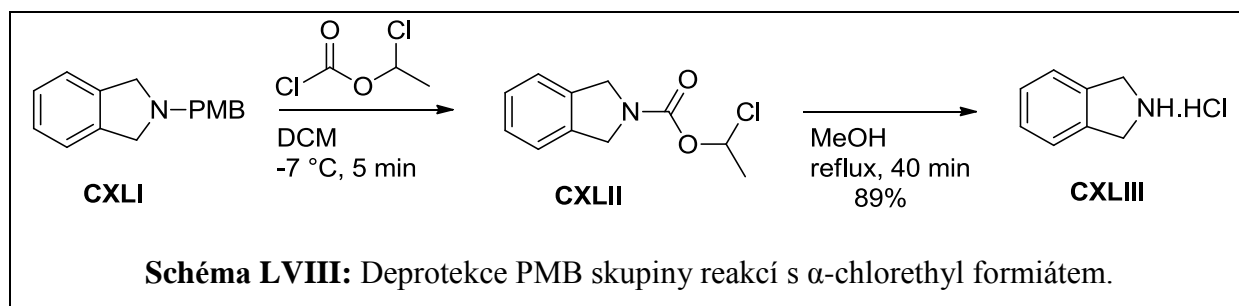
**Schéma LVII:** Deprotekce PMB skupiny působením systému  $\text{AlCl}_3$ -anisol.

### 3.2.2.4 Méně běžné metody odstranění PMB skupiny

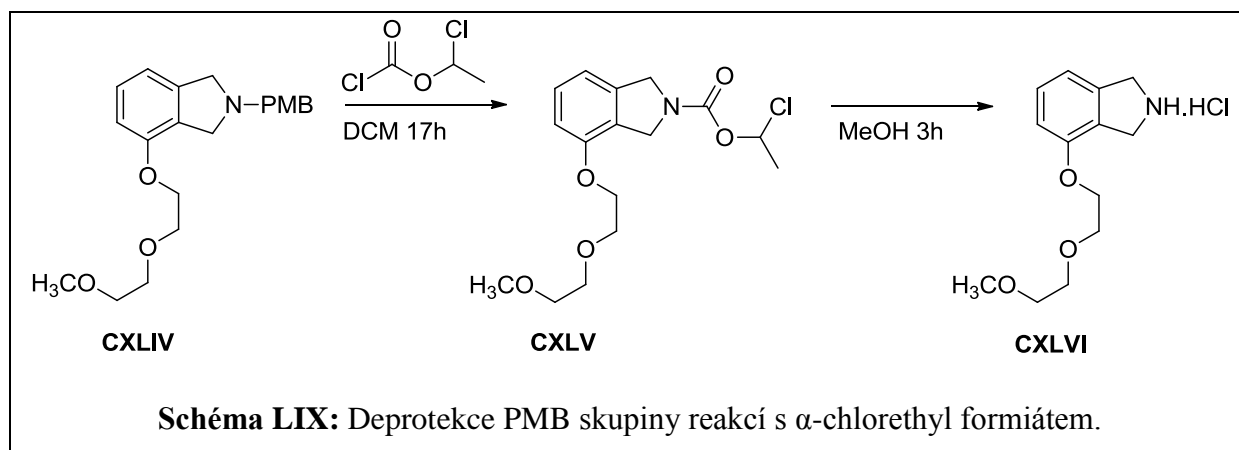
K méně běžným metodám deprotektce PMB patří použití  $\alpha$ -chlorethyl formiátu a jako zajímavost je uvedena fotolýza 3-methoxybenzyladeninu.

#### 3.2.2.4.1 Reakce s $\alpha$ -chlorethyl chlorformiátem

Reakci s  $\alpha$ -chlorethyl formiátem provedli Yang *et al.*<sup>69</sup> úspěšně nejprve s benzylovým analogem **CXLI** (Schéma LVIII), pak teprve s 4-methoxybenzylem **CXLI**. V obou případech došlo k debenzylaci rychle a selektivně za vzniku příslušného karbamátu (**CXLII**), který varem v methanolu poskytl nechráněný sekundární amin (**CXLIII**) ve formě hydrochloridu. Tato jemná metoda debenzylace se ukázala jako efektivní, když katalytická hydrogenace a oxidativní odbourání působením CAN u PMB-chráněné sloučeniny **CXLI** selhalo.

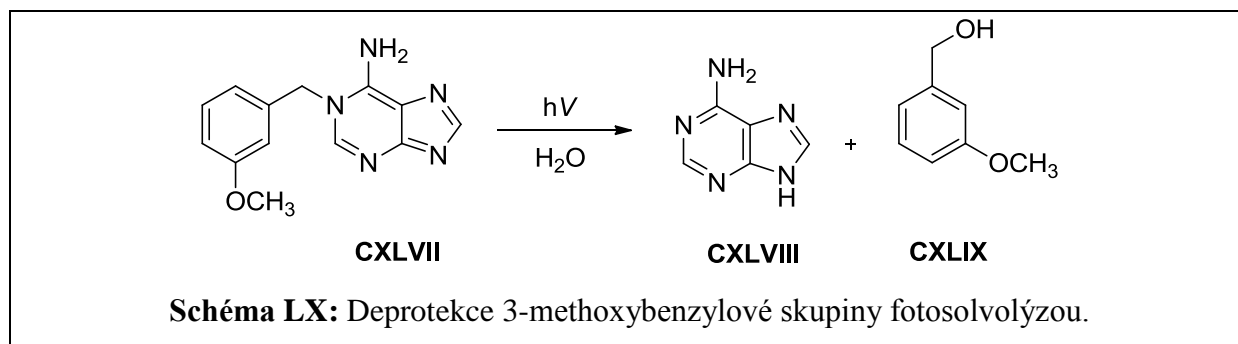


Podobné deproteční podmínky i substrát (**CXLIV**, Schéma LIX) použili také Congreve *et al.*<sup>50</sup> v syntéze isoindolových derivátů jako analgetik.



#### 3.2.2.4.2 Fotolýza

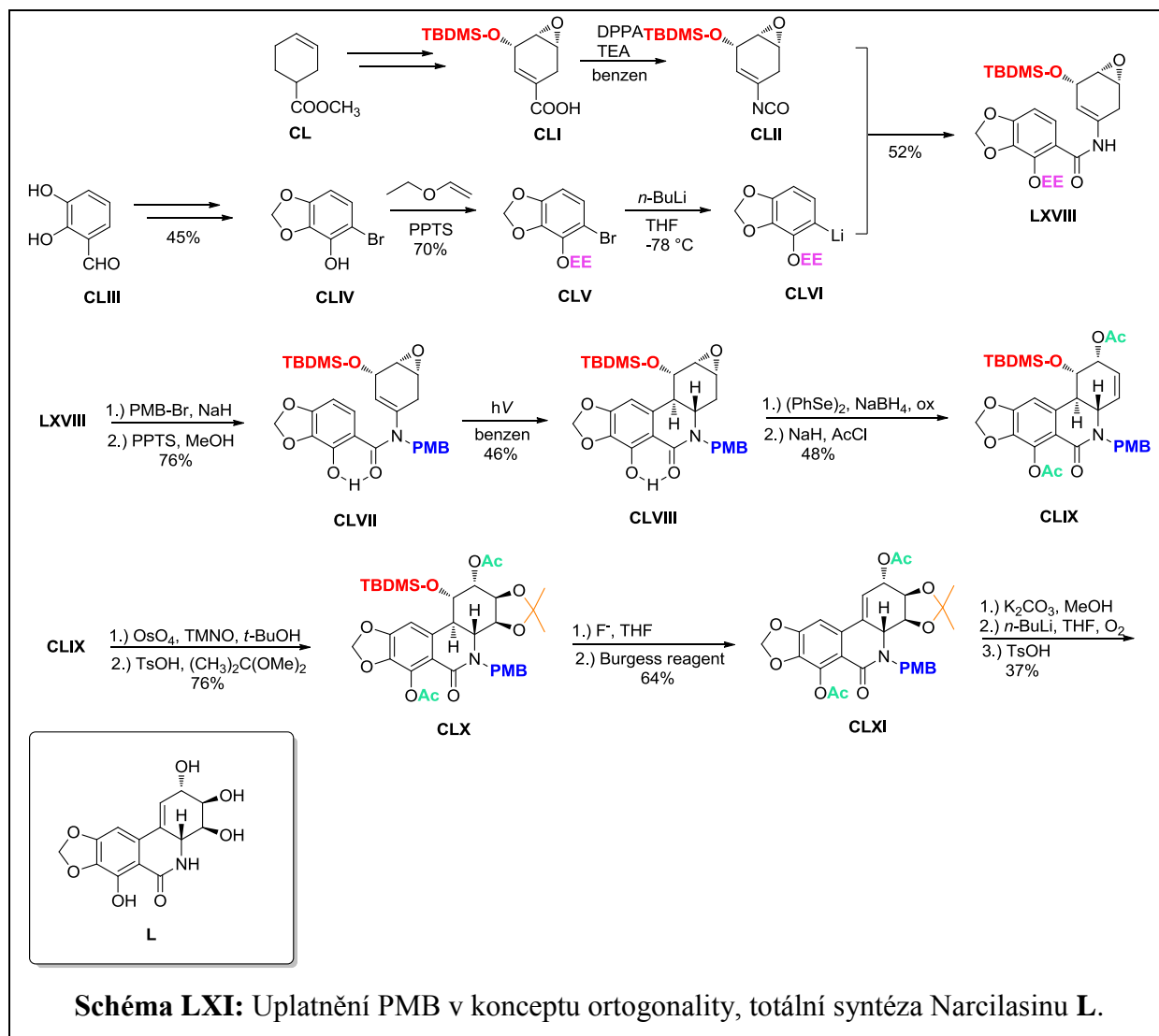
Fotosolvolýzu *N*-(3,5-dimethoxybenzyl) a *N*-(3-methoxybenzyl)adeninů (**CXLVII**, Schéma LX) jako možnost deprotektce benzylové chránicí skupiny studovali Er-Rhaimini *et al.*<sup>70</sup>



### 3.2.3 Využití PMB-protektce v konceptu ortogonalit

Jako názorný příklad ortogonální koncepce byla vybrána totální syntéza Narciklasinu (Schéma LXI),<sup>42</sup> kde autoři uplatnili různé protektivní skupiny (včetně PMB), které dočasně zabránily reaktivitě dané funkční skupiny a jejich deprotektce nevyžadovala drastické podmínky.

Výchozím materiálem pro syntézu Narciklasinu byl komerčně dostupný methyl ester 3-cyklohexen-1-karboxylové kyseliny (**CL**), ze kterého byl sledem reakcí, zahrnujícím i navázání první protektivní skupiny TBDMS působením TBDMS-chloridu a imidazolu, získán derivát **CLI**. Ten reakcí s difenylfosforyl azidem (DPPA) poskytl stavební podjednotku (**CLII**) pro syntézu Narciklasinu. U komerčně dostupného 2,3-dihydroxybenzaldehydu (**CLIII**) uzavřeli přikondenzovaný heterocyklus (**CLIV**) a hydroxyskupinu na benzenovém jádře ochránili reakcí s ethyl vinyl etherem (**CLV**). Reakce s butyl lithiem byla následována reakcí izokyanátu (**CLII**) za vzniku derivátu **LXVIII**, kde byly hydroxyskupiny chráněny prostřednictvím TBDMS a EE. Do molekuly byla zavedena PMB protektivní skupina. Ethoxyethylová skupina byla hydrolyzována za mírně kyselých podmínek (PPTS = pyridinium p-toluensulfonát) za vzniku fenolu (**CLVII**). Trans-přikondenzovaný fenantridon (**CLVIII**) byl připraven působením záření na derivát **CLVII**. Následovalo zakomponování další chránící skupiny – acetylů na hydroxy skupinách (**CLIX**). Oxidací dvojné vazby vznikl diol, který byl ochráněn přes acetonid (**CLX**). Pak už nadcházela série deprotektčních kroků – hydrolýza acetylových skupin, odstranění PMB oxidativně podle Williamsova protokolu, odmaskování acetonidu za vzniku produktu (**L**).



### 3.3 2,4-Dimethoxybenzyl (Dmb)

Tato kapitola je analogicky jako v případě PMB chránící skupiny rozdělena do tří částí. První část se věnuje metodám zavedení Dmb skupiny do molekuly, druhá část naopak řeší její deprotekcii a na závěr uvádíme několik příkadů použití Dmb v kombinaci s Boc chránící skupinou. Tato kombinace byla zvolena z toho důvodu, že tvořila stěžejní prvek i při syntéze pyrazolů v předložené závěrečné práci. Občas se v textu objevuje i 3,4-Dmb skupina z toho důvodu, abychom podali ucelený obraz o reaktivitě methoxybenzylových chránících skupin.

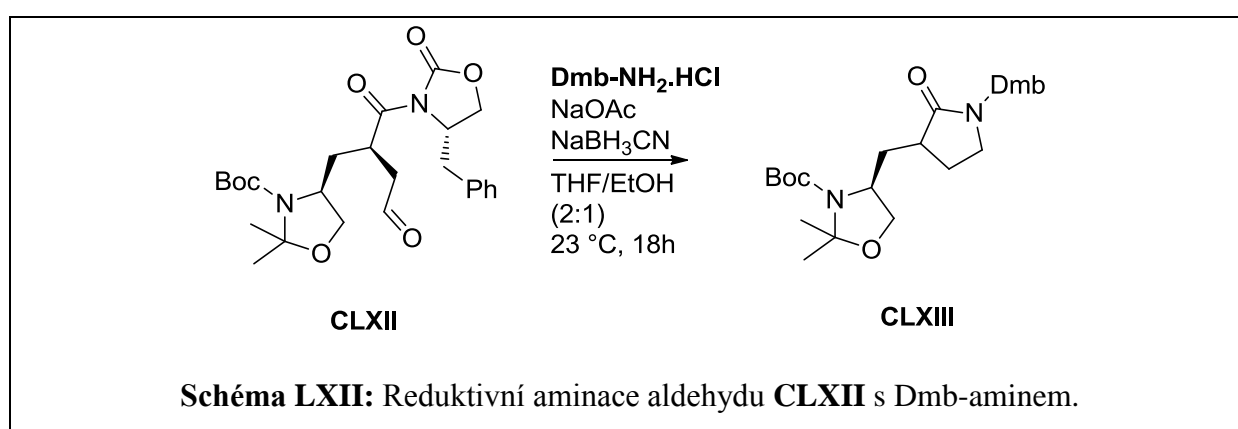
#### 3.3.1 Dmb – metody navázání

Pro zavedení 2,4-dimethoxybenzylové chránící skupiny (Dmb) literatura už tak pestré možnosti zavedení do molekuly jako v případě PMB neuvádí. Patří sem především redukční

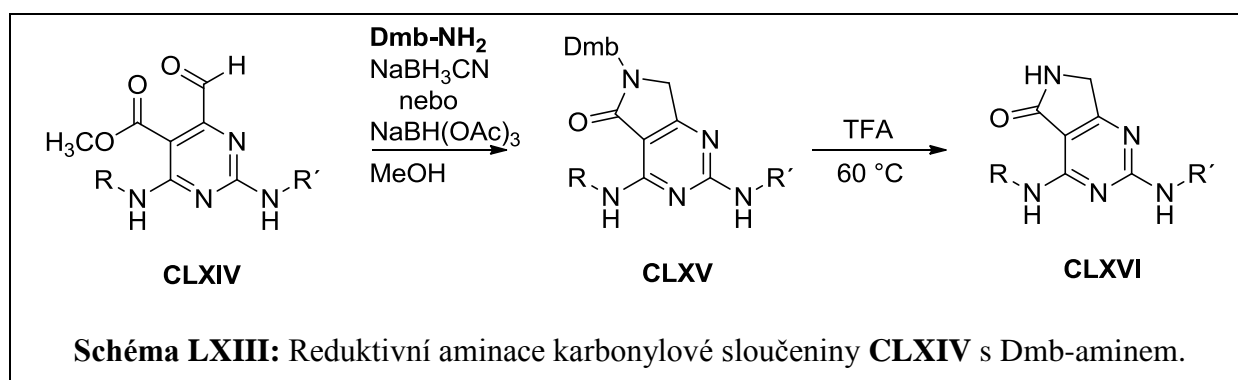
aminace, kdy se jedná o reakci Dmb-aminu a karbonylové sloučeniny, nebo jde o opačné uspořádání – Dmb-alehyd a amin. Konkrétní reakce jsou blíže popsány v následujících kapitolách, které jsou rozděleny podle zdroje Dmb na Dmb-amin, Dmb-aldehyd, Dmb-glycinát, kam jsme zařadili i funkční derivát glycinu - *N*-Dmb-aminoacetonitril, a na závěr méně typické reakce vycházející z 1,3-dimethoxybenzenu.

### 3.3.1.1 Dmb-amin

Dragovich *et al.*<sup>71</sup> připravili Dmb-chráněný laktam (**CLXIII**, Schéma LXII) reduktivní aminací aldehydu (**CLXII**) s Dmb-aminem.

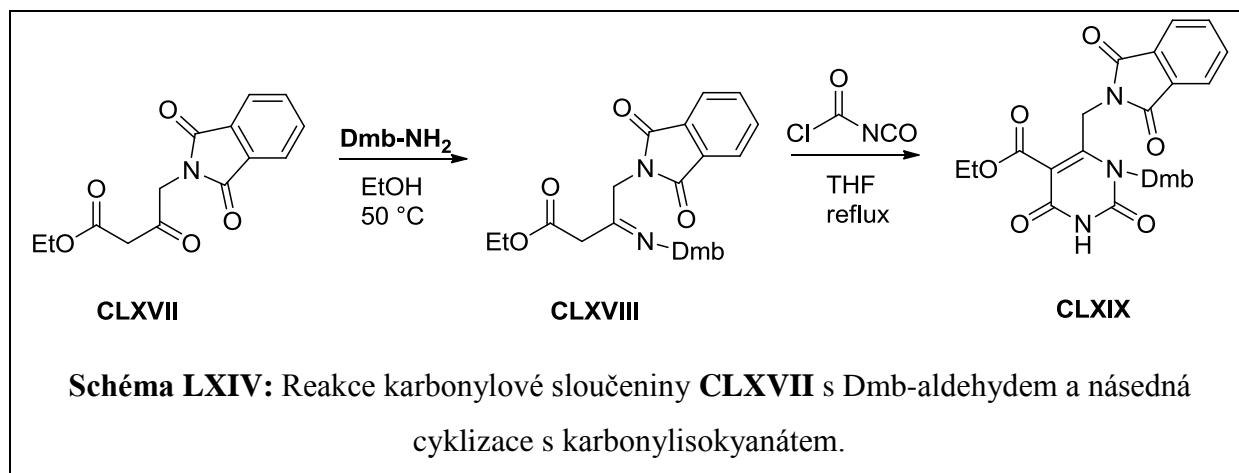


V přípravě přikondenzovaných heteroaromatických pyrrolidinonů (**CLXVI**, Schéma LXIII) použili Arikawa *et al.*<sup>72</sup> rovněž reduktivní aminace. Navázanou Dmb skupinu ihned štěpili působením TFA za vzniku produktu (**CLXVI**), Dmb-amin zde tedy hrál roli zdroje amino skupiny.

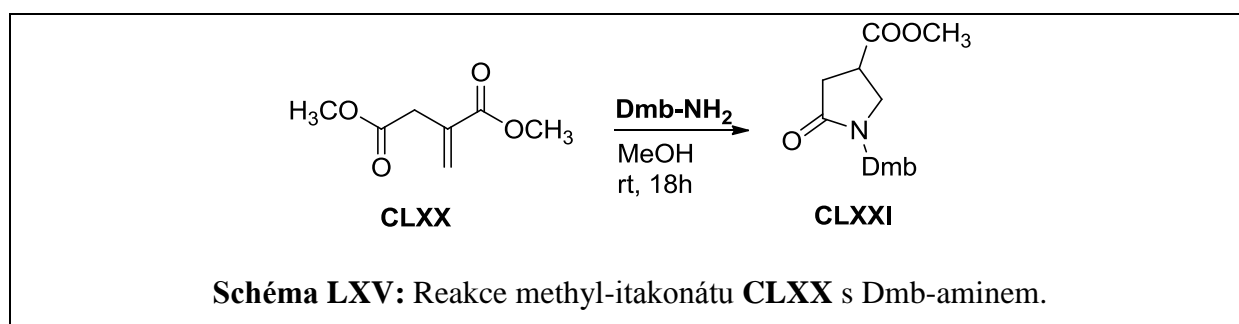


Stejní autoři nechali reagovat Dmb-amin s ketosloučeninou (**CLXVII**, Schéma LXIV), nenásledovala však redukce jako v předchozím případě, ale reakce intermediátu (**CLXVIII**)

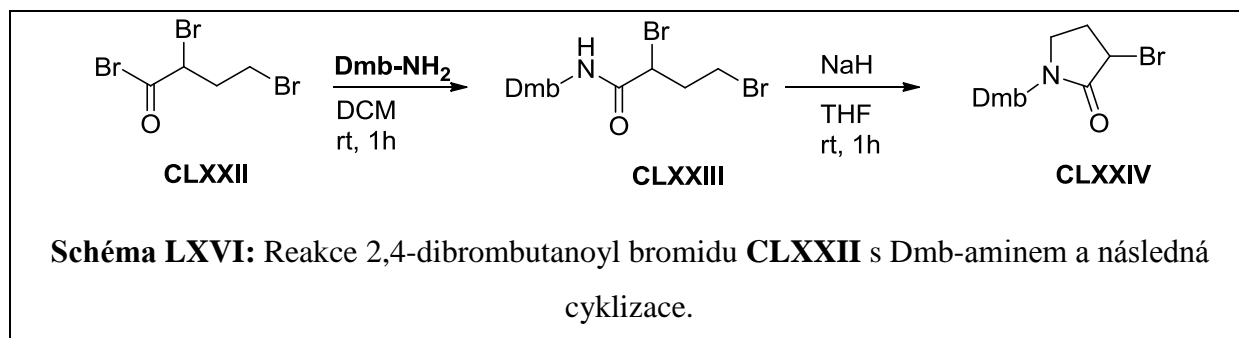
s aktivovaným karbonylisokyanátem za vzniku derivátu **CLXIX**, kde byla Dmb skupina na pyrimidinovém dusíku.



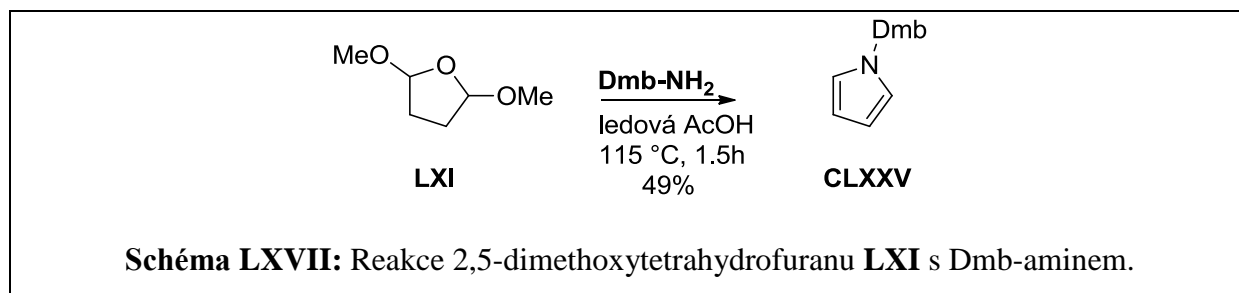
Zatímco Old *et al.*<sup>73</sup> použili pro přípravu Dmb-chráněného 5-oxopyrrolidin-3-karboxylátu (**CLXXI**, Schéma LXV) methylester kyseliny itakonové (**CLXX**), Imamura *et al.*<sup>74</sup> vycházeli přímo z kyseliny, kterou nechali reagovat s Dmb-aminem (72%).



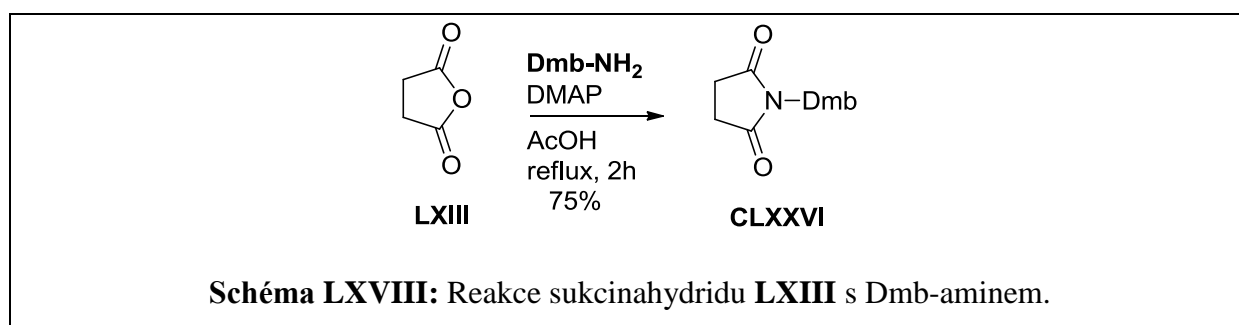
Reakcí 2,4-dibrombutanoyl bromidu (**CLXXII**, Schéma LXVI) s Dmb-aminem vznikl alifatický Dmb-chráněný derivát (**CLXXIII**), který byl cyklizován na laktam **CLXXIV**.<sup>75</sup>



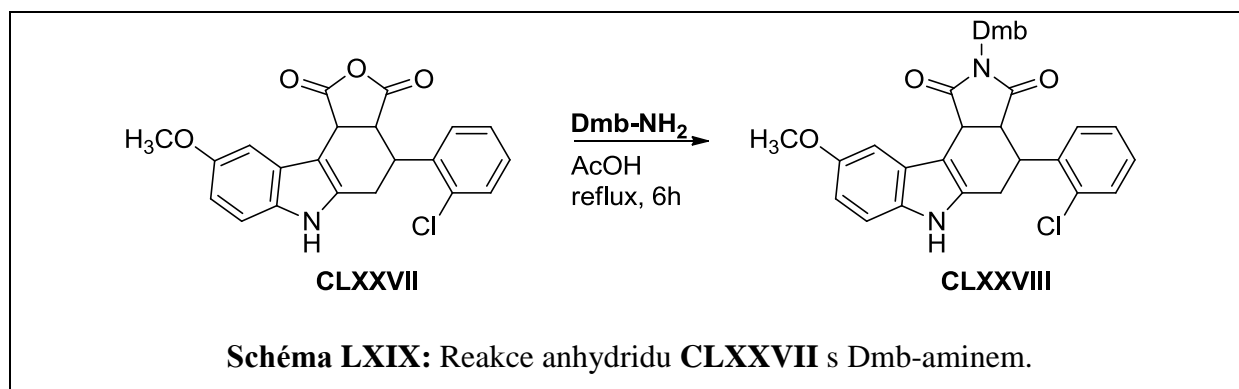
Podobně jako v případě PMB-analogu **LXI** připravili Taylor *et al.*<sup>47</sup> i Dmb-pyrrol (**CLXXV**, Schéma LXVII).



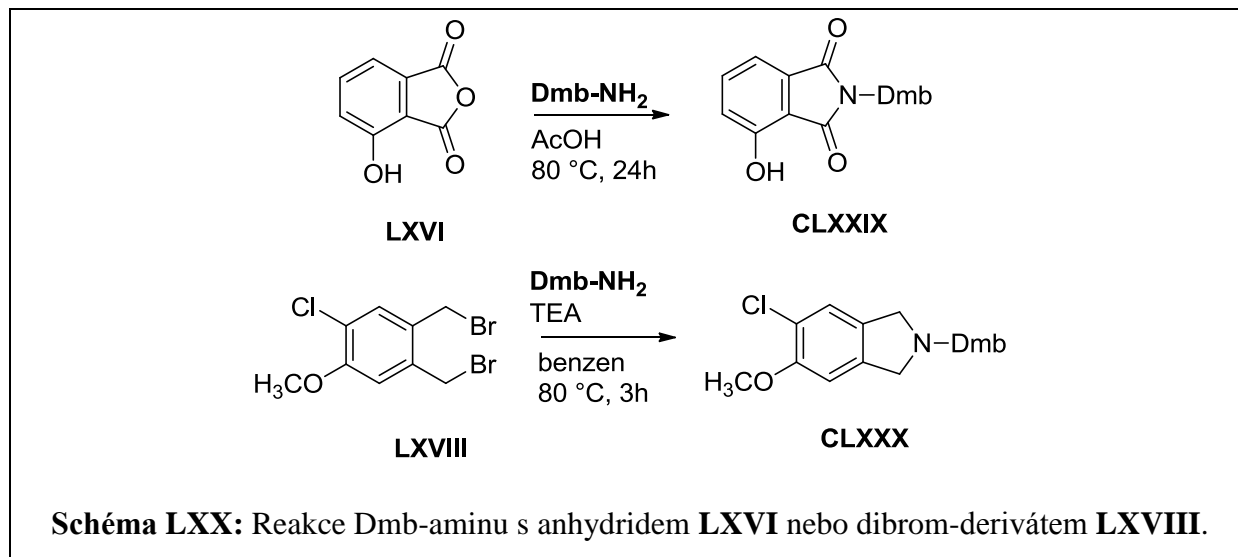
Dmb-chráněný pyrrolidin-2,5-dion (**CLXXVI**, Schéma 68) připravili Jin *et al.*<sup>76</sup> záhřevem ze sukcinahydridu (**LXIII**). Verschueren *et al.* použili také DMAP.<sup>49</sup>



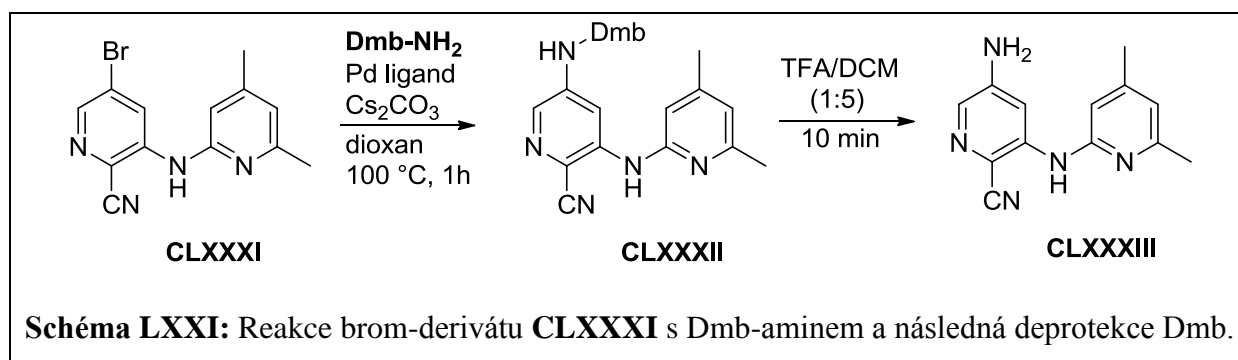
Dalším příkladem reakce Dmb-aminu s anhydridem popsali Palmer *et al.*<sup>77</sup> v syntéze nových inhibitorů Wee1 kinas (G2 fáze buněčného cyklu) 4-fenylpyrrolkarbazolového typu (Schéma LXIX).



Congreve *et al.*<sup>50</sup> a Lyons *et al.*<sup>51</sup> připravili Dmb deriváty (**CLXXIX**, **CLXXX**, Schéma LXX) analogickým způsobem jako příslušné PMB-deriváty, přičemž vycházeli z anhydridu (**LXVI**) nebo z dibromderivátu (**LXVIII**).



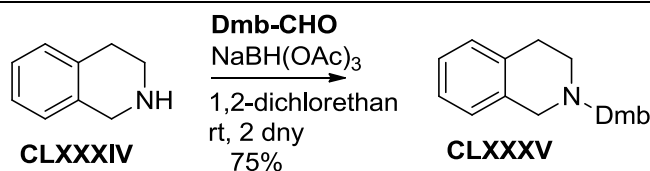
V případě syntézy derivátu **CLXXXIII** (Schéma LXXI) autoři použili Dmb-amin jako zdroj amino skupiny.<sup>78</sup>



### 3.3.1.2 Dmb-aldehyd

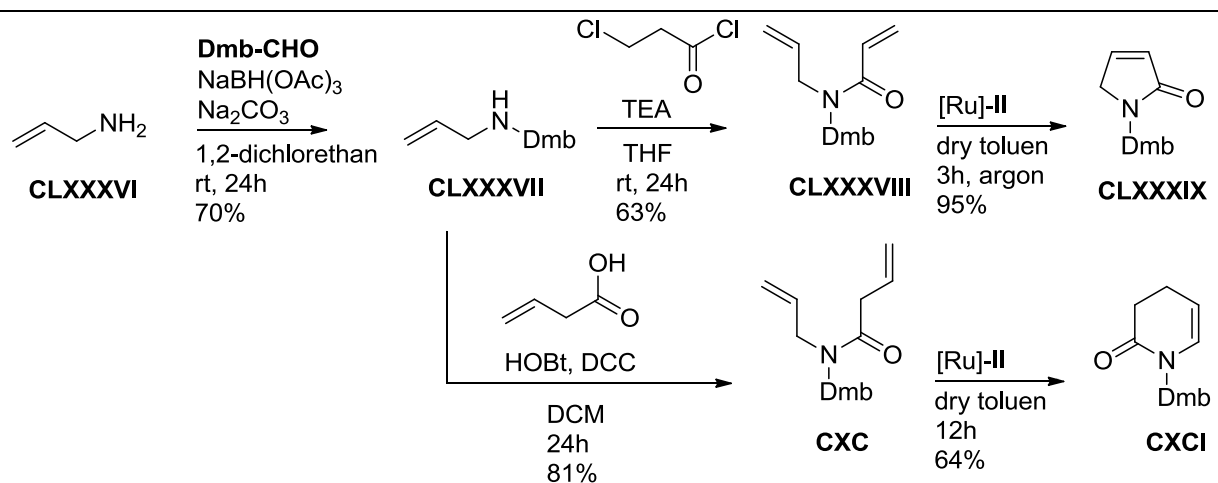
Reduktivní aminací tetrahydroisochinolinu (**CLXXXIV**, Schéma LXXII) s Dmb-aldehydem připravili Lemoucheux *et al.*<sup>79</sup> Dmb-chráněný derivát (**CLXXXV**). Analogicky připravili autoři i další benzylované deriváty, včetně PMB.





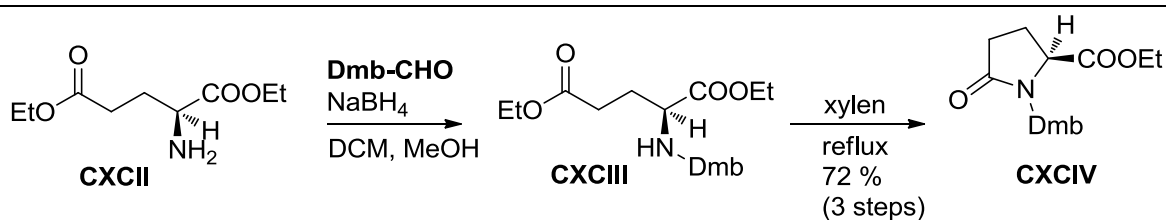
**Schéma LXXII:** Reduktivní aminace aminu **CLXXXIV** s Dmb-aldehydem.

Mallagaray *et al.*<sup>80</sup> použili pro cyklizaci látek **CLXXXIX** a **CXCI** (Schéma LXXIII) druhou generaci Grubbsových katalyzátorů. Alifatický Dmb-chráněný derivát (**CLXXXVII**) připravili reductivní aminací. Na alifatický intermediát **CLXXXVII** uplatnili dvě acylační metody – chloridem kyseliny 3-chlorpropanové a vinyloctovou kyselinou v přítomnosti HOBt/DCC. V případě derivátu **CXCI** vznikaly ještě další dva izomery lišící se polohou dvojné vazby.



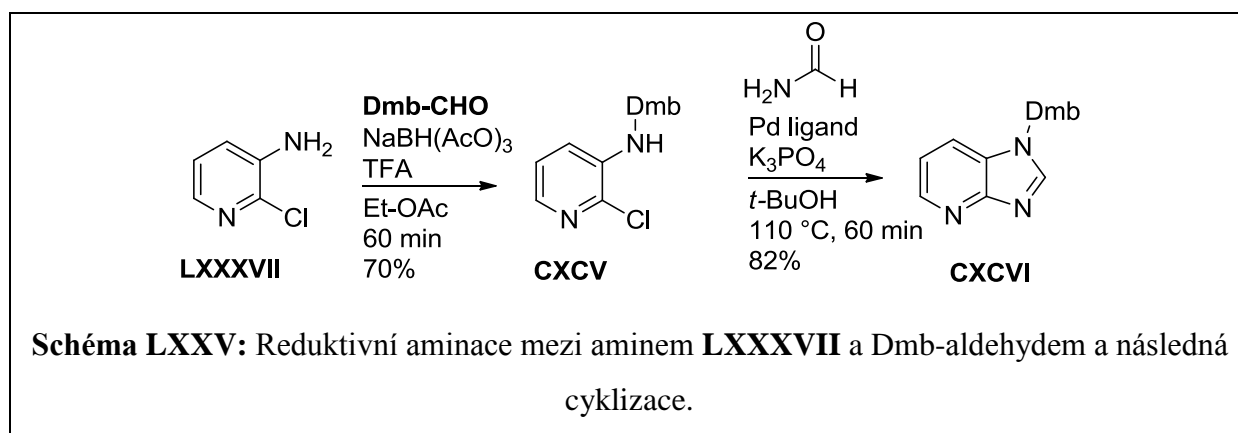
**Schéma LXXIII:** Reduktivní aminace allylaminu **CLXXXVI** s Dmb-aldehydem a následná acylace a cyklizace za přítomnosti Grubbsova katalyzátoru.

V syntéze 4-amino-5-hexanové kyseliny<sup>81</sup> byl intermediátem Dmb-chráněný laktam **CXCIV** (Schéma LXXIV), který připravili McAlonan *et al.* z diethyl-glutamátu (**CXCII**), který nechali reagovat s Dmb-aldehydem za podmínek reductivní aminace.



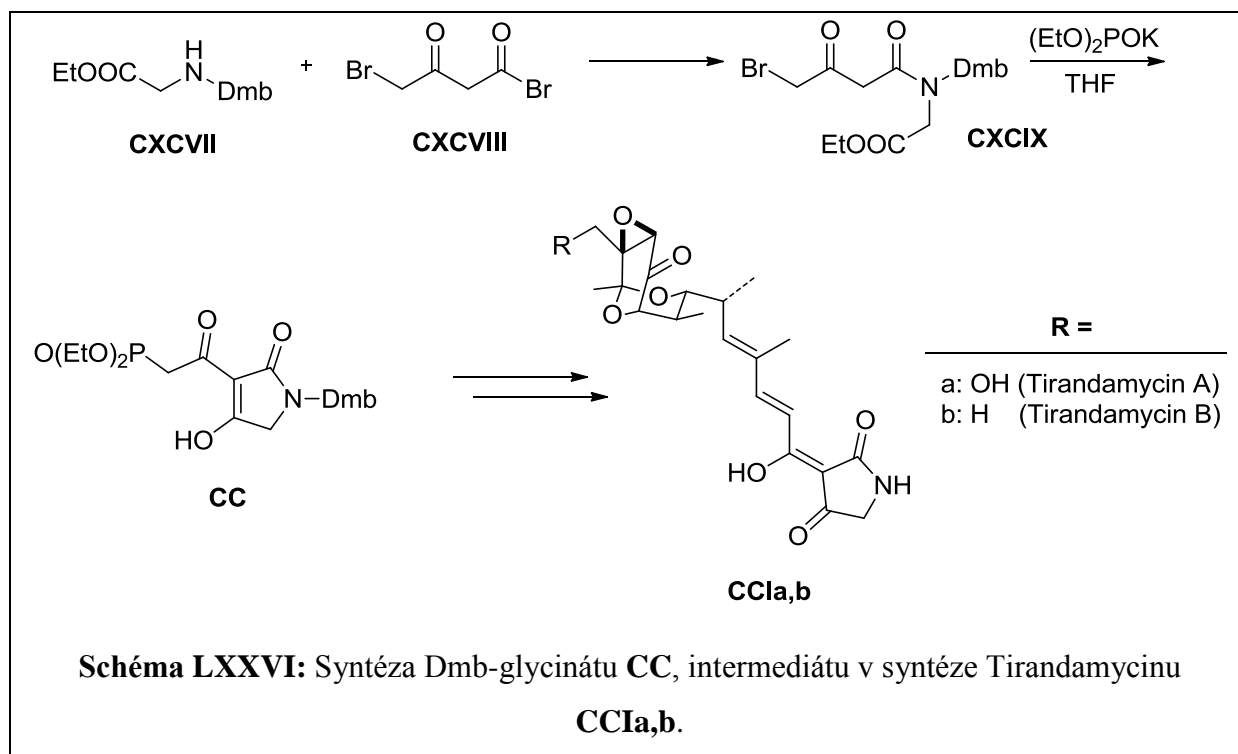
**Schéma LXXIV:** Reduktivní aminace mezi aminem **CXCII** a Dmb-aldehydem a následná cyklizace.

Analogicky jako PMB-chráněný imidazo[4,5-*b*]pyridin (**XC**) připravili Rosenberg *et al.*<sup>57,82</sup> reaktivní aminací aminu (**LXXXVII**, Schéma LXXV) s Dmb-aldehydem také Dmb-derivát **CXCVI**.

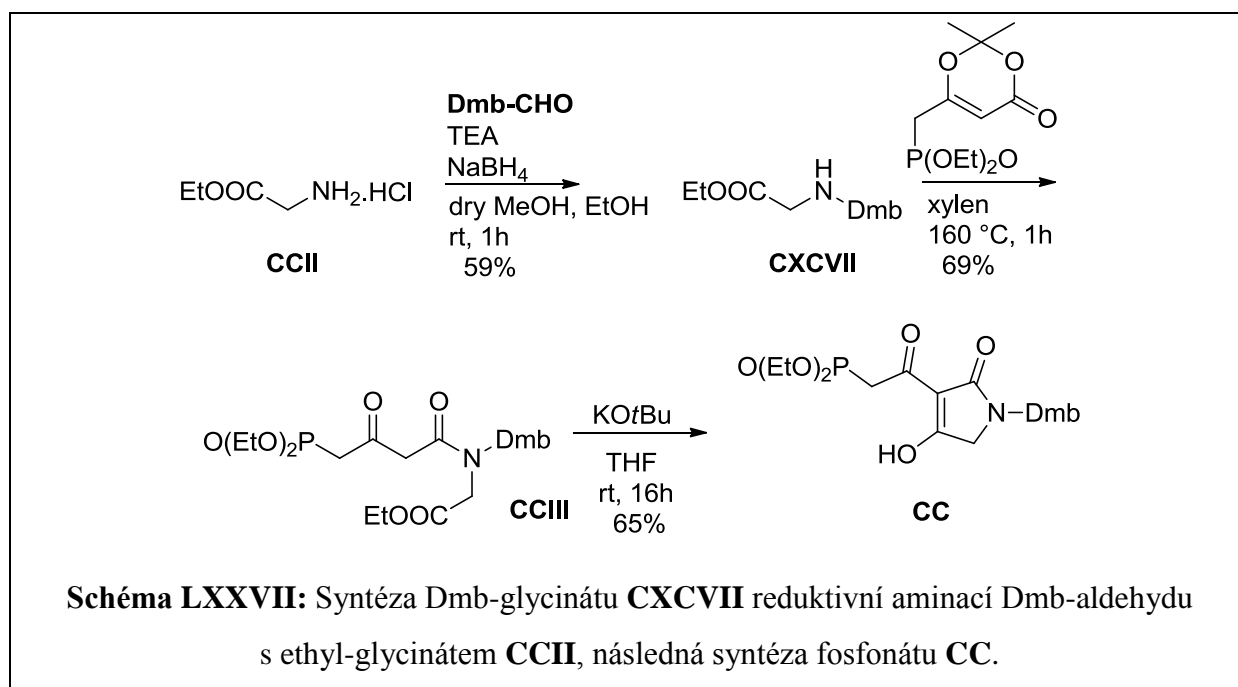


### 3.3.1.3 Dmb-glycinát

Schlessinger *et al.*<sup>83,84</sup> a DeShong *et al.*<sup>85</sup> popsali *N*-Dmb-glycinát (**CC**, Schéma LXXVI), klíčový intermediát v syntéze Tirandamycinu (**CCI**), který patří do rodiny antibiotik na bázi 3-dienoyl tetramové kyseliny. Autoři zde vycházeli z 4-brom-3-oxobutanoyl bromidu (**CXCVIII**), který nechali reagovat s Dmb-glycinátem (**CXCVII**).

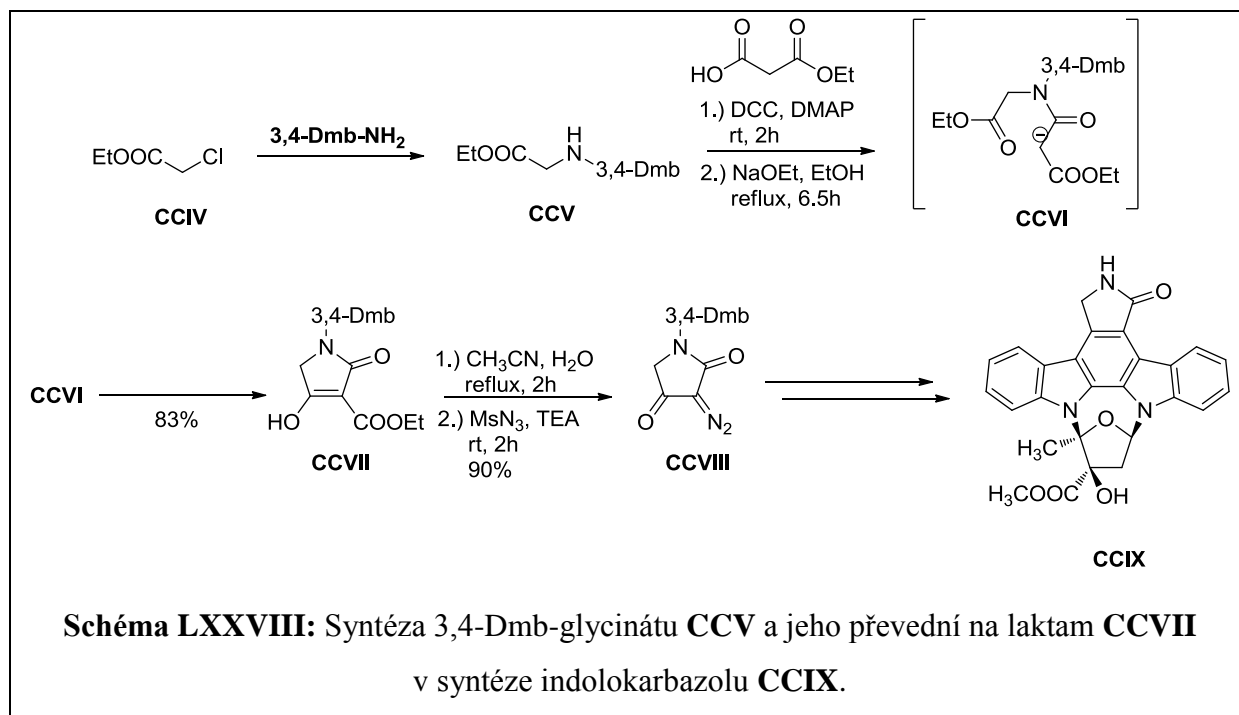


Fosfonát tetramové kyseliny (**CC**) nezávisle syntetizovali také ve skupině Boeckmana.<sup>86</sup> Připravili ho z Dmb-glycinátu (**CXCVII**) a diethyl ((2,2-dimethyl-4-oxo-4*H*-1,3-dioxin-6-yl)methyl) fosfonátu (Schéma LXXVII). Popsali zde i syntézu Dmb-glycinátu reductivní aminací ethyl-glycinátu hydrochloridu (**CCII**) s Dmb-aldehydem.

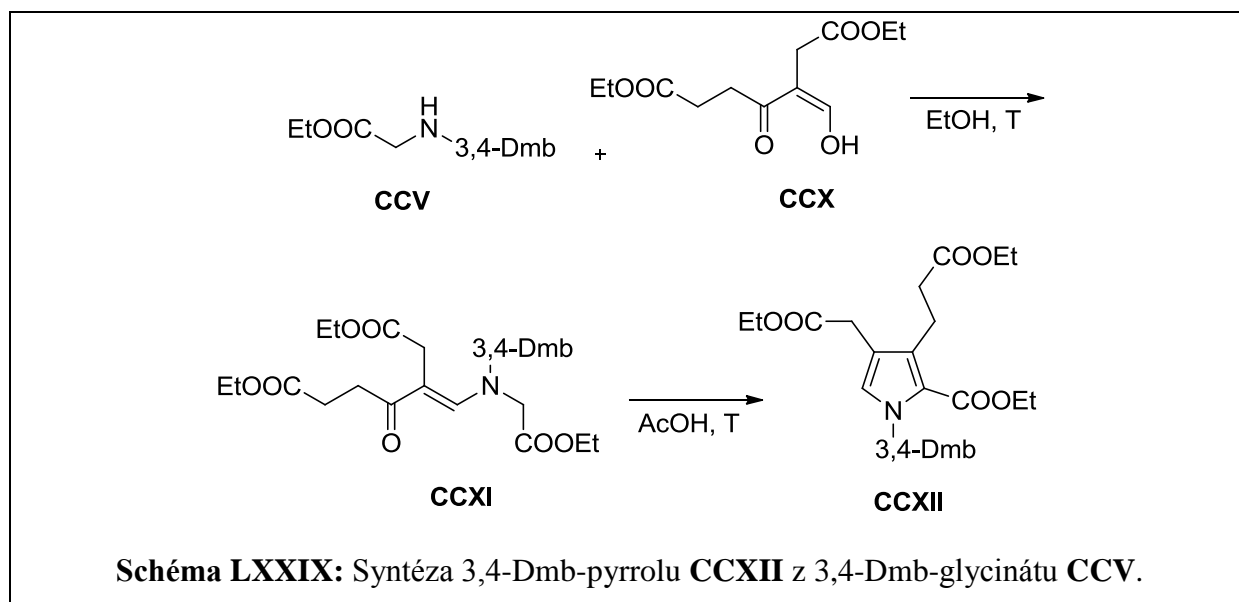


Syntéza Tirandamycinu byla i nadále aktuální, věnoval se jí Rosen *et al.*,<sup>87</sup> Shimshock *et al.*,<sup>88</sup> kteří rovněž použili Schlessingerův fosfonátový protokol. Pozornost byla zaměřena i na Tirandamycin C, pro který byl fosfonát **CC** také stěžejním intermediátem.<sup>89</sup>

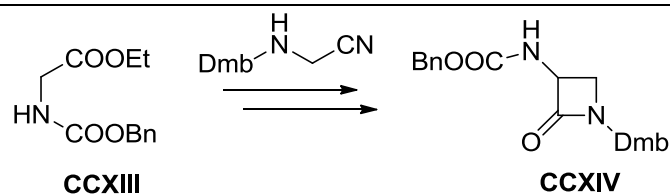
3,4-Dmb-chráněný (také PMB) ethyl-glycinát (**CCV**, Schéma 78) připravili Wood *et al.*<sup>90,91</sup> reakcí 3,4-Dmb-aminu s 2-chlorethyl-acetátem (**CCIV**). Následovala acylace ethyl hydrogen malonátem za přítomnosti DCC, DMAP, dalším krokem byla Dieckmannova cyklizace vedoucí k laktamu **CCVII**. Zahřívání v acetonitrilu, následné ochlazení a reakce s mesylazidem poskytla diazosloučeninu **CCVIII**, klíčový intermediát v totální syntéze furanosylovaného idolokarbazolu **CCIX**.



3,4-Dmb-chráněný (nebo PMB) ethyl-glycinát (**CCV**) vedl reakcí s ketodikarboxylovou sloučeninou (**CCX**, Schéma LXXIX) a následnou cyklizací k 3,4-Dmb chráněnému pyrrolu (**CCXII**).<sup>92</sup>



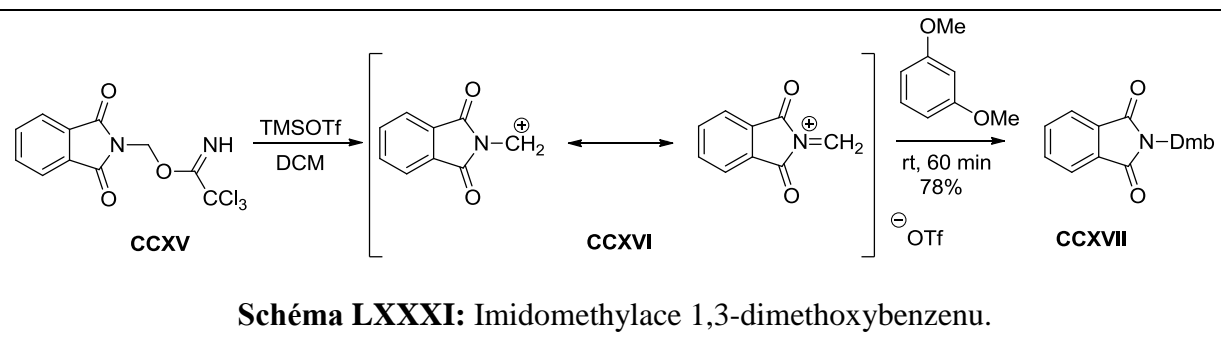
V syntéze  $\beta$ -laktamových antibiotik použili Overman *et al.*<sup>93</sup> *N*-Dmb-aminoacetonitril, který připravili z primárního aminu (Schéma LXXX).



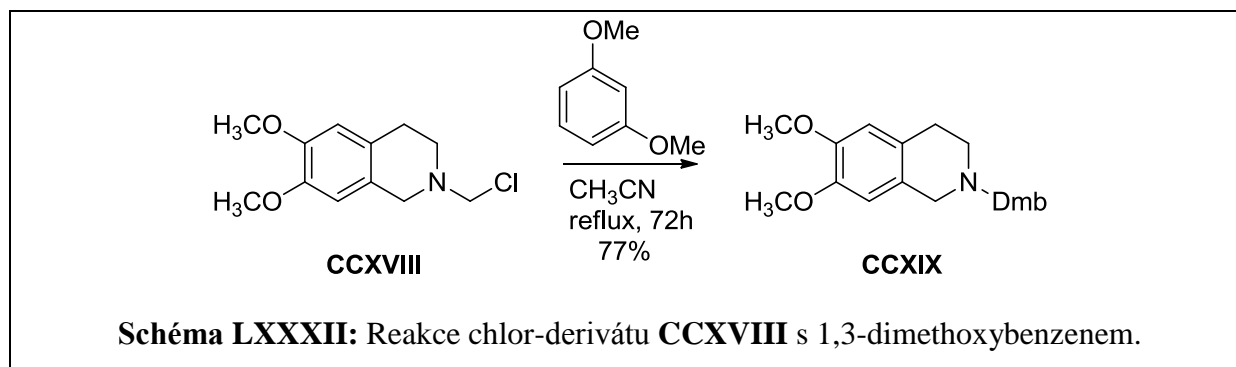
**Schéma LXXX:** Použití *N*-Dmb-aminoacetonitrilu v syntéze β-laktamových antibiotik.

### 3.3.1.4 Méně běžné postupy

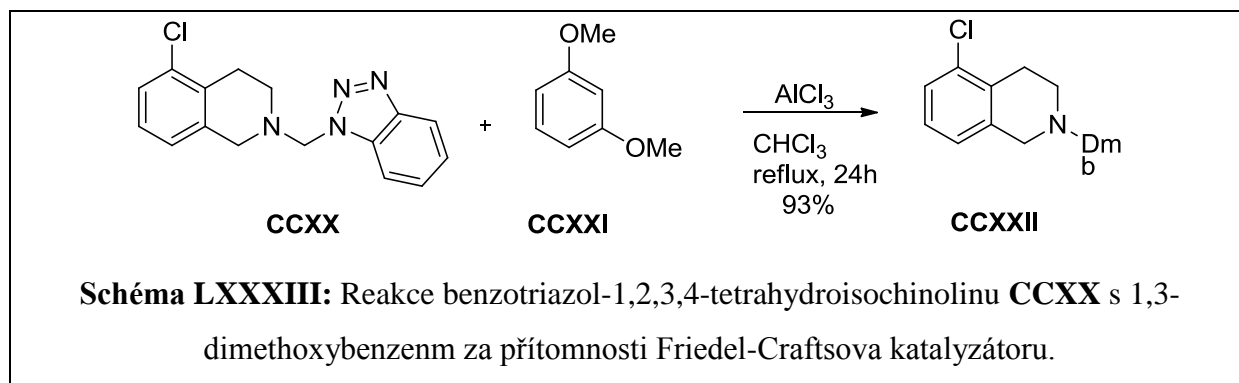
*O*-Ftalimidomethyl trichloracetimidát (**CCXV**, Schéma LXXXI) působil jako aminomethylační činidlo v reakci s C-nukleofilem – 1,3-dimethoxybenzenem v přítomnosti katalytického množství trimethylsilyl trifluormethansulfonátu (TMSOTf).<sup>94</sup>



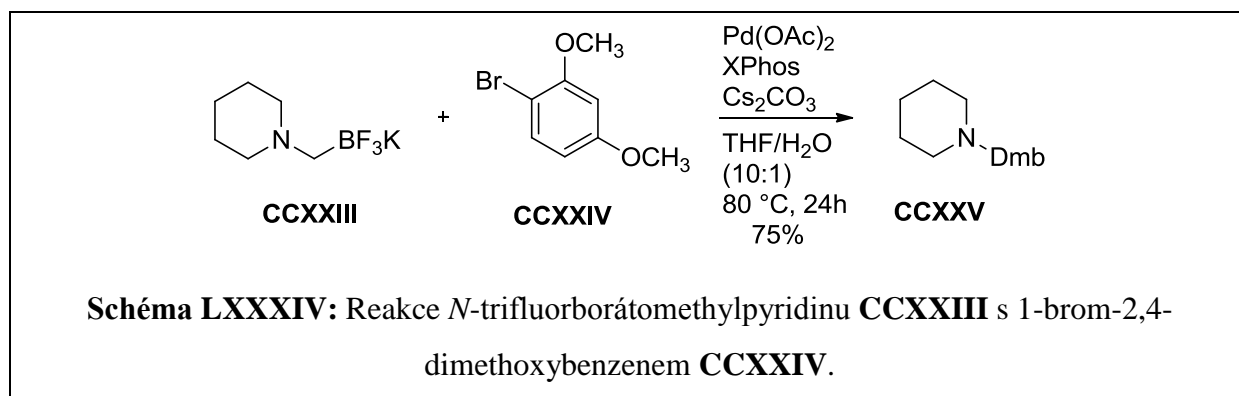
Tetrahydroisochinolinový derivát (**CCXVIII**, Schéma LXXXII) reagoval s 1,3-dimethoxybenzenem za vzniku Dmb-isochinolinu **CCXIX**.<sup>95</sup>



V následujícím příkladě (Schéma LXXXIII) byl benzotriazol nahrazen nukleofilem 1,3-dimethoxybenzenem (**CCXXI**) za přítomnosti Friedel-Craftsova katalyzátoru chloridu hlinitého za vzniku Dmb-isochinolinu **CCXXII**.<sup>96</sup>



*N*-Trifluorborátmethylpyridin (**CCXXIII**, Schéma LXXXIV) reagoval s 1-brom-2,4-dimethoxy-benzenem (**CCXXIV**) za katalýzy paládiem a 2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenyly (XPhos) za vzniku *N*-Dmb-piperidinu **CCXXV**.<sup>97</sup>

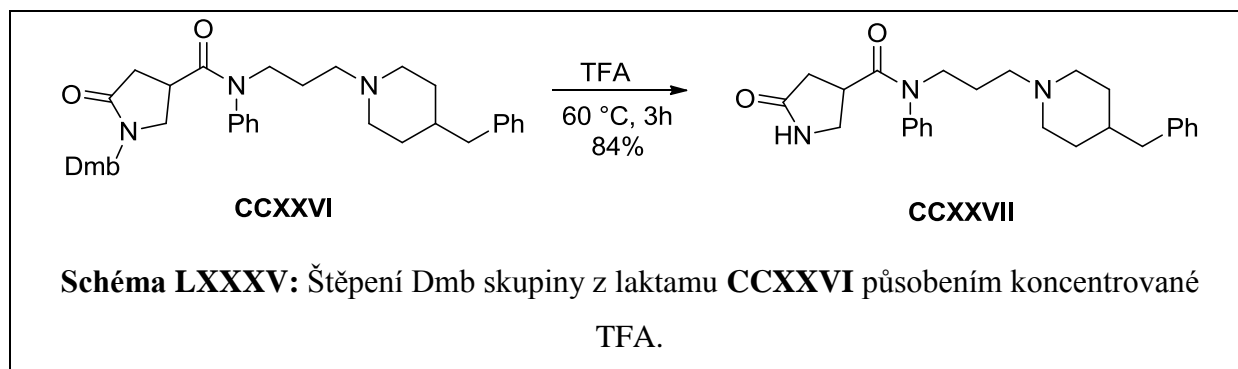


### 3.3.2 Dmb – možnosti odstranění

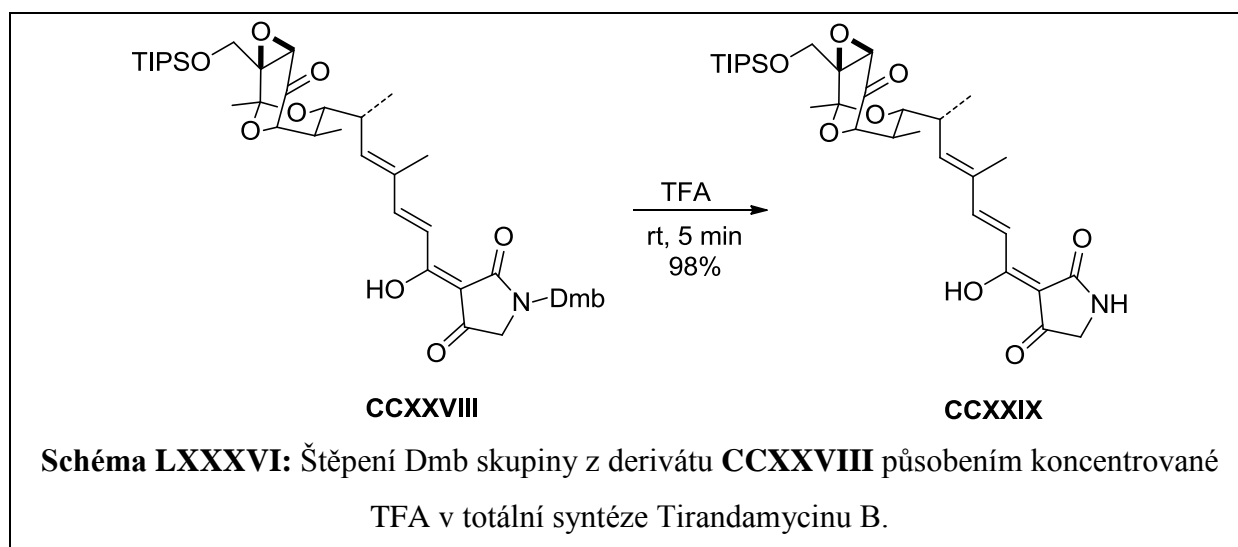
Vlivem kladného mezomerního efektu methoxyskupin se Dmb odstraňuje snáze než PMB. Z mnoha studií je však patrné, že schopnost odštěpit protektivní skupiny je často závislá na použitém substrátu. Nejčtenější odkazy v literatuře uvádějí solvolýzu trifluoroctovou kyselinou, pak jsou to oxidativní metody – nejpobulárnější je DDQ, dalšími možnostmi je použití CAN nebo oxidace peroxodisíranem. Na závěr této kapitoly jsou uvedeny i méně běžné metody – použití fosgeny a fotolýzy.

#### 3.3.2.1 Štěpení působením TFA

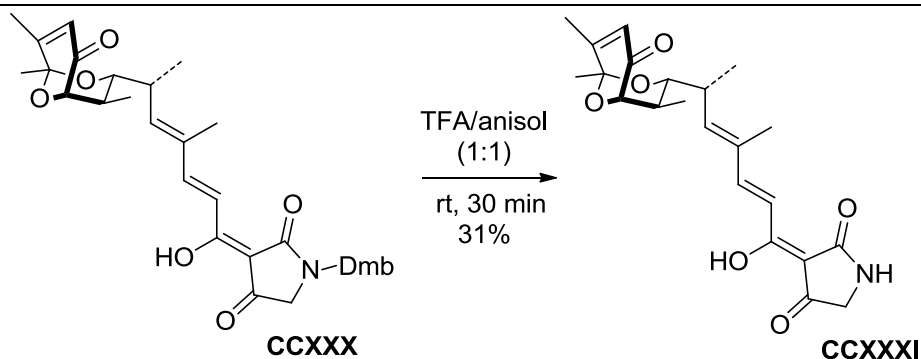
Imamura *et al.*<sup>74</sup> odstranili Dmb chránící skupinu u derivátu **CCXXVI** (Schéma LXXXV) působením koncentrované TFA za vyšší teploty.



Pro odstranění Dmb v totální syntéze Tirandamycinu A používali už v původním provedení Schlessinger *et al.*<sup>83</sup> a DeShong *et al.*<sup>85</sup> koncentrovanou TFA za laboratorní teploty. Zde uvádíme příklad z totální syntézy Tirandamycinu B, kde Shimshock *et al.*<sup>88</sup> již za 5 minut docílili odštěpení Dmb (Schéma LXXXVI). Zjistili, že dlouhodobější vystavení sloučeniny **CCXXVIII** koncentrované TFA vede nejen k odštěpení Dmb, ale částečně se štěpila i silylová chránicí skupiny TIPS. Zároveň však docházelo k zásadní dekompozici cílové látky, a tak autoři nejprve štěpili Dmb a teprve poté odchránili TIPS působením TBAF.

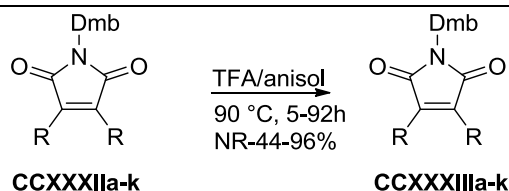


V totální syntéze Tirandamycinu C (**CCXXXI**, Schéma LXXXVII) použili Chen *et al.*<sup>89</sup> k odstranění Dmb systém TFA/anisol.

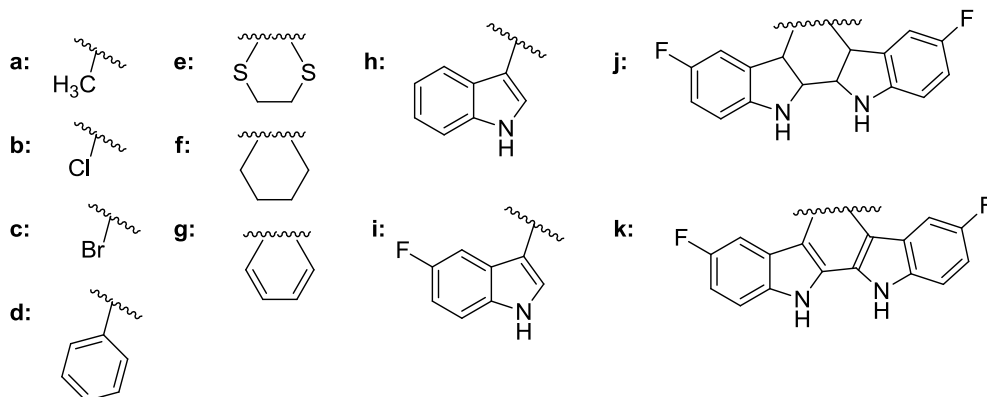


**Schéma LXXXVII:** Štěpení Dmb skupiny z derivátu **CCXXX** působením systému TFA/anisol v totální syntéze Tirandamycinu C **CCXXXI**.

Watson *et al.*<sup>98</sup> sledovali vliv elektronových efektů na kyselé katalyzovanou deprotekcí *N*-2,4-Dmb maleimidů (**CCXXXIIa-k**, Schéma LXXXVIII) systémem TFA/anisol za vyšší teploty. Různá substituce přítomná na maleinimidu (**CCXXXIIa-k**) měla za důsledek různý stupeň deprotektce. K deprotekcí byl v závislosti na substituci potřebný i rozdílný reakční čas. Zatímco deriváty **CCXXXII a, d, e, h, i, k**, potřebovaly 5-92 hodin štěpení, ostatní deriváty **CCXXXII b, c, f, g j** se neštěpily ani při prodloužené reakční době (NR = nereaguje). Autoři shrnují, že zatímco elektron donorové skupiny přítomné na 2,4-Dmb-maleinimidech usnadňují kyselé katalyzovanou deprotekcí, elektron akceptorové skupiny této reakci zabraňují.



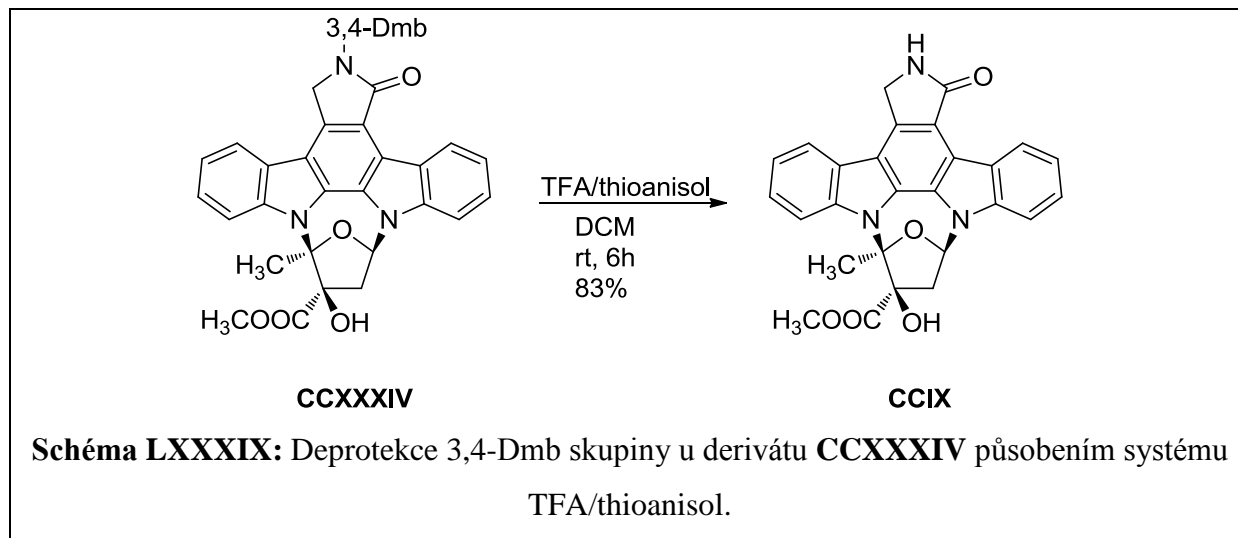
R =



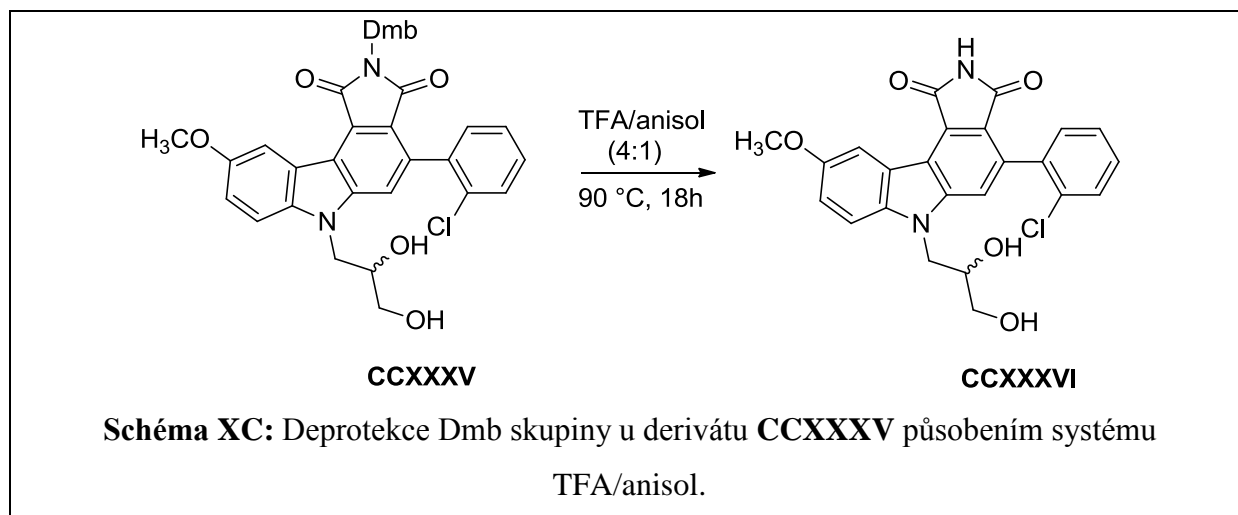
**Schéma LXXXVIII:** Elektronové efekty v kyselé katalyzované deprotekcí Dmb skupiny působením systému TFA/anisol.



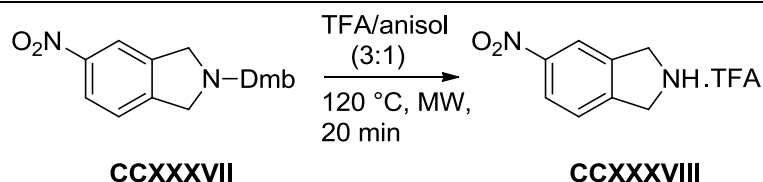
V totální syntéze Staurosporinu a jeho tetrahydrofuranového analogu (**CCIX**, Schéma LXXXIX) použili autoři<sup>90,91,99</sup> pro chránění pyrazolového dusíku 3,4-Dmb. Tuto protektivní skupinu pak odstranili působením TFA/thioanisolu za laboratorní teploty.



V syntéze nových inhibitorů Wee1 kinas (G2 fáze buněčného cyklu) 4-fenylpyrrolokarbazolového typu uplatnili Palmer *et al.*<sup>77</sup> a Smaill *et al.*<sup>100</sup> Dmb chránění pyrazolového dusíku. Protektivní skupinu štěpili systémem TFA/anisol (Schéma XC).

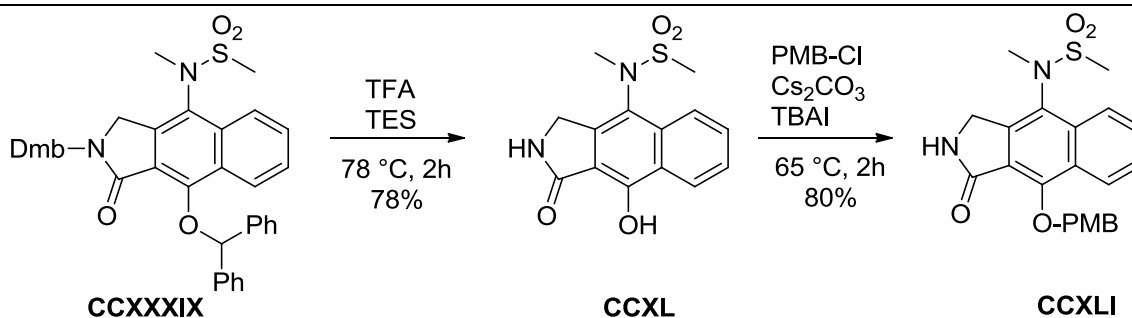


V syntéze nových analgetik na bázi *N*-benzoylisoindolinu použili Congreve *et al.*<sup>50</sup> a Lyons *et al.*<sup>51</sup> štěpící systém TFA/anisol v kombinaci s mikrovlnným zářením (Schéma XCI).



**Schéma XCI:** Deprotekce Dmb skupiny u *N*-benzoylisoindolinu **CCXXXVII** působením systému TFA/anisol v kombinaci s mikrovlnným zářením.

V syntéze tricyklických inhibitorů HIV integrasy štěpili Jin *et al.*<sup>76</sup> *N*-Dmb kyselinou TFA v přítomnosti triethylsilanu (TES). Za těchto podmínek došlo k odmaskování nejen pyrrolového dusíku, ale také fenolické hydroxyskupiny. Ta byla vzápětí ochráněna PMB skupinou reakcí s PMB-chloridem za přítomnosti uhličitanu cesného a tetrabutylammonium jodidu (TBAI). Reakce s PMB-chloridem běžela selektivně na fenolickou hydroxyskupinu (**CCXLI**, Schéma XCII).



**Schéma XCII:** Deprotekce Dmb skupiny u derivátu **CCXXXIX** působením TFA v přítomnosti TES.

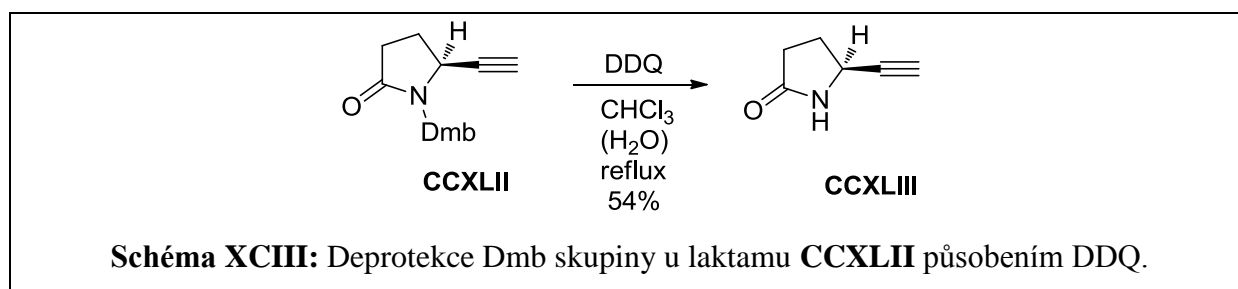
### 3.3.2.2 Oxidativní metody odstranění Dmb

Literature zmiňuje použití tří oxidačních činidel pro odstranění Dmb skupiny z heterocyklu – DDQ, CAN a peroxodisíran draselný.

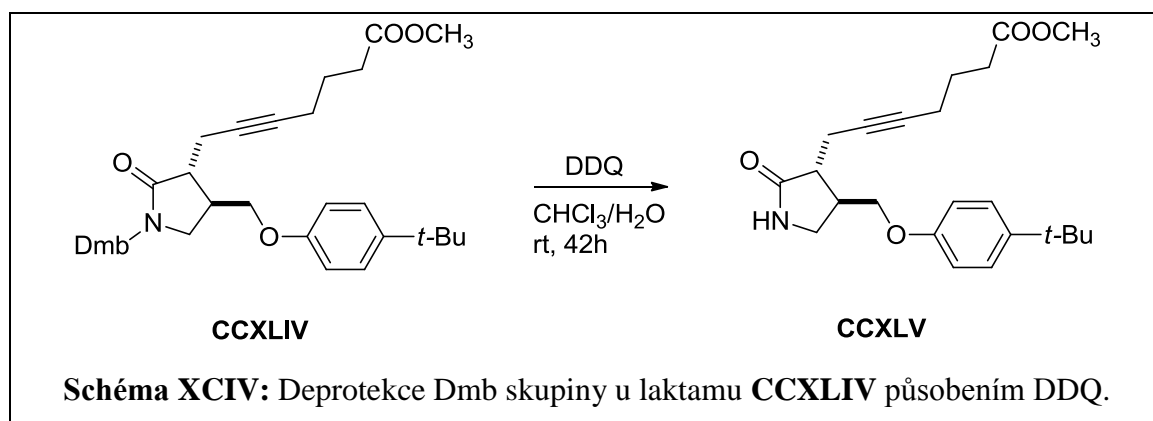
#### 3.3.2.2.1 2,3-Dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinon (DDQ)

K odstranění Dmb skupiny u derivátu **CCXLII** (Schéma XCIII) použili autoři DDQ.<sup>81,101</sup> Tento postup však selhal u prop-1-yn-1-yl analogu.<sup>101</sup> Při volbě vhodného činidla k deprotekcí zvažovali McAlonan *et al.*<sup>81</sup> také TFA, ale ta vedla k rozkladu acetyleny. Při

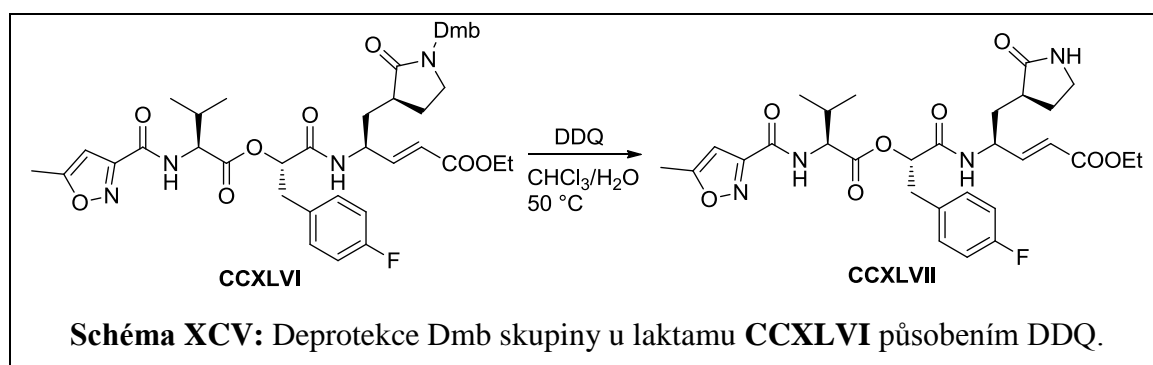
použití vodného CAN sice izolovali kvantitativní množství vedlejšího produktu – Dmb-aldehydu, ale nepodařilo se jim získat sloučeninu **CCXLIII**.



Old *et al.*<sup>73</sup> použili k odmaskování laktamu **CCXLIV** (Schéma XCIV) rovněž DDQ v prostředí chloroform/voda.

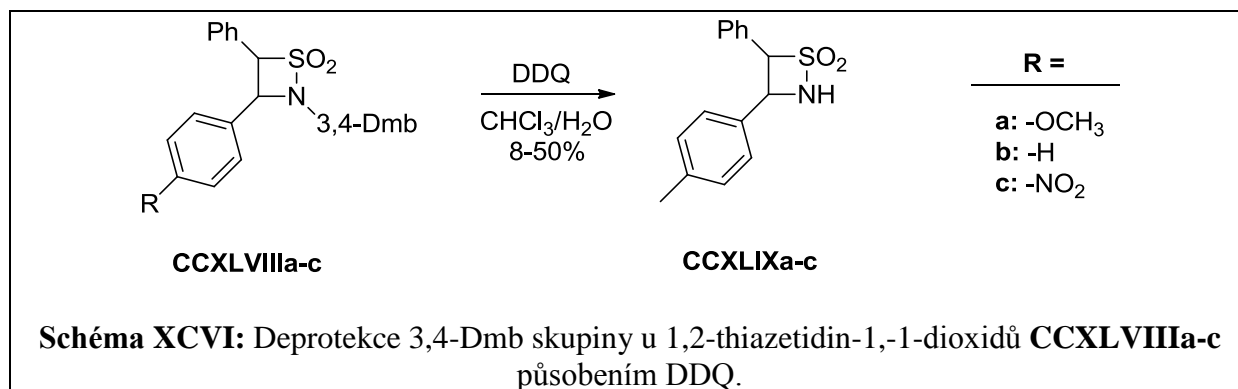


V syntéze ireverzibilních inhibitorů Rhinoviru použili Webber *et al.*<sup>102</sup> k deprotekcí laktamu **CCXLVI** oxidativní odbourání působením DDQ (Schéma XCV).



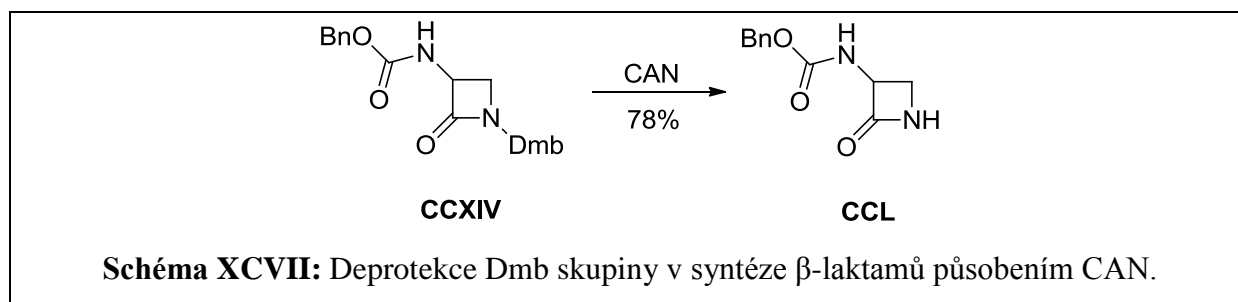
Grunder-Klotz *et al.*<sup>103</sup> studovali DDQ deprotekcí *N*-3,4-Dmb 1,2-thiazetidín-1,1-dioxidů **CCXLVIIIa-b** (Schéma XCVI), důležitých intermediátů v syntéze biologicky aktivních látek.

Deprotekce se snižovala s rostoucím elektron-akceptorním efektem substituentu v para pozici na 3-fenylovém kruhu.



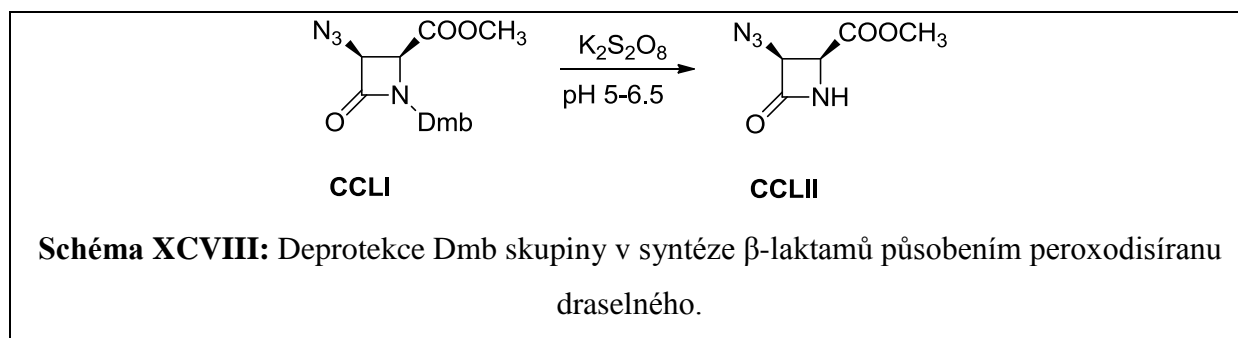
### 3.3.2.2.2 Hexanitrátocéričitan amonný (CAN)

Hexanitrátocéričitan amonný (CAN) použili Overman *et al.*<sup>93</sup> k odstranění Dmb skupiny v syntéze  $\beta$ -laktamů (Schéma XCVII).

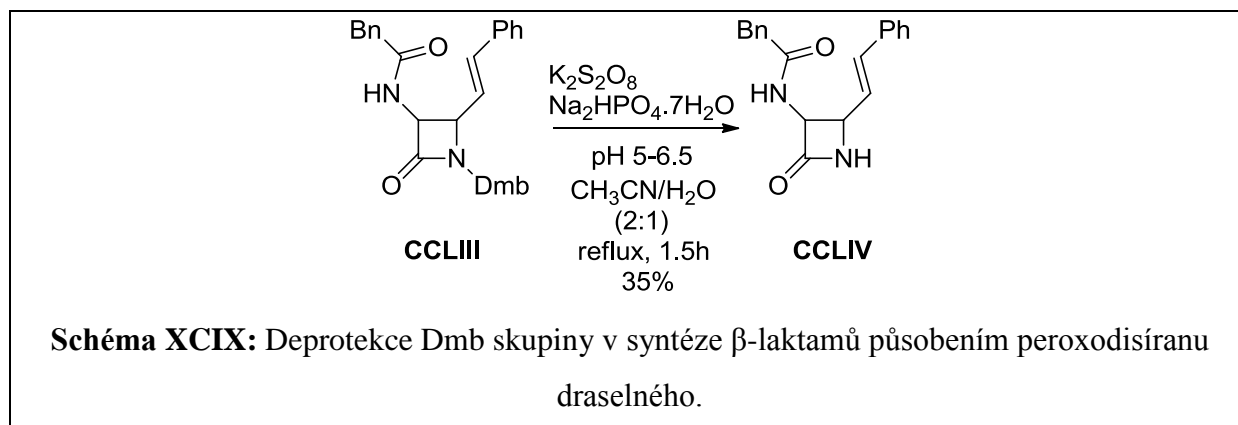


### 3.3.2.2.3 Oxidace peroxodisíranem draselným

V syntéze  $\beta$ -laktamů použili Huffman *et al.*<sup>104</sup> k odstranění Dmb protektivní skupiny oxidativní štěpení peroxodisíranem (Schéma XCVIII).

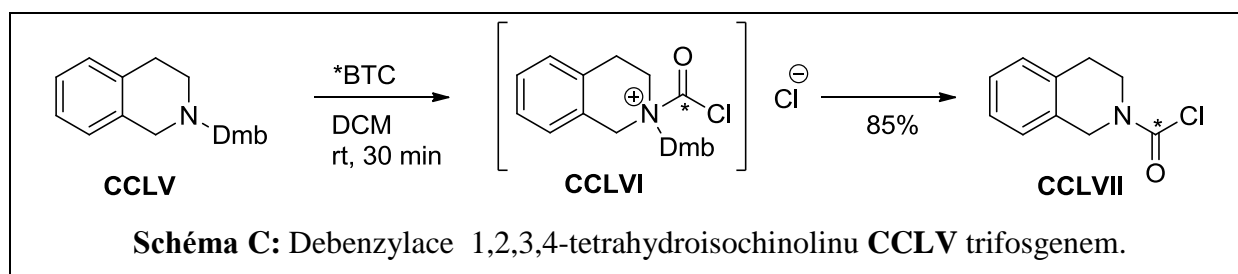


Tyto podmínky odbourání Dmb se osvědčily i u amino- $\beta$ -laktamu **CCLIII** (Schéma XCIX).<sup>105</sup>

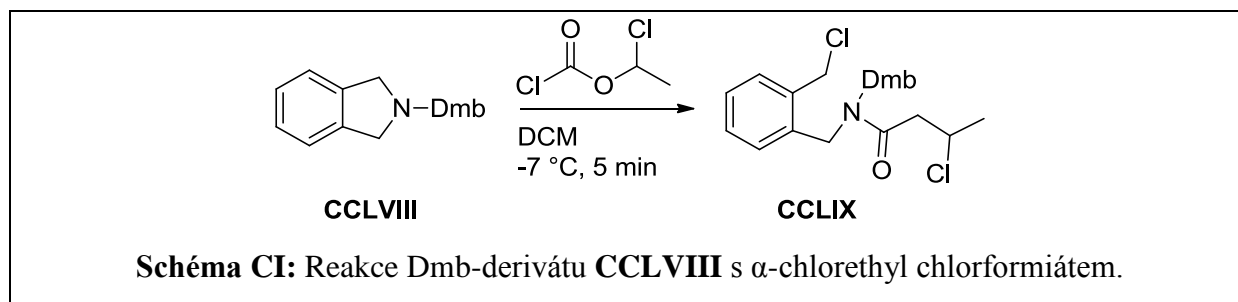


### 3.3.2.3 Méně běžné metody odstranění Dmb skupiny

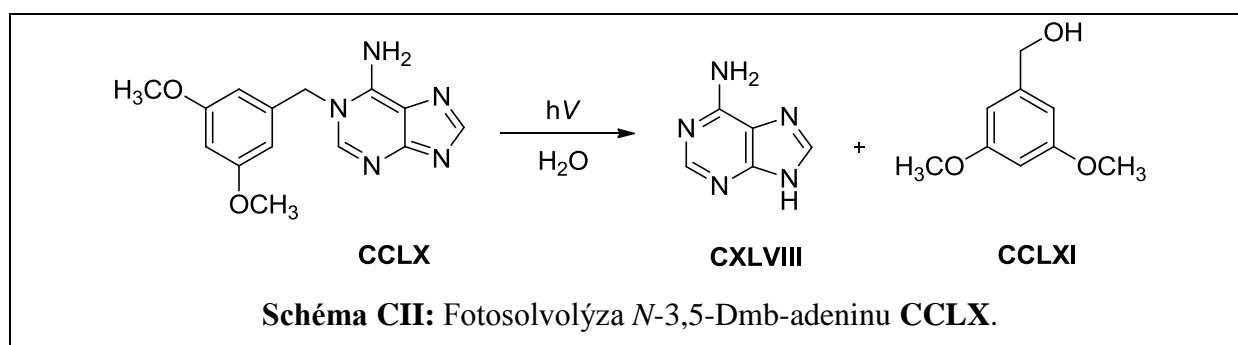
Trifosgenem (BTC) zprostředkovaná debenzylace terciárních aminů běží ve dvou krocích. Trifosgen rychle reaguje s terciárním dusíkem (**CCLV**, Schéma C) za vzniku acyl amonium chloridu (**CCLVI**). Ten se autorům nepodařilo izolovat, je nestabilní a rozkládá se za vzniku karbamoyl chloridu (**CCLVII**). Autoři používali také PMB chránicí skupinu.<sup>79</sup>



V případě derivátu **CCLVIII** (Schéma CI) selhalo kyselé katalyzované štěpení, oxidativní štěpení bylo rovněž neúčinné. Ačkoliv se u analogického PMB-derivátu **CXLI** deprotektace  $\alpha$ -chlorethyl chlorformiátem dařila, zde vznikal kvantitativně úplně jiný derivát **CCLIX**. Chloridový atak na Dmb-uhlík byl zřejmě stítněn  $C^2$  methoxy substituentem.<sup>69</sup>

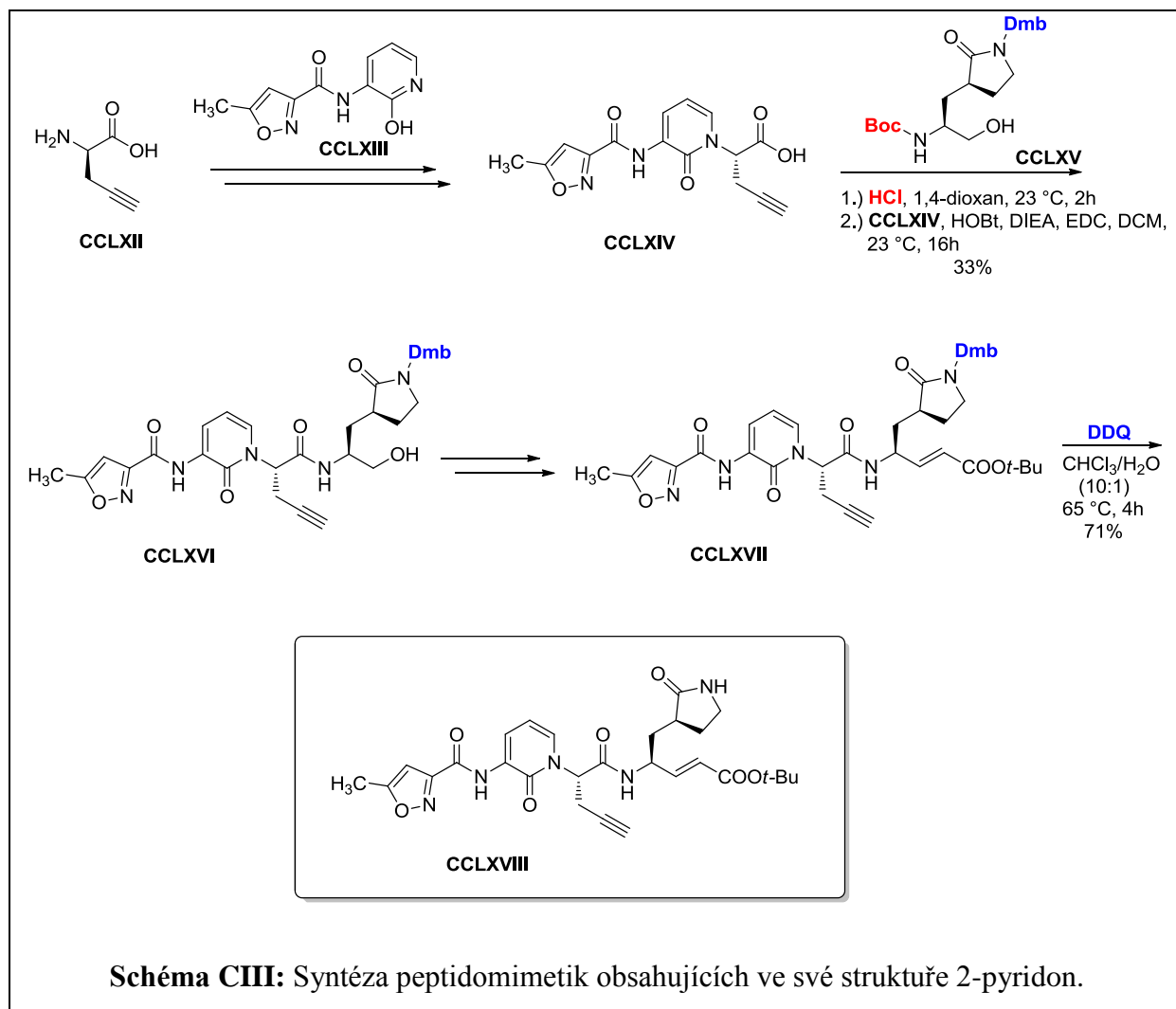


Fotosolvolýzu *N*-3,5-Dmb-adeninů (např. **CCLX**, Schéma CII) studovali Er-Rhaimini et al.<sup>70</sup>

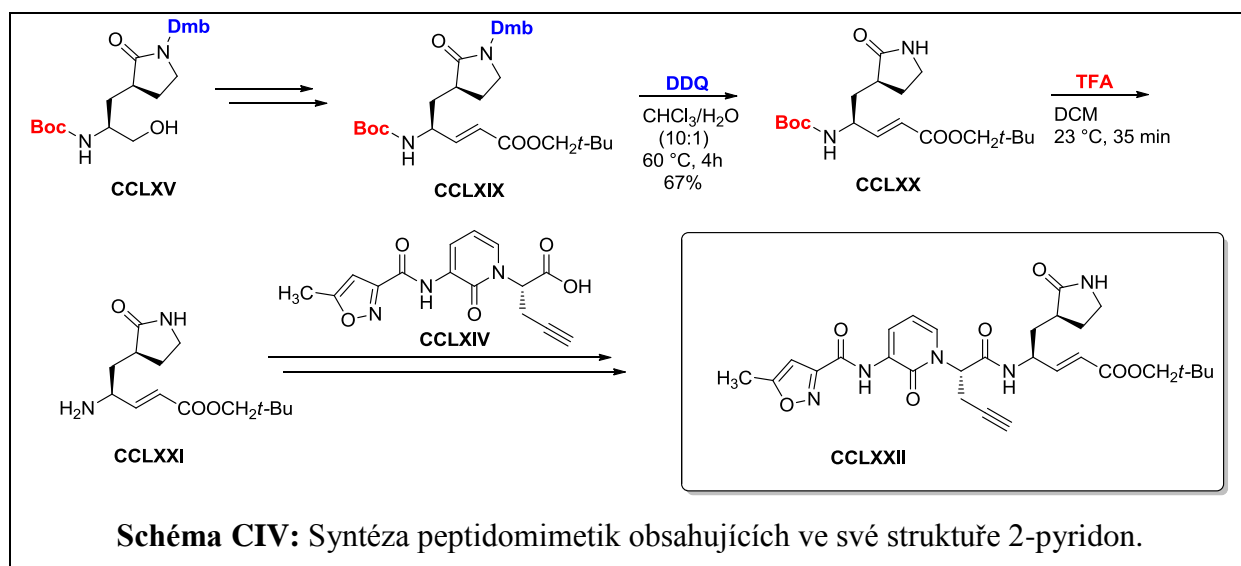


### 3.3.3 Příklady použití Dmb protektivní skupiny v kombinaci s Boc skupinou

Ve farmakologické optimalizaci peptidomimetik obsahujících ve své struktuře 2-pyridon ukázali Dragovich *et al.*<sup>106</sup> selektivní deprotekcí dvou kyselých labilních chránících skupin – Boc a Dmb. Autoři vycházeli v syntéze z komerčně dostupného *D*-propargylglycinu (**CCLXII**, Schéma CIII), který převedli na hydroxyderivát, karboxylovou skupinu esterifikovali, hydroxyskupinu převedli na odpovídající triflát. Takto aktivovaný derivát reagoval s 2-hydroxypyridinem (**CCLXIII**). Produkt kondenzace těchto dvou látek byl ve formě methyl esteru, pro další reakce byl převeden na karboxylovou kyselinu (**CCLXIV**). Následovala reakce s Dmb,Boc-chráněným laktamem **CCLXV**, od kterého byla nejprve Boc skupina kyseliny odštěpena a poté byla tato sloučenina acylována kyselinou **CCLXIV** za vzniku Dmb-chráněného derivátu **CCLXVI**. Ten byl dalšími reakcemi převeden na derivát **CCLXVII**, od kterého byla Dmb skupina odstraněna oxidativně.

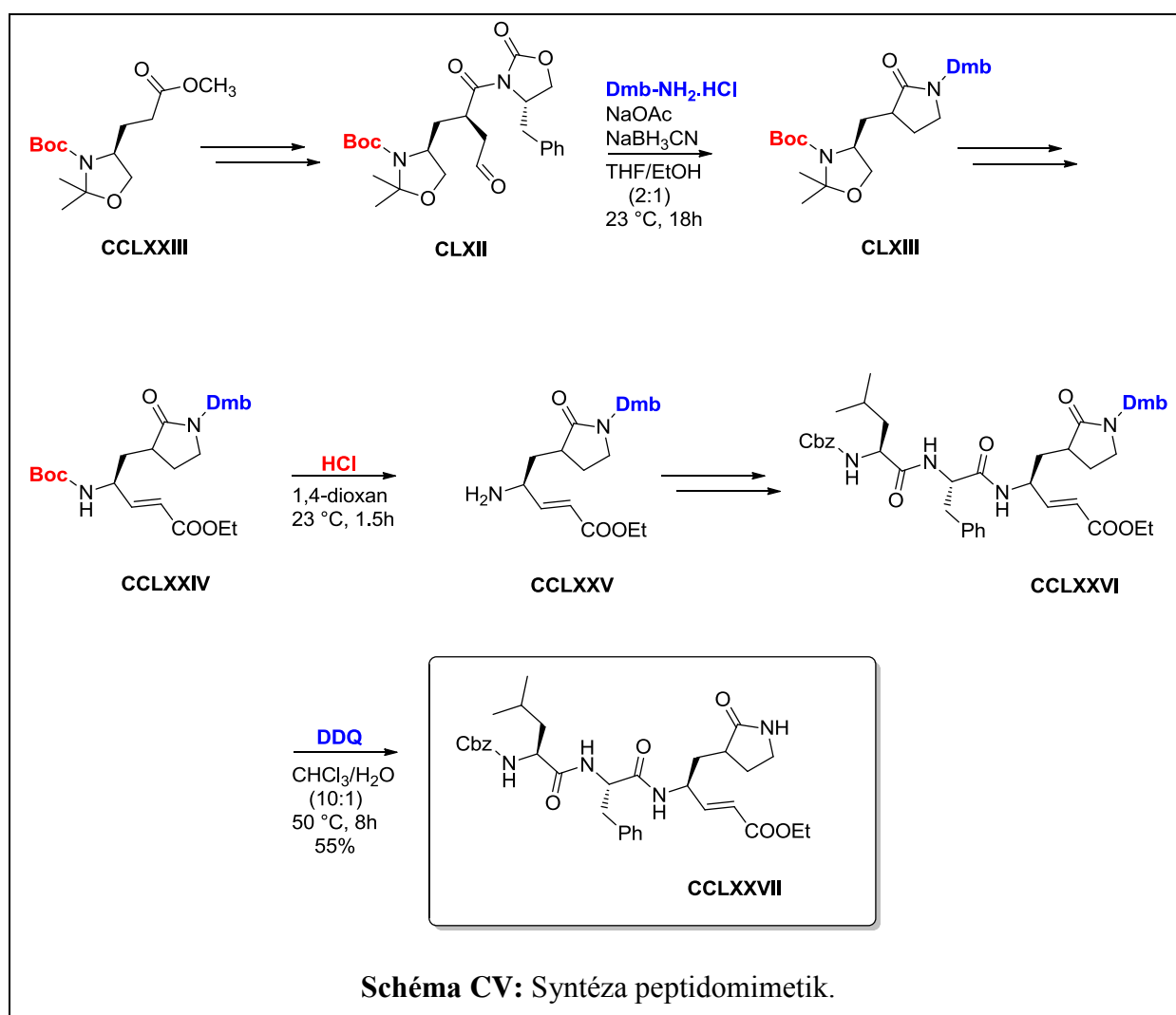


Autoři se v této práci věnovali dále Dmb, Boc-chráněné sloučenině **CCLXV**. Následující syntéza ukazuje nejprve oxidativní odchránění Dmb a následné kyselé odštěpení Boc skupiny (Schéma CIV).



Stejní autoři se této tématice věnovali také v patentu.<sup>107</sup>

Methyl ester od Boc-chráněného oxazolidonu **CCLXXIII** stejní autoři<sup>71</sup> nejprve hydrolyzovali, získanou karboxylovou kyselinu nechali reagovat s 4-benzyl-2-oxazolidinonem a produkt této reakce alkylovali allyl jodidem. Provedli ozonolýzu a získali aldehyd **CLXII** (Schéma CV). Tento aldehyd podrobili reduktivní aminaci s Dmb-aminem za vzniku Dmb,Boc-chráněného derivátu **CLXIII**. Další sérií reakčních kroků získali derivát **CCLXXIV**, od kterého odstranili Boc chránicí skupinu působením kyseliny chlorovodíkové. Následovala acylace vedoucí k derivátu **CCLXXVI**, od kterého byla Dmb protektivní skupina odstraněna oxidací DDQ.

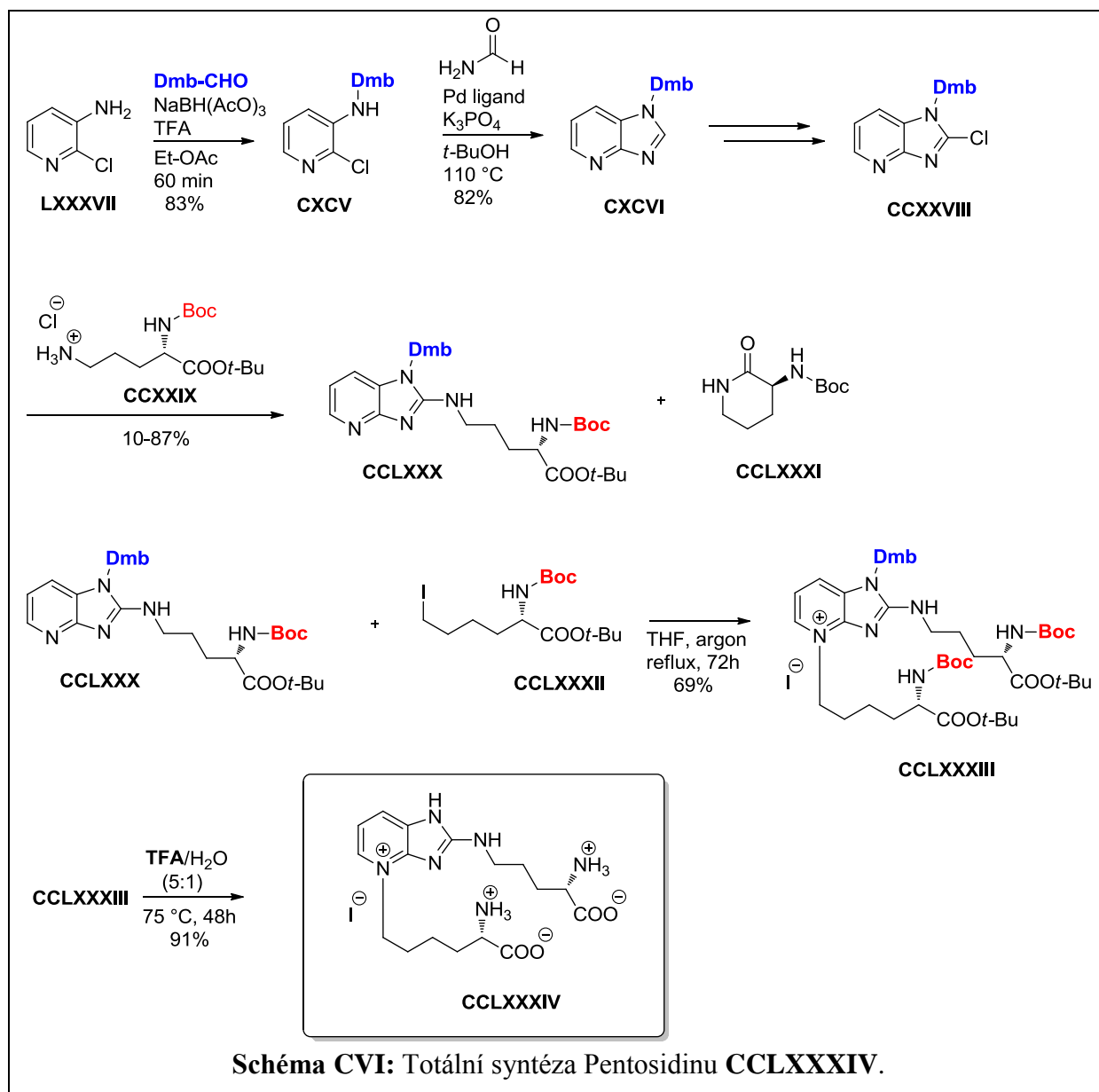


Podobný přístup, tedy kyselou deprotekcí Boc skupiny působením kyseliny chlorovodíkové a oxidativní odbourání Dmb použitím DDQ autoři dále rozvíjeli.<sup>108</sup>

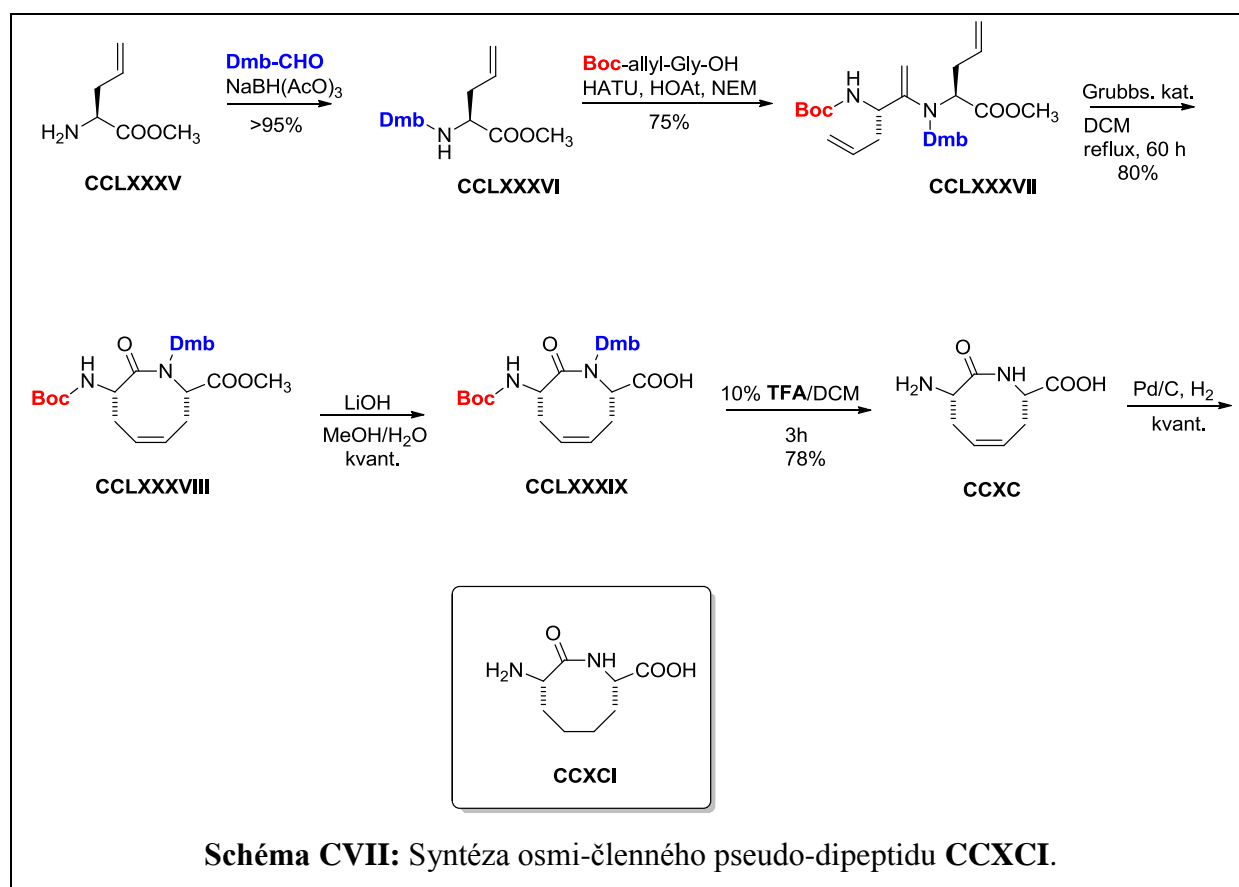


V totální syntéze Pentosidinu (Schéma CVI) Rosenberg *et al.*<sup>82</sup> také používali tyto dvě kyselí labilní skupiny Dmb a Boc. Ale na rozdíl od předchozích příkladů, zde tyto chránící skupiny odštěpili v jediném kroku, působením kyseliny trifluoroctové.

Syntézu začali z komerčně dostupného 3-amino-2-chlorpyridinu (**LXXXVII**). Amino skupinu ochránili reakcí s Dmb-aldehydem za podmínek reaktivní aminace. Za katalýzy paládiem vytvořili imidazo[4,5-*b*]pyridin (**CXCVI**), tuto sloučeninu pak chlorovali do polohy 2 (**CCLXXVIII**). Chlor derivát (**CCLXXVIII**) nechali reagovat ornithinovým zbytkem (**CCLXXIX**). V závislosti na použitých podmínkách této reakce vznikaly látky **CCLXXX** a **CCLXXXI** v různém poměru. Reakcí imidazo[4,5-*b*]pyridin **CCLXXX** s jodidem **CCLXXXII** získali plně ochráněný intermediát **CCLXXXIII**, jehož deprotekcí provedli v jediném kroku záhřevem ve vodné TFA za vzniku Pentosidinu **CCLXXXIV**.



V syntéze osmi-členného pseudo-dipeptidu použili Creighton *et al.*<sup>109</sup> Dmb a Boc chránící skupiny a deprotekcí provedli v jednom kroku zředěnou trifluoroctovou kyselinou. Výchozím materiálem byl methyl ester allyl-glycinu (**CCLXXXV**, Schéma CVII), který za podmínek reaktivní aminace nechali reagovat s Dmb-aldehydem. Následovala acylace Dmb-chráněné amino skupiny Boc-allyl-glycinem. Poté byl uzavřeno osmičlenný cyklus metathesí (**CCLXXXVIII**). Methyl ester byl alkalicky hydrolyzován a poté byly obě chránící skupiny odštěpeny směsí trifluoroctové kyseliny a dichlormethanu. K cílové látce už následovala jen redukce dvojně vazby.



Podobný reakční sled uplatnili v syntéze osmi-členných cyklických pseudodipeptidů také Abell *et al.*<sup>110</sup> Jako výchozí látku použili rovněž allyl-glycin, který nechali reagovat s Dmb-aldehydem. Finální deprotekcí provedli zředěnou 20% trifluoroctovou kyselinou v dichlormethanu.

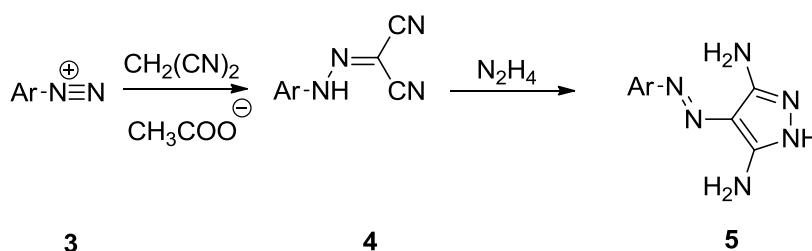
## 4 Výsledky a diskuse

Kapitola pojednává o syntéze nízkomolekulárních látek, které byly připraveny primárně za účelem biologického testování. V dalších ohledech se ale předkládané látky podstatně liší - chemickou strukturou i sledem chemických reakcí, které k nim vedly. Zjednodušeně by bylo možné připravené sloučeniny rozdělit do dvou různých celků – syntéza pyrazolů a bicyklických sloučenin. Bicykly byly syntetizovány s použitím nástroje, který je charakteristický pro kombinatoriální chemii, byly připraveny na pevné fázi. Naproti tomu reakce vedoucí k pyrazolům byly prováděny převážně v roztoku. Ale i některé zde popisované pyrazoly byly připraveny na pevné fázi.

Tato kapitola je rozčleněna do pěti částí, začíná prekurzory pyrazolů, dále jsou diskutovány na pyrazolovém dusíku nesubstituované a chráněné pyrazoly jako druhá podkapitola, následují acylované pyrazoly, které jsou ještě podrobněji rozděleny na základě toho, kde se substituent nachází. Všechny tyto tři oddíly řeší syntézu látek v roztoku. Podkapitola o pyrazolech na pevné fázi tvoří v této práci jakýsi přechod mezi roztokovou chemií a syntézou na pevné fázi. Celá kapitola je pak uzavřena syntézou bicyklických sloučenin, rovněž na pevné fázi.

### 4.1 Prekurzory pyrazolů

Deriváty 4-(aryldiazenyl)-pyrazol-3,5-diaminů (**5**) je možné získat zahříváním příslušných hydrazonů (**4**) s methanolickým roztokem hydrazinu monohydrátu (Schéma 1). Hydrazony lze připravit diazotací odpovídajících aromatických aminů a následnou reakcí s malononitrilem ve vodném roztoku octanu sodného.<sup>111</sup>



**Schéma 1:** Obecné schéma syntézy 4-arylazo-3,5-diaminopyrazolů (**5**).

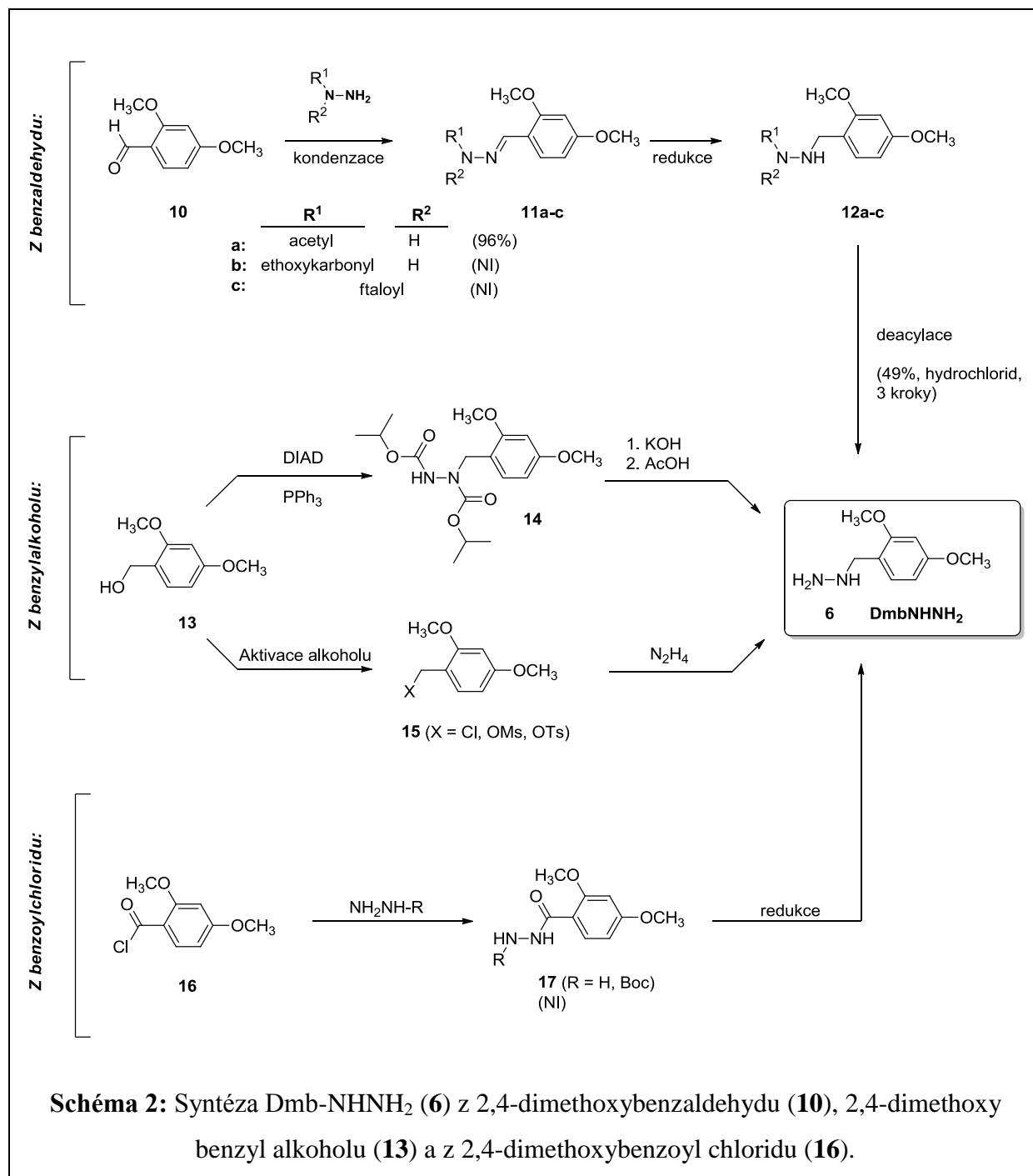
Pro přípravu pyrazolů byl v této práci zvolen cykloadiční mechanismus reakce hydrazinu s hydrazonomalononitrily. V této kapitole je diskutována syntéza čtyř derivátů, stavebních

kamenů pyrazolů – dvou substituovaných derivátů hydrazinu Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**) a TMB-NHNH<sub>2</sub> (**7**) a dvou hydrazonů TIPS-hydrazonu (**8**) a pyridin-hydrazonu (**9**).

#### 4.1.1 Syntéza 2,4-dimethoxybenzylhydrazinu (Dmb-NHNH<sub>2</sub>) **6**

Vedle pyrazolů, které byly na endocyklickém dusíku pyrazolu nesubstituované, byly pro další syntézu vyžadovány pyrazoly chráněné – na endocyklickém dusíku či na fenolické hydroxy skupině, pokud arylem azo-pyrazolu byl fenol. Pro syntézu 3,5-diamino pyrazolů substituovaných na amino skupině bylo bezpodmínečně nutné zajistit protekci pyrazolového dusíku, což je nejreaktivnější část molekuly, nejvíce náchylná na acylační reakce. Zároveň bylo třeba, aby protektivní skupina byla stabilní pro následné acylace, ale také snadno odštěpitelná pro syntézu finálních látek, již bez protektivních skupin. Byly zvoleny PMB (4-methoxybenzyl),<sup>56</sup> Dmb (2,4-dimethoxybenzyl)<sup>112</sup> a TMB (2,4,6-trimethoxybenzyl)<sup>113</sup> pro svou labilitu v kyselém prostředí a tedy jejich možnost deprotektce za těchto podmínek, ale především pro jednoznačnost chránění pyrazolu v poloze 1. Tato jednoznačnost byla zajištěna tím, že byly součástí substituovaného hydrazinu. Kdyby byla chránící skupina do molekuly zakomponována až ve stádiu pyrazolu, jedná se o velmi složitý tautomerní systém s více funkčními skupinami se srovnatelnou reaktivitou, rovněž určení polohy substituce na 3,5-diaminoazopyrazolu pomocí NMR je komplikované. Proto byl přístup zahrnující substituovaný hydrazin tak výhodný.

Pro přípravu Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**) je možné aplikovat řadu přístupů, v rámci této práce byly vyzkoušeny následující postupy, jak ilustruje Schéma 2.



#### 4.1.1.1 Kondenzace 2,4-dimethoxybenzaldehydu s acetohydrazidem, *N*-aminoftalimidem nebo s ethyl-karbazátem

Nabízí se sled reakcí, který naznačuje první řádek Schématu 2, vycházející z benzaldehydu (**10**). Ten kondenzací s acetohydrazidem poskytuje derivát (**11a**, 96%), kde redukcí dvojně vazby mezi N a C vzniká z benzylidenu (**11a**) benzyl (**12a**, NI = nebylo izolováno), a pak

odstranění acetylu vede ke vzniku požadovaného Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**, 49% ve formě hydrochloridu, 3 reakční kroky).

Kondenzace aromatického aldehydu s derivátem hydrazinu se může provádět za podmínek refluxování v ethanolu.<sup>114</sup> Reakce benzaldehydu (**10**) s acetohydrazidem běžela bez problému v methanolu, kde jsou obě výchozí látky dobře rozpustné. Refluxováním 2 h byl získán produkt (**11a**), který se už při chladnutí reakční směsi na laboratorní teplotu srážel ve formě bílých krystalků.

V syntéze se dále pokračovalo, většinou nebyl výsledek kondenzace benzaldehydu (**10**) s derivátem hydrazinu izolován, jen byl zkontrolován průběh reakce analýzou LC-MS. Dvojná vazba pak byla redukována vodíkem za podmínek katalytické hydrogenace, jako katalyzátor bylo vybráno paladium na uhlíku. Protože derivát (**11a**) už byl hůře rozpustný a srážel se z reakční směsi, bylo nutné přidat další rozpouštědla – směs methanolu a tetrahydrofuranu.

Také byla zkoušena katalytická hydrogenace s přidavkem katalyzátoru Pd(C) za přítomnosti hydrazinu ve směsi rozpouštědel THF/MeOH. Za těchto podmínek vznikal nejen požadovaný produkt a to jen minimálně, zůstávala ale i výchozí látka a dokonce se tvořil azin.

Vedle katalytické hydrogenace byla pozornost věnována rovněž jiným možnostem redukce. Byly vyzkoušeny podmínky reduktivní aminace<sup>115</sup> s použitím triacetoxyborohydridu sodného s přidavkem kyseliny octové v suchém THF nebo DMF – nereagovalo. Při analogickém použití NaBH<sub>4</sub> za podmínek reduktivní aminace redukce běžela čistě, ale ani po týdnu a při zahřevu na 60 °C nebyl poměr látky redukované a oxidované ani 1:1, stále převládala výchozí látka. Ještě byl vyzkoušen další komplexní hydrid NaBH<sub>3</sub>CN<sup>116</sup> rovněž při zahřevu na 60 °C, již za 24 h byla výchozí látka zcela převedena na redukovaný produkt, který však obsahoval nečistoty. Nakonec byla pro syntézu Dmb-hydrazinu zvolena katalytická hydrogenace za přítomnosti vodíku, protože reakce běžela relativně čistě.

Dalším úkolem bylo odstranění acetylové skupiny chránící hydrazin. Zpočátku byla zkoušena alkalická hydrolyza přidavkem pevného hydroxidu sodného, který byl v reakční směsi rozpuštěn ultrazvukem. Průběh reakce byl sledován na LC-MS a TLC. Byly hledány optimální reakční podmínky – za laboratorní teploty, zahřev na 50 °C, prodloužení reakční doby na několik dní, nereagovalo. Nakonec byla v přístupu změněna alkalická hydrolyza za hydrazinolýzu pomocí hydrazin hydrátu bez rozpouštědla. Finální derivát byl extrahován do ethyl-acetátu a srážen roztokem methanolickeho chlorovodíku za vzniku Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**) ve formě hydrochloridu (49%, po 3 reakčních krocích), který se pro další syntézu pyrazolu snadno převedl na volný hydrazino derivát přidavkem báze.

Zdrojem hydrazinu pro Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**) nemusel být jen acetohydrazid ale také *N*-aminofthalimid.<sup>117</sup> Když byla kondenzace aminu s aldehydem prováděna v methanolu, reakce probíhala v suspenzi a vznikala směs látek.

Dalším zdrojem hydrazinu byl ethyl-karbazát.<sup>118,119</sup> Kondenzace s aldehydem proběhla bez problému, stejně tak redukce vodíkem za katalýzy Pd(C). Redukce byla kompletní již za dvě hodiny. Poté byl katalyzátor odsát a k filtrátu byl přidán chlorovodík rozpuštěný v metanolu jako hydrolytické činidlo. Hydrolyza ethoxykarbonylu se však nedařila za laboratorní teploty ani při záhřevu na 50 °C.

#### **4.1.1.2 Dmb-NHNH<sub>2</sub> z 2,4-dimethoxybenzylalkoholu**

Benzylalkohol (**13**, Schéma 2) může být také prekurzorem pro Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**). Nabízí se zde vyzkoušet reaktivitu diethyl azodikarboxylátu (DIAD) s benzylalkoholem za podmínek Mitsunobu reakce. Další možností, jak vycházet z alkoholu, je jeho převedení na aktivovanější derivát (chlorid, mesyl, tosyl) a pak reakce s hydrazinem.

##### **4.1.1.2.1 Mitsunobu reakce**

Mitsunobu reakce primárně slouží k syntéze esterů z kyselin a alkoholů v přítomnosti DIAD, který váže vodík, a trifenylofosfinu (PPh<sub>3</sub>), u něhož se využívá jeho afinita ke kyslíku.<sup>120,121</sup> V přítomnosti kyseliny může vznikat nechtěný vedlejší produkt – derivát hydrazinu, byla snaha to v této práci využít (druhý řádek Schématu 2).

Reakce však vedla k bohatým směsím, a tak tento přístup nebylo možné v této syntéze použít.

##### **4.1.1.2.2 Převedení alkoholu na aktivovanější derivát**

Hydroxy skupina benzylalkoholu (**13**, Schéma 2) může být nukleofilně substituována hydrazinem, ale nejprve je třeba ji příslušně aktivovat. Bylo zvoleno převedení na chlorid různými chloračními činidly, případně je zde možné převedení na mesylát či tosylát. Následná reakce s hydrazinem by pak poskytla Dmb-NHNH<sub>2</sub> (**6**).

Pro zavedení chloru se pro tento typ reakcí se nejčastěji používá thionyl chlorid, který může sám fungovat jako rozpouštědlo,<sup>122-124</sup> nebo reflux probíhá v jiném rozpouštědle s přidavkem SOCl<sub>2</sub>. Literatura uvádí například benzen,<sup>125</sup> směs pyridinu a benzenu,<sup>126</sup> nebo chlorovaná rozpouštědla dichlormethan<sup>127,128</sup> a chloroform.<sup>129</sup> Pokud se jako chlorační činidlo používá koncentrovaná kyselina chlorovodíková,<sup>130</sup> vyžaduje reakce chlazení.

V rámci disertační práce byla chlorace prováděna thionyl chloridem v chloroformu, v dichlormethanu a *N,N*-dimethylanilinu, v samotném thionyl chloridu, koncentrovanou

kyselinou chlorovodíkovou jako chloračním činidlem, kyselinou chlorovodíkovou s etherem či methanolem, methanolem nasyceným plynným chlorovodíkem. Získané produkty se ale z důvodu omezené rozpustnosti nedařilo dostatečně charakterizovat. Proto byla pozornost obrácena k reakcím s mesyl a tosyl chloridem. Po odpaření rozpouštědla byl reziduát rozpuštěn v methanolu a k tomuto roztoku byl přidán hydrazin monohydrát. Výsledkem byla směs látek, požadovaný produkt se nepodařilo připravit, proto byly studovány jiné syntetické postupy vedoucí k Dmb-NHNH<sub>2</sub>.

#### **4.1.1.3 Z 2,4-dimethoxybenzoyl-chloridu na hydrazid a následná redukce**

Acyl chloridy poskytují reakci s hydrazinem příslušné hydrazidy. Literatura uvádí syntézu 4-methoxybenzoylhydrazidu z odpovídajícího chloridu půl hodinovým refluxováním v methanolu s hydrazin monohydrátem.<sup>131</sup>

V této práci se vycházelo z komerčně dostupného 2,4-dimethoxybenzoyl chloridu (**16**, Schéma 2) a hydrazin monohydrátu a také z hydrazinu substituovaného Boc skupinou. Jako rozpouštědla byla v případě hydrazin monohydrátu používána: methanol, který vedl k čistému hydrazidu, dále se jednalo o THF, kde vznikal převážně diacylhydrazid. Reakce s Boc-hydrazinem byla provedena v suchém THF a vznikal čistý produkt, od kterého bylo možné odštěpit Boc skupinu zředěnou TFA.

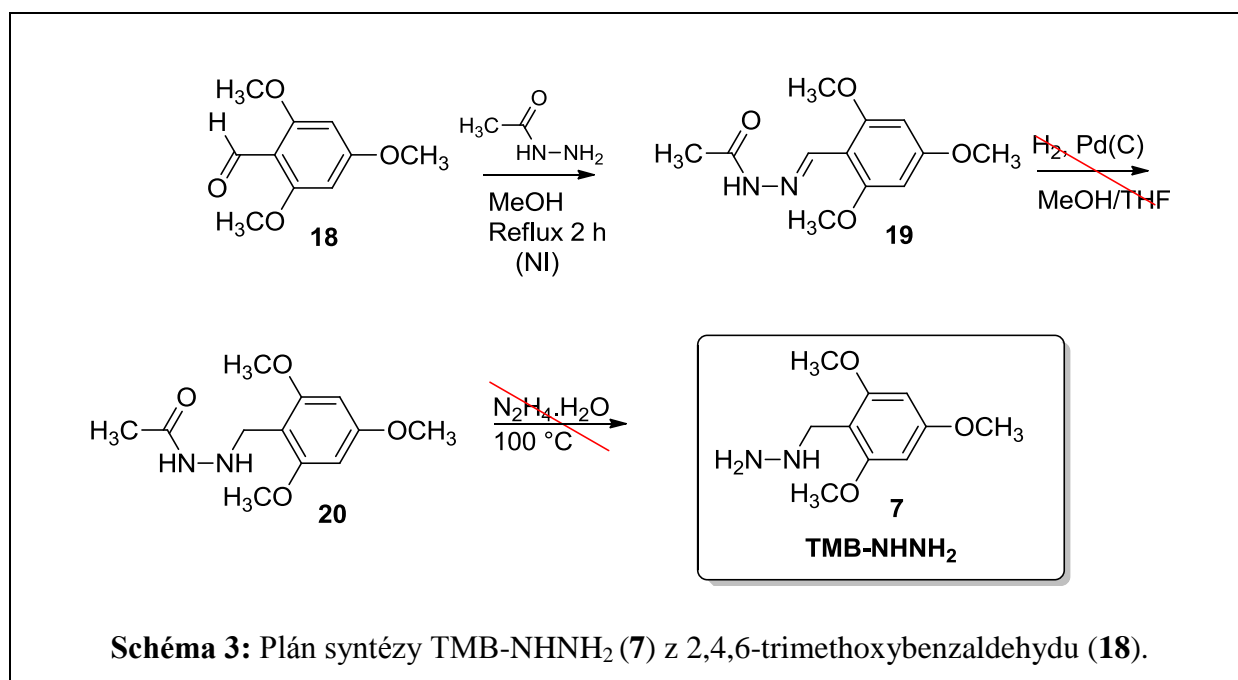
Jako redukční činidla pro redukcí karbonylu na methylen byly používány komplexní hydridy. Jednalo se o lithium aluminium hydrid (LAH)<sup>129,132</sup> a také boran-tetrahydrofuran komplex (BH<sub>3</sub>/THF).<sup>133</sup> Reakce s komplexními hydridy byly provedeny v suchém dimethoxyethanu (DME). V něm byl rozpuštěn LAH, tento roztok byl ochlazen na 0-5 °C a byl k němu přidán roztok acyl hydrazidu v DME. Reakční směs byla zahřívána při teplotě 60 °C. Po více než 24 h redukce stále nebyla kompletní, vznikala směs látek, dle LC-MS byl detekován dokonce i diacyl derivát. Reakce byla modifikována následujícími experimenty: změna rozpouštědla za suchý THF za laboratorní teploty a zvýšené teplotě při 60 °C. Redukce probíhala pomalu a nevznikal výhradně požadovaný produkt, ale i další látky, které se nepodařilo identifikovat. Bylo vyzkoušeno ještě další redukční činidlo – BH<sub>3</sub>/THF, ale rovněž to nevedlo k úspěchu, od tohoto přístupu bylo tedy upuštěno.

#### **4.1.2 Syntéza 2,4,6-trimethoxybenzylhydrazinu (TMB-NHNH<sub>2</sub>) 7**

Zatímco PMB protektivní skupina se v TFA štěpí neochotně a je třeba záhřevu, Dmb se štěpí již za laboratorní teploty.<sup>134</sup> Předpokládali jsme, že TMB skupina, obsahující tři methoxy skupiny, se díky mezomernímu efektu bude odstraňovat ještě snáze než Dmb a PMB. Proto



byla vybrána jako protektivní skupina pro syntézu pyrazolů acylovaných na aminoskupině a pokus o přípravu TMB-NHNH<sub>2</sub> (7) byl proveden analogicky jako u Dmb-NHNH<sub>2</sub> (6).



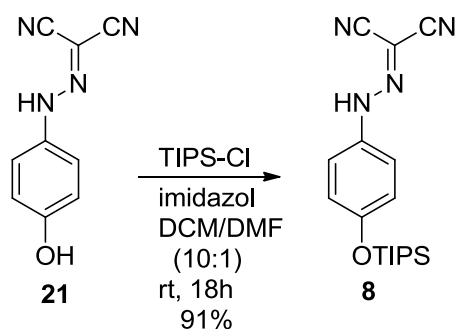
**Schéma 3:** Plán syntézy TMB-NHNH<sub>2</sub> (7) z 2,4,6-trimethoxybenzaldehydu (18).

Pro získání TMB-NHNH<sub>2</sub> (7) byla aplikována analogická syntéza, která se ukázala být efektivní pro přípravu derivátu se dvěma methoxyskupinami. Kondenzace 2,4,6-trimethoxybenzaldehydu (18, Schéma 3) s acetohydrazidem proběhla čistě na derivát (19). Po redukci však nebyl detekován derivát 20. Na základě LC-MS zřejmě došlo ke spojení dvou molekul TMB, acetylová skupina však zůstala. Přídavkem hydrazinu pak se acetyl odštěpil. Látky nebyly izolovány (NI), struktury jsou předpokládány na základě LC-MS analýz z reakčních směsí.

Příprava TMB-NHNH<sub>2</sub> (7) nebyla více studována, pro syntézu acylovaných pyrazolů na aminoskupině byl nakonec používán Dmb-NHNH<sub>2</sub> (6).

#### 4.1.3 Syntéza (4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)karbonohydrazonoyl dikyanidu (TIPS-hydrazonu) 8

Triisopropylsilylová skupina (TIPS) se na hydroxy skupinu navazuje nejčastěji reakcí s TIPS-Cl, v přítomnosti imidazolu a jako rozpouštědlo se doporučuje DMF.<sup>135</sup> Zavedením chránicí skupiny TIPS do molekuly hydrazonu bylo zajištěno, že hydroxy skupina nebude podléhat acylačním reakcím v následných reakčních krocích. Odstranění TIPS-u je pak možné působením TBAF.<sup>136</sup>

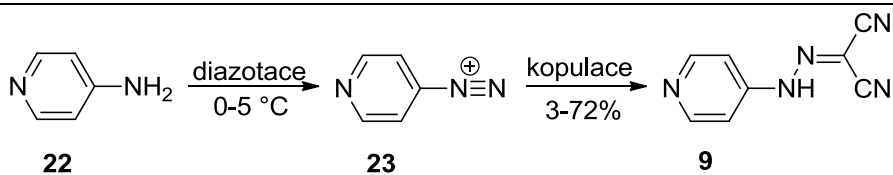


**Schéma 4:** Silylace hydrazonu **21** za vzniku TIPS-hydrazonu **8**.

Reakce byla provedena podle literatury v přítomnosti imidazolu v DMF. Vše bylo dobře rozpuštěno, ale reakce za 18 h míchání za laboratorní teploty nedoběhla do konce, poměr (výchozí látka **21**) : (produkt **8**) byl cca. 2:3. Když byla použita směs rozpouštědel DCM/DMF (10:1), podařilo se izolovat čistou látku **8** (91%), kterou bylo možné krystalovat z methanolu (59%).

#### 4.1.4 Syntéza pyridin-4-ylkarbonohydrazonoyl dikyanidu (pyridin-hydrazonu) **9**

Příprava derivátu **9** sestává ze dvou kroků – diazotace aminu (**22**) a kopulace vzniklé diazoniové soli (**23**) s malonodinitrilem (Schéma 5). Diazotace 4-aminopyridinu (**22**) probíhá bouřlivě. Při klasickém průběhu chlazení 30 min dochází k úniku dusíku, protože příslušná diazoniová sůl (**23**) je velmi nestabilní. Následkem je pak nízký výtěžek **9** (3%). Byla provedan optimalizace této reakce, modifikace byly následující. Doba diazotace se zkrátila na 5 min. Tímto výtěžek vzrostl na 9%, což bylo stále málo. Proto byl zvolen přístup zahrnující vznik stabilnější diazoniové soli<sup>137</sup> a diazotace byla provedena v přítomnosti tetrafluoroborátu sodného.<sup>138</sup> Měnilo se množství NaBF<sub>4</sub> i reakční čas diazotace (Tabulka 1). Jako nejvhodnější podmínky pro další syntézu byly vybrány podmínky experimentu číslo 6 (12 eq NaBF<sub>4</sub>).



**Schéma 5:** Syntéza pyridin-4-ylkarbonohydrazonoyl dikyanidu **9**.

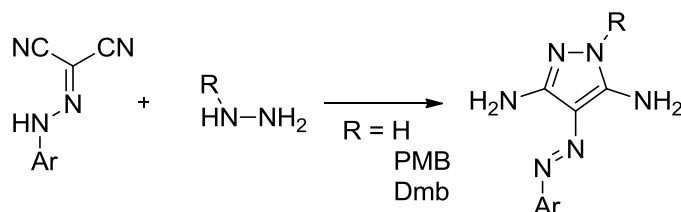
**Tabulka 1:** Optimalizace diazotace 4-aminopyridinu.

Experiment číslo	NaBF <sub>4</sub> [ekvivalenty]	Výtěžek [%]	Doba diazotace [min]
1	-	3	30
2	-	9	5
3	3	18	5
4	6	22	15
5	6	58	5
6	12	62	5
7	60	72	5

## 4.2 Nesubstituované a chráněné pyrazoly

V této části disertační práce jsou diskutovány syntézy pyrazolů, které jsou na endocyklickém dusíku nesubstituované (TIPS-pyrazol **24** a pyridin-pyrazol **25**), dále pyrazolů, které mají na tomto dusíku protektivní skupinu (Schéma 6).

Protektivní skupina může být na pyrazol navázána prostřednictvím substituovaného hydrazinu (PMB-NHNH<sub>2</sub>, Dmb-NHNH<sub>2</sub> **6**; pak se jedná o tyto pyrazoly: PMB-pyrazol **26**, Dmb-pyrazol **29**, Dmb-pyridin-pyrazol **30**). Stejně jako u nesubstituovaných pyrazolů byly tyto látky připraveny cykloadiční reakcí substituovaného hydrazinu a příslušného hydrazonu (Schéma 6).

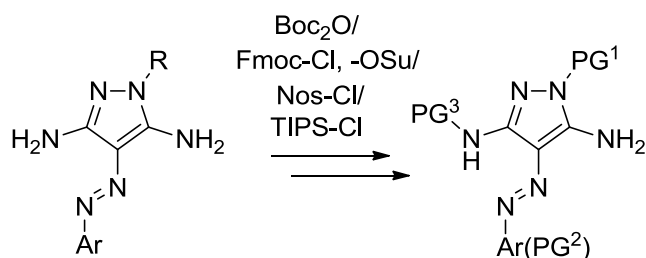


**Schéma 6:** Zjednodušené reakční schéma syntézy nesubstituovaných a chráněných pyrazolů, protektivní skupina se zavádí reakcí s hydrazonem.

Chránicí skupina může být do molekuly zavedena také dodatečně, ve stádiu pyrazolu (Schéma 7), který reagoval s di-*t*-butyl-dikarbonátem (Boc-pyrazol **36**, Boc-TIPS-pyrazol **38**, Boc-pyridin-pyrazol **39**, PMB-Boc-pyrazol **27**, Dmb-Boc-pyrazol **31**, diBoc-pyrazol **37**), Fmoc chloridem nebo Fmoc-Osu (**34**), Nosyl chloridem (**33**, **35**), TIPS-chloridem (**24**).

Pro lepší přehlednost je tato kapitola rozdělena do čtyř částí: pyrazoly na endocyklickém dusíku nesubstituované (4.2.1), PMB-pyrazoly a jejich reaktivita (4.2.2), Dmb-pyrazoly a jejich reaktivita (4.2.3), reakce nesubstituovaných a chráněných pyrazolů s di-*t*-butyl-

dikarbonátem (4.2.4). Všechny zde diskutované pyrazoly jsou pro lepší orientaci čtenáře uvedeny v Tabulce 2, kde je připojeno i jejich rozdělení do příslušných kapitol



**Schéma 7:** Zjednodušené reakční schéma syntézy chráněných pyrazolů, kdy se protektivní skupina zavádí ve stádiu pyrazolu.

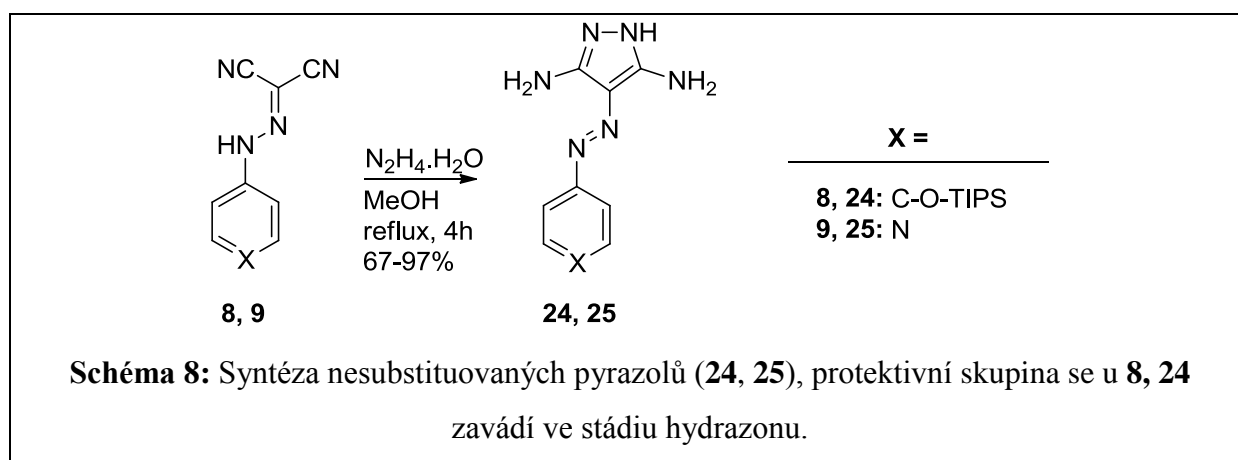
Kapitola	Značení	Aryl =	R =	PG <sup>1</sup> =	PG <sup>2</sup> =	PG <sup>3</sup> =
4.2.1 nesubst.	24		H	-	-	-
	25		H	-	-	-
4.2.2 PMB	26		PMB	-	-	-
	27		-	PMB	Boc	H
	28		-	PMB	Fmoc	H
4.2.3 Dmb	29		Dmb	-	-	-
	30		Dmb	-	-	-
	31		-	Dmb	Boc	H
	32		-	Dmb	TIPS	H
	33		-	Dmb	Boc	Nos
	34		-	Dmb	Fmoc	H
	35		-	Dmb	TIPS	Nos
4.2.4 Boc	36		-	Boc	H	H
	37		-	Boc	Boc	H
	38		-	Boc	TIPS	H
	39		-	Boc	H	H

#### 4.2.1 Pyrazoly nesubstituované na endocyklickém dusíku (TIPS-pyrazol **24**, pyridin-pyrazol **25**)

Tyto deriváty pyrazolu byly syntetizovány se záměrem následného navázání na pevnou fázi, což bude diskutováno v dalších kapitolách (4.4.2). Pyrazol **25** byl vybrán, protože byla známa jeho biologická aktivita v oblasti inhibice CDK. Byl totiž připraven už dříve v rámci bakalářské práce a dosahoval více než 5x lepších výsledků než jeho strukturní model **1**, avšak jeho selektivita byla mnohem menší. Předpokládali jsme tedy, že i deriváty od něj odvozené další substitucí by mohly vykazovat zajímavou biologickou aktivitu.

Na základě znalosti způsobu navazování pyrazolu **1** do aktivního místa enzymu jsme předpokládali, že na jedné aminoskupině může být i objemnější substituent, aby látka inhibovala CDK. Proto snahy v syntéze 3,5-diamino-4-arylazopyrazolů vždy směřovaly k syntéze amino substituovaných derivátů. K tomu je ale třeba jednoznačné chránění ostatních funkčních skupin molekuly, to v případě hydroxy skupiny zajišťuje silylová skupina triisopropylsilyl (TIPS). U pyridinového derivátu protekce chránící skupinou nebyla třeba.

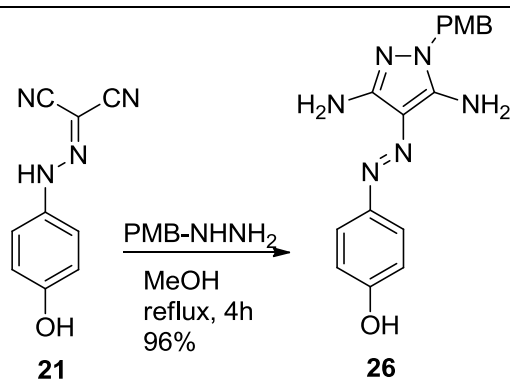
Oba tyto pyrazoly **24** (97%) a **25** (67%, Schéma 8) byly připraveny analogicky jako 4-((3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenol **1** (CAN508).<sup>3</sup>



Příprava derivátu **24** navíc umožnila syntetický důkaz, kam se při chránění nesubstituovaného pyrazolu váže první Boc skupina. Více je toto téma diskutováno v kapitole 4.2.4 pojednávající o Boc-derivátech.

#### 4.2.2 Syntéza PMB-pyrazolu (**26**) a jeho Boc (**27**) a Fmoc (**28**) derivátů

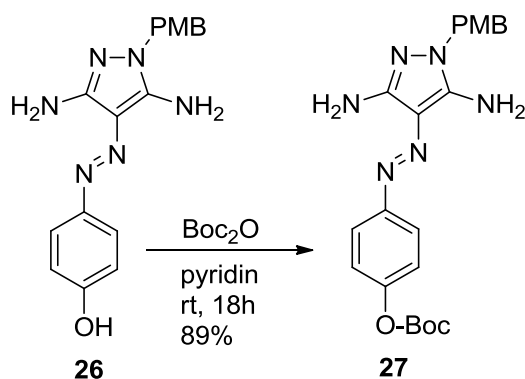
Pyrazol **26**, nesoucí na endocyklickém dusíku kyselé labilní protektivní skupinu 4-methoxybenzyl (PMB), byl syntetizován cykloadiční reakcí hydrazonu **21** s PMB-hydrazinem<sup>56</sup> (Schéma 9).



**Schéma 9:** Příprava PMB-pyrazolu **26** z hydrazonu **21** a PMB-hydrazinu.

Na pyrazolu **26** bylo poprvé zkoušeno chránění Boc skupinou reakcí s di-*t*-butyl-dikarbonátem<sup>9</sup> za účelem získání ochráněného derivátu pro následnou acylaci aminoskupin. Zde byly nalezeny optimální podmínky pro reakci s di-*t*-butyl-dikarbonátem. Cílové acyl deriváty však byly nakonec syntetizovány s Dmb analogem, protože Dmb se oproti PMB snáze štěpí v kyselém prostředí (podrobněji diskutováno u acyl derivátů, kapitola 4.3.2).

Při reakci PMB-pyrazolu **26** s di-*t*-butyl-dikarbonátem (1.1 eq; Schéma 10) byl jako rozpouštědlo používán zpočátku THF. Výsledkem reakce provedené za laboratorní teploty byla bohatá směs obsahující nezreagovanou výchozí látku **26**, dva polohové izomery mono-Boc-substituovaného pyrazolu a také diBoc-substituovaný pyrazol. Zvýšení teploty na 40 °C výslednou reakční směs výrazně nezměnilo. Zvýšení množství činidla (5 eq) nevedlo ke kvantitativní konverzi výchozí látky, stále zůstávala nedoreagovaná.

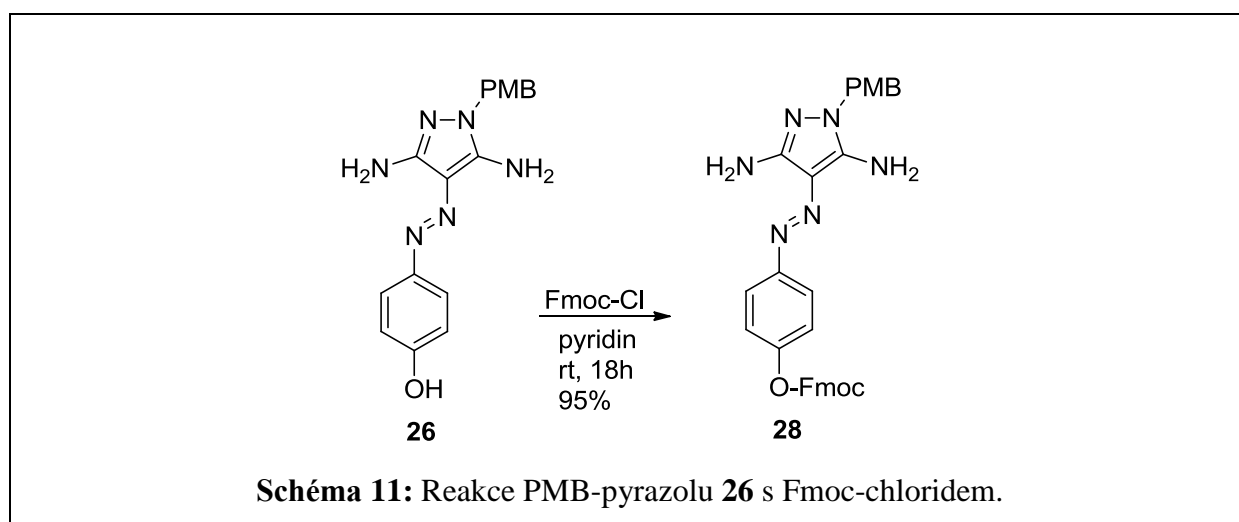


**Schéma 10:** Reakce PMB-pyrazolu **26** s di-*t*-butyl-dikarbonátem.

Z předběžných výsledků reakce pyrazolu **26** s di-*t*-butyl-dikarbonátem bylo patrné, že reaktivnost hydroxy a amino skupiny je zhruba stejně velká. Z toho důvodu bylo testováno

ochránění pyrazolu **26** Boc skupinou v bazickém prostředí. Použití pyridinu jako rozpouštědla by mělo zvýšit reaktivitu hydroxy skupiny. Provedením reakce v pyridinu vznikala jednoznačně jedna sloučenina. Na základě pozdějších výsledků u analogického Dmb derivátu (rentgeno-strukturní analýza derivátu **45b**, kapitola 4.3.3.1) byla přiřazena struktura **27**, kde je Boc skupina na hydroxy skupině.

Další reaktivita PMB-pyrazolu **26** byla studována s bazicky labilní chránicí skupinou – Fluorenylmethoxykarbonylem (Fmoc).<sup>139</sup> Nejprve byl jako činidlo použit Fmoc-Osu v suchém THF za laboratorní teploty. Ani za 24 h nedošlo k doreagování na produkt **28** (Schéma 11). Delší reakční čas nebyl zkoušen. Bylo vyzkoušeno razantnější činidlo – Fmoc-chlorid v prostředí pyridinu. Postupně byla prodlužována reakční doba – za 2 h ani 6 h, nedoreagovalo. Zvýšením množství činidla na 1.5 eq se za 24 h podařilo získat téměř čistý produkt (95%), reakční směs obsahovala i malé množství disubstituovaného pyrazolu. Množství Fmoc-Cl bylo dále optimalizováno a ukázalo se, že 1.3 eq je dostačující.

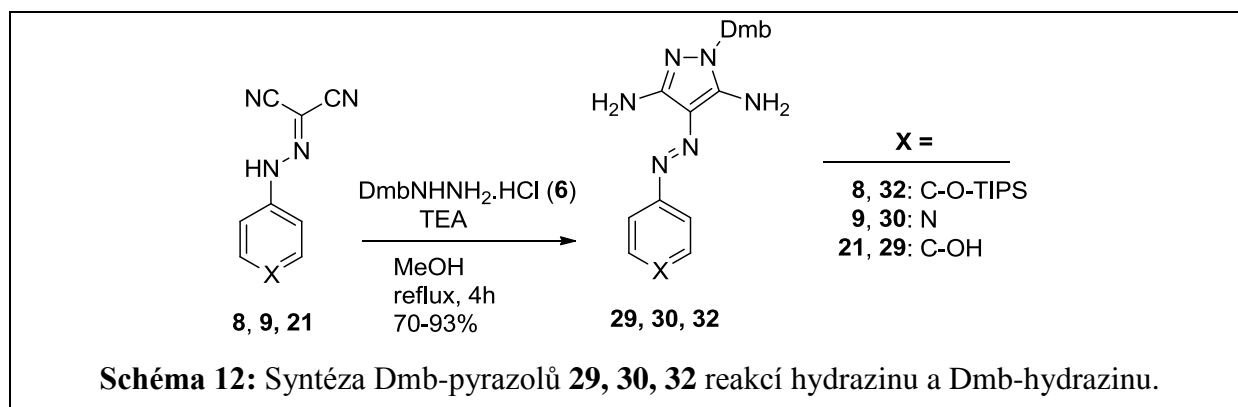


Poloha Fmoc skupiny byla přiřazena na základě analogie reaktivnosti Dmb-chráněného pyrazolu (**29**). S vysokou pravděpodobností se dá předpokládat, že PMB chránicí skupina bude mít stejný vliv na reaktivnost pyrazolu (**26**) jako Dmb skupina. Za účelem jednoznačného určení polohy Fmoc skupiny pomocí rentgeno-strukturní analýzy byly učiněny pokusy tuto sloučeninu krystalovat. Žádný z krystalizačních pokusů neposkytl vhodné krystalky pro rentgeno-strukturní analýzu.

Další reakce už s derivátem **26** neprováděny nebyly, pro syntézu finálních acyl derivátů byl používán jeho Dmb analog.

### 4.2.3 Syntéza Dmb-pyrazolů (29, 30, 32) a jejich Boc, Fmoc, silyl a Nosyl deriváty

Pyrazoly s chránicí 2,4-dimethoxybenzylovou skupinou (Dmb) na endocyklickém pyrazolovém dusíku byly připraveny analogickým postupem jako PMB-pyrazol (26), tedy reakcí příslušného hydrazonu (8, 9, 21) s Dmb-hydrazinem (6) varem v metanolu (Schéma 12).

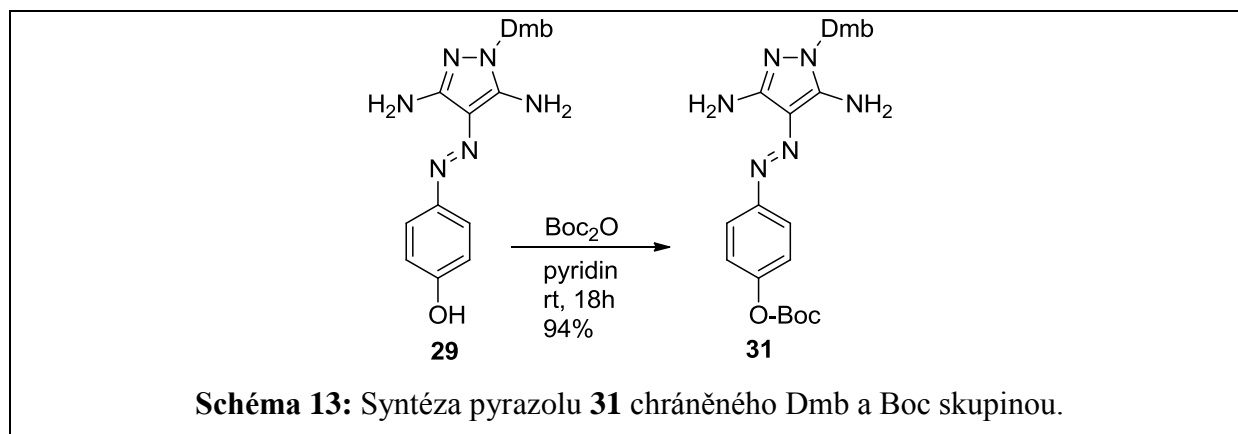


Volný Dmb-NHNH<sub>2</sub> (6), olejovité konzistence, byl nestabilní. Dmb-hydrazin (6) bylo možné izolovat ve formě krystalického hydrochloridu přidávkem methanolu nasyceného plynným chlorovodíkem. Tento hydrochlorid bylo možné převést zpět na volnou bázi přidávkem TEA. Reakce vedoucí k pyrazolu **29** běžela čistěji za použití hydrochloridu Dmb-NHNH<sub>2</sub>, než když byl použit samotný volný hydrazin (6). U takto získaného pyrazolu **29** (93%) nebylo třeba další purifikace a byl připraven pro další reakce. Pyrazoly **30** (80%) a **32** (70%) byly tedy připraveny rovněž z Dmb-NHNH<sub>2</sub>.HCl.

Se záměrem plánovaného navázání pyrazolů na pevnou fázi byla pozornost věnována přípravě pyrazolů s různými protektivními skupinami, za účelem jednoznačné polohy kotvící funkční skupiny. Chránicí skupiny byly vybrány tak, aby je bylo možné jednoduše odštěpit kyselé (Dmb, Boc), bazicky (Fmoc, Nos), nebo jinými metodami – např. TIPS pomocí fluoridových iontů (TBAF).

Postup pro přípravu Dmb-Boc-pyrazolu **31** (94%, Schéma 13) byl odvozen od syntézy jeho PMB-analogu **27**. Osvědčilo se di-*t*-butyl-dikarbonát naředit rozpouštědlem a pomalu přikapávat do reakční směsi, jinak hrozilo, že se reakce nezastaví na mono-derivátu, ale dojde k vícenásobné substituci Boc skupinou. V případě potřeby byl derivát **31** dočištěn chromatograficky (70%).





Pokusy o substituci pyrazolu **29** reakcí s Fmoc-OSu nebo Fmoc-chloridem vedly ke směsi, která obsahovala Fmoc-derivát **34** v cca. 80% čistotě. Látku nešlo vyčistit s pomocí chromatografie.

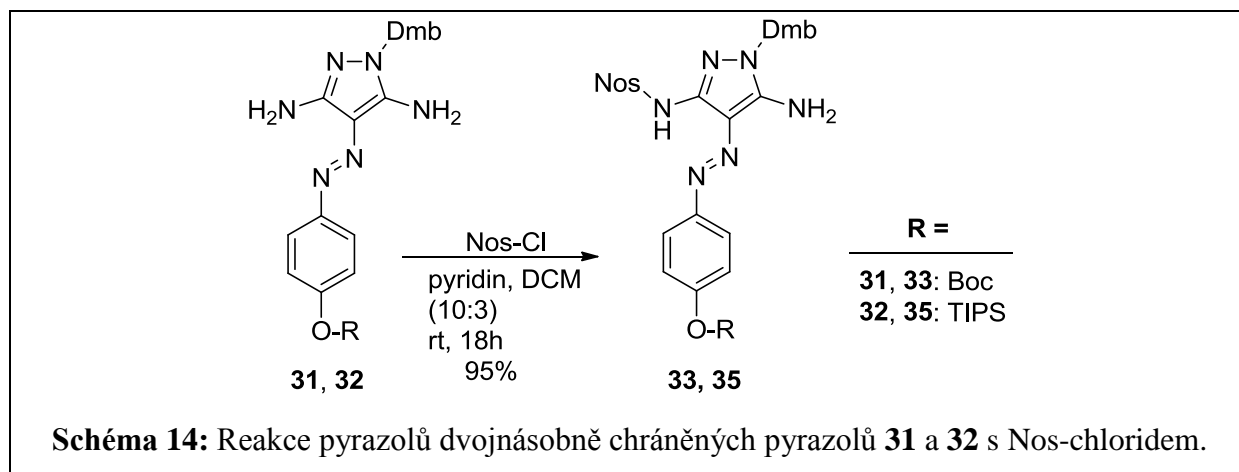
Silylace sloužila k protekci fenolické hydroxy skupiny, která by u pyrazolu **1** obsahujícího více funkčních skupin mohla v další syntéze rovněž podléhat acylačním reakcím. Pokusy o přípravu pyrazolu **32** silylací Dmb-chráněného pyrazolu **29** selhaly. Ochránění hydroxy skupiny silylem bylo možné ve stádiu hydrazonu (**8**), který cykloadiční reakcí s hydrazinem vedl k pyrazolu (**32**, 70%, Schéma 12).

Za účelem získání protektivními skupinami vícenásobně substituovaného pyrazolu **1** byly provedeny reakce Dmb,TIPS-pyrazolu (**32**) s Fmoc-chloridem. Pokusy byly neúspěšné.

Pozornost tedy byla zaměřena na Nos-skupinu. Význam této skupiny spočívá v tom, že aktivuje amino skupinu pro Fukuyama-Mitsunobu reakci<sup>140</sup> s alkoholem. Záměrem bylo navázání pyrazolu **33** nebo **35** na Wangovu<sup>141</sup> pryskyřici (diskutováno dále – u syntézy pyrazolů na pevné fázi kapitola 4.4.2).

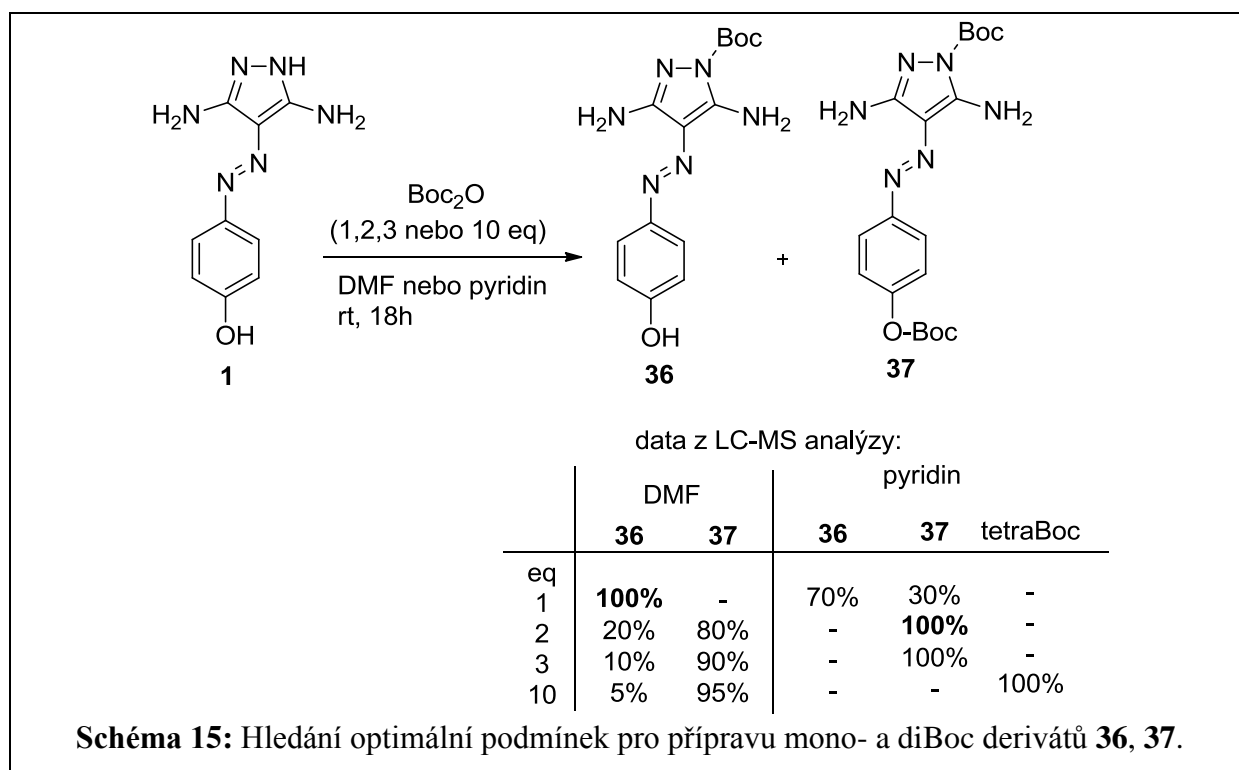
Při použití 1.5 ekvivalentu činidla v bezvodém pyridínu se podařilo připravit čisté nosylované deriváty **33** (95%, Schéma 14) a **35** (95%). Ani při zvýšení množství činidla na 2.0 ekvivalentu nevznikal disubstituovaný derivát. Poloha nosyl skupiny na stericky přístupnější amino skupině byla odvozena na základě analogické reakce přípravy acyl derivátu (**45b** - viz kapitola 4.3.3.1), kde struktura byla jednoznačně prokázána rentgeno-strukturní analýzou.

Oběcně byl pozorován trend, že zvyšující se počet substituentů na daných pyrazolech snižoval jejich reaktivitu k další substituci.



#### 4.2.4 Studium Boc substituce nesubstituovaného pyrazolu (**1**)

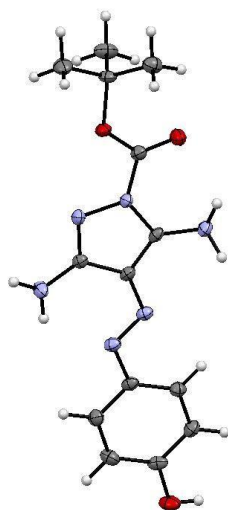
Za účelem zjištění reaktivity di-*t*-butyl-dikarbonátu s pyrazolem **1** bylo provedeno několik předběžných reakcí. Nejprve byl zkoušen nadbytek činidla s 1, 2, 3 a 10 ekvivalenty di-*t*-butyl-dikarbonátu. Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý DMF nebo pyridin. Nesubstituovaný pyrazol **1** poskytuje čistý mono-Boc (**36**) a diBoc (**37**) derivát, v závislosti na množství činidla a použitém rozpouštědle.



Pro přípravu mono-Boc derivátu (**36**, 99%) je vhodnějším prostředím bezvodý DMF za přítomnosti 1 eq. di-*t*-butyl-dikarbonátu. Zatímco diBoc pyrazol (**37**) se nejlépe připraví

v bezvodém pyridinu s 2 eq. činidla (Schéma 10). V DMF při přidavku 10 ekvivalentů činidla vznikaly mono a diBoc derivát v poměru 5:95. V bezvodém pyridinu běžela reakce dál, s použitím LC-MS byl detekován jediný pík o hmotnosti odpovídající 4x substituovanému derivátu, který však nebyl izolován.

Krystaly mono-Boc derivátu (**36**) byly podrobeny rentgeno-strukturální analýze, která jednoznačně ukázala polohu Boc skupiny na endocyklickém dusíku pyrazolu. Podařilo se vykrytalovat i diBoc derivát (**37**), ale dosud získané krystaly nesplňovaly všechny parametry pro úspěšné měření. Obrázek 3 ukazuje vypočítanou strukturu mono-Boc derivátu na základě rentgeno-strukturální analýzy. Výsledky jsou velmi čerstvé, a proto ještě nejsou vložena všechna finální data.

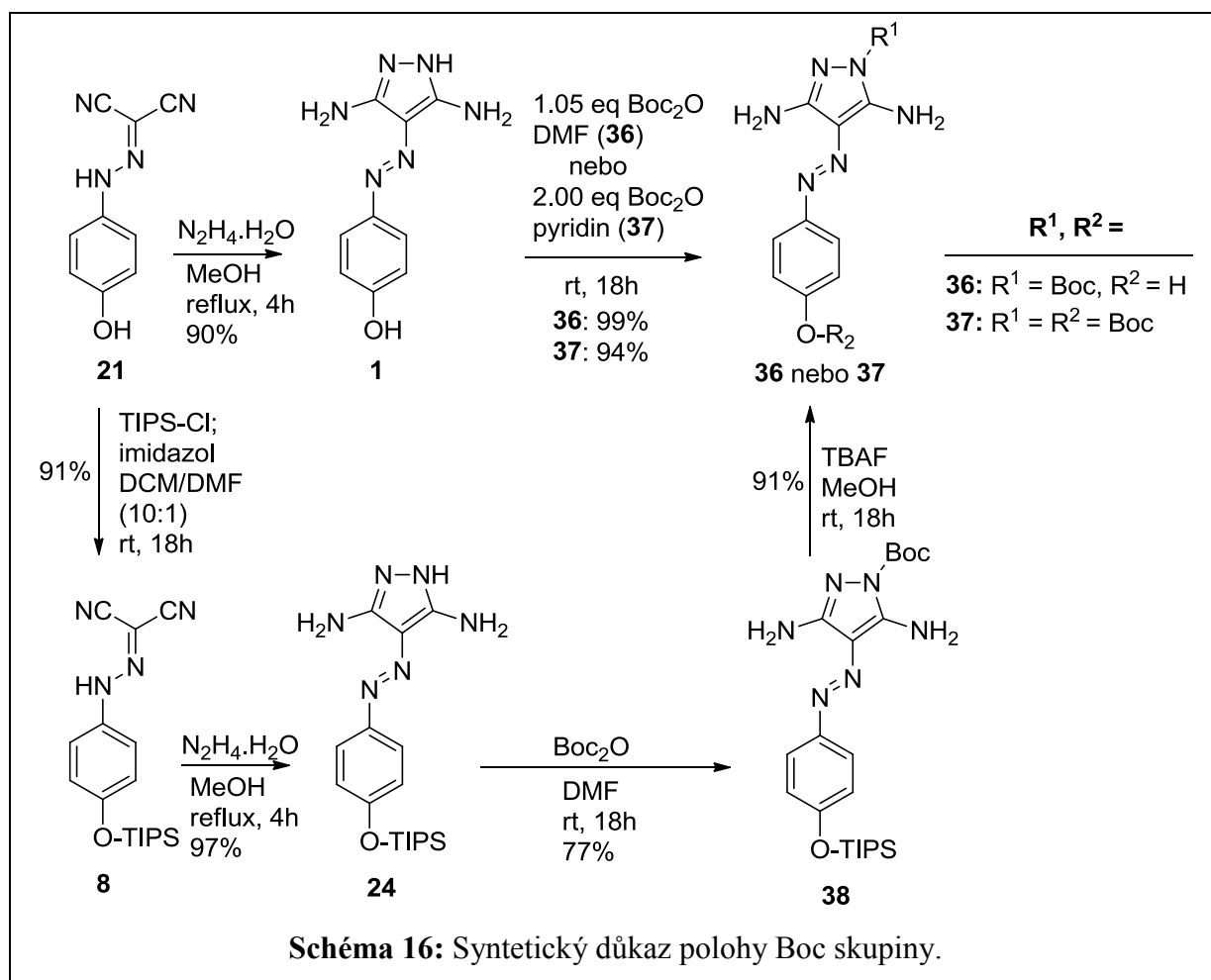


**Obrázek 3:** Vypočtená struktura mono-Boc derivátu **36** na základě rentgeno-strukturální analýzy.

Souběžně s rentgeno-strukturální analýzou byl proveden také syntetický důkaz polohy Boc skupiny vázané na endocyklickém dusíku sledem reakcí (Schéma 16). Následující schéma ukazuje dvě možné cesty vedoucí k přípravě mono-Boc derivátu (**36**).

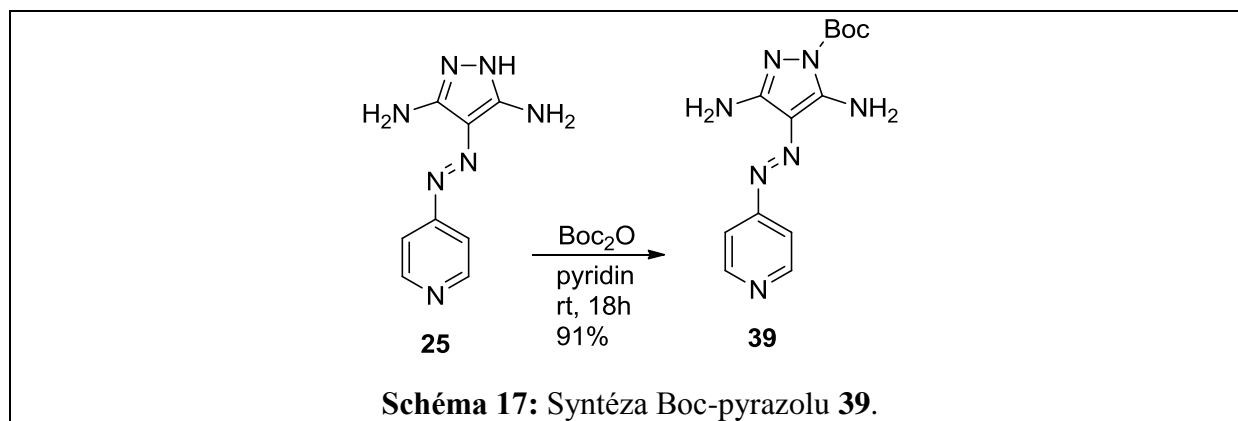
Pyrazol **1** připravený cyklo-adiční reakcí z hydrazonu **21** je možné mono i di-substituovat *t*-butyl dikarbonátem za vzniku derivátů **36** a **37**. Alternativní cesta vede přes silylaci hydrazonu **21** TIPS chloridem za vzniku příslušného silyl hydrazonu **8**. Následná reakce s hydrazin monohydrátem uzavře pyrazolový cyklus a tím poskytne pyrazol **24** (97%). Reakcí s 1.05 ekvivalentem Boc anhydridu v DMF vzniká čistý mono-substituovaný derivát **38** (77%). Reakcí derivátu **38** s fluoridovými ionty (TBAF) již po šesti hodinách došlo téměř

k úplnému odstranění silylové skupiny, reakcí přes noc jsme získali čistou látku.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektra pyrazolu **36** připraveného oběma způsoby byla identická.



Analogicky byl připaven i další mono-Boc chráněný pyrazol **39** (Schéma 17). Reakci pyrazolu **25** s 1 ekvivalentem di-*t*-butyl dikarbonátu bylo možné provést v bezvodém DMF nebo pyridinu. Obě reakce vedly k čistému **39** (91%). Zajímavé bylo, že derivát **25** bylo možné substituovat Boc skupinou jen jedenkrát. Ani při přidavku 5 ekvivalentů dikarbonátu nedošlo k vícenásobné substituci Boc skupinou, což opět nepřímo naznačuje, že dvojnásobné chránění pyrazolu **1** Boc skupinou vede s velkou pravděpodobností k pyrazolu **37**.

Tento derivát (**39**) byl připraven výlučně za účelem navázání na pevnou fázi a přípravu knihovny, kdy byly vybrány dva pyrazoly – s fenolem jako arylem a v tomto případě s pyridinem jako arylem. Vhodné chránění pak zajišťovaly skupiny Dmb (**30**), resp. Boc (**39**). Syntézou knihovny pyrazolů na pevné fázi se zabývá další kapitola (4.3).



### 4.3 Acylované pyrazoly

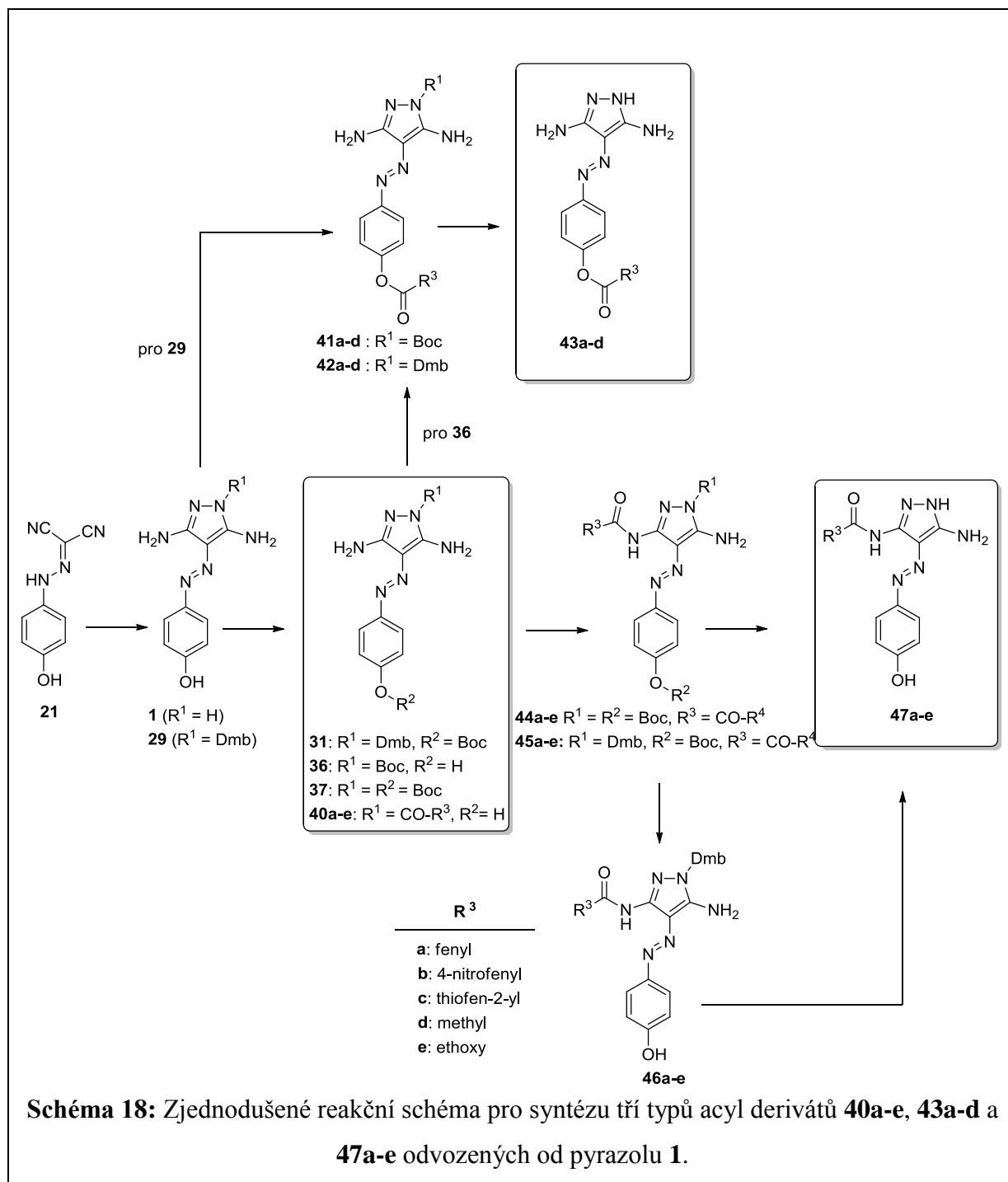
Acylová skupina se do molekuly aminu zavádí obecně reakcí s karboxylovými kyselinami a jejich funkčními deriváty. Zde byl aminem nesubstituovaný pyrazol **1**. Byl vybrán jako strukturální model pro téma této práce, protože byl identifikován jako inhibitor CDK. Naším záměrem byla taková modifikace struktury, která by vedla k ještě lepším výsledkům v oblasti biologické aktivity. Rovněž jsme se snažili prostudovat reaktivitu pyrazolu **1** s acylačními činidly. Možnost získání různých izomerů je dána povahou funkčních skupin na pyrazolu **1**, kdy se jedná o aminy a hydroxyl, které je možné substituovat. Tyto funkční skupiny mají podobnou reaktivitu a celou situaci ještě komplikuje fakt, že se jedná o složitý konjugovaný systém.

Podarilo se připravit polohové izomery lišící se polohou acylu, jejich obecnou syntézu ilustruje Schéma 18. Z hydrazonu **21** lze reakcí s hydrazinem získat pyrazol **1**, který má volnou nejreaktivnější polohu – endocyklický dusík. Právě sem směřuje prvotní acylace a vznikají pyrazoly **40a-e**.

Při reakci se substituovaným hydrazinem (**6**) poskytuje hydrazon (**21**) chráněný Dmb-pyrazol **29**, který s acylačními činidly poskytuje deriváty **42a-d**, substituované na fenolickém hydroxylu. Analogické deriváty lze získat také z Boc-pyrazolu **36** (**41a-d**) a protektivní skupiny je pak možné odštěpit působením zředěné nebo koncentrované TFA.

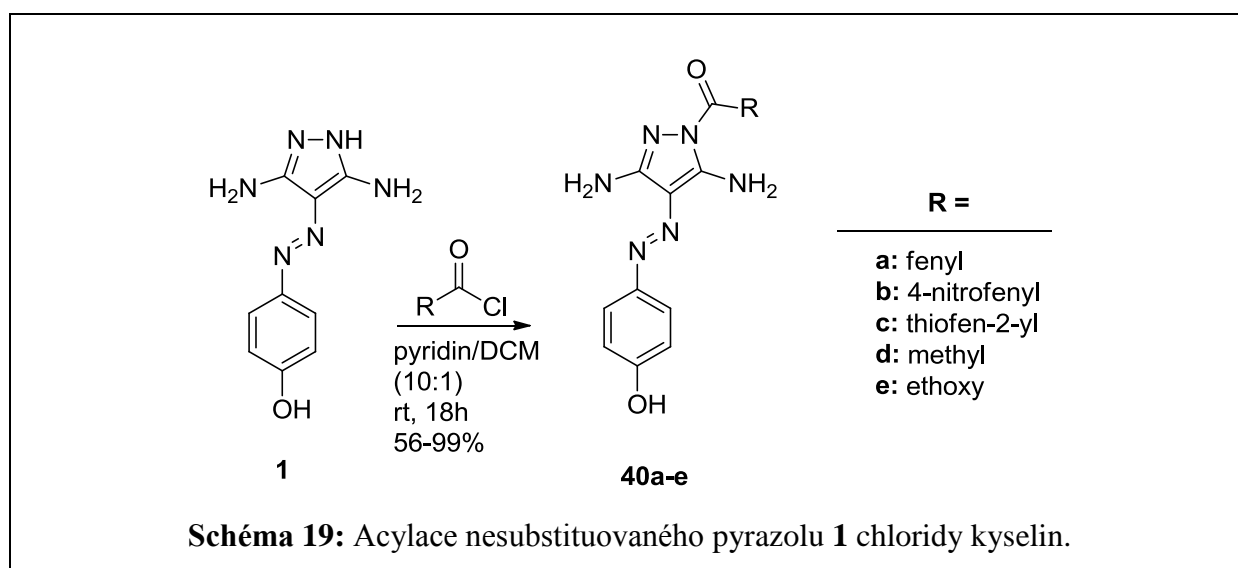
Pokud jsou ochráněné obě nejreaktivnější skupiny – endocyklický dusík a fenolická hydroxy skupinu (Dmb a Boc – deriváty **31** nebo **37**), acylace směřuje na exocyklický dusík pyrazolu, tedy na méně stericky bráněnou aminoskupinu (deriváty **44a-e**, resp. **45a-e**). Chránící skupiny mohou být parciálně odstraněny za vzniku derivátů (**46a-e**) a je možná další acylace nebo odštěpení všech protektivních skupin až na finální produkty **47a-e**.

Tyto polohové izomery byly identifikovány s pomocí LC-MS a NMR. Přípravy jednotlivých zástupců jsou diskutovány v této kapitole, která je rozdělena na základě polohy acylu na pyrazolovém dusíku endocyklickém (4.3.1), na hydroxy skupině (4.3.2) a na exocyklickém pyrazolovém dusíku (4.3.2)



### 4.3.1 Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu (40a-e)

Jako acylační činidla byly zvoleny chloridy od aromatických karboxylových kyselin - benzoyl, 4-nitrobenzoyl a thiofen-karbonyl. Dále byly používány chloridy odvozené od alifatických karboxylových kyselin – acetyl a ethoxykarbonyl. Nechráněný pyrazol **1** reagoval v pyridinu s 1 ekvivalentem acyl chloridů za vzniku acyl pyrazolů **40a-e** (Schéma 19). Reakce běžela čistě a 1 ekvivalent právě stačil, výtěžky byly v rozmezí 56-99% surového produktu (36-81% po chromatografii).



Dále byla pozornost zaměřena na studium vlivu acylačního činidla na polohu substituentu u výsledného derivátu. Pro toto studium byla zvolena acetylační reakce a jako činidlo bylo použito – acetyl chlorid, acetanhydrid, kyselina octová aktivovaná DIC a HOBt a také Meldrumová kyselina, která rovněž může sloužit jako acetylační činidlo. U získaných produktů byla změřena  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra a získané výsledky byly porovnány s derivátem **40d**. Ukázalo se, že se jedná o totožné látky. Tedy bez ohledu na použité acylační činidlo, nechráněný pyrazol **1** se vždy acetyloval do polohy 1. Další závěry tohoto studia acylace se týkají praktických aspektů celé reakce a jsou shrnuty v Tabulce 3. Nejlepší výtěžek (98%) poskytl experiment s číslem 2 - s acetanhydridem.

**Tabulka 3:** Reakční podmínky acetylace nechráněného pyrazolu **1**.

Číslo experimentu	Činidla	Rozpouštědlo	Čas	Teplota	Výtěžek
<b>1</b>	CH <sub>3</sub> COCl	pyridin	6h	rt <sup>a</sup>	52%
<b>2</b>	(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O	DMF	6h	60 °C	98%
<b>3</b>	CH <sub>3</sub> COOH, DIC, HOBT	dry DMF	18h	rt <sup>a</sup>	44%
<b>4</b>	Meldrumová kyselina	DMF	6h	60 °C	62%

<sup>a</sup> rt... laboratorní teplota

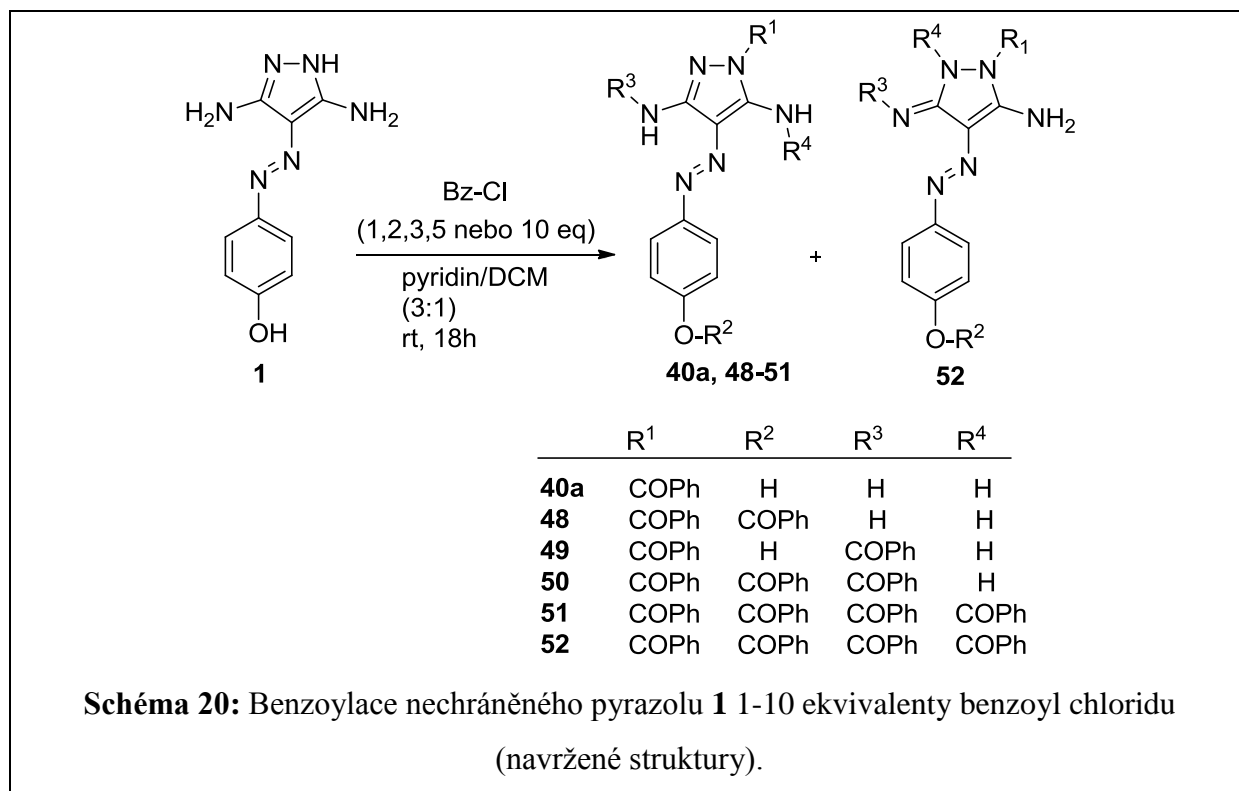
Nechráněný pyrazol **1** má všechny funkční skupiny volné a nás zajímalo, kolikrát ho lze substituovat. Byla studována reakce pyrazolu **1** s přidavkem benzoyl chloridu v množství 1; 2; 3; 5 a 10 ekvivalentů. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4.

Vždy došlo k odreagování výchozího pyrazolu **1**. Přidavkem 1 ekvivalentu benzoyl chloridu vznikal čistě mono-benzoyl **40a**, přičemž byl pozorován jen jeden pík monobenzoylu. Tedy acylace probíhá výlučně na pyrazolový dusík a není zde konkurenční acylace. Diacylace (**48** nebo **49**, Schéma 20) byla možná za vzniku dvou izomerů. Při zvyšování množství činidla vznikala mazovitá směs, kde byla pozorovatelná i hmota tetra-substituovaného derivátu (**51** nebo **52**), ale nevznikal jako majoritní pík. Čtvrtý benzoyl by mohl být na druhé amino skupině, jak naznačuje struktura **51**, ale díky tautomerii je možná i navrhovaná struktura **52**. Pokud acylace druhé amino skupiny probíhá, pak velmi neochotně. Navržené struktury jsou spekulacemi, závěry byly učiněny na základě LC-MS.

**Tabulka 4:** Benzoylace nechráněného pyrazolu **1** různým množstvím činidla.

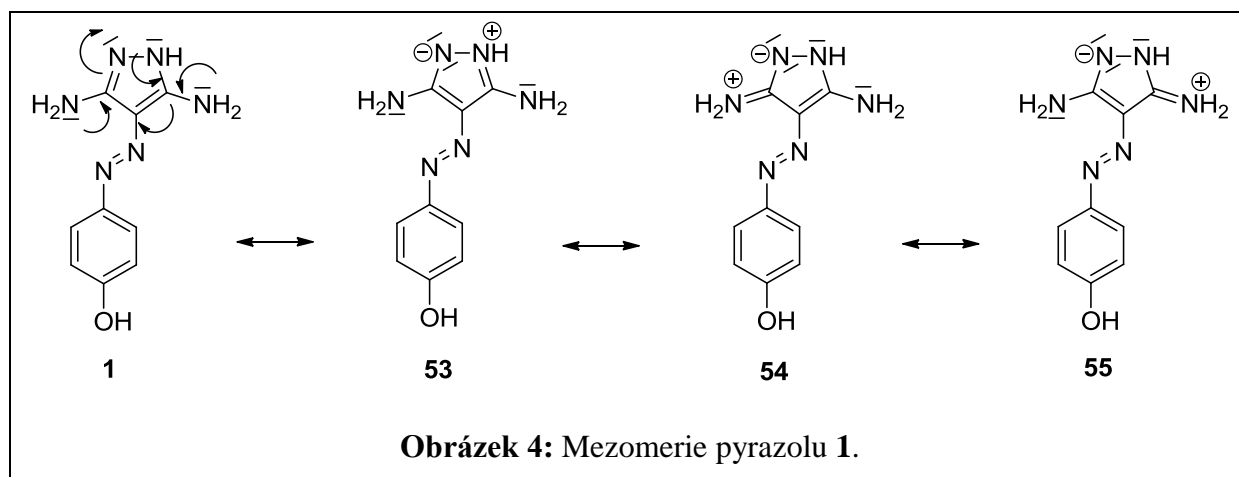
Počet eq Bz-Cl	<b>1</b>	<b>40a</b>	<b>48</b> nebo <b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b> nebo <b>52</b>
<b>1</b>	-	100%	-	-	-
<b>2</b>	-	50%	35% a 10%	5%	-
<b>3</b>	-	-	45% a 5%	50%	-
<b>5</b>	-	-	10% a 10%	75%	5%
<b>10</b>	-		směs		





Deriváty **40a-d** byly připraveny také z karboxylových kyselin. Kyselina a DIC byly smíseny v poměru 2:1 v suchém THF, došlo ke vzniku symetrického anhydridu a k tomuto roztoku byl přikápan roztok pyrazolu **1** s bázi (TEA) a katalyzátorem (DMAP). Na základě srovnání <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR bylo potvrzeno, že se jedná o totožné látky s **40a-d**. Tímto postupem však došlo ke snížení výtěžků u všech derivátů z 56-99% (jsou uvedeny výtěžky surových produktů před chromatografií) na 41-72%.

Regioselektivita k endocyklickému dusíku může být vysvětlena rezonančním efektem pyrazolu **1** (Obrázek 4). Každá ze tří mezních struktur **53**, **54**, **55** ukazuje vyšší elektronovou hustotu na pyrazolovém dusíku v poloze 1.



Byla studována stabilita Bz-pyrazolu **40a** v TFA, která byla používána pro odstranění protektivních skupin Dmb a Boc (více v následující části 4.3.2, 4.3.3). Reakce byla sledována 24h na LC-MS. Ukázalo se, že pyrazol je stabilní, nedocházelo k rozkladu, ale částečně se trifluoroacetyloval (poměr 3:1 **40a**/trifluoroacetyl-**40a**).

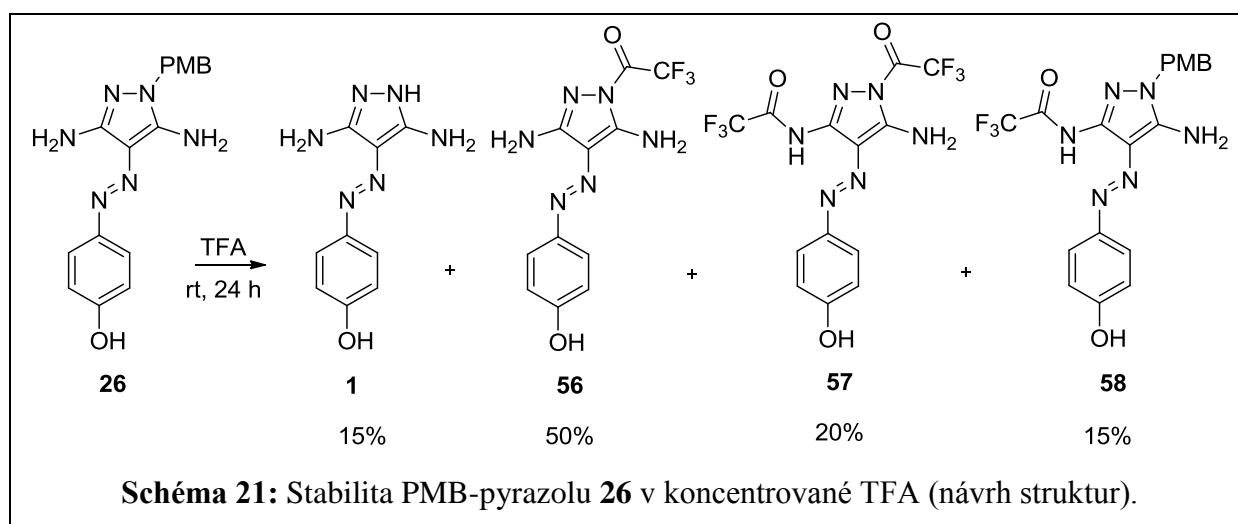
### 4.3.2 Acyl na fenolické hydroxy skupině pyrazolu

Tato kapitola se zabývá testováním stability methoxybenzylových protektivních skupin v kyselém prostředí, benzoylací PMB a Dmb-pyrazolu a odstraněním chránících skupin za účelem získání cílových látek **43a-d** acylovaných na fenolické hydroxy skupině.

#### 4.3.2.1 Testování reaktivity chráněných pyrazolů PMB (**26**) a Dmb (**29**) skupinou

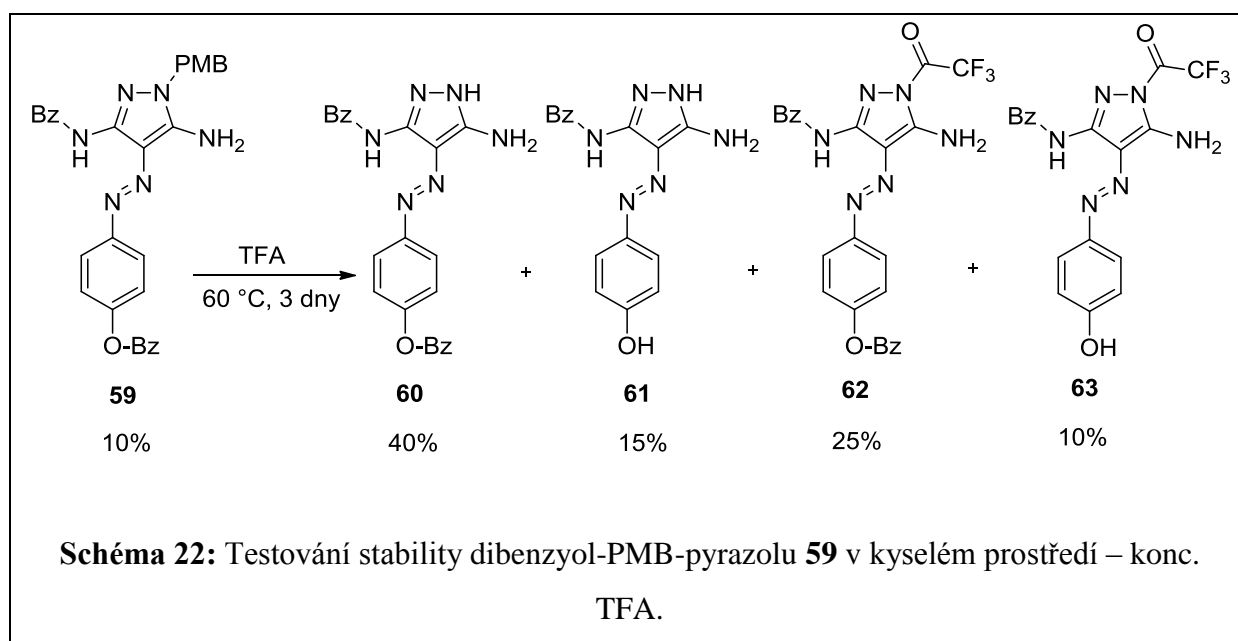
Nejprve byla studována stabilita methoxybenzylových chránících skupin. Podařilo se připravit PMB-pyrazol **26**, nesoucí na benzylu jednu methoxyskupinu, a Dmb-pyrazol **29**, který by měl být vlivem dvou methoxy skupin snáze odštěpitelný v kyselém prostředí. Pyrazol substituovaný benzylem se třemi methoxy skupinami se nepodařilo připravit, protože selhala syntéza jeho prekurzoru TMB-hydrazinu.

Stabilita protektivní PMB skupiny byla testována v koncentrované TFA za laboratorní teploty. Po 6 h stále zůstávala výchozí látka, po 24 h už nebyla detekována, ale zároveň nevzniklo ani moc volného pyrazolu **1**, jak ukazuje reakční Schéma 21, struktury byly navrženy na základě LC-MS analýz a nebyly izolovány. Vlivem dlouhodobého působení konc. TFA došlo totiž k trifluoroacetylaci (**56**, **57**). Majoritní pík tvořil acylovaný pyrazol **56**. Závěrem je možno shrnout, že PMB skupina je obtížně odštěpitelná i koncentrovanou TFA a po delší době se pyrazol acyluje, což pro následnou syntézu nebylo vhodné.



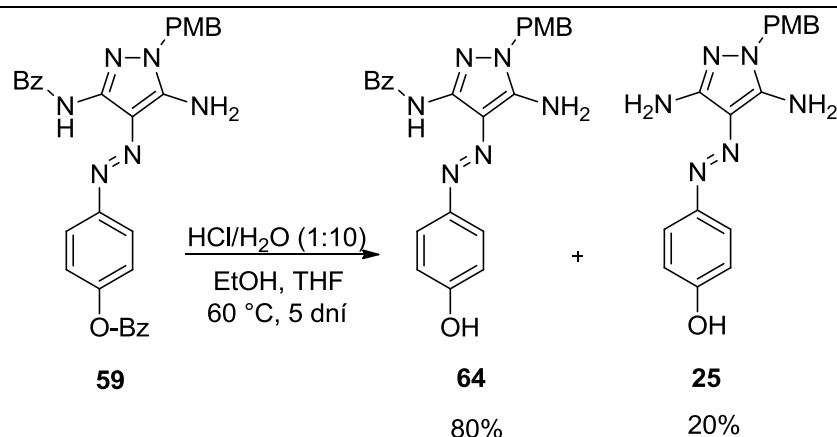
PMB-pyrazol **26** byl acylován 2.2 ekvivalentu benzoyl chloridu za vzniku mono- a dibenzoyl derivátu v poměru 1:3, dibenzoyl **59** byl chromatograficky čištěn, pak u něho byly testovány štěpící podmínky (Schéma 22 a 23).

Při reakci dibenzoyl-PMB-pyrazolu **59** s konc. TFA (Schéma 22) se odštěpovala chránící skupina a částečně docházelo k trifluoracetylaci. Rovněž se odštěpila labilnější acylová skupina, je předpokládáno, že skupina vázaná na hydroxyl. Druhý acyl byl stabilnější a tyto podmínky vydržel. I v tomto případě se jedná o spekulaci založenou na LC-MS analýzách.



Abychom zabránili trifluoracetylaci, byl derivát **59** štěpen zředěnou TFA ve vodě (2:1). Při záhřevu po 6 dnech byly v reakční směsi detekovány jen dibenzoyl (**60**) a monbenzoyl (**61**) v poměru 1:1.

Zcela jiná situace nastala při reakci dibenzoylu **59** se zředěnou chlorovodíkovou kyselinou. PMB skupina se neodštěpila ani po 5 dnech při záhřevu na 60 °C, zato však docházelo k hydrolyze acylů. Předpokládaný průběh je naznačen Schématem 23.



**Schéma 23:** Testování stability dibenzylol-PMB-pyrazolu **59** v kyselém prostředí – HCl.

Vzhledem k nezbytnosti zvýšené teploty pro odštěpení PMB chránící skupiny byla pozornost zaměřena na protektivní skupinu obsahující o jednu methoxy skupinu víc – Dmb. Další methoxy skupina by měla usnadňovat odštěpení.

V rámci průzkumu reaktivity byl Dmb-pyrazol **29** acylován 10 ekvivalenty benzoyl chloridu. Vysoký nadbytek činidla byl zvolen záměrně, za účelem zjištění, kolikrát se může derivát **29** acylovat. V LC-MS analýze byla detekována látka o molární hmotnosti 784, což by odpovídalo tetra-substituovanému pyrazolu.

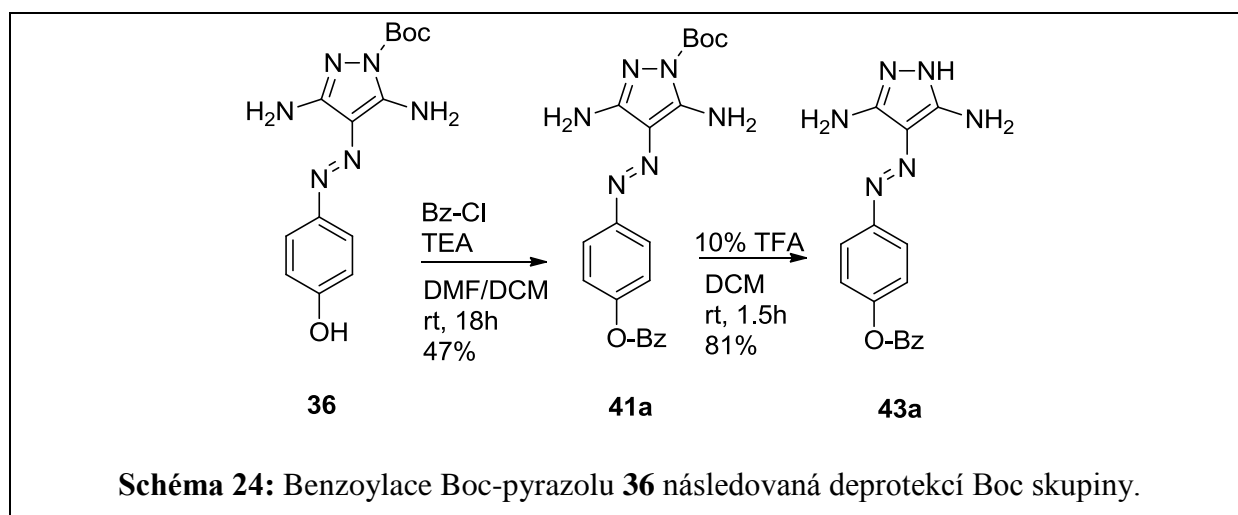
Reaktivita Dmb-pyrazolu **29** s 2.2 ekvivalenty benzoyl chloridu byla naprosto shodná jako v případě PMB-pyrazolu **26**. Vznikala směs mono a di-acylovaného derivátu v poměru 1:3. Ale to nebránilo v testování stability v kyselém prostředí obou derivátů současně. Bylo provedeno štěpení této směsi působením TFA za laboratorní teploty i při zvýšené teplotě 60 °C. Pozitivní zjištění bylo, že nebyly pozorovány žádné trifluoracetylované deriváty, ale to zřejmě i proto, že štěpení bylo sledováno jen po dobu 5-7 h. Za laboratorní teploty došlo k úplnému odštěpení Dmb skupiny po sedmi hodinách. Výsledkem byla opět směs látek – tentokrát už bez chránící skupiny – monobenzoylu a dibenzoylu. I poměr látek zůstal přibližně stejný, jako byl u výchozí směsi. Při vyšší teplotě se Dmb skupina odštěpila už po půl hodině.

#### 4.3.2.2 Syntéza pyrazolů s acylem na fenolické hydroxy skupině

Vzhledem k tomu, že dvojnásobná substituce pyrazolu **1** Boc skupinou vede k derivátu **37**, nesoucímu Boc na endocyklickém pyrazolovém dusíku a na fenolické hydroxy skupině, usoudili jsme, že hydroxy skupina je k acylacím náchylnější než amino skupiny zejména v bazickém prostředí. Tento předpoklad byl podpořen sledem reakcí ve Schématu 24,

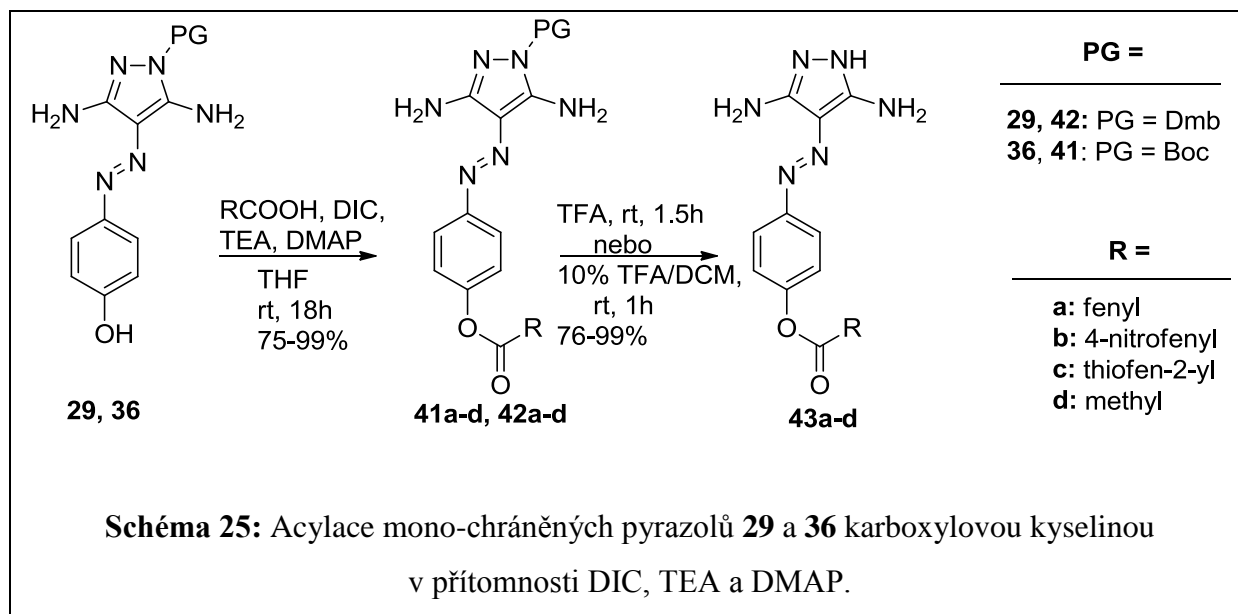
startovním materiálem byl Boc-pyrazol **36**. Acylace benzoyl chloridem byla provedena dvěma způsoby. Pyrazol **36** byl rozpuštěn v bezvodém DMF, byl přidán TEA jako báze a benzoyl chlorid. Tímto způsobem byl získán jediný produkt – **41a** (Schéma 24), kde podle  $^{13}\text{C}$  NMR byl acyl na hydroxy skupině, štěpením v TFA pak poskytl **43a**.

Pokud byla reakce provedena v bezvodém pyridinu, který hrál roli rozpouštědla i báze najednou, a bylo přidáno DMAP jako katalyzátor, vznikaly dva produkty o hmotě odpovídající **41a**. Vzhledem k jejich retenčním časům na LC-MS předpokládáme, že se jedná o **41a**, kde je benzoyl na hydroxy skupině, a druhý derivát má benzoyl na stéricky přístupnější amino skupině. Na základě těchto experimentů předpokládáme, že je hydroxyl reaktivnější než amino skupina v bazickém prostředí, a jeho protekce je pro regioselektivní acylaci amino skupiny nezbytná (kapitola 4.3.3).



Acylace fenolické hydroxy skupiny je podporována bazickým charakterem triethylaminu. Byla provedena série acylačních reakcí (Schéma 25) s mono-chráněnými pyrazoly **29** a **36**. Acylace obou pyrazolů nakonec vedly ke stejným finálním látkám **43a-d** substituovaným na hydroxy skupině, což bylo potvrzeno pomocí NMR.

Rozdíl v chránících skupinách spočívá ve způsobu zavedení skupiny do molekuly pyrazolu a v deprotekcí. Dmb se zavádí pomocí substituovaného Dmb-hydrazinu, což má obrovskou výhodu, protože poloha chránící skupiny je jednoznačně daná. Zatímco v případě Boc skupiny, která se zavádí až ve stádiu pyrazolu to tak jasné není díky tautomerii. Dmb skupina vyžaduje pro deprotekcí koncentrovanou kyselinu TFA a dobu 1,5 h, Boc se odštěpí zředěnou TFA (10% TFA v DCM) už za hodinu.



Pro testování možností acylačních činidel byl zvolen symetrický anhydrid generovaný příslušnou kyselinou a DIC. Při hledání vhodných podmínek pro acylaci **36** byl zkoušen 1 ekvivalent symetrického anhydridu (tedy 2 ekvivalenty kyseliny, 1 ekvivalent DIC) a 2 ekvivalenty. Ukázalo se, že 1 ekvivalent anhydridu je pro kvantitativní reakci nedostatečný. Vždy zůstane cca. 30% výchozí látky **36**. Přičemž při použití dvou ekvivalentů anhydridu vzniká čistě **41a-d**. Nedochozí k žádné konkurenční acylaci, ani nebyl detekován diacyl derivát.

Při acylaci Dmb-pyrazolu **29** kyselinami bylo zkoušeno více variant aktivace acylačního činidla. Nejprve se jednalo o aktivovaný ester, formovaný z karboxylové kyseliny, DIC a HOBt v bezvodém THF. Při reakci s Dmb-pyrazolem **29**, s použitím kyseliny benzoové, reakce moc neprobíhala, zůstávala výchozí látka. Ale zajímavé bylo, že vznikaly dva deriváty s různým retenčním časem, ale stejnou molární hmotností odpovídající **42a**. Zřejmě tedy byla možná acylace hydroxy i amino skupiny. Při použití razantnější acylačního činidla generovaného z dvou molekul kyseliny a DIC stále vznikaly dva produkty, ale jeden byl oproti druhému v nadbytku. Rovněž však nedošlo k odreagování veškeré výchozí látky **29**. Přičemž změna rozpouštědla ze suchého THF na suchý DMF neměla velký vliv. Zajímavých výsledků bylo dosaženo při použití acylačního protokolu pro vytvoření symetrického anhydridu z kyseliny a DIC spolu s přidavkem báze TEA a katalyzátoru DMAP. Báze posunula reaktivitu tak, že vznikal výlučně jeden acylační produkt **42a** a aby došlo ke 100% konverzi výchozí látky, stačilo jen zvýšit množství činidla na dvojnásobek. Diacyl byl

detekován jen minimálně. Odštěpení chránící skupiny koncentrovanou TFA pak vedlo k derivátu **43a**. Přičemž acyl byl na hydroxy skupině.

Průzkumu této reakce byla věnována větší pozornost, protože se zdálo, že je možné připravit i druhý acylovaný derivát – na amino skupině. Bez přítomnosti báze vznikaly dva acylované produkty, jedním z nich byl **42a**, ale ten druhý zřejmě nesl benzoyl na amino skupině. Reakce však probíhala neochotně, zůstávala nedoreagovaná výchozí látka a vedle dvou acyl derivátů vznikala i bohatá směs nečistot. Další optimalizací ani purifikací už jsme se nezabývali.

I u dalších acylací jsme pozorovali dva acylované deriváty, pokud byl použit protokol: kyselina, DIC, bezvodý THF. Při přidavku ještě TEA a DMAP vznikal jen čistě **42a-d**.

### 4.3.3 Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na amino skupině)

V této kapitole nejprve ukazujeme směr acylace dvojnásobně chráněných pyrazolů za vzniku acyl derivátů substituovaných na aminoskupině. Poté následuje jednoduchý způsob rozlišení jednotlivých acyl-izomerů pomocí alkalické hydrolyzy. Na závěr kapitoly jsou uvedeny výsledky biologické aktivity připravených látek.

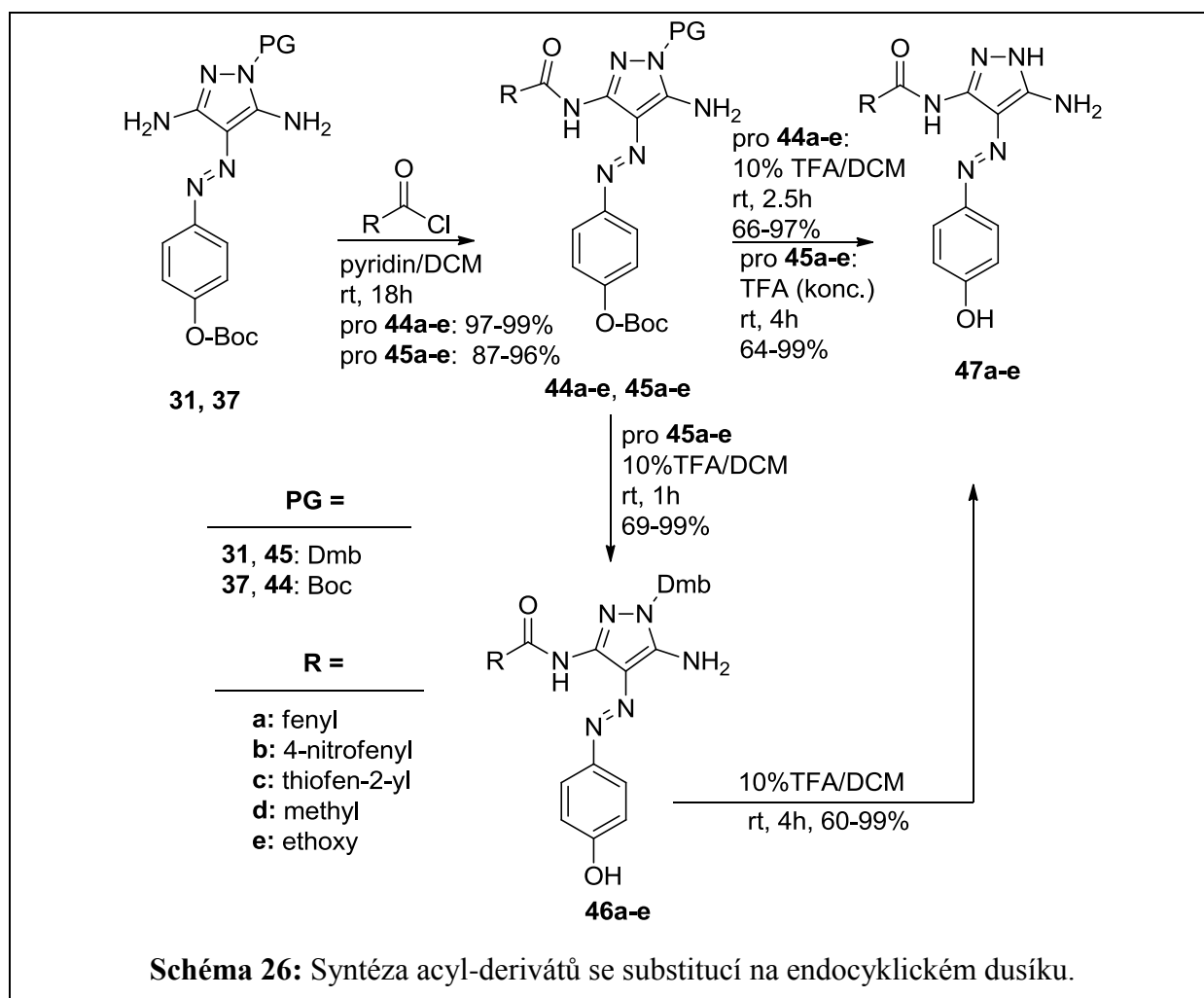
#### 4.3.3.1 Acylace chráněných pyrazolů **31** a **37**

Aby acylace směřovala na stericky přístupnější aminoskupinu pyrazolu, bylo třeba nejprve ochránit dvě reaktivnější skupiny molekuly – endocyklický pyrazolový dusík a fenolickou hydroxy skupinu. Jako protektivní skupiny byla za tím účelem vybrána skupina Dmb, která se do molekuly zavádí ve stádiu hydrazonu, a Boc skupina, která se navazuje reakcí s di-*t*-butyl-dikarbonátem. Jako ochráněný pyrazol byl v této práci používán Dmb-Boc-pyrazol **31** a také diBoc-pyrazol **37**.

Syntézu finálních látek **47a-e** naznačuje Schéma 26. Protekci endocyklického dusíku a hydroxy skupiny zajistil chráněný Dmb-Boc-pyrazol **31**, který reakcí s acylačními činidly poskytl chráněné acyl-deriváty **45a-e** (87-96%) a ty bylo možné převést koncentrovanou TFA na finální látky **47a-e** (64-99%) nebo reakcí se zředěnou TFA odštěpit jen Boc skupinu. Následná reakce takto získaných derivátů **46a-e** (69-98%) s koncentrovanou TFA opět vedla k finálním látkám **47a-e** (60-99%).

Analogicky je možné využít i diBoc-pyrazol **37**, který acylací poskytuje acyl-diBoc-pyrazoly **44a-e** (97-99%). Dokonce i zde je možná parciální deprotektce, tedy odštěpení jen jedné Boc skupiny působením zředěné TFA kratší dobu, než vyžadují obě Boc skupiny. Bohužel se nám

dosud nepodařilo určit, která z Boc skupin se odštěpuje přednostně. Totožnost látek jsme prokázali s využitím LC-MS ale především srovnáním  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR daných látek.

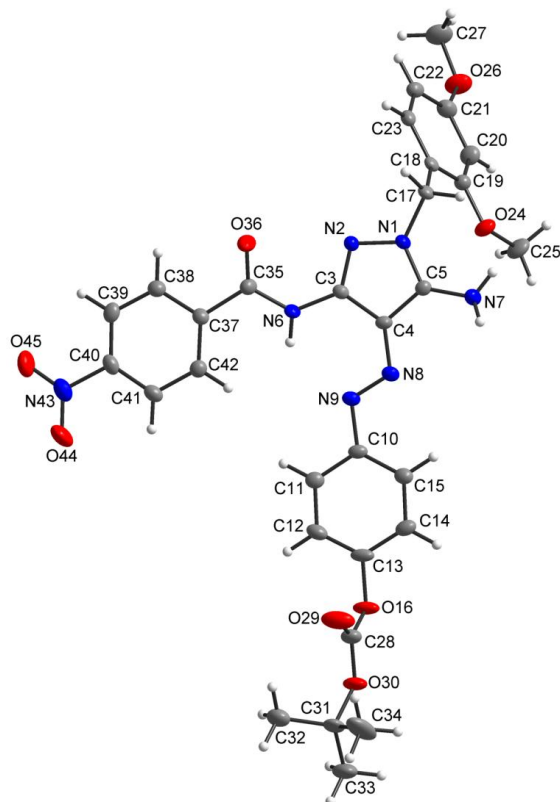


Polohu obou protektivních skupin a acylu jsme prokázali rentgenostrukturní analýzou derivátu **45b** (Obrázek 5).

Pro acylaci Dmb-Boc-pyrazolu **31** s acyl chloridy bylo třeba nalézt optimální podmínky. U chloridů aromatických karboxylových kyselin stačil mírný nadbytek činidla 1.1 ekvivalentu a bylo vhodné činidlo na přidavek trochu naředit inertním rozpouštědlem, aby nedocházelo k vícenásobné substituci. Přičemž 4-nitrobenzoyl chlorid byl přidáván jako pevná látka, nebyl ničím ředěn, ale byl rozpuštěn přímo v suchém pyridinu, kde všechny acylace chloridy probíhaly. Pro přípravu acetyl-derivátu **45d** bylo 1.1 ekvivalentu chloridu málo, nedoreagovalo – výchozí látka/produkt (1:1), 1.9 ekvivalentu bylo stále málo, 2.0 ekvivalentu akorát. Pro přípravu ethoxykarbonyl-derivátu **45e** nebylo řešením zvýšení množství činidla,



ale dostatečné naředit kvůli pomalému přidávku, aby nedocházelo k vícenásobné reakci a současnému nedoreagování.



**Obrázek 5:** Rentgenová struktura derivátu **45b** (CCDC 837640).

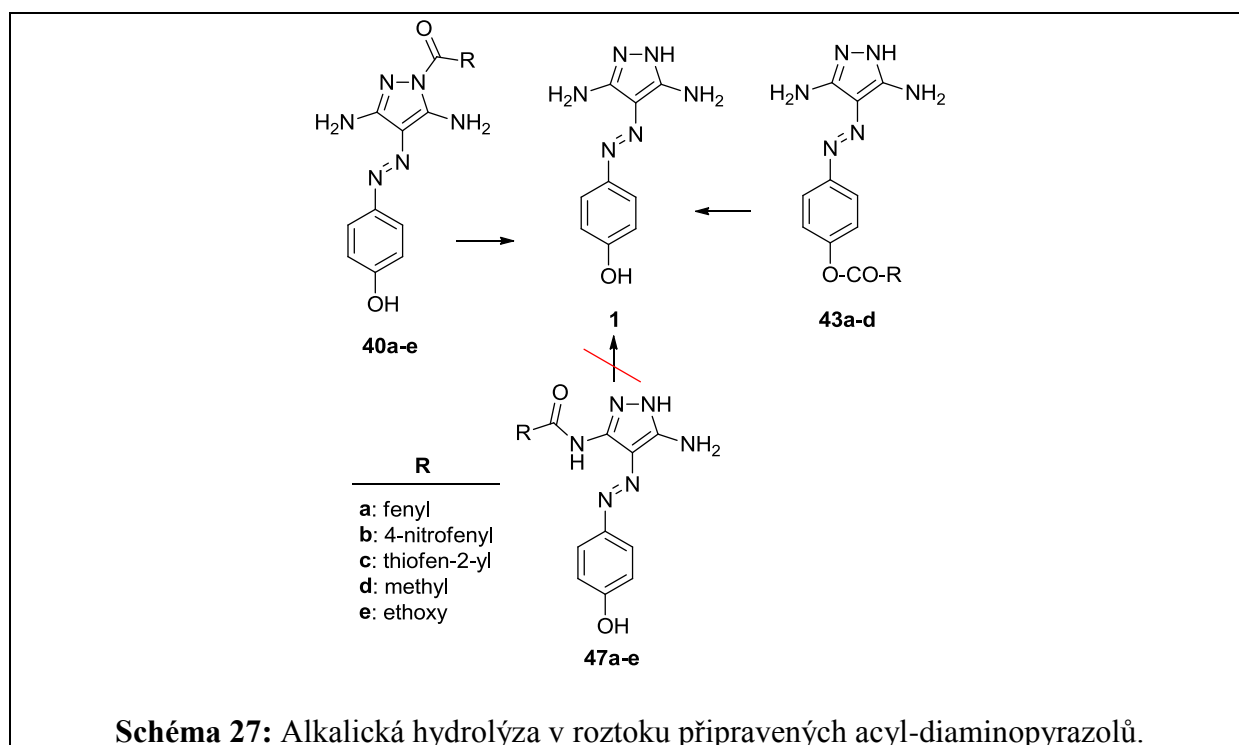
Acylace diBoc-pyrazolu **37** chloridy byly prováděny rovněž v bezvodém pyridinu. Aromatické chloridy byly přidávány v množství 1.1 ekvivalentu a alifatické 1.8 ekvivalentu. Vedle acylace chloridy bylo záměrem rozšíření možností přípravy **45a-d** o jiné acylační metody – reakci Dmb-Boc-pyrazolu **31** s karboxylovými kyselinami, které reagovaly v přítomnosti DIC, DMAP jako katalyzátoru a TEA jako báze. Podmínky byly převzaty od úspěšné acylace kyselinami na fenolickou hydroxy skupinu. Zde však tyto postupy selhaly. Tyto reakce probíhaly velmi neochotně s nízkou konverzí. Jednalo se o slabší acylační činidla a jejich použití pro acylaci ochráněného Dmb-Boc-pyrazolu **31** nebylo výhodné. Acylace diBoc-pyrazolu **37** kyselinami v přítomnosti DIC, TEA, DMAP selhala kompletně. Zkoušeli jsme 1 i 2 ekvivalenty symetrického anhydridu formovaného z kyseliny a DIC v suchém THF za přítomnosti DMAP a TEA. Produkt acylace jsme detekovali jen v případě benzoylu a 4-nitrobenzoylu a to z cca. 5%. Podmínky byly dále modifikovány, byl vyzkoušen aktivovaný ester s přidavkem HOBt a s prodloužením „aktivace“ z 10 min na 1 h. Zajímavé

bylo, že ačkoliv tento protokol nefungoval v roztoku, na pevné fázi, i když s aktivací jiných kyselin, ano (kapitola 4.4.3 o syntéze pyrazolů na pevné fázi). V roztoku však byly vhodnějšími acylačními činidly chloridy.

#### 4.3.3.2 Rozlišení acyl-pyrazolových izomerů alkalickou hydrolyzou

Určit jednoznačně polohu substituentů na popisovaných pyrazolech je možné pomocí rentgeno-strukturální analýzy. Další možností je NMR spektroskopie, která však díky komplikované konjugované struktuře diaminopyrazolu s více dusíkovými atomy nemusí poskytnout jednoznačné strukturální informace. Rozhodli jsme se najít jednoduchou chemickou cestu, jak polohové izomery rozlišit. Výchozím předpokladem je rozdílná reaktivita acylu na pyrazolovém kruhu, na amino a na hydroxy skupině.

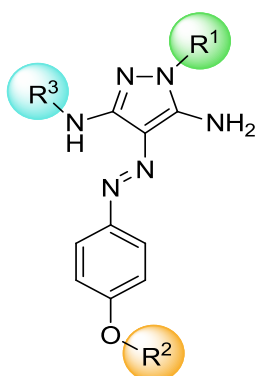
Byla srovnána reaktivita připravených acyl-diaminopyrazolů<sup>112</sup> **40a-e**, **43a-d**, **47a-e** (Schéma 27) s různou polohou acylu. Všechny deriváty byly podrobeny alkalické hydrolyze zředěným NaOH ve směsi THF/MeOH po dobu 1h. Alkalicky labilní se ukázal nejen esterově vázaný acyl u derivátů **43a-d**, ale také u derivátů **40a-e**, kde byl acyl navázán na pyrazolový dusík. Vznikal nechráněný pyrazol **1**. Acyl navázaný na stéricky přístupnější amino skupinu v poloze 3 v případě derivátů **47a-e** se vlivem hydroxidu na pyrazol **1** nerozkládal, je stabilní. Reakce byly provedeny v miligramovém množství, neuvádíme výtěžky. Nejedná se o absolutní metodu, byla však použita v předložené práci jako srovnávací metoda při určení polohy acylu v kapitole věnované syntéze chemické knihovny pyrazolů (4.4.3).



### 4.3.3.3 Biologická aktivita připravených látek

Biologická aktivita vybraných pyrazolů (Tabulka 5) navazuje na předchozí práci v oblasti inhibice CDK 4-arylazo-3,5-diaminopyrazoly.<sup>3</sup> Ukazuje se, že acylace na endocyklickém pyrazolovém dusíku (**40a**, **40e**) snižuje biologickou aktivitu oproti strukturnímu modelu **1**. Zatímco acylace na exocyklické amino skupině (**47a-e**) zvyšuje inhibiční potenciál všech testovaných sloučenin. Připravené látky byly testovány jako inhibitory CDK2 a na buněčné lince rakoviny prsu (MCF7).

**Tabulka 5:** Inhibiční aktivita rekombinační CDK2/cyklin E kinasy a cytotoxicita proti MCF7 rakoviny prsu vybraných pyrazolů



Sloučenina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
				CDK2	MCF7
<b>1</b> (CAN508)	H	H	H	3.5 ± 0.7	33 ± 0.75
<b>40a</b>	benzoyl	H	H	23 ± 7.2	> 25
<b>40e</b>	ethoxykarbonyl	H	H	100 ± 16	70 ± 11
<b>47a</b>	H	H	benzoyl	1.7 ± 0.5	10.5 ± 4.2
<b>47b</b>	H	H	4-nitrobenzoyl	5.2 ± 1.3	> 25
<b>47c</b>	H	H	thiofen-2-karbonyl	4.3 ± 1.4	> 12.5
<b>47e</b>	H	H	acetyl	2.6 ± 0.7	13.9 ± 3.3

<sup>a</sup> ... poloviční maximální (50%) inhibiční koncentrace (IC) substance (50% IC, nebo IC<sub>50</sub>)

## 4.4 Acylované pyrazoly na pevné fázi

4-(Aryldiazenyl)-pyrazol-3,5-diaminy byly v rámci této práce syntetizovány i na pevné fázi. Syntéza na pevné fázi se přednostně využívá v kombinatoriální chemii pro syntézu chemických knihoven. V závislosti na tom, ve kterém stádiu vyhledávání biologicky aktivních látek se výzkum nachází, existují rozdílné přístupy. Rozlišuje se vyhledávání nových biologicky aktivních sloučenin, tzv. „hit nebo lead discovery“, které zahrnuje syntézu strukturálně nových a diverzních látek, a optimalizace struktury „lead optimization“ za účelem získání sloučenin s lepšími vlastnostmi, které se testují jako potenciální léčiva a studuje se vliv provedených strukturních změn na různé farmakologické vlastnosti. Při optimalizaci struktury je snaha zachovat biologicky úspěšný farmakofor a provádět drobnější změny v molekule.<sup>142</sup>

Výchozím strukturním modelem v této práci byl 4-((3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenol **1** (CAN508),<sup>3</sup> který byl identifikován jako inhibitor CDK. Strategie, které byly aplikovány v syntéze pyrazolů na pevné fázi, byly dvojího typu. Syntéza pyrazolu **1** byla převedena z roztoku do pevné fáze modulárním způsobem, který umožňuje modifikovat strukturní prvky v jakémkoliv místě molekuly. Další strategií bylo navržení knihovny látek na základě krystalové struktury komplexu inhibitor **1**-CDK **2**, kde byl polymerní nosič navazován pyrazol připravený v roztoku, zde se tedy jednalo o modifikaci jen periferní substituce pyrazolu.

Tuto kapitolu tvoří tři části – převedení syntézy pyrazolu **1** z roztoku do syntézy na pevné fázi, testování možností ukotvení pyrazolů na pevné fázi a příprava menší knihovny s využitím principu kombinatoriální chemie.

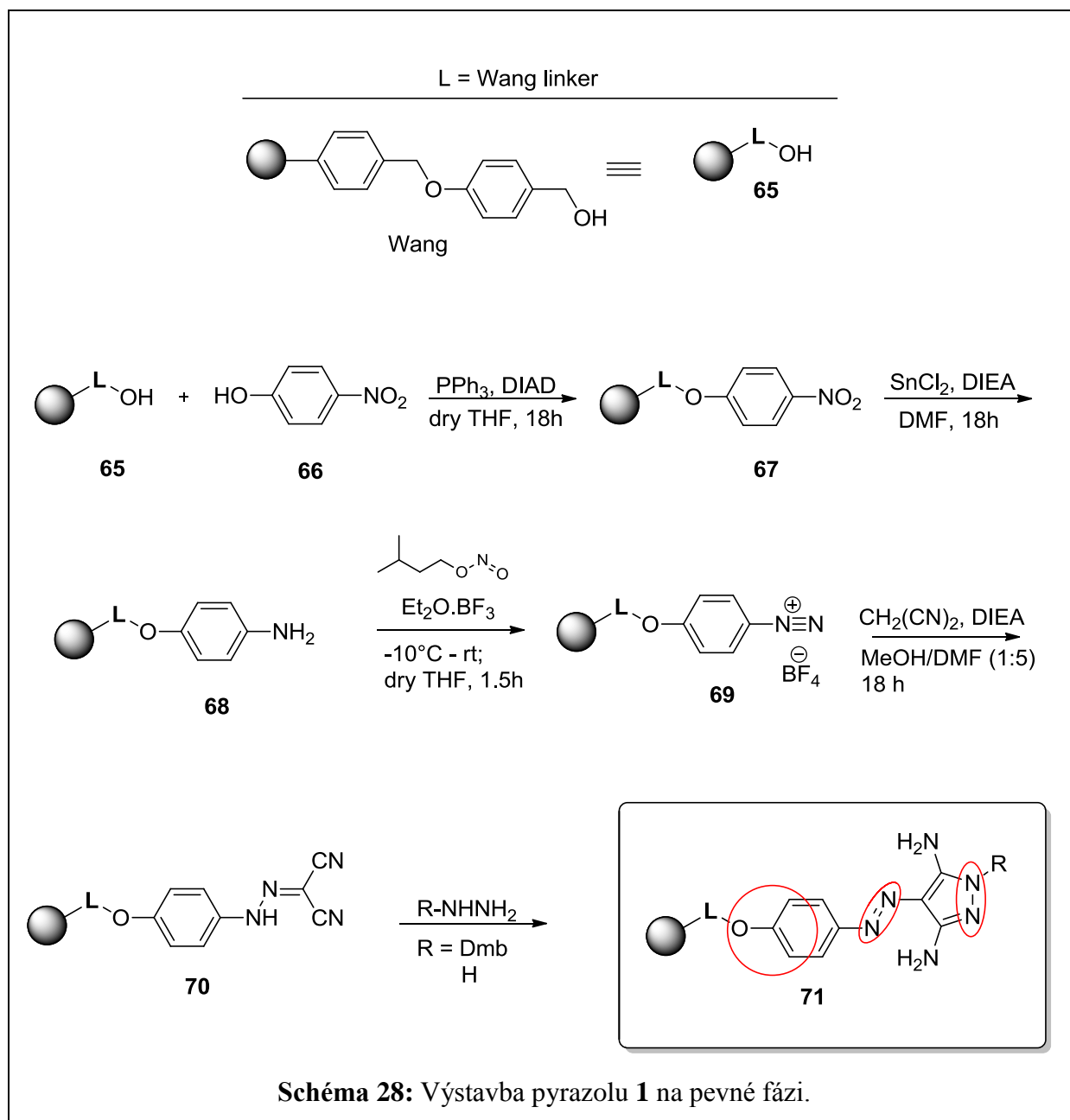
### 4.4.1 Výstavba pyrazolu **1** na pevné fázi

Tato část navazuje na již vypracovanou syntézu 4-((3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenolu **1**<sup>3</sup> a jeho amino substituovaných derivátů<sup>112</sup> v roztoku. Tyto acylované deriváty byly navrženy na základě struktury pyrazolu **1**, který je zajímavý svou biologickou aktivitou v oblasti selektivní inhibice cyklin-dependentních kinas (CDK).

Výchozím materiálem byl 4-nitrofenol (**66**, Schéma 28), který byl pomocí Mitsunobu reakce navázán na pryskyřici. Sledem reakcí zahrnujícím redukcí nitro skupiny, diazotací vzniklé amino skupiny, kopulací s malononitrem a cykloadicí s hydrazinem či s Dmb-hydrazinem bylo dosaženo pyrazolové struktury (**71**).

Význam výstavby heterocyklu pyrazolu **1** (**71**, Schéma 28) na pryskyřici modulárním způsobem spočívá v tom, že po zvládnutí celé syntézy umožňuje modifikovat reakční kroky a

stavební kameny tak, aby se zaměnily jednotlivé části molekuly, které jsou naznačeny červeně. Modulární syntéza umožňuje záměnu arylu, azo můstku a hydrazinové části. Taková modifikace struktury by vedla k celé knihovně derivátů vhodných k biologickým testům a přispělo by to k lepšímu poznání vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou. Ukázalo by se totiž, které strukturální prvky jsou kritické pro úspěšnou inhibici CDK.



Prvním úkolem byla volba pryskyřice (**65**). Byla vybrána Wangova<sup>141</sup> pryskyřici, na níž byla výchozí látka navázána s pomocí Mitsunobu reakce<sup>143</sup> se substitucí 0.43 mmol/g (49%).

Následovala redukce nitro skupiny (**67**) na amino (**68**), jako činidlo byl použit chlorid cínatý<sup>144</sup> za přídavku báze DIEA. Stejně jako ostatní syntetické kroky, i tato reakce byla kontrolována na LC-MS. Ale před odštěpením látky navázané na pryskyřici působením štěpícího koktejlu tvořeného 50% TFA v DCM bylo třeba tuto látku z důvodu detekce nechat reagovat s Fmoc chloridem. Tato reakce byla úspěšná a následovala diazotace.

V roztoku se pro diazotaci nejčastěji používá dusitan sodný v prostředí kyseliny chlorovodíkové,<sup>145</sup> také je možné použít TFA.<sup>146</sup> Ale je třeba zohlednit pevnou fázi a z toho plynoucí omezené možnosti při výběru vhodného rozpouštědla a činidla, aby nedocházelo k odštěpení syntetizované látky z pryskyřice a také, aby pryskyřice dobře bobtnala. Z toho důvodu byly vyzkoušeny jemnější kyselé podmínky s použitím kyseliny octové v NMP.<sup>147</sup> Zdrojem nitrosylového kationtu nutného pro diazotaci byl amylnitrit. Výhodnější než kyselina octová bylo použití fluoridu boritého etherátu, protože došlo k formaci stabilní diazoniové soli (**69**).<sup>148,149</sup>

Po diazotaci rovnou následovala další reakce – kopulace s malondinitrilem. Bylo nutné najít vhodné reakční prostředí. Byla vyzkoušena reakce v pyridinu,<sup>143</sup> který současně působil jako rozpouštědlo i jako báze. Reakci byla testována ve dvojitě provedení – za laboratorní teploty a při doporučených 80° C. Reakcí za laboratorní teploty produkt (**70**) vznikal, ale konverze byla nízká a produkt obsahoval nečistoty. Při vyšší teplotě se produkt nepodařilo vůbec detekovat. Literatura uváděla dobré výtěžky při použití octanu amonného jako báze.<sup>150,151</sup> Jako rozpouštědla byl zvolen kompromis – methanol/DMF (1:1), protože methanol, ačkoliv pryskyřici sráží, dobře rozpouští octan amonný, a DMF je zase vhodný pro nabobtnání pryskyřice. Tentokrát reakce běžela čistě a s vyšší konverzí a bylo na místě tuto reakci optimalizovat. Měnil se poměr rozpouštědel ve prospěch DMF, tedy methanol/DMF (1:5), dále DMF za DCM, protože v něm pryskyřice výborně bobtná, a také použít výrazný nadbytek báze. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v rozpouštědlech methanol/DMF (1:5). Při studiu této reakce byl studován také vliv báze, a tak byly analogicky provedeny další experimenty, kde byly zachovány optimální podmínky a jen se měnila báze. Vedle doporučeného octanu amonného byl vyzkoušen také pyridin, 2,6-lutidin, DIEA a DBU. Právě s posledními dvěma bázemi probíhala reakce nejlépe, tedy je možné vyvodit závěr, že reakce vyžaduje silnou bázi. Pro další postup byl jako báze vybrán DIEA.

Dalším syntetickým krokem byla reakce s hydrazinem za vzniku heterocyklu (**71**). V roztoku se tato reakce dělá v methanolu varem 4 h, jenže methanol není vhodné médium pro syntézu na pevné fázi. Literatura uvádí analogickou reakci diketonu na pevné fázi se substituovaným hydrazin hydrochloridem. Pro uvolnění hydrazinu je třeba přidat bázi TEA a reakce se

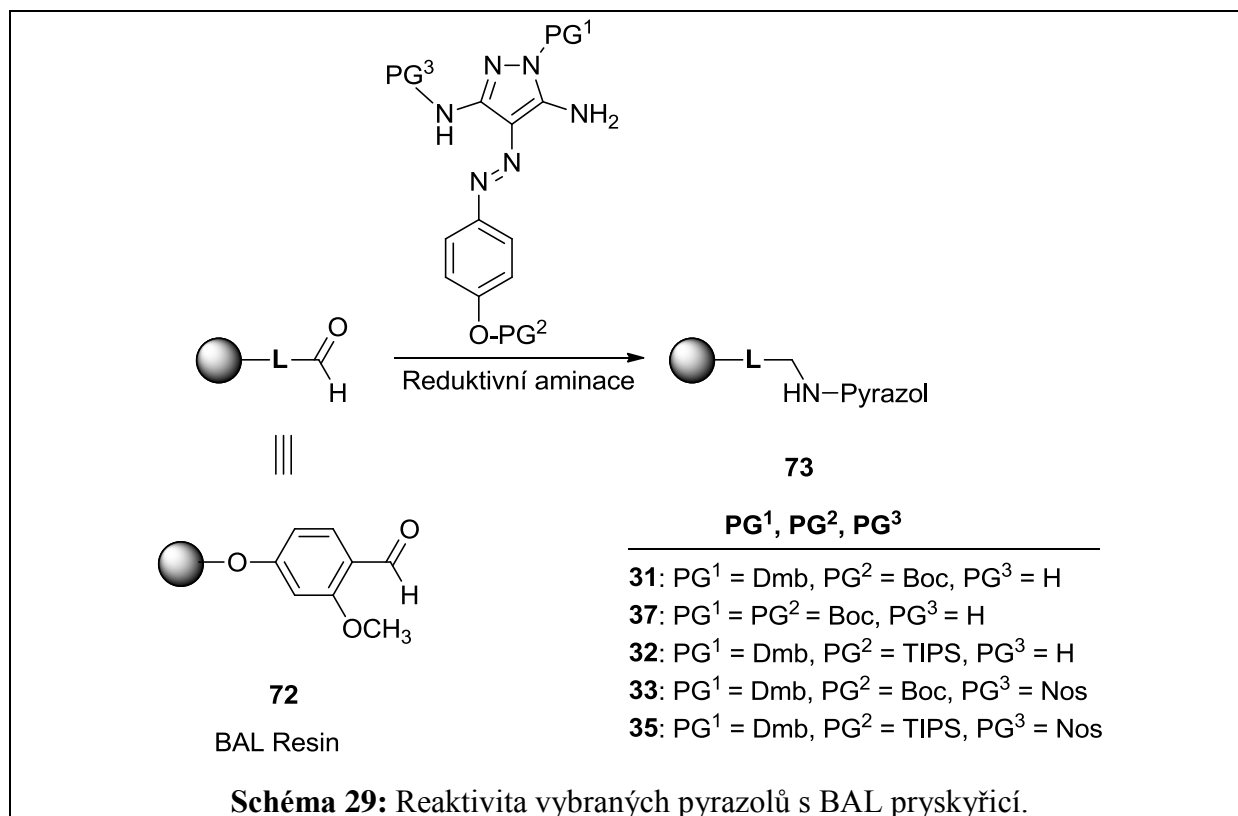
provádí za vyšší teploty, která souvisí s volbou rozpouštědla.<sup>152</sup> V rámci této práce byla reakce provedena za různých podmínek. Hydrazin byl používán ve formě hydrochloridu i monohydrátu, substituované deriváty hydrazinu (Dmb, Bn) ve formě hydrochloridu. V zásadě se dařila reakce s hydrochloridy hydrazinů za přítomnosti báze TEA, octanu sodného, pyridinu. Vždy však vznikaly i nečistoty. Reakce byly prováděny při teplotách 50 °C – 80 °C, jak dovolovalo rozpouštědlo THF, toluen, NMP, DMSO. Jestli se jednalo čistě o výševroucí rozpouštědlo nebo o směs s alkoholem (methanol, ethanol) nehrálo ve výsledku až takovou roli. Reakce s hydrazin monohyrátem nakonec byla úspěšná v DMSO za kyselých katalýzy kyseliny octové, při teplotě 80° C, s čistotou surového produktu 65%. Se substituovaným hydrazinem Dmb-NHNH<sub>2</sub>.HCl se rovněž nejvíc osvědčil DMSO za vyšší teploty a přítomnosti pyridinu.

Závěrem lze shrnout, že modulární syntéza pyrazolu **1** byla popisovaným způsobem principiálně možná. V posledním kroku však vznikalo velké množství nečistot. Z praktických důvodů bylo od tohoto přístupu ustoupeno, čistý pyrazol nebyl izolován.

#### 4.4.2 Navázání pyrazolu na pevnou fázi

Za účelem testování reaktivity chráněných pyrazolů a při zvažování volby nejvhodnějšího postupu pro syntézu knihovny byla provedena řada pokusů o navázání pyrazolu na pevnou fázi. Z tohoto předběžného výzkumu vyplynula nezbytnost vhodně volených protektivních skupin na vícenásobně funkcionalizovaném pyrazolu, kde je reaktivita jednotlivých funkčních skupin odstupňována v tomto sledu: pyrazolový endocyklický dusík > fenolická hydroxy skupina > amino skupina. Analogická je i ochota pyrazolu vázat se na pevnou fázi. S ohledem na to je nutné uzpůsobit i volbu pryskyřice a aktivace.

Pro testování možnosti navázání pyrazolu byla zvolena reduktivní aminace<sup>153</sup> na pryskyřici BAL (**73**, Schéma 29),<sup>154</sup> mezi aldehydickou funkční skupinou polymerního nosiče a amino skupinou příslušného pyrazolu. Výsledné substituce na pryskyřici („loading“) jsou uvedeny v Tabulce 6.



**Tabulka 6:** Navázání pyrazolů na BAL pryskyřici.

Navazovaný pyrazol	Substituce na pryskyřici [mmol/g]
<b>31</b>	0.40
<b>37</b>	0.32
<b>32</b>	0.15
<b>33</b>	Nízký, navazuje se i bez Nos skup.
<b>35</b>	Nereaguje

Dalším syntetickým záměrem byla acylace amino skupiny, přes kterou se pyrazol (**31**, **32**, **33**, **35**, **37**) vázal na BAL a pak Mitsunobu reakce Nosylované amino skupiny s různými alkoholy. Jenže Nosylované pyrazoly se na pevnou fázi nevázaly, což bylo zřejmě způsobeno tím, že lze substituovat jen jednu amino skupinu pyrazolu, dle předpokladu stericke přístupu.

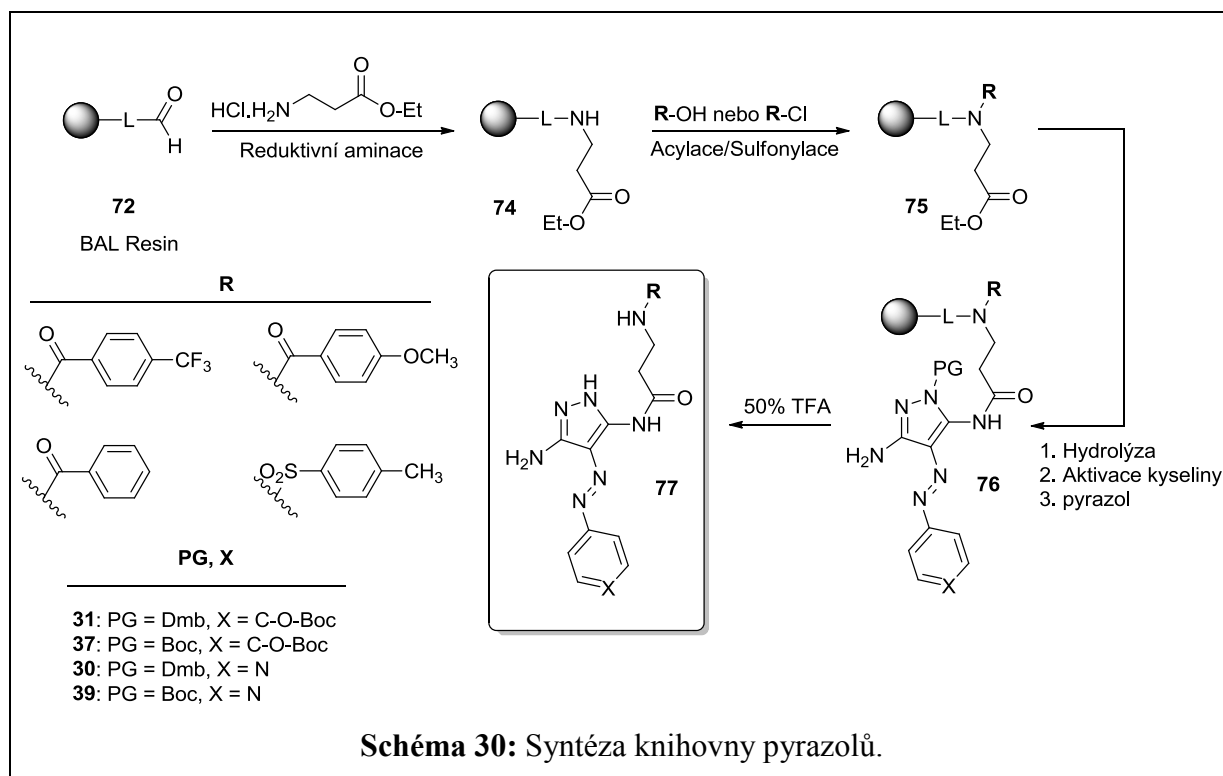
Tyto reakce vypovídají o reaktivitě různě substituovaných pyrazolů. Nicméně pro syntézu knihovny pyrazolů nejsou vhodné kvůli nízké reaktivitě druhé amino skupiny, takže pro syntézu knihovny je třeba na pryskyřici vystavět substituent s více reakčními centry, na který je možné navázat daný pyrazol a zároveň aplikovat kombinatoriální přístup.



### 4.4.3 Syntéza knihovny pyrazolů

Byla navržena taková knihovna pyrazolů, která by zachovala strukturu úspěšného inhibitoru CDK a zároveň by byl pyrazol substituovaný na amino skupině. Na základě krystalické struktury komplexu inhibitor-enzym totiž bylo možné předpokládat, že pyrazol dobře zapadne do aktivního místa enzymu, bude-li mít volný pyrazolový endocyklický dusík, na jedné amino skupině menší nebo žádný substituent a na druhé může být i objemnější substituent.

Před samotnou syntézou knihovny pyrazolů (Schéma 30) bylo nejprve nutné provést sérii předběžných reakcí, na jejichž základě pak byla zvolena odpovídající metodika.



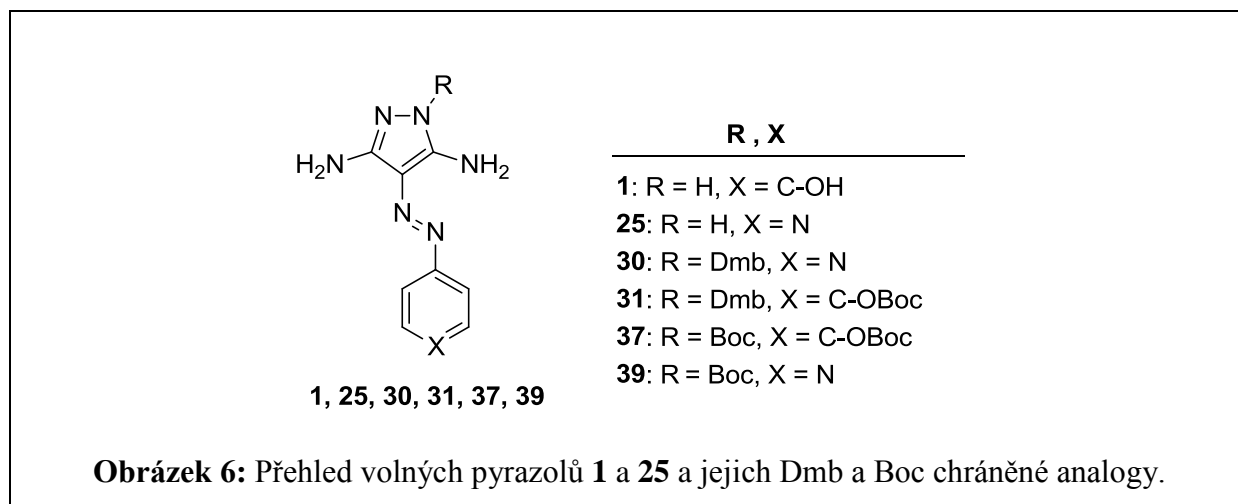
Alifatické raménko,  $\beta$ -alanin ethyl ester a glycin ethyl ester, bylo na pryskyřici (**72**) ukotveno přes amino skupinu reductivní aminací. Alifatický můstek tedy mohl být tvořen dvěma nebo třemi uhlíky. Substituce polymerního nosiče oběma estery byla srovnatelná, pro další syntézu byl vybrán jen  $\beta$ -alanin.

Alifatické raménko (**74**) na sekundárním aminu bylo dále substituováno karboxylovými kyselinami nebo sulfonyl chloridy. Acylace aromatickými karboxylovými kyselinami byla provedena jejich převedením na aktivovaný ester působením DIC a HOBt. Byly vybrány takové benzoové kyseliny, které se lišily elektronovým efektem substituentu v poloze para. Jednalo se o tyto substituenty: vodík, methoxy, trifluormethyl. Reakce sulfonyl chloridu se

sekundárním aminem byla podpořena přítomností báze lutidinu, sulfonylace běžela s tosyllem i 2- a 4-nosylem. Jako reprezentativní zástupce pro syntézu knihovny byl vybrán tosyl.

Esterová skupina na alifatickém můstku (**75**) byla hydrolyzována na karboxylovou kyselinu alkalickým roztokem hydroxidu sodného ve směsi rozpouštědel THF/MeOH. Hydrolyzu esterů amino kyselin za mírnějších podmínek podporuje také trimethyl silanolát draselný.<sup>155,156</sup> Jeho použitím se však prodloužil reakční čas – pro kompletní hydrolyzu bylo třeba 24h, zatímco hydrolyza hydroxidem byla ukončena po hodinu.

Hydrolyzou získaný karboxyl bylo třeba náležitě aktivovat pro reakci s dalším aminem – v roztoku připraveným 3,5-diaminopyrazolem za vzniku struktury **76**. Vedle pyrazolu **1** (Obrázek 6) byl na karboxyl vázán také jeho analog **25** lišící se v arylové části – místo fenolu měl pyridin. Tyto dva pyrazoly byly zvoleny z důvodu jejich biologických aktivit. Pyrazol **25** dosahoval 5x lepších inhibičních výsledků než pyrazol **1**. Záměrem bylo navázání daného pyrazolu přes stéricky přístupnější amino skupinu, právě takové deriváty totiž dosahovaly nejlepších výsledků v inhibici CDK.<sup>112</sup> Z toho důvodu bylo třeba zabránit acylaci endocyklického dusíku, což mělo zajistit použití protektivních skupin Dmb a Boc. U fenolu bylo třeba ochránit i hydroxy skupinu a k tomu sloužil rovněž Boc.



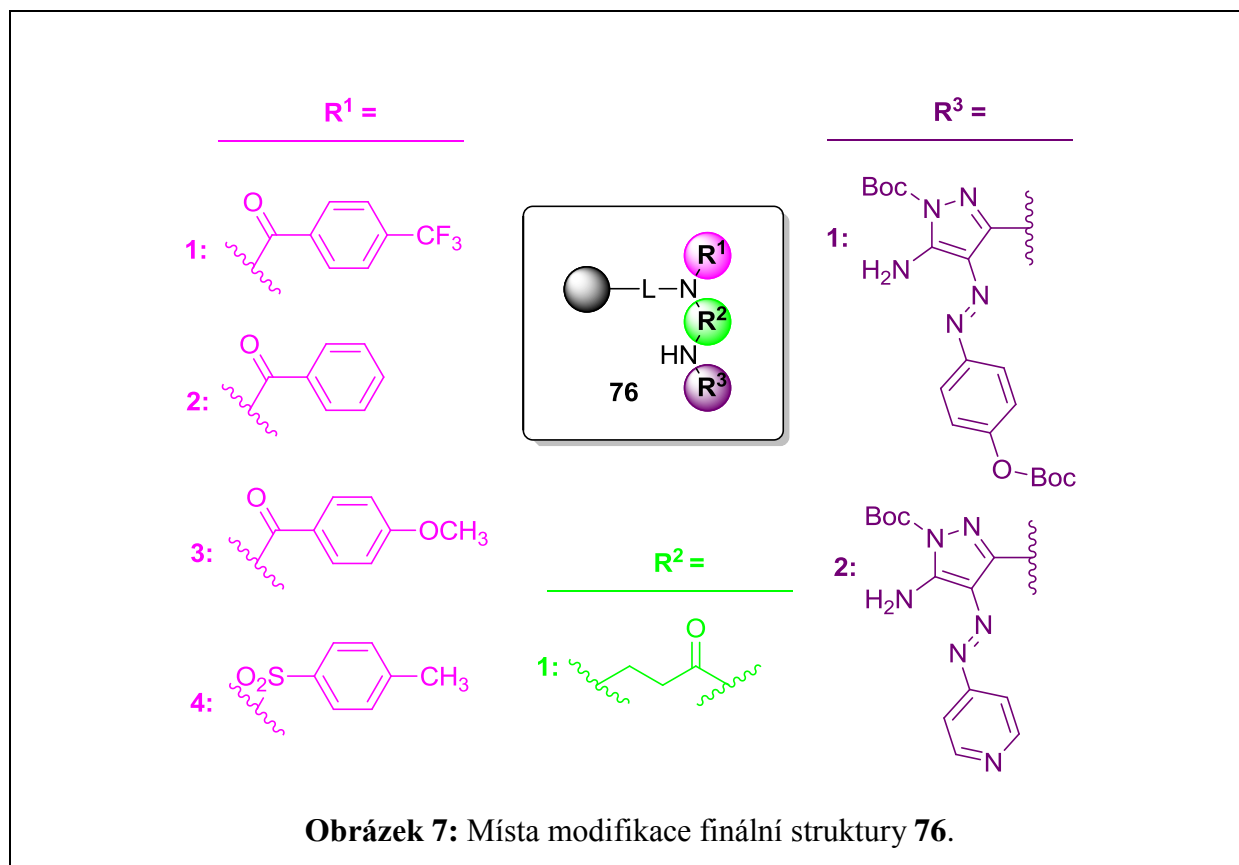
Pro tvorbu amidu reakcí karboxylové kyseliny nebo jejího derivátu s aminem na pevné fázi je tradičně amin ukotvený na pevné fázi a reaguje s roztokem aktivované kyseliny. Toto provedení používal už Merrifield<sup>157</sup> při své peptidové syntéze. V našem případě diaminopyrazolu a karboxylové kyseliny jsou role obrácené – kyselina je na pevné fázi a je třeba ji zde aktivovat pro reakci s aminem. Aktivace byla provedena působením DIC a HOBt ve směsi rozpouštědel DMF/DCM (1:1) a pryskyřici nesoucí karboxylovou skupinu byla

třepána po dobu 1h. Poté byl aktivační roztok od pryskyřice odfiltrován a hned byl přidán roztok chráněného pyrazolu, vše pak bylo třepáno přes noc. Nejprve byla reakce studována s Dmb-Boc-pyrazolem **31**. Výsledkem byla bohatá reakční směs, což bylo způsobeno i tím, že chránící skupiny jsou kyselě labilní, a tak je štěpící koktejl částečně odštěpoval. Provedení aktivace bylo modifikováno přidavkem DMAP jako katalyzátoru, ale stále vznikala směs. Nabízela se další aktivační činidla jako směs trichloracetonitrilu/trifenylfosfinu,<sup>158</sup> uroniová sůl HBTU<sup>159</sup> nebo thionyl chlorid a další.<sup>160</sup> Situace se však značně zjednodušila při použití diBoc-pyrazolu **37**. Vznikal čistě produkt svou hmotou odpovídající struktuře **76** (Schéma 30). Použití diBoc-pyrazolu **37** mělo i další výhody – chránící skupiny se do molekuly pyrazolu snadno zaváděly, snadno a rychle se štěpily a derivát byl i lépe rozpustný než analogický Dm-Boc-pyrazol **31**. Pro syntézu knihovny se tedy z těchto důvodů používaly pyrazoly chráněné Boc skupinou **37** a **39**.

Po zvládnutí syntézy až do stádia navázání pyrazolu (**76**) byla provedena řada testovacích reakcí s cílem substituovat druhou amino skupinu pyrazolu. Nedařila se však methylace (methyl jodidem, methyl triflátem), ani reakce s Nosyl chloridem, která by pak umožňovala Mitsunobu reakci s příslušnými málo „objemnými“ alkoholy – např. methanolem, ethanolem a isopropanolem. Navázaný pyrazol nešlo acylovat chloridem kyseliny (2-thiofenkarbonyl chlorid, oxalyl chlorid) ani kyselinou s aktivací DIC, HOBt (2-thiofenkarboxylová kyselina, kyanoctová kyselina), nefungovala reakce s ketonem (acetylaceton), diazotace amyl-nitritem a následná kopulace s C-kyselinami (malononitril, kyanoacetyluretan) ani redukivní aminace s paraformaldehydem.

Z důvodu obtížné derivatizace druhé aminoskupiny se tedy pro syntézu knihovny substituovala jen jedna aminoskupina. Po navázání pyrazolu následovalo odštěpení z pryskyřice a purifikace produktu.

O struktuře **76** ukotvené na pevné fázi lze z kombinatoriálního hlediska říci, že má tři diverzní místa **R**<sup>1</sup>, **R**<sup>2</sup> a **R**<sup>3</sup>, kde mohou být různé strukturní prvky. Jako **R**<sup>1</sup> byly vybrány tři různé acyly a sulfonyl (4), jako **R**<sup>2</sup> byla pro syntézu knihovny zvolena jen jedna možnost – β-alanin (1) a jako **R**<sup>3</sup> dva různé pyrazoly (2). Tímto kombinatoriálním přístupem je tedy možné připravit celkem 8 (4\*1\*2) finálních látek.

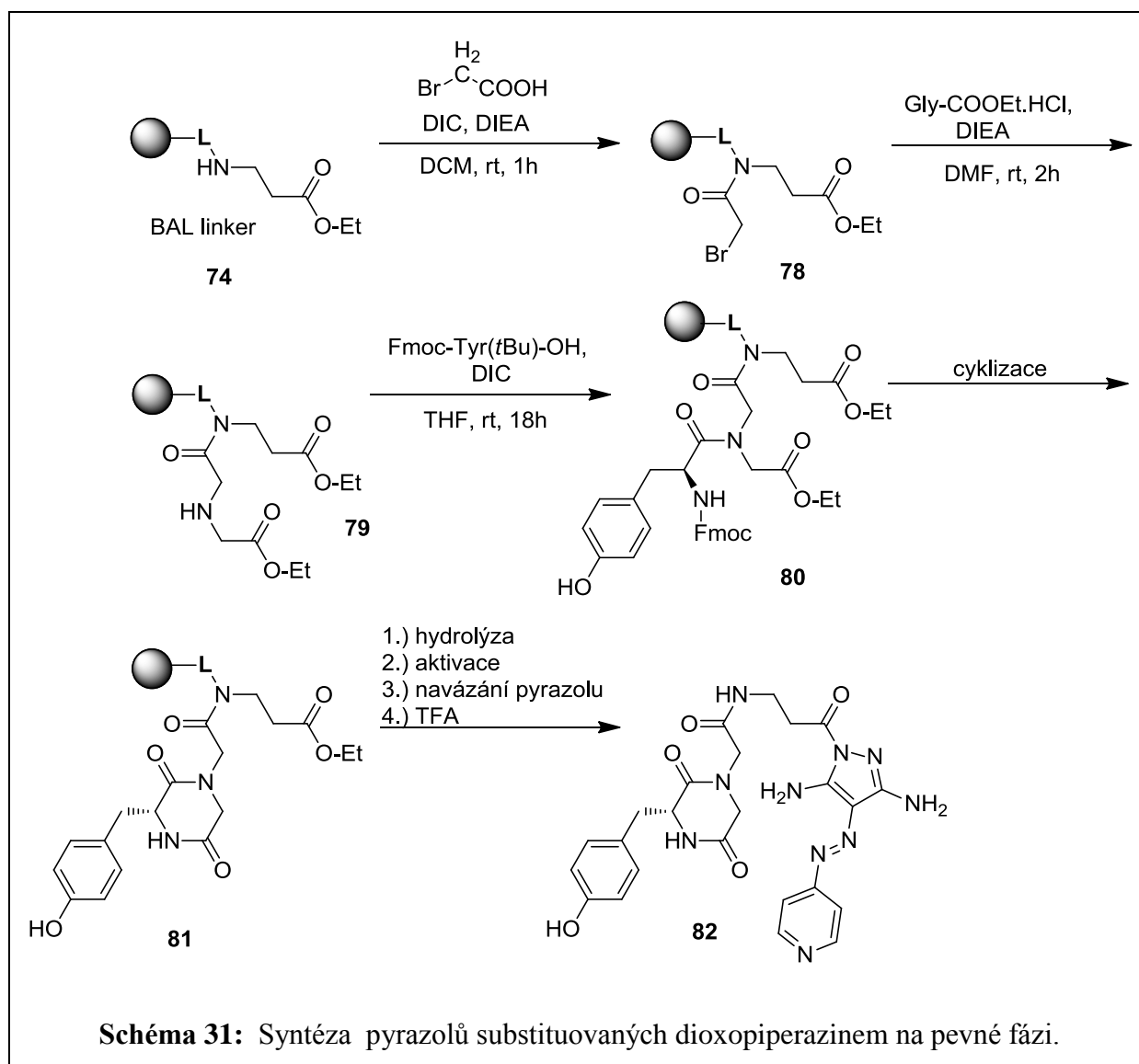


Dalším syntetickým záměrem byla příprava knihovny s chirálními substituenty. Byl zvolen dioxopiperazinový heterocyklus na alifatickém raménku, který by rovněž mohl dobře vyplnit aktivní místo enzymu CDK a mohl by následně zlepšit biologický účinek daného derivátu pyrazolu. Jako stavební kameny pro výstavbu dioxopiperazinu byly vybrány amino kyseliny glycín a tyrosin. Amino skupina  $\beta$ -alaninu byla v tomto případě acylovalována bromoctovou kyselinou místo aromatických karboxylových kyselin. Syntéza je zachycena ve Schématu 31. Začátek syntézy je shodný se Schématem 30: jako linker na pryskyřici byl zvolen BAL, následovala reductivní aminace s  $\beta$ -alanin ethyl ester hydrochloridem (**74**). Zde se obě syntézy rozcházejí, dalším krokem byla acylace kyselinou bromoctovou (**78**).

Brom byl nukleofilně substituován<sup>161</sup> amino skupinou glycín ethyl ester hydrochloridu (**79**). Nejprve byla vyzkoušena reakce s methyl esterem, ale byl omezeně rozpustný, zatímco ethyl ester reagoval v roztoku.

Následovalo navázání druhé aminokyseliny převedené působením DIC na symetrický anhydrid (**80**).<sup>162</sup> Z důvodu snadné detekce díky chromoforu byl vybrán Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH. Fmoc skupina byla odštěpena působením piperidinu v DMF (1:1), 20 min a tím se uzavřel dioxopiperazinový cyklus (**81**). V okamžiku, kdy byla z molekuly odstraněna Fmoc skupina,

byla syntetizovaná látka stále dobře detekovatelná na LC-MS díky tyrosinovému skeletu. To bylo důležité pro monitorování následující reakce – hydrolyzy.



Úspěšnost hydrolyzy byla kontrolována na LC-MS. Získaná kyselina byla aktivována (DIC, HOBt)<sup>163</sup> a byl na ni navázán Boc chráněný pyrazol **39**. Na závěr byla na pevné fázi vystavěná látka z pryskyřice odštěpena a purifikována.

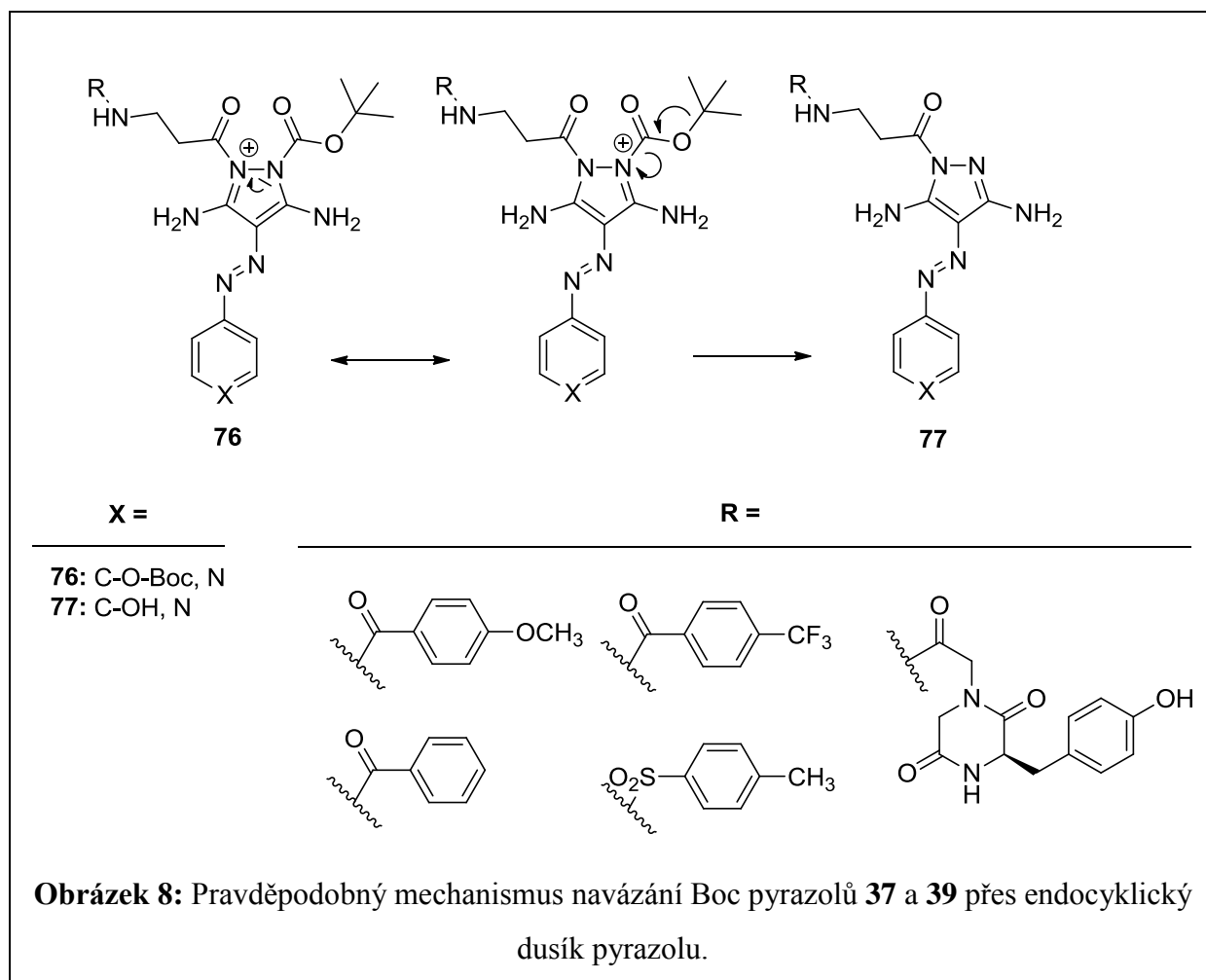
Více derivátů lišících se v substituci dioxopiperazinu použitím různých amino kyselin na jeho výstavbu nebo navázání jiného pyrazolu nebylo z časových důvodů provedeno.

Ve třech případech (**77(1,1,2)**, **77(2,1,1)**, **77(4,1,2)**) však vznikaly dva produkty o stejné hmotě. Tato odchylka se vyskytla u obou typů pyrazolů – s fenolem nebo pyridinem jako arylem. V syntéze v roztoku taková situace vzniku dvou produktů nebyla pozorována, vznikala vždy jen jedna látka vázaná na amino skupinu.

Možnost rozkladu navazovaného pyrazolu, tedy že by v průběhu reakce došlo k odštěpení chránící Boc skupiny, byla vyloučena analýzou reakčního roztoku - ukázalo se, že oba (**37**, **39**) pyrazoly jsou stabilní. Poloha protektivních skupin byla v případě fenolového pyrazolu (**45b**, kapitola 4.3.3.1) navíc jednoznačně prokázána rentgenostrukturní analýzou.<sup>112</sup>

Z faktu, že mohly vznikat dva různé deriváty o stejné hmotě ale s rozdílným retenčním časem, bylo možné předpokládat, že chráněné pyrazoly se mohou navazovat na dvou místech. Acyl se jednak může navázat na stericky přístupnější aminoskupinu, ale díky mezomerii i přímo na pyrazolový dusík, Obrázek 8.

Možným vysvětlením acylace na endocyklický dusík i přes použití protektivních skupin je vysoká elektronová hustota na tomto dusíku. Může se sem navázat acyl za vzniku kationtu (**76**, Obrázek 8), který se stabilizuje zapojením volného elektronového páru dusíku, což může vyvolat tah na vazbu a dochází k odštěpení Boc skupiny.



Poloha substituce u celkem 12 připravených látek byla určena srovnáním reaktivit v roztoku již dříve připravených acyl-diaminopyrazolů.<sup>112</sup> Jednoduchou chemickou cestou jak rozlišit polohové izomery je tomto případě alkalická hydrolýza.

Vzhledem k tomu, že pro syntézu na pevné fázi byly používány pyrazoly jednak na hydroxy skupině chráněné Boc skupinou nebo pyridino deriváty, je struktura odpovídající esterově vázanému acylu jako finální produkt vyloučena. V úvahu připadají deriváty s acylem na pyrazolu nebo na amino skupině. Většina z celkem 11 finálních látek se působením hydroxidu rozkládala, jen tři **77(1,1,2)-F1**, **77(2,1,1)-F1**, **77(4,1,2)-F1** byly stabilní. Alkalická hydrolýza indikovala, že se pyrazoly na pevné fázi acylují primárně i přes použití protektivních skupin na pyrazolový dusík, což umožňuje mezomerie. Přestože ve třech případech vznikaly dva majoritní produkty, podařilo se purifikací reakční směsi oba izolovat a toto množství bylo dostatečné pro charakterizaci pomocí <sup>1</sup>H NMR. I v případě substituce pyrazolu derivátem dioxopiperazinu se získaná látka v hydroxidu rozkládala na nesubstituovaný pyrazol **25**. Lze tedy předpokládat, že pyrazol byl vázán přes endocyklický pyrazolový dusík.

Přehled všech pyrazolů připravených na pevné fázi ukazuje Tabulka 7.

Znovu byla pozornost zaměřena k původní syntéze (Schéma 5). Acylací Boc-chráněných pyrazolů (**37**, **39**) mohou vznikat dva produkty. Boc skupina je v tomto případě poměrně labilní a díky mezomerii umožňuje acylaci endocyklického dusíku. Z toho důvodu byly provedeny předběžné reakce s analogickými Dmb-pyrazoly (**31**, **30**) následujícím způsobem: acylace sekundární aminoskupiny β-alaninu benzoylem, hydrolýza esteru, aktivace karboxylu a reakce s aminy Dmb-Boc-pyrazolem (**31**) a Dmb-pyridin-pyrazolem (**30**). Pro syntézu knihovny byly totiž používány jejich analogy s Boc chránící skupinou v poloze 1. Průmysly s navázanými Dmb-chráněnými pyrazoly byly podrobeny alkalické hydrolýze. V obou případech byly detekovány produkty s Dmb. Protože nedošlo k odštěpení acylu, domníváme se, že pyrazol byl vázán přes amino skupinu a touto cestou by bylo možné připravit přes amino skupinu vázané acylované deriváty. Z časových důvodů syntéza knihovny s Dmb-pyrazoly (**31**, **30**) provedena nebyla.

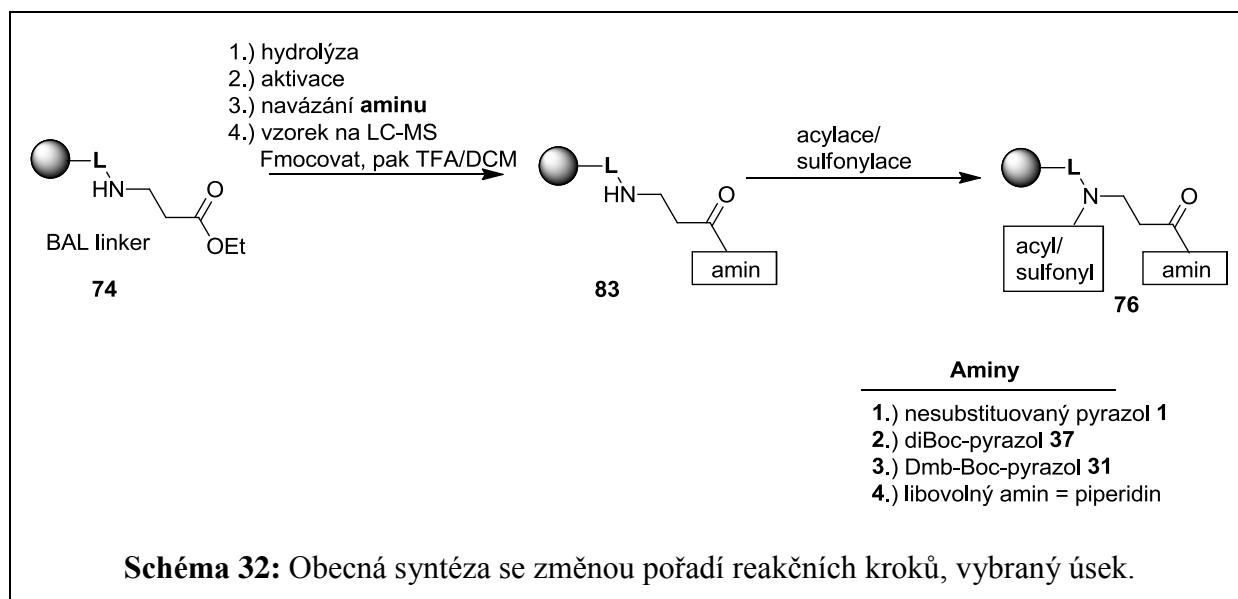
Syntézu lze modifikovat, pořadí reakcí je možné měnit. Ke změně strategie bylo přistoupeno se záměrem zvýšení výtěžků finálních látek a se záměrem zjistit, je-li možné ovlivnit regiosektivitu navazování pyrazolu. Zajímalo nás, jestli se změni způsob navazování pyrazolu změnou pořadí jednotlivých reakčních kroků. Navíc azo pyrazoly jsou výborné chromofory, a tak by byly syntetizované látky v jednotlivých reakčních krocích dobře detekovatelné na LC-MS.

**Tabulka 7:** Knihovna pyrazolů na pevné fázi – přehled připravených derivátů.

Značení	Struktura po odštěpení	Výtěžek	Značení	Struktura po odštěpení	Výtěžek
77(1,1,1)		14.0 mg (32%)	77(3,1,1)		3.4 mg (9%)
77(1,1,2)-F1		8.1 mg (10%)	77(3,1,2)		8.1 mg (17%)
77(1,1,2)-F2		19.5 mg (23%)	77(4,1,1)		14.5 mg (35%)
77(2,1,1)-F1		2.1 mg (6%)	77(4,1,2)-F1		4.9 mg (6%)
77(2,1,1)-F2		4.3 mg (12%)	77(4,1,2)-F2		12.1 mg (26%)
77(2,1,2)		4.5 mg (13%)	82		9.2 mg (18%)

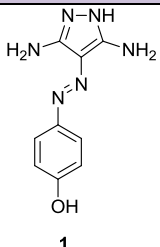
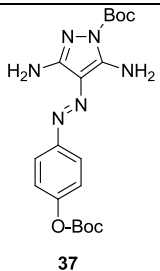
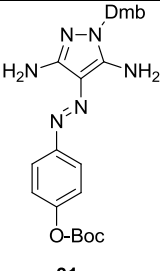



V původní syntéze (Schéma 30) bylo pořadí následující: navázání  $\beta$ -alaninu, acylace/sulfonylace, hydrolýza, aktivace karboxylu, reakce s chráněným pyrazolem. Změna pořadí syntetických kroků uvedená v obecném Schématu 32: navázání  $\beta$ -alaninu, pak navázání pyrazolu, čemuž však musí předcházet hydrolýza ethyl esteru, aktivace karboxylu, teprve po navázání pyrazolu by pak následovala příslušná acylace (aromatickou karboxylovou kyselinou nebo bromoctovou kyselinou) nebo sulfonylace (Tos-Cl).



Při studiu tohoto obráceného syntetického přístupu byl kladen důraz na dobré zvládnutí hydrolýzy. Po hydrolýze následovala aktivace a reakce s příslušným aminem. Byly vyzkoušeny různé variace s použitím DMAP jako katalyzátoru (ukázalo se, že nemá velký vliv) a také mikrovlnného záření. S použitím MW se podařilo zkrátit reakční dobu acylace na 10 min. Byly provedeny reakce s těmito aminy: nesubstituovaný pyrazol **1**, diBoc-pyrazol **37**, Dmb-Boc-pyrazol **31** a pro kontrolu reakce byl zvolen piperidin, výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Navazování vybraných aminů podle Schématu 7.

Experiment číslo	Struktura navazovaného aminu	Závěr
1	 1	Pyrazol <b>1</b> se navázal, ale hydrolyzou se odštěpil. Pyrazol byl jednoznačně navázán na pyrazolový endocyklický dusík.
2	 37	Pyrazol <b>37</b> se navázal, ale hydrolyzou se odštěpil. Musel být tedy vázán přes pyrazolový endocyklický dusík. Boc substituce umožňuje acylaci do polohy 1 pyrazolu díky mezomerii.
3	 31	Pyrazol se nepodařilo navázat, opakováno 2x.
4		Kontrolní reakce, piperidin se navázal.

## 4.5 Bicykly

Tato kapitola popisuje stereoselektivní syntézu (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyklo[3.2.1]oktanového typu bicyklických sloučenin, které byly připraveny na pevné fázi s využitím strategie typické pro Merrifieldovu peptidovou syntézu. Tento přístup umožnil připravit malou knihovnu látek svou strukturou podobných látkám přírodním - tropanovým alkaloidům, jako tropan, atropin, kokain a skopolamin.<sup>4,5</sup>

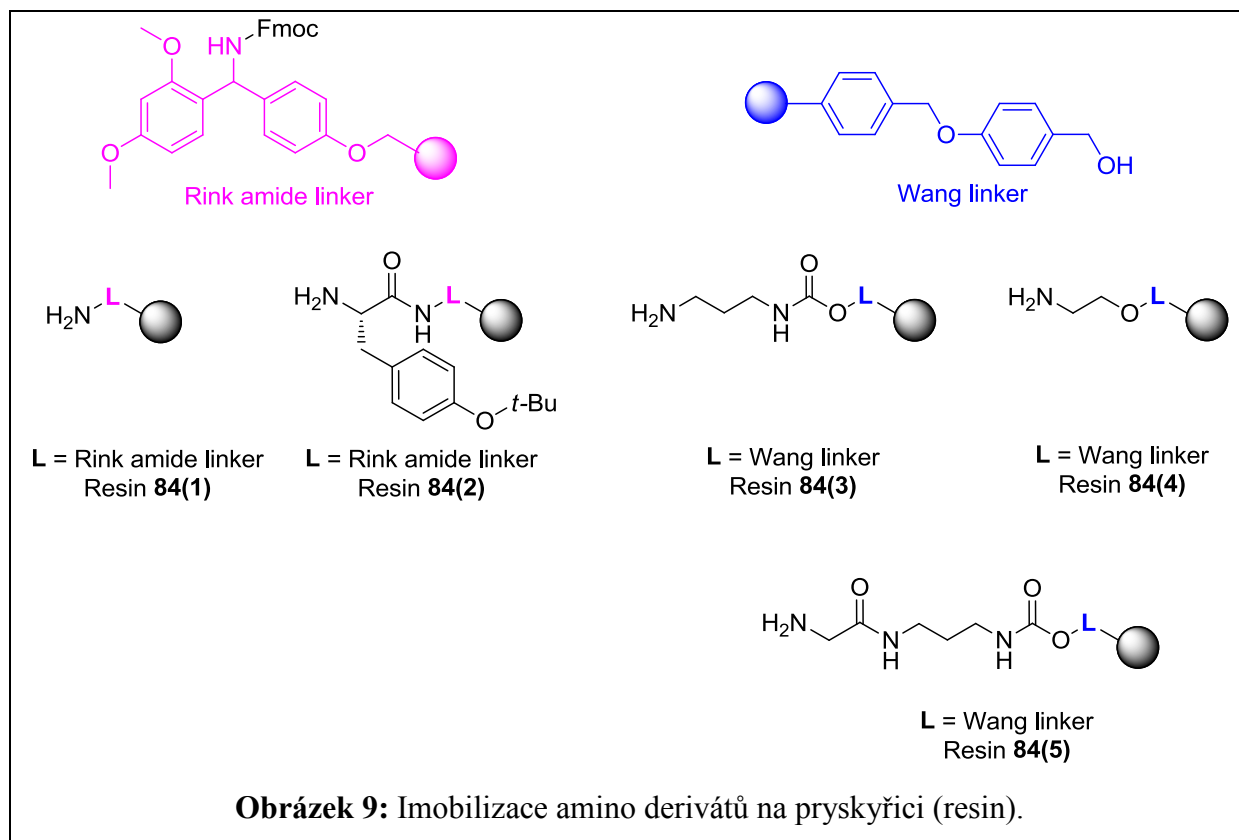
U látek odvozených od látek přírodních lze očekávat zajímavou biologickou aktivitu. Struktura řady léčiv byla rovněž odvozena od struktury látek přírodních.<sup>6,7</sup> Úkolem této práce bylo také rozšíření dosud připravených knihoven látek v tom smyslu, že zde připravené bicyklické sloučeniny jsou chirální a obsahují sp<sup>3</sup> hybridizované uhlíky, tedy nejsou planární.<sup>8</sup>

#### 4.5.1 Syntéza chemické knihovny, studium vlivů na formaci bicyklu

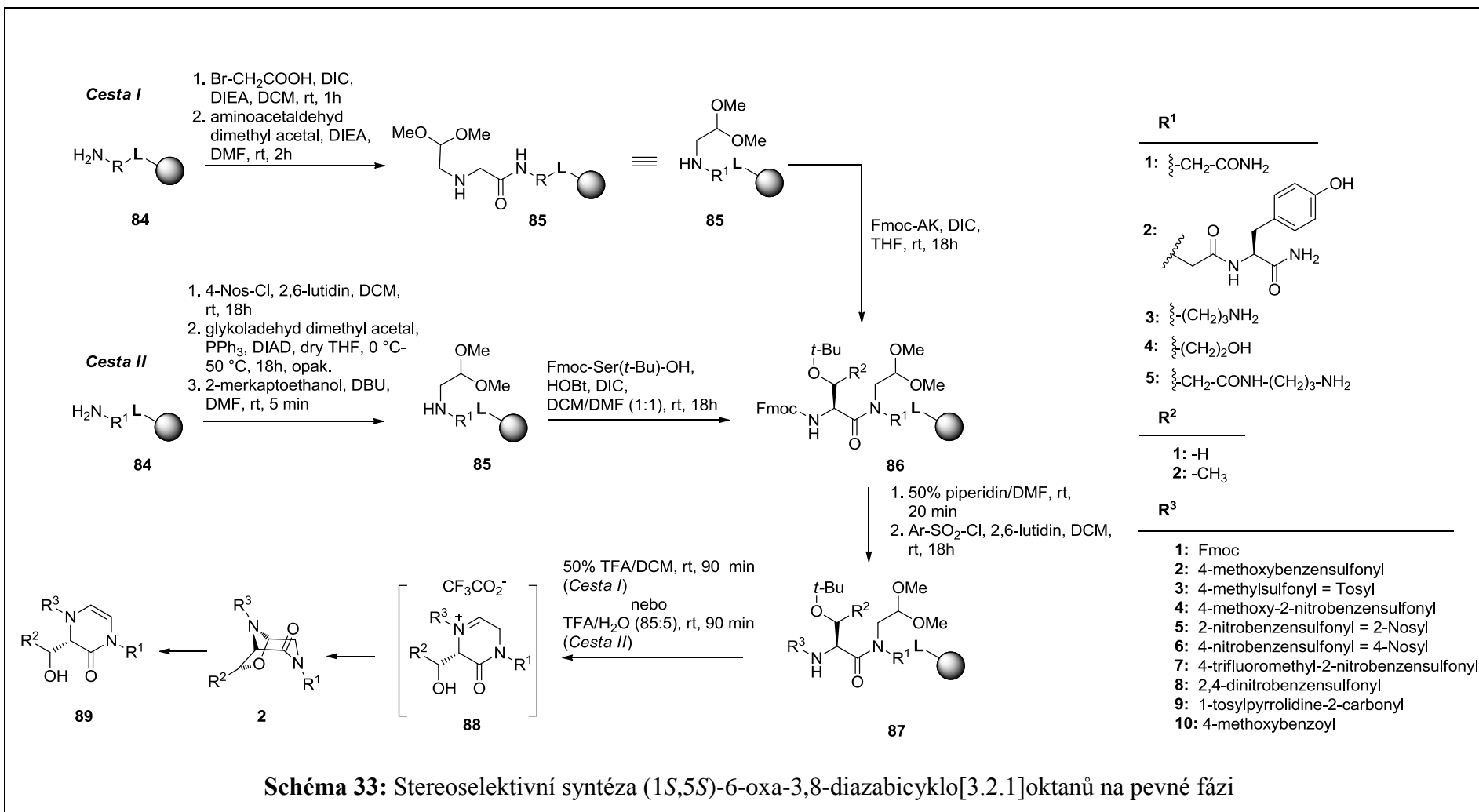
Pro syntézu byla použita metodika tandemu cyklické iminiové formace – nukleofilní adice.<sup>164-166</sup> Cyklický iminiový ion byl prekurzorem vedoucím k bicyklům se dvěma chirálními uhlíky nebo k olefinické struktuře. Iminiové ionty mohou být získány řadou reakcí, zde byla použita reakce aldehydu s amidem.<sup>167,168</sup> Iniciují řadu následných cyklizací.<sup>169</sup> Výsledné produkty pak často získají nové stereogenní centrum. Ačkoliv je jejich charakteristickým rysem vysoká reaktivita, podařilo se v minulosti izolovat iminium chlorid ve vysokém výtěžku.<sup>170</sup> *N*-Acyliminiová chemie byla použita v multikomponentních reakcích Mannichova typu syntézy vedoucí ke kumarínovým derivátům<sup>168</sup> nebo v kaskádových reakcích poskytujících přikondenzované benzimidazolopiperaziny.<sup>171</sup> Iminiová chemie byla dále použita například ve stereosektivní syntéze chinolizidinů a indolizidinů,<sup>172</sup> dále v syntéze 2,6-můstkových piperazine-3-onů, kde jako výchozí materiál byly použity amino kyseliny.<sup>173</sup>

Acyklické intermediáty byly v této práci syntetizovány na aminech ukotvených na pryskyřici (Obrázek 9). Za účelem zvýšení diverzity cílových sloučenin byly různé aminy navázány na Rinkovu<sup>174</sup> a Wangovu pryskyřici<sup>141</sup> s uplatněním různého ukotvení – přes amin, karboxamid, karbamát a ether. Rinkova amidová pryskyřice **84(1)** byla použita jako startovní amin a také byla acylována Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (pryskyřice **84(2)**). Wangova pryskyřice byla derivatizována 1,3-diaminopropanem (**84(3)**) přes karbamát s použitím karbonyldiimidazol (CDI) aktivační metody<sup>175</sup> a 2-(Fmoc-amino)ethanol prostřednictvím etherického navázání s použitím trichloracetimidátové aktivace<sup>176</sup> následované odštěpením Fmoc skupiny (**84(4)**), pryskyřice **84(3)** mohla být acylována bromoctovou kyselinou (**84(5)**), brom byl pak substituován aminoacetaldehyd dimethyl acetalem.

Byly použity dvě cesty, jak vnést do molekuly chráněný aldehyd. Na pevnou fázi navázané aminy **84(1)-84(3)** (Obrázek 9) byly acylovány bromoctovou kyselinou, následovala nukleofilní substituce bromu aminoacetaldehyd dimethyl acetalem<sup>177,178</sup> vedoucí k pryskyřici **85** (Schéma 4, *Cesta I*). Alternativu k tomuto přístupu ukazuje *Cesta II*. Zde byly výchozím materiálem pryskyřice **84(3)** a **84(4)**, které nejprve reagovaly s 4-nitrobenzensulfonyl chloridem (4-Nos-Cl), čímž byly aktivovány pro následnou Fukuyama alkylaci<sup>140</sup> glykolaldehyd dimethyl acetalem. Poté byla 4-Nos skupina odštěpena působením merkptoethanolu a DBU.<sup>179</sup>



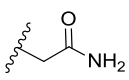
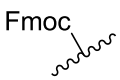
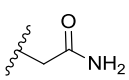
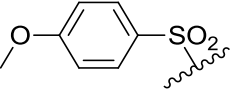
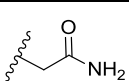
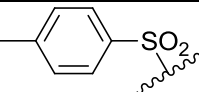
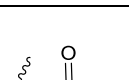
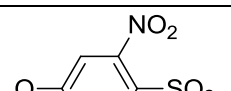
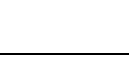
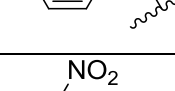
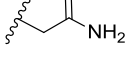
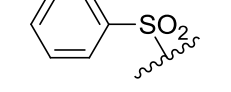
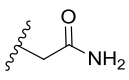
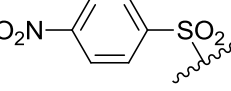
Působením *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu (DIC) na Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (nebo Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH) vznikl symetrický anhydrid, který sloužil jako acylační činidlo pro reakci se sekundárním aminem **85** (*Cesta I*). V *Cestě II* byla použita acylační metoda zahrnující vznik aktivovaného esteru v přítomnosti *N*-hydroxybenzotriazolu (HOBt) a DIC.<sup>180</sup> Došlo tak ke spojení obou cest ve struktuře **86**. Fmoc deprotektace působením piperidinu byla následována reakcí s různými činidly za účelem vnesení různých substituentů  $R^3$  do molekuly. Zajímá nás rozsah případně limity formace finální látky, proto byly vybrány různé typy reakcí - jednalo se o arylsulfonylace, alkylace, arylace a acylace. Reakce s arylsulfonyl chloridy byla podpořena přítomností báze 2,6-lutidinu za vzniku sulfonamidu **87**. Byla provedena také *N*-alkylace s 2-nitrobenzyl alkoholem a *N*-(2-hydroxyethyl)ftalidem za podmínek Mitsunobu reakce,<sup>121</sup> která však vyžadovala nejprve aktivaci s 4-Nos chloridem. Dále byla zkoušena *N*-arylace působením 4-fluor-3-nitrobenzofluoridu v přítomnosti báze.<sup>181</sup> *N*-acylace byla provedena s těmito kyselinami: 4-methoxybenzoovou, 4-trifluormethylbenzoovou a s aminokyselinami Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Ala-OH za podmínek peptidové syntézy v přítomnosti HOBt a DIC. Závěrečná cyklizace na pryskyřici vystavěných acyklických prekurzorů **87** byla umožněna kyselé katalyzovaným odmaskováním hydroxylové a aldehydické skupiny za současného odštěpení z pryskyřice s použitím 50% TFA



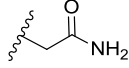
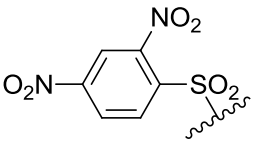
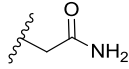
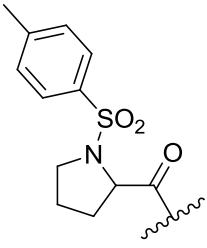
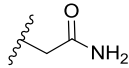
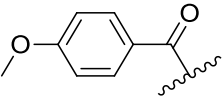
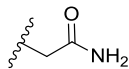
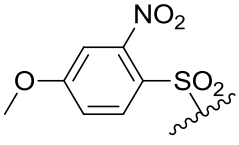
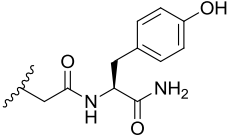
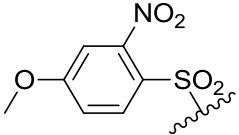
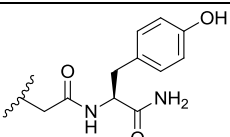
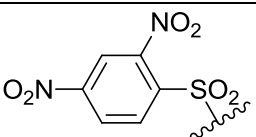
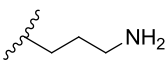
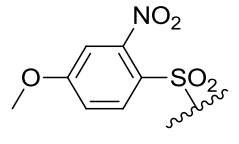
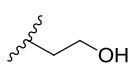
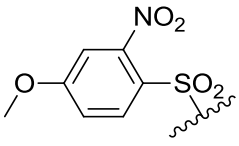
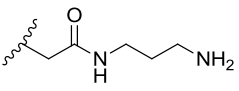
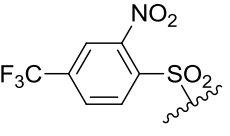
v dichlormethanu (DCM) (*Cesta I*) nebo 5% roztokem vody v TFA (*Cesta II*). Přičemž byly izolovány dva produkty - (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oktan **2** a 3,4-dihydropyrazin-2(1*H*)-on **89** (Schéma 33).

V tomto okamžiku nebylo jasné, zdá olefinická struktura **89** vzniká přímo z cyklické iminiové soli **88**, nebo z bicyklu **2** jako rozkladný produkt vlivem kyselého charakteru štěpícího koktejlu. Předpokládali jsme, že určujícím faktorem pro poměr mezi deriváty **2** a **89** je R<sup>3</sup> substituent, protože je navázán přímo na dusíkovém atomu iminiového iontu. Proto jsme se zaměřili na hledání takového R<sup>3</sup> mezi *N*-arylsulfonyly, *N*-alkyly, *N*-aryly a *N*-acyly, aby vznikal výlučně bicyklus **2**. Za účelem určení vlivu *N*-substituce (R<sup>3</sup>) byla připravena série sloučenin s variací R<sup>3</sup> substituentu. Tabulka 9 sumarizuje vlivy R substituce na poměr produktů **2** a **89**.

**Tabulka 9:** Syntetizované deriváty (S)-3-(hydroxymethyl)-3,4-dihydropyrazin-2(1*H*)-onu **89** a (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]oktanu **2**.

Prskyřice	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Štěpící koktejl <sup>a</sup>	Poměr <sup>b</sup> 2:89 Výtěžek <sup>c</sup> 2/89
<b>87(1,1,1)</b>		H	Fmoc 	A	39:61 41/46
<b>87(1,1,2)</b>		H		A	44:56 12/30
<b>87(1,1,3)</b>		H		A	62:38 47/39
<b>87(1,1,4)</b>		H		A	83:17 36/24
<b>87(1,1,5)</b>		H		A	90:10 50/11
<b>87(1,1,6)</b>		H		A	89:11 37/10
<b>87(1,1,7)</b>		H		A	95:5 41/NI

Tabulka 9 (Pokračování)

Prskyřice	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Štěpící koktejl <sup>a</sup>	Poměr <sup>b</sup> 2:89 Výtěžek <sup>c</sup> 2/89
87(1,1,8)		H		A	>99:<1 55/NI
87(1,1,9)		H		A	<1:>99 NI/NI
87(1,1,10)		H		A	<1:>99 NI/50
87(1,2,4)		CH <sub>3</sub>		A	99:1 69/4
87(2,1,4)		H		A	81:19 27/17
87(2,1,8)		H		A	99:1 17/NI
87(3,1,4)		H		B	82:18 23/NI
87(4,1,4)		H		B	79:21 14/8
87(5,1,7)		H		A	99:1 12/NI

<sup>1</sup> Štěpící koktejl: A: 50% TFA v DCM, 1.5 h; B: 5% vody v TFA, 1.5 h;

<sup>b</sup> relativní poměr produktů 2:89 byl určen z LC odezev při 240 nm;

<sup>c</sup> výtěžek po HPLC purifikaci; NI = nebyl izolován.

V případě Fmoc skupiny jako R<sup>3</sup> (**90**) vznikaly oba produkty **2** i **89**, přičemž olefin **89** byl v nadbytku. Sulfonamidy poskytovaly oba produkty a jejich poměr závisel na elektronových efektech substituentů na aromatickém kruhu. Relativní množství bicyklu **2** rostlo s rostoucím elektron-akceptorním efektem (OMe < Me < OMe + NO<sub>2</sub> < NO<sub>2</sub> ~ CF<sub>3</sub> + NO<sub>2</sub> ~ 2 x NO<sub>2</sub>) a tento trend odpovídal i Hammettovým konstantám substituentů (Tabulka 10).

**Tabulka 10:** Korelace relativního množství bicyklu **2** s Hammettovou konstantou  $\sigma$  substituentů na aromátu R<sup>3</sup> sulfonamidů.

Prskyřice	Substituent	$\sigma_{\text{para}}^a$	$\sigma_{\text{ortho}}^b$	Suma $\sigma^c$	Množství <b>6</b> <sup>d</sup>
<b>87(1,1,2)</b>	4-OMe	-0.27	-	-0.27	44
<b>87(1,1,3)</b>	4-Me	-0.17	-	-0.17	62
<b>87(1,1,4)</b>	2-NO <sub>2</sub> , 4-OMe	-0.27	0,51	0.24	83
<b>87(1,1,5)</b>	2-NO <sub>2</sub>	-	0,51	0.51	90
<b>87(1,1,2)</b>	4-NO <sub>2</sub>	0.78	-	0.78	89
<b>87(1,1,7)</b>	2-NO <sub>2</sub> , 4-CF <sub>3</sub>	0.54	0,51	1.05	95
<b>87(1,1,8)</b>	2,4-diNO <sub>2</sub>	0.78	0,51	1.28	99

<sup>a</sup> Podle referencí;<sup>182,183</sup>

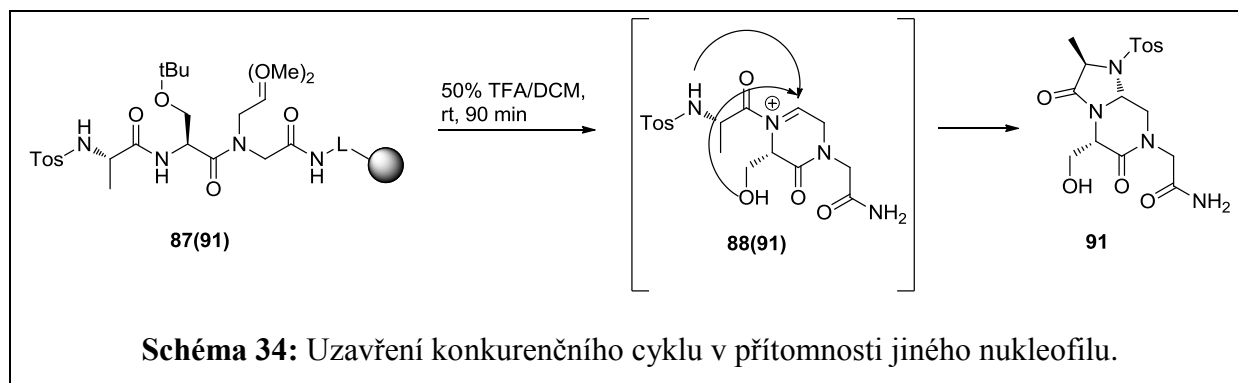
<sup>b</sup> vypočteno s použitím vzorce  $\sigma_{\text{ortho}} = 0.65 \times \sigma_{\text{para}}$  podle reference;<sup>184</sup>

<sup>c</sup> suma příslušných ortho- a para konstant založena na referenci;<sup>185</sup>

<sup>d</sup> podle relativního množství produktu **2**, odvozeno LC odezev při 240 nm.

Produkty alkylace se rychle po odštěpení z prskyřice rozkládaly a nemohly být tedy identifikovány. Arylace vedla výlučně k olefinické struktuře, v NMR spektrech je vidět přítomnost charakteristických signálů olefinických protonů. *N*-acylderiváty jako Tos-Pro derivát (**87(1,1,9)**) a 4-methoxybenzoyl (**87(1,1,10)**) tvořily jen olefin **89**. V přítomnosti dalšího nukleofilu, jako v případě acylace Fmoc-Ala-OH a následné reakce s Tosyl chloridem u sloučeniny **87(91)**, vedla konkurenční cyklizace k tvorbě imidazo[1,2-*a*]pyrazinového jádra **91** (Schéma 34). Vzhledem k získaným datům můžeme učinit závěr, že tvorba bicyklicku vyžaduje přítomnost elektron akceptorních skupin v substituentu R<sup>3</sup>.





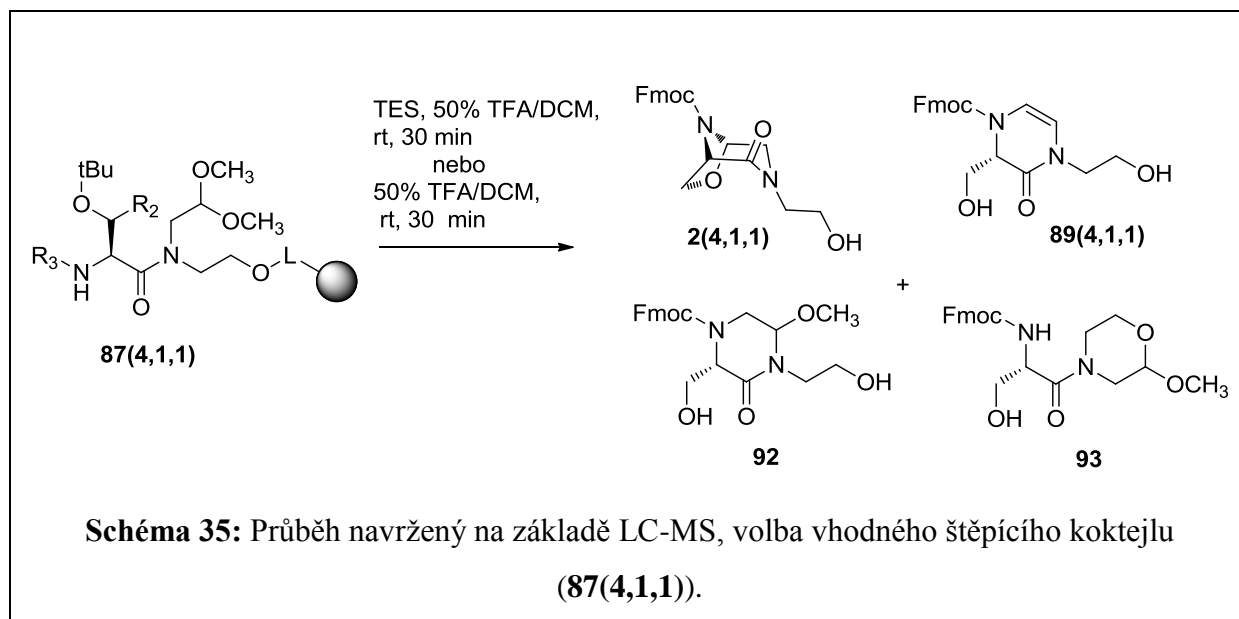
Za účelem získat sloučeniny se třemi diverzními místy, zanesli jsme do molekuly methyl jako  $R^2$ , čehož bylo dosaženo použitím vhodně substituované aminokyseliny. V případě **87(1,2,4)** byl použit Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH. Ukázalo se, že i  $R^2$  má zajímavý vliv na tvorbu obou finálních sloučenin **2** a **89**. Došlo k výraznému zvýšení poměru mezi **2:89** ve prospěch vzniku bicyklu, který vznikal z 99%. A to navzdory tomu, že substituce na aromatickém jádře arylsulfonylu měla protichůdné elektronové efekty (-OMe a -NO<sub>2</sub>). Vyšší stabilita bicyklů odvozených od threoninu byla prokázána syntézou dalších derivátů,<sup>186</sup> kde tento trend přetrval.

Poté, co bylo prokázáno, že substituce  $R^2$  a  $R^3$  má zásadní vliv při formaci produktů, byla pozornost zaměřena na význam  $R^1$  skupiny. Byla tedy připravena řada sloučenin lišících se v  $R^1$  substituci, přičemž jako  $R^3$  byl zvolen 4-methoxy-2-nitrobenzenesulfonyl (**R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,4**), protože tato  $R^3$  skupina umožňovala formaci obou produktů, bicyklu **2** a olefinu **89**, a díky tomu bylo možné posoudit vliv  $R^1$  substituce na poměr mezi **2:89**. Kvůli vysoké čistotě bicyklu **2** byly dále připraveny 4-trifluormethyl-2-nitrobenzenesulfonyl (**R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,7**) a 2,4-dinitrobenzenesulfonyl (**R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,8**) jako další  $R^3$  deriváty.

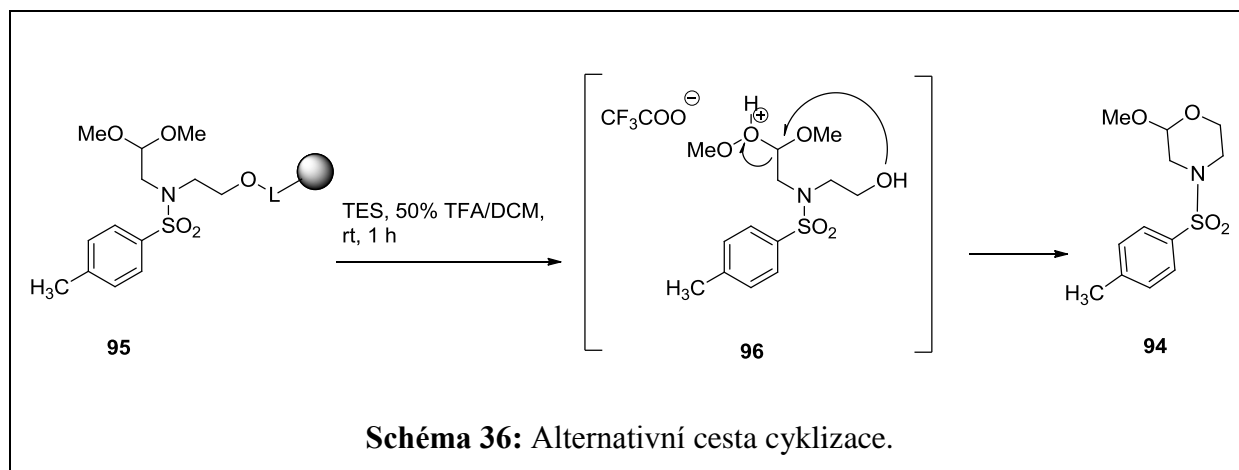
$R^1$  bylo rozšířeno o dipeptid Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> ve formě amidu (**87(2,1,4)** a **87(2,1,8)**). Za účelem získat sloučeniny s hydroxy a amino terminální skupinou byly na pevné fázi připraveny *N*-2-hydroxyethyl (**87(4,1,4)**) a *N*-3-aminopropyl (**87(3,1,4)**, případně **87(5,1,7)**). Nebyl vyzorován žádný výrazný trend v poměru produktů **2:89**, předpokládáme tedy, že substituce  $R^1$  nemá na jejich formaci zásadní vliv.

V případě *N*-3-aminopropylu (**87(3,1,4)**) a *N*-2-hydroxyethylu (**87(4,1,4)**) byla pozorována kompetitivní cyklizace, která ztěžovala purifikaci a měla za následek snížení výtěžku. Z LC-MS analýz surové reakční směsi předpokládáme jinou cestu cyklizace při použití štěpícího koktejlu TFA/DCM (Schéma 35). Pokusy o purifikaci a charakterizaci předpokládaných methoxy derivátů a určení jejich struktury byly neúspěšné, protože byly tyto produkty

nestabilní a rozkládaly se. Proto byl vyzkoušen štěpící koktejl s přídavkem „scavengeru“, který hraje důležitou roli při odstranění vedlejších produktů protektivních skupin a reakcí s karbokationty minimalizují zpětné reakce.<sup>187</sup> Bylo testováno použití štěpících směsí s přídavkem silanů a také s přídavkem vody. Nakonec se v případě **87(3,1,4)** a **87(4,1,4)** podařilo uspět s použitím štěpícího koktejlu TFA/H<sub>2</sub>O (95:5), kdy vznikaly čistě bicyklické sloučeniny **2** bez methoxy derivátů.



Methoxy deriváty jako **93** (Schéma 35) jsou náchylné ke kyselé katalyzované formaci příslušného enamidu.<sup>188</sup> Protože byl předpokládán derivát **93** nestabilní, byla snaha prokázat možnost jiné cesty cyklizace přípravou jednoduššího derivátu - modelové sloučeniny **94**. Zde byl možný jen jeden směr cyklizace<sup>189,190</sup> (Schéma 36). Syntéza byla provedena na výchozí pryskyřici **84(4)** (*N*-2-hydroxyethyl jako R<sup>1</sup>), na kterou byl Mitsunobu reakcí podle *Cesty II* navázán glykolaldehyd dimethyl acetal (pryskyřice **85**), ale místo acylace Fmoc-Ser-(*t*-Bu)-OH byla provedena sulfonylace Tosyl chlorid **95**. Produkt **94** byl izolován a plně charakterizován pomocí NMR spektroskopie a HRMS.



V další sérii experimentů byla pozornost zaměřena na možnost transformace enamidu **89** na bicyklus **2** protonizací olefinu na iminivou sůl za účelem zvýšení výtěžku produktu **2**. Analogické transformace totiž byly popsány v literatuře.<sup>171,191</sup> Byla testována stabilita v kyselém prostředí od bicyklu **2(1,1,1)** a enamidu **89(1,1,1)** v TFA/DCM a HCOOH. Ukázalo se, že zatímco olefinická struktura je **89(1,1,1)** stabilní, bicyklus přecházel na olefin z 20% už po půl hodině v kyselém prostředí TFA/DCM, přes noc došlo ke 100% konverzi na olefin. Vlivem kyseliny mravenčí se deriváty **2** i **89** pouze formylovaly, přičemž vznikl na základě stejného retenčního času totožný produkt. Vzhledem ke kyselé labilitě derivátu **2** předpokládáme, že formylovaný produkt má olefinickou strukturu.

V literatuře je popsána syntéza podobných bicyklických sloučenin, jako byly syntetizovány v této práci.<sup>192</sup> Acyklické intermediáty byly připraveny na 2-bromo-1-ethoxy-1-oxypolystyrenovou pryskyřici, ze které se pak finální produkty štěpily kyselinou mravenčí za 14h za laboratorní teploty. Zajímalo nás, jestli by reakce s kyselinou mravenčí a následné doštěpení štěpícím koktejlem 50% TFA/DCM zvýšilo poměr produktů **2:89** směrem k bicyklu. Za tím účelem byl na Rinkově pryskyřici připraven analogický derivát jako **87(1,1,3)**, ale místo *t*-butyl chráněného Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH byla použita amino kyselina s volnou hydroxy skupinou. U této látky bylo nejprve provedeno odmaskování acetalu na aldehyd a poté cyklizace. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3. Ukázalo se, že delší působení kyseliny posouvá poměr **2:89** směrem k nadbytku enamidu **89**, to stejné platí pro vyšší koncentrace TFA. Kyselina mravenčí vyžaduje delší dobu pro odštěpení produktu z pryskyřice. Dobré výsledky byly získány použitím kyseliny mravenčí nebo octové, následované doštěpením 50%TFA/DCM. Poměr se v těchto případech posunul směrem k bicyklu **2**.

**Tabulka 11:** Vliv štěpícího koktejlu na poměr produktů **2:89** z pryskyřice **87(1,1,3)**.

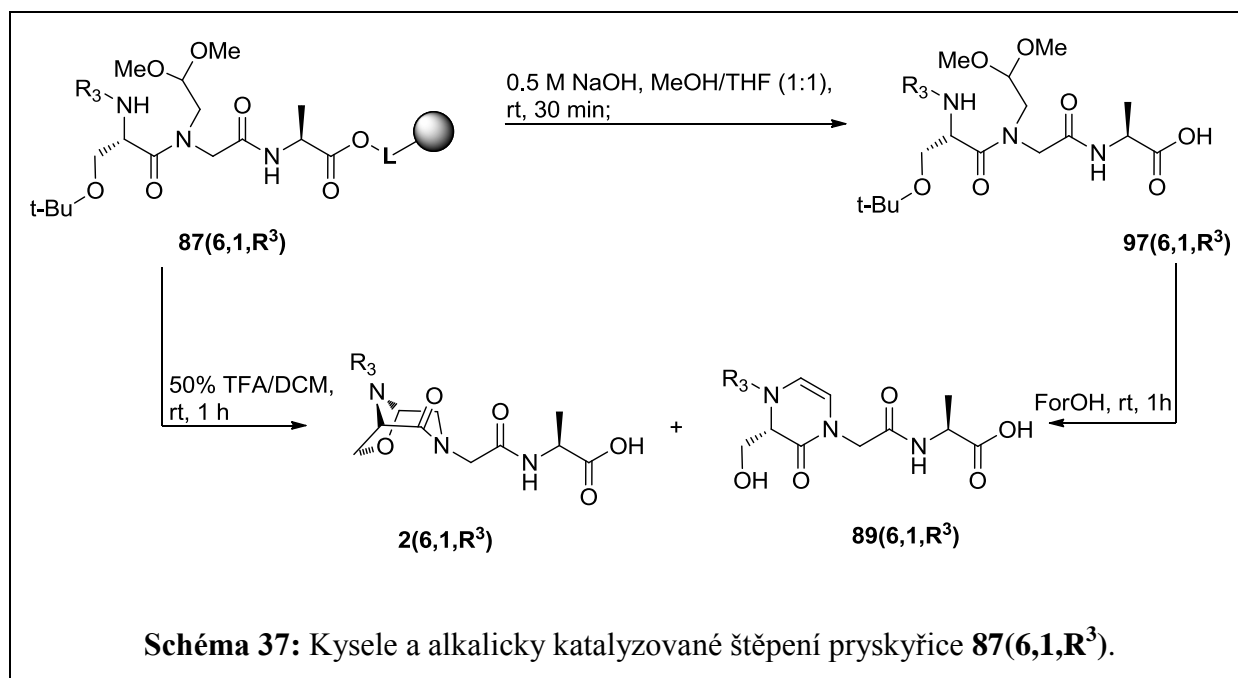
	Štěpící koktejl	Čas	6:7
1	HCOOH	30 min	0
2	HCOOH	on (17 h)	46:54
3	HCOOH <sup>a</sup> , následně 50% TFA/DCM	30 min	34:66
4	AcOH	30 min	0
	AcOH	on (17 h)	0
	AcOH <sup>a</sup> , následně 50% TFA/DCM	30 min	43:57
	10% TFA/DCM	30 min	50:50
	50% TFA/DCM	30 min	36:64
	50% TFA/DCM	on (17 h)	28:72
	100% TFA/DCM	30 min	29:71
	95% TFA/voda	30 min	27:73

<sup>a</sup> On = overnight, přes noc;

Přítomnost dihydroprazinonu **89** v surové reakční směsi po kyselé katalyzovaném odštěpení acyklického intermediátu z pryskyřice a jeho stabilita v kyselém prostředí nás vedla k otázce, jak dochází k jeho tvorbě. Derivát **7** mohl vznikat jako vedlejší produkt z iminiové soli<sup>193,194</sup> nebo rozkladem bicyklu **2** vzhledem k jeho kyselé labilitě. Vedle testování kyselé stability pryskyřice **87(1,1,3)** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{-CONH}_2$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{Tos}$ ), ze které se produkt štěpil kyselé, byl na Wangově pryskyřici připraven acyklický intermediát **87(1,1,4)** ( $R^1 = \text{CH}_2\text{-COOH}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = 4\text{-methoxy-2-nitrobenzonsulfonyl}$ ), který byl ukotven jako karboxylát a umožňoval i alkalické štěpení z pryskyřice.<sup>186</sup>

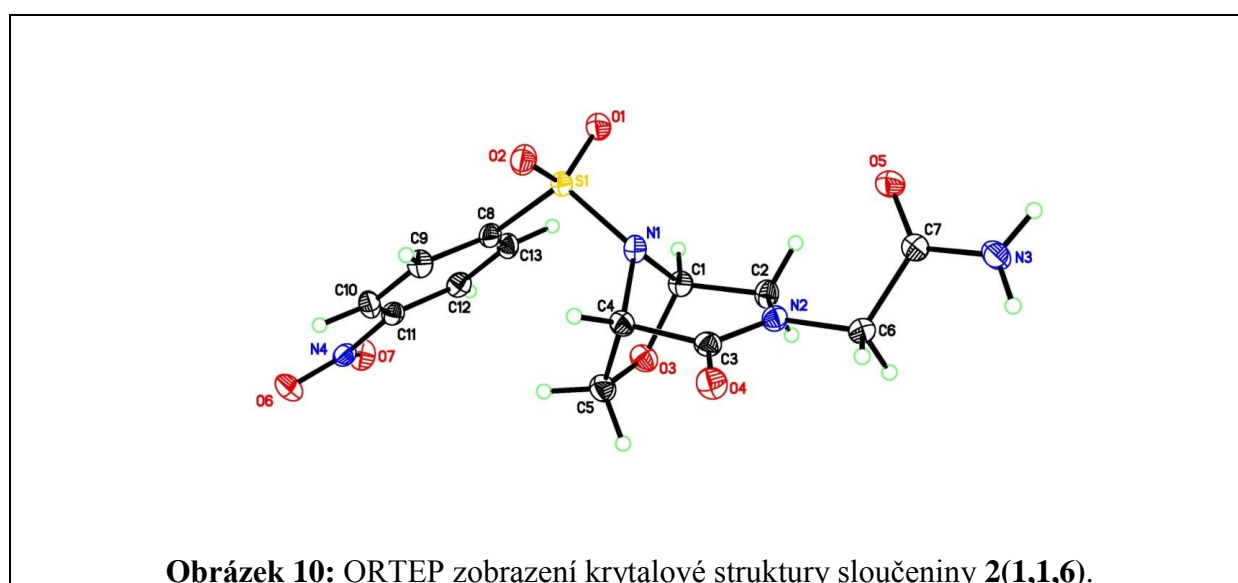
Výsledky štěpení pryskyřice **87(1,1,3)** indikovaly, že bicyklus **2** je náchylný ke kyselé katalyzované transformaci na enamid **89**, a že jemnější podmínky štěpení zvyšovaly podíl bicyklu **2**. Jenže štěpení produktu z Rinkovy amidové pryskyřice většinou vyžaduje kyselinu TFA a slabší kyselina, jako je kyselina mravenčí, běžně užívaná k iniciaci tandemové cyklizace iminiového iontu s nukleofilní adicí,<sup>195-197</sup> neodštěpí veškerý produkt z pryskyřice. Mravenčí kyselina je dostatečně silná, aby ochránila *tert*-butylovou skupinu ze serinu a odmaskovala aldehyd v roztoku. Na pryskyřici uvolní aldehyd, *tert*-butyl však po 1 h štěpení zůstává z 83%. Tyto závěry byly formulovány na základě štěpících experimentů sloučeniny **87(6,1,4)**, imobilizované na Wangově pryskyřici esterově (Schéma 37). Působením 0.5 M NaOH se acyklický chráněný intermediát **97(6,1,4)** odštěpil a izoloval ve vysoké čistotě. Po vystavení kyselině mravenčí po dobu 1 h vznikal výlučně bicyklus **2**, po dalším působení této

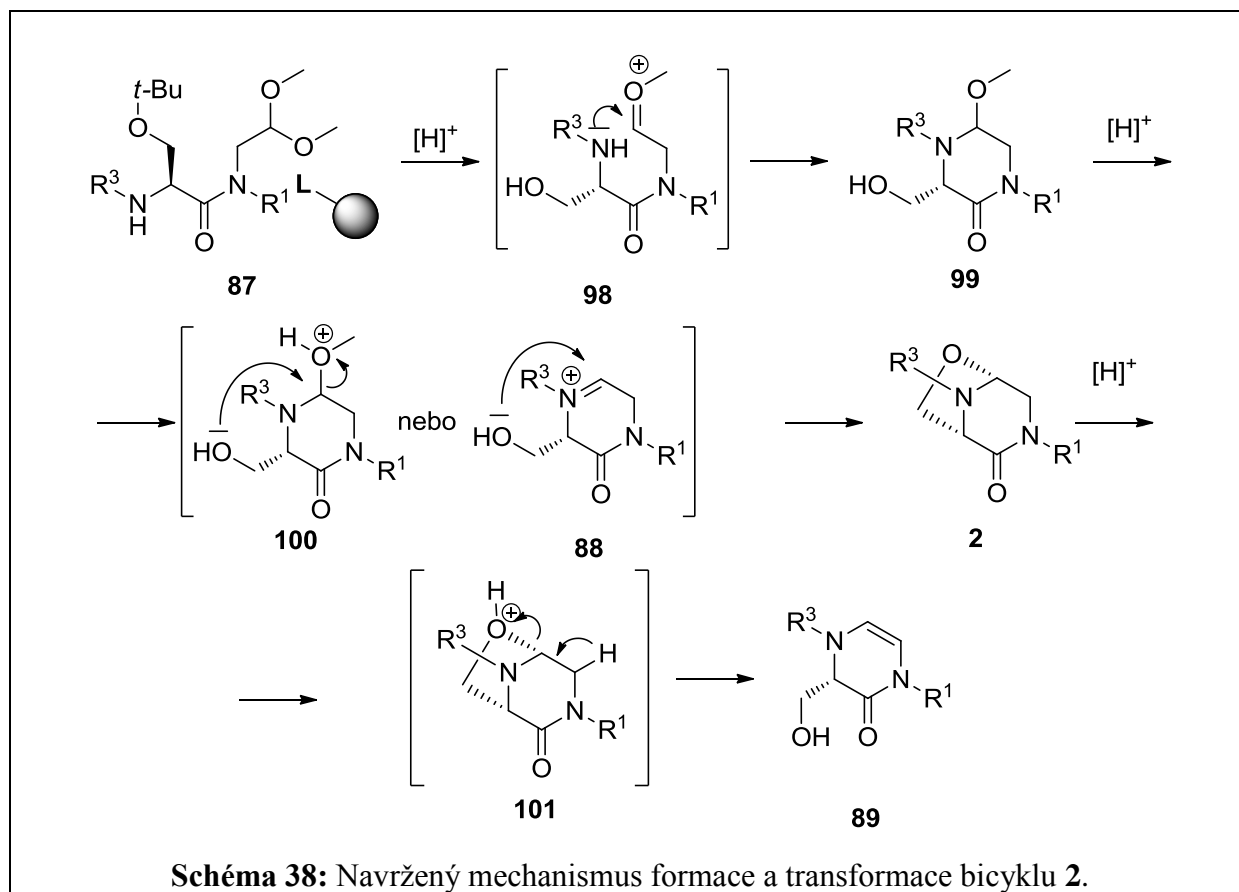
kyseliny přes noc už docházelo ke konverzi na enamin **89** ze 42 %. Tento experiment prokázal, že enamin **89** vzniká z bicyklu **2** v kyselém prostředí a je tedy jeho rozkladným produktem.



Na základě těchto výše popsaných pozorování je zde uveden předpokládaný mechanismus tvorby bicyklu **2** a jeho kyselá katalyzovaná transformace na enamid **89** (Schéma 38). Počáteční tvorba oxoniové struktury **98** je odvozena na základě navrženého mechanismu deprotektce acetalu za bezvodých podmínek.<sup>198</sup>

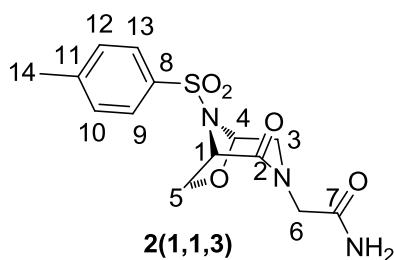
Absolutní konfigurace bicyklu **2** byla potvrzena rentgenovou krystalografií derivátu **2(1,1,6)**, který byl krystalován ze směsi acetonitril/DMSO.





Bicycklická struktura byla potvrzena také 1D a 2D  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopii u derivátu **2(1,1,3)**. Protony byly korelovány pomocí COSY spekter (Tabulka 12). Struktura byla určena studiem signálů všech uhlíků přímo navázaných na protonech s použitím HSQC spektra. HMBC spektrum sloužilo k přiřazení kvarterních uhlíků a ke kontrole správnosti konektivit.

**Tabulka 12:** NMR spektroskopická data (600 MHz, DMSO) pro **2(1,1,3)**.



Pozice	$\delta_{\text{C}}$ , typ	$\delta_{\text{H}}$ (J v Hz)	HMBC
<b>1</b>	58.9, CH	4.65, d (5.3)	3, 4, 5
<b>2</b>	166.1, C=O		1, 3, 5, 6
<b>3</b>	54.9, CH <sub>2</sub>	3.23, d (11.7)	2, 4, 6

**Tabulka 12 (Pokračování)**

Pozice	$\delta_C$ , typ	$\delta_H$ (J v Hz)	HMBC
		3.50, dd (12.2, 2.8)	2, 4
<b>4</b>	85.3, CH	6.01, m	1, 3, 4, 5, 6
<b>5</b>	68.6, CH <sub>2</sub>	2.87, dd (7.9, 5.6)	1, 2, 4
		3.73, m	2, 4
<b>6</b>	46.2, CH <sub>2</sub>	3.71. m	2, 3, 7
		3.87, d, (16.4)	2, 3, 4, 7
<b>7</b>	169.0, C=O		NH <sub>2</sub> , 6
<b>8</b>	134.5, C		9, 10, 12, 13, 14
<b>9</b>	127.9, CH	7.86, d (8.5)	10, 12, 13, 14
<b>10</b>	130.0, CH	7.43, d (8.2)	9, 12, 13, 14
<b>11</b>	144.9, C		9, 10, 12, 13, 14
<b>12</b>	130.0, CH	7.43, d (8.2)	9, 10, 13, 14
<b>13</b>	127.9, CH	7.86, d (8.5)	9, 12, 12, 14
<b>14</b>	21.1, CH <sub>3</sub>	2.41, s	10, 12
<b>NH<sub>2</sub></b>		7.06, br. s.	
		7.40, br. s.	

Závěrem je možné syntézu shrnout tak, že zásadním rysem byla kyselá katalyzovaná tandemově probíhající cyklizace iminiového iontu a nukleofilní adice vedoucí k tvorbě bicyklu, současně docházelo k odštěpení látky z pryskyřice. Byla studována stabilita připravených látek v kyselém prostředí a ukázalo se, že bicykly odvozené od serinu přecházely v dihydropyrazinony, zatímco deriváty odvozené od threoninu vykazovaly větší stabilitu. Byl studován rovněž vliv substituentů s různým elektronovým efektem na formaci bicyklických a olefinických sloučenin.

## 5 Závěr

Předložená dizertační práce je věnována syntéze pyrazolů a bicyklů. V syntéze pyrazolů se vycházelo z modelové sloučeniny - pyrazolu **1**, úspěšného inhibitoru CDK. Cílem této práce byla taková obměna struktury, která by vedla k derivátům se srovnatelnými nebo ještě lepšími inhibičními vlastnostmi. K dosažení takových derivátů byly zvoleny dvě metodiky – tradiční syntéza v roztoku, ale také syntéza knihovny látek na pevné fázi. Dále byla studována reaktivita pyrazolu k acylačním reakcím.

Bylo zjištěno, že nejreaktivnějším místem pyrazolu **1** je jeho endocyklický dusík v poloze 1. Právě sem směřují acylace za vzniku derivátů **40a-e**. Bylo ověřeno, že nezáleží na použitém acylačním činidle. Acylace nechráněného pyrazolu **1** vždy vede k substituci do polohy 1. Preference acylace k endocyklickému dusíku je způsobena mezomerií, díky níž je právě zde největší elektronová hustota.

Pro získání dalších acyl-pyrazolových izomerů bylo třeba použít chránících skupin. Byly vybrány methoxybenzylové skupiny PMB a Dmb a dále Boc skupina. Rovněž byly studovány možnosti jejich následné deprotektce.

Výhody a nevýhody těchto skupin je možno shrnout následovně: PMB i Dmb se do molekuly pyrazolu zavádějí více stupňovou syntézou, než je tomu u Boc skupiny. Je totiž třeba syntetizovat příslušný substituovaný hydrazin. Syntézu Dmb-hydrazinu se podařilo zvládnout sledem tří reakčních kroků a celkový výtěžek činil 49%. Reakcí substituovaného hydrazinu s hydrazonem byly získány PMB-pyrazol **25** (96%) a Dmb-pyrazol **28** (93%), kde byla poloha chránící skupiny jednoznačná. Boc-pyrazol **35** (99%) byl připraven jednoduchou reakcí pyrazolu **1** s di-*t*-butyl dikarbonátem a poloha protektivní skupiny byla prokázána rentgenostrukturní analýzou a souběžně i sledem reakcí, kdy fenolická hydroxy skupina byla chráněna prostřednictvím silyl etheru TIPS.

Nejen zavedení Boc skupiny do molekuly, ale i její deprotektce byla snadná, stačila 1 hodina ve zředěné trifluoroctové kyselině za laboratorní teploty. Co se týče deprotektce methoxybenzylových skupin, byla situace náročnější a vyžadovala razantnější podmínky. Reakcí s minerální kyselinou HCl nedocházelo k deprotektci, ale k hydrolýze acylů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo působením koncentrované kyseliny trifluoroctové, která v případě PMB vyžadovala vyšší teploty, v případě Dmb stačila teplota laboratorní. Pro syntézu pyrazolů byla z methoxybenzylových skupin zvolena právě Dmb. Použití kyseliny TFA k deprotektci bylo výhodné i z toho důvodu, že umožňovala současnou deprotektci i Boc skupiny.



Po ochránění pyrazolového dusíku PMB, Dmb či Boc skupinou byly acylací získány deriváty substituované na fenolické hydroxyskupině (**43a-d**). Jako acylační činidlo byly používány především karboxylové kyseliny působením DIC převedené na symetrické anhydridy. Při přidavku báze TEA vznikal jediný produkt acylace, bez báze vznikaly dva deriváty. Rovněž při acylaci benzoyl-chloridem byl pozorován vznik dvou derivátů, pokud byla přidána báze. Při mono-ochránění pyrazolu prostřednictvím Dmb (**28**) nebo Boc (**35**) skupiny je k acylaci náchylnější hydroxy skupina, reakce je usnadněna bazickým charakterem TEA. Bez přítomnosti báze se částečně acyluje i aminoskupina pyrazolu.

Deriváty substituované na aminoskupině (**47a-e**) je však vhodnější získat předchozí protekcí k acylacím reaktivnějších míst – pyrazolového dusíku a fenolické hydroxyskupiny. Za tím účelem byly používány Dmb-Boc-pyrazol (**30**) a diBoc-pyrazol (**36**). Jako acylační činidla byly používány chloridy kyselin. Jiné acylační metody se neosvědčily.

Pyrazoly substituované na amino skupině a na pyrazolovém dusíku byly podrobeny biologickému testování. Ukázalo se, že substituce na amino skupině zlepšuje inhibiční vlastnosti. Od ostatních připravených derivátů zatím výsledky biologické aktivity nejsou.

Jednotlivé acyl-izomery se podařilo rozlišit jednoduchou chemickou cestou – alkalickou hydrolyzou. Zatímco acyl na amino skupině je stabilní, esterově vázaný na hydroxy skupině nebo na pyrazolovém dusíku se hydrolyzují.

Syntézu pyrazolu **1** se podařilo převést z roztoku do syntézy na pevné fázi. Heterocyklus byl vystaven na pevné fázi modulárním způsobem, který umožňuje v budoucnu další modifikace struktury.

Byla navržena syntéza knihovny pyrazolů zahrnující raménko  $\beta$ -alaninu, které zajistilo tři diverzní místa. Pro syntézu knihovny byl vedle pyrazolu **1** zvolen také jeho analog **24** lišící se v aromatické části. Byl vybrán proto, že dosahoval pětikrát lepších inhibičních účinků než pyrazol **1**. Používaly se chráněné varianty těchto pyrazolů. Substituenty byly rozšířeny i o chirální látky, z amino kyselin se podařilo vystavět dioxopiperazinový kruh. Syntéza knihovny pyrazolů poskytla 12 látek. Jen tři z nich však byly vázány přes amino skupinu pyrazolu. Navzdory ochránění pyrazolu v poloze 1 Boc skupinou totiž i v syntéze na pevné fázi směřují acylační reakce právě sem. Tuto skutečnost pravděpodobně umožňuje mezomerie a větší labilita Boc skupiny.

Ve stereoselektivní syntéze (1*S*,5*S*)-6-oxa-3,8-diazabicyklo [3.2.1]oktanového typu bicyklických sloučenin na pevné fázi byla použita metodika tandemové cyklické iminiové tvorby a následné nukleofilní adice. Cyklický iminiový ion byl prekurzorem vedoucím k bicyklům **2** se dvěma chirálními uhlíky. Bylo zjištěno, že bicyklus **2** není stabilní v kyselých

podmínkách, pokud  $R^2 = H$  (odvozeno od serinu) částečně se rozkládá za vzniku olefinu **89**. Pokud je ovšem  $R^2 = CH_3$  (odvozeno od threoninu), je bicyklus v kyselých podmínkách stabilní. U derivátů odvozených od serinu byl určen vliv substituentu  $R^3$  na poměr **2:89**. Fmoc tvoří oba deriváty **2** i **89**, sulfonamidy poskytují deriváty **2** a **89** v poměru odpovídajícímu elektronovému efektu substituentů. Acyly poskytují výlučně olefin **89**, aryly rovněž, alkylované produkty se rozkládaly. Tvorba bicyklu vyžaduje přítomnost elektronakceptorních skupin. U substituentu  $R^1$  nebyl nevypozorován zásadní trend na poměr **2:89**.

## 6 Experimentální část

Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 MHz, pracujícím při 300,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 75,47 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) a Varian 400 MHz, pracujícím při 399,90 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 100.56 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Bicyklické deriváty byly měřeny na přístroji Varian DirectDrive 600 MHz, pracujícím při 599.88 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 150.86 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Látky byly rozpuštěny v deuterovaném dimethylsulfoxidu a měřeny při laboratorní teplotě, pokud není uvedeno jinak. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách. LC-MS spektra byla měřena na UHPLC-MS systému UHPLC Accela, trojitý kvadrupól TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). HRMS bylo prováděno na přístroji LCMS Exactive v konfiguraci s APCI/ESI ionizací a orbitální pastí. Experimentální podmínky pro HRMS: (+)(-)-HESI (100 °C), mobilní fáze:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$  70/30/0.1 na koloně Luna C18, 3  $\mu\text{m}$ , 2x50mm. Purifikace byla provedena na semi-preparativním HPLC přístroji 1200 Series (Agilent Technologies, USA) s použitím kolony SunFire Prep C18 OBD 19 x 100 mm, 5  $\mu\text{m}$  částice, byly použity různé gradienty tvořené 10 mM vodným octanem amonným a acetonitrilem, průtok 15 mL/min. Infračervená spektroskopie byla měřena na ATI Mattson Genesis Series FTIR<sup>TM</sup> Spektrometr Genesis metodou KBr tablety.

Poznámka k  $^{13}\text{C}$  NMR spektrům pyrazolů: některé kvarterní uhlíky pyrazolů nebyly pozorovány. Tyto pyrazoly totiž existují v tautomerních formách s pomalou rychlostí protonové výměny v měřítku NMR.<sup>56,199-201</sup> Toto má za následek široké signály s velmi nízkou intenzitou, jejichž identifikace je obtížná.

### 6.1 Prekurzory pyrazolů

#### 6.1.1 (2,4-Dimethoxybenzyl)hydrazin hydrochlorid (6)

K roztoku acetyl hydrazinu (659 mg, 8.0 mmol) v methanolu (40 ml) byl za laboratorní teploty přidán 2,4-dimethoxy-benzaldehyde (1.33 g, 8.0 mmol). Reakční roztok byl refluxován po dobu 2 h. Během ochlazování na laboratorní teplotu se začal srážet *N'*-(2,4-dimethoxybenzyliden)acetohydrazid **11a**. Suspenze byla naředěna metanolem (20 ml) a THF (20 ml). K roztoku pak bylo přidáno 10% Pd(C) (100 mg) a hydrazin **11a** byl redukován vodíkem za silného míchání při laboratorní teplotě a za atmosférického tlaku. Po 24 h byla redukce kompletní, po přidavku Celitu byl odfiltrován katalyzátor a filtrát byl zahuštěn na vakuové rotační odparce. Surový *N'*-(2,4-dimethoxybenzyl)acetohydrazid **12a** tvořil bezbarvý olej, ke kterému byl přidán 98% hydrazine hydrate (8 ml, 165 mmol). Reakční směs byla

zahřívána při teplotě 100 °C po dobu 30 h, ochlazená na laboratorní teplotu a byla přidána voda (0.5 ml). Vodná vrstva hydrazinu byla extrahována do ethyl etheru (3 × 8 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty solankou (2 ml), sušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rozpouštědlo bylo opařeno na vakuové rotační odparce. Surový (2,4-dimethoxy-benzyl)hydrazin **6** tvořil viskózní olej, který mohl být přímo použit do dalšího reakčního kroku vedoucího k 4-((3,5-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenolu **29**. Sloučenina **6** byla izolována ve formě hydrochloridu přidávkem methanolickeho chlorodíku (3 ml, konc. 3.29 mol/l) k výslednému extraktu. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Sraženina **6**×HCl byla odfiltrována, promyta ethyl etherem a sušena v exsikatoru za přítomnosti P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, byla získána bílá krystalická látka (862 mg, 49% přes 3 reakční kroky): t.t. = 138–140 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3265, 3156, 2965, 2840, 2812, 27769, 2595, 2441, 1613, 1587, 1508, 1445, 1321, 1287, 1273, 1211, 1157, 1133, 1042, 925, 834; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.77 (br s, 2H), 7.28 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J*=2.3, 8.3 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 48.5, 55.3, 55.6, 98.3, 104.7, 113.2, 131.8, 158.6, 161.0 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (182.22) [M + H]<sup>+</sup> 183.1128, naměřeno 182.9853.

### 6.1.2 (4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)karbonohydrazonoyl dikyanid (**8**)

Hydrazon **21** (186 mg, 1.00 mmol) byl rozpuštěn ve směsi DCM (5 ml) a suchého DMF (0.5 mL), k roztoku byl přidán imidazol (75 mg, 1.10 mmol) a triisopropylsilyl chlorid (TIPS-Cl; 235 μl, 1.10 mmol), reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a odparek byl naředěn methanolem (2 ml). Roztok byl nakapán do ledové vody (10 ml). Sraženina byla odsáta a sušena volně na vzduchu. Surový dikyanid **8** byl krystalován z methanolu (3 ml). 312 mg, 91% surového produktu; 202 mg, 59% po krystalizaci: žlutá krystalická látka, t.t. = 136-138 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3220, 3187, 3126, 3059, 2944, 2865, 1606, 1551, 1512, 1483, 1461, 1270, 1313, 1164, 993, 920, 883, 836, 699, 676, 525, 473; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.37 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.91 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 1.30 - 1.16 (m, 3H), 1.04 (d, *J*=7.1 Hz, 18H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 12.0, 17.7, 82.9, 110.3, 114.7, 118.04, 120.39, 135.51, 153.66 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>OSi (342.51) [M-H]<sup>-</sup> 341.1792, naměřeno 341.1796.

### 6.1.3 Pyridin-4-karbonohydrasonoyl dikyanid (9)

4-Aminopyridin (940 mg, 10.0 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (20 ml) a konc. HCl (5 ml) za laboratorní teploty. K roztoku byl přidán tetrafluoroboritan sodný (13.175 g, 120 mmol) a byl přidán další podíl vody (20 ml). Roztok byl chlazen a míchán na ledové lázni na 0-5 °C, došlo k částečnému vysrážení výchozí látky. K této suspenzi byl při 0-5 °C přikapán roztok dusitanu sodného (690 mg, 10.0 mmol) ve vodě (3 ml). Vznikající diazoniové sůl byla za chlazení míchána 5 min, poté byl přikapán kopulační roztok malondinitrilu (727 mg, 11.0 mmol) a bezvodého octanu sodného (8.203 g, 100.0 mmol) ve vodě (55 ml). Reakční směs byla dále míchána při 0-5 °C 30 min. Poté byla umístěna přes noc do lednice. Po 18 h byla žlutá sraženina odsáta, promyta vodou a sušena volně na vzduchu. 1.130 g (66%); žlutá krystalická látka; t.t. = 208–210 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3536, 3227, 3075, 2946, 2874, 2659, 2215, 1631, 1490, 1395, 1283, 1255, 1234, 1167, 992, 830; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.33 (d, *J*=7.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J*=7.0 Hz, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 87.7, 112.6, 113.9, 117.2, 140.6, 164.7 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> (171.05) 172.0618, naměřeno 172.0619.

## 6.2 Volné a chráněné pyrazoly

### 6.2.1 4-((4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diamin (24; TIPS-pyrazol)

K roztoku sloučeniny **8** (342 mg, 1.00 mmol) v methanolu (15 ml), byl za laboratorní teploty nakapán N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (64%; 73 μl, 1.50 mmol). Reakční směs byla refluxována po dobu 4 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn methanolem (2 ml). Methanolický roztok byla nakapán do ledové vody (10 ml). Sraženina byla odfiltrována a sušena volně na vzduchu. 726 mg, 97%: žlutá krystalická látka, t.t. = 184-186 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3282, 3197, 2943, 2891, 2865, 1626, 1596, 1561, 1494, 1422, 1387, 1264, 1209, 1124, 908, 882, 841, 683, 642; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 10.63 (s, 1H), 7.56 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.18 (br s, 2H), 5.63 (br s, 2H), 1.23 (sxt, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.06 (s, 9H), 1.04 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 12.5, 18.2, 114.0, 120.2, 122.2, 148.5, 154.9 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>OSi (374.23) [M+H]<sup>+</sup> 375.2323, naměřeno 375.2325.

### 6.2.2 4-(Pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diamin (**25**, pyridin-pyrazol)

K suspenzi dikyanidu **9** (1.71 g, 10.0 mmol) v methanolu (100 ml) byl přidán hydrazin monohydrát (730  $\mu$ l, 15.0 mmol). Roztok byl refluxován po dobu 4 h. Reakční směs byla ochlazena na laboratorní teplotu a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Produkt byl krystalován z vody. 1.36 g (67%); červená krystalická látka; t.t. = 285–287 °C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3471, 3348, 3302, 3141, 3089, 2892, 2729, 1940, 1635, 1592, 1548, 1477, 1376, 1333, 1299, 1195, 1112, 998, 834, 747, 560;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.94 (br s, 1H), 8.50 (dd,  $J$ =1.6, 4.7 Hz, 2H), 7.56 (dd,  $J$ =1.6, 4.7 Hz, 2H), 6.65 (br s, 2H), 6.13 (br s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 114.7, 116.5, 150.4, 158.7 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_7$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (203.09) 204.0992, naměřeno 204.0993.

### 6.2.3 4-((3,5-Diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl) diazenyl)fenolu (**26**; Pmb-pyrazol)

K suspenzi (4-hydroxyfenyl)karbonohydrazonoyl dikyanidu **21** (508 mg, 2.73 mmol) v methanolu (3 ml) byl za laboratorní teploty přikapán roztok (4-methoxybenzyl)hydrazinu (831 mg, 5.45 mmol) v methanolu (3 ml). Reakční roztok byl refluxován po dobu 4 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Surový produkt byl purifikován flash chromatografií ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  20:1) a poskytl čistý fenol **26**; (882 mg, 96% surového produktu; 569 mg, 62 % po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 190–192 °C;  $R_f$  = 0.18; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3380, 3153, 2925, 1600, 1567, 1513, 1496, 1452, 1403, 1362, 1240, 1174, 1024, 836, 821, 754, 672, 535, 511;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.54 (br s, 1H), 7.55 (d,  $J$ =8.6 Hz, 2H), 7.19 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H), 6.89 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H), 6.78 (d,  $J$ =8.6 Hz, 2H), 5.55 (br s, 1H), 4.87 (s, 2H), 3.72 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 48.7, 55.1, 112.9, 113.7, 115.3, 121.9, 128.9, 129.5, 146.5, 156.9, 158.5, 161.9 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2$  (338.37) [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  339.1564, naměřeno 339.1565.

### 6.2.4 (9*H*-fluoren-9-yl)methyl 4-((3,5-diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl) diazenyl)fenyl karbonát (**28**; PMB-Fmoc-pyrazol)

K roztoku pyrazolu **26** (338 mg, 1.00 mmol) v suchém pyridinu (3 ml) byl za chlazení 2-5 °C přidán fluorenylmethoxykarbonyl chlorid (336 mg, 1.30 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce, zbylý odparek byl naředěn metanolem (3 ml) a nakapán do ledové vody (15 ml).

Sraženina byla odpařena, promyta vodou a sušena volně na vzduchu. 532 mg, 95%; žlutá krystalická látka; t.t. = 96-98 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3312, 3063, 3038, 2952, 2935, 2905, 2834, 2684, 2597, 1912, 1735, 1608, 1563, 1513, 1477, 1449, 1395, 1356, 1247, 1177, 1153, 1130, 1102, 1032, 942, 886, 840, 758, 740, 672, 644; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.73 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 7.92 - 7.87 (m, 3H), 7.76 - 7.70 (m, 2H), 7.59 - 7.55 (m, 2H), 7.42 - 7.38 (m, 3H), 7.31 - 7.27 (m, 2H), 7.24 - 7.20 (m, 3H), 7.13 (s, 2H), 6.89 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.80 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 3.71 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 46.4, 49.1, 55.1, 66.2, 113.8, 115.4, 119.9, 120.1, 121.4, 122.4, 125.4, 127.1, 127.7, 128.9, 140.7, 143.7, 145.9, 153.9, 157.9, 158.6 ppm.

### 6.2.5 Obecný postup pro reakci DmbNHNH<sub>2</sub>×HCl s příslušným hydrazonem

K suspenzi dikyanidu **21** (186 mg, 1.00 mmol; pro syntézu Dmb-pyrazolu **29**) nebo **9** (171 mg, 1.00 mmol; pro syntézu Dmb-pyridin-pyrazolu **30**) nebo **8** (342 mg, 1.00 mmol; pro syntézu Dmb-TIPS-pyrazolu **32**) v methanolu (3 ml) byl za laboratorní teploty přikapán roztok DmbNHNH<sub>2</sub>×HCl (273 mg, 1.25 mmol) a TEA (1 ml, 7.15 mmol) v methanolu (3 ml). Reakční směs byla refluxována 4 h, pak byl ochlazen na laboratorní teplotu a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Odparek byl naředěn methanolem (3 ml) a tento roztok byl přikapán do ledové vody (15 ml). Sraženina byla odfiltrována a sušena na vzduchu.

#### 6.2.5.1 4-((3,5-Diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl) fenol (**29**; Dmb-pyrazol)

342 mg, 93%; žlutá krystalická látka; t.t. = 108–110 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3576, 3439, 3345, 3080, 1610, 1563, 1498, 1460, 1393, 1356, 1265, 1209, 1157, 1110, 840; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.55 (br s, 1H), 7.56 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.84 - 6.71 (m, 3H), 6.57 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J*=2.1, 8.3 Hz, 1 H), 5.58 (br s, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 44.3, 55.3, 55.5, 98.2, 104.5, 112.9, 115.3, 117.4, 121.9, 128.7, 146.5, 152.2 (br s), 156.9, 157.3, 159.9 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (368.40) [M + H]<sup>+</sup> 369.1670, naměřeno 369.1666.

#### 6.2.5.2 1-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-(pyridin-4-yl)diazenyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (**30**; Dmb-pyridin-pyrazol)

282 mg, 80%; červená krystalická látka; t.t. = 200–202 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3460, 6401, 3265, 3146, 3074, 2927, 2835, 1650, 1613, 1586, 1553, 1511, 1466, 1415, 1395, 1332, 1296, 1209, 1195, 1102, 1035, 996, 935, 829, 566; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.50 (d, *J*=5.9 Hz, 2H),

7.65 (s, 1H), 7.58 (d,  $J=5.9$  Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.82 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J=2.4, 8.2$  Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.52 (br s, 1H), 4.83 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm; Směs izomerů:  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 44.3, 44.8, 55.2, 55.5, 98.3, 104.5, 114.6, 114.7, 116.2, 116.4, 116.6, 116.7, 128.9, 129.0, 139.6, 146.3, 149.0, 150.3, 153.5, 157.5, 158.8, 158.8, 160.1, 160.1$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (353.16) 354.1673, naměřeno 354.1677.

### 6.2.5.3 1-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-((4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl) diazenyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (32; Dmb-TIPS-pyrazol)

367 mg, 70%; žlutá krystalická látka; t.t. = 156-158 °C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3432, 3370, 3270, 3193, 3154, 2944, 2865, 1614, 1595, 1567, 1511, 1491, 1463, 1420, 1392, 1366, 1295, 1268, 1206, 1157, 1116, 1027, 907, 843, 826, 688, 672, 542;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 7.60$  (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.75 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.57 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 6.46 (dd,  $J=2.4, 8.4$  Hz, 1H), 5.76 (br s, 2H), 5.29 (br s, 2H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 1.33 - 1.18 (m, 3 H), 1.07 (d,  $J=7.0$  Hz, 18H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 12.1, 17.7, 44.3, 55.2, 55.5, 98.2, 104.5, 113.3, 117.3, 119.7, 121.7, 128.7, 148.0, 154.5, 157.3, 159.9$  ppm.

### 6.2.6 Obecný postup pro reakci příslušného pyrazolu s Boc anhydridem

K roztoku pyrazolu **1** (218 mg, 1.00 mmol; pro syntézu **36**) v suchém DMF (2 ml) nebo **24** (374 mg, 1.00 mmol; pro **38**) v suchém DMF (6 ml) byl za chlazení 2-5 °C přikapán di-*tert*-butyl dikarbonát (0.240 ml, 1.05 mmol; pro syntézu **36** nebo **38**) zředěný suchým DMF (1 ml). Pro syntézu **31**: k roztoku sloučeniny **29** (368 mg, 1.00 mmol) v suchém pyridinu (5 ml) byl přikapán roztok di-*tert*-butyl dikarbonátu (0.343 ml, 1.50 mmol) v suchém pyridinu (1 ml) při 2-5 °C; pro syntézu **27**: k roztoku pyrazolu **26** (338 mg, 1.00 mmol) v suchém pyridinu (5 ml) byl za chlazení 2-5 °C přidán di-*tert*-butyl dikarbonát (345  $\mu\text{l}$ , 1.50 mmol); pro syntézu **37**: k roztoku pyrazolu **1** (218 mg, 1.00 mmol) v suchém pyridinu (6 ml) byl za chlazení 2-5 °C přikapán di-*tert*-butyl dikarbonát (0.460 ml, 2.00 mmol) zředěný suchým pyridinem (2 ml); pro syntézu **39**: k suspenzi pyrazolu **28** (203 mg, 1.0 mmol) v pyridinu (6 ml) byl při 0-5 °C přikapán di-*tert*-butyl bikarbonát (230  $\mu\text{l}$ , 1.00 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté byla reakční směs nakapána do ledové vody (15 ml; pokud reakce probíhala v DMF) nebo rozpouštědlo (pokud pyridin) odpařeno na vakuové rotační odparce, zbylý odparek byl naředěn metanolem (5 ml) a nakapán do ledové vody (25 ml). Sraženina byla odpařena, promyta vodou a sušena volně na vzduchu.



### 6.2.6.1 *tert*-butyl 4-((3,5-diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl karbonát (27; PMB-Boc-pyrazol)

389 mg (89%); žlutá krystalická látka; t.t. = 172-174 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3424, 3321, 3264, 3144, 2977, 2936, 1755, 1607, 1572, 1514, 1492, 1395, 1372, 1297, 1281, 1251, 1238, 1170, 1027, 891, 849, 824, 782, 742, 536; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.71 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.20 (dd, *J*=2.3, 8.7 Hz, 4H), 6.90 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 4.88 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.50 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 27.2, 55.0, 83.1, 113.7, 121.1, 121.5, 128.8, 129.2, 149.0, 151.2, 151.3, 158.5 ppm.

### 6.2.6.2 *tert*-Butyl 4-((3,5-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl) fenyl karbonát (31; Dmb-Boc-pyrazol)

Získaný odparek byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:1) a poskytl čistý karbonát **31** (440 mg, 94% surového produktu; 327 mg, 70% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 172–174 °C, *R*<sub>f</sub> = 0.14 (80:1); IR (cm<sup>-1</sup>) 3419, 3338, 3285, 2967, 2923, 1745, 1621, 1593, 1575, 1560, 1509, 1488, 1422, 1384, 1341, 1272, 1257, 1209, 1149, 1120, 1045, 828; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ = 7.78 (dd, *J*=2.0, 8.9 Hz, 2H), 7.38 (br s, 1H), 7.27 (dd, *J*=2.0, 8.9 Hz, 2H), 6.91 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.68 (br s, 1H), 6.63 (d, *J*=2.5 Hz, 1 H), 6.52 (dd, *J*=2.5, 8.4 Hz, 1 H), 6.04 (br s, 2H), 5.38 (br s, 2H), 4.94 (br s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.55 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ = 27.2, 45.0, 55.2, 55.5, 83.3, 98.4, 104.7, 114.9, 117.7, 121.4, 121.9, 129.0, 139.8, 146.9, 149.0, 149.9, 152.0, 152.2, 153.9, 157.9, 160.8 ppm; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) (65 °C) δ = 7.74 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.00 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 6.75 (br s, 2H), 6.64 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.54 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 5.52 (br s, 2H), 4.94 (br s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 1.57 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMF-*d*<sub>7</sub>) δ = 27.4, 45.0, 55.4, 55.7, 83.3, 98.8, 105.2, 115.1, 117.9, 121.5, 121.7, 129.5, 143.3, 150.2, 151.5, 152.0, 152.3, 158.2, 161.0 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (468.52) [M + H]<sup>+</sup> 469.2194, naměřeno 469.2188.

### 6.2.6.3 *tert*-butyl 3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (36; Boc-pyrazol)

Surový **36** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 40:1) a poskytl čistý produkt (314 mg, 99% surového produktu; 228 mg, 72% po chromatografii): žlutá krystalická látka.

Alternativní postup z jiné výchozí látky:

K roztoku **38** (200 mg, 0.42 mmol) v methanolu (40 ml) byl přidán tetrabutylammonium fluorid hydrát (TBAF; 110 mg, 0.42 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn methanolem (5 ml). Roztok byl nakapán do ledové vody (25 ml). Sraženina byla odfiltrována a sušena volně na vzduchu. 122 mg, 91%: žlutá krystalická látka, t.t. = 114-116 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3442, 3312, 2979, 1722, 1620, 1566, 1498, 1424, 1369, 1312, 1286, 1260, 1148, 840, 799, 759, 535; R<sub>f</sub> = 0.23; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 9.75 (br s, 1H), 7.63 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.59 (br s, 2H), 6.79 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.02 (br s, 2H), 1.53 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 28.2, 84.0, 112.6, 115.9, 123.0, 145.4, 146.4, 150.7, 152.1, 158.6 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (318.33) [M+H]<sup>+</sup> 319.1515, naměřeno 319.1515.

**6.2.6.4 tert-butyl 3,5-diamino-4-((4-((tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (37; diBoc-pyrazol)**

392 mg, 94%; žlutá krystalická látka; t.t. = 148-150 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3444, 3418, 3376, 3343, 3260, 3195, 3156, 2985, 2934, 1754, 1712, 1625, 1567, 1489, 1421, 1368, 1318, 1274, 1256, 1143, 894, 805, 785; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 7.82 (br s, 2H), 7.80 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, *J*=8.8, 2H), 6.15 (br s, 2H), 1.54 (s, 9H), 1.48 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 27.7, 28.2, 83.7, 84.3, 113.6, 122.3, 122.3, 149.7, 150.1, 150.5, 150.6, 151.2, 151.6 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (418.45) [M+H]<sup>+</sup> 419.2037, naměřeno 419.2037.

**6.2.6.5 tert-butyl 3,5-diamino-4-((4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (38; Boc-TIPS-pyrazol)**

365 mg, 77%: žlutá krystalická látka, t.t = 88-90 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3438, 3373, 3278, 3201, 3164, 2943, 2866, 2021, 1716, 1637, 1596, 1570, 1493, 1422, 1370, 1313, 1261, 1154, 907, 882, 842, 683; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 7.69 (br s, 2H), 7.68 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.89 (d, *J*=8.8 z, 2H), 6.07 (br s, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.24 (sxt, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.06 (s, 9H), 1.04 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 12.5, 18.2, 28.2, 84.1, 113.0, 120.3, 122.9, 146.5, 148.0, 150.7, 152.1, 156.0 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>Si (474.28) [M+H]<sup>+</sup> 475.2847, naměřeno 475.2851.

### 6.2.6.6 *tert*-butyl 3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (**39**; Boc-pyridin-pyrazol)

275 mg (91%); žlutá krystalická látka; t.t. = 150-152 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3440, 3264, 3156, 2982, 1706, 1638, 1571, 1515, 1496, 1480, 1422, 1349, 1256, 1148, 994, 898, 831, 788, 764, 564; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.58 (dd, *J*=1.6, 4.7 Hz, 2H), 8.09 (br s, 2H), 7.69 (d, *J*=4.7 Hz, 2H), 6.52 (br s, 1H), 6.13 (br s, 1 H), 1.55 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 27.7, 84.1, 115.0, 141.5, 149.6, 150.0, 150.4, 150.6, 157.9 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> (303.14) 304.1517, naměřeno 304.1514.

### 6.2.7 Obecný postup pro Nosylaci amino skupiny pyrazolů

K rozotku pyrazolu (**31** pro syntézu **33**: 468 mg, 1.00 mmol; **32** pro syntézu **35**: 524 mg, 1.00 mmol) v suchém pyridinu (10 ml) byla za chlazení 2-5 °C přidána jemná suspenze 4-nitrobenzensulfonylchloridu (332 mg, 1.50 mmol) v DCM (3 ml). Došlo k barevné změně: žlutý roztok zčervenal. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (10 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (50 ml). Vzniklá sraženina **33/35** byla odfiltrována a sušena na volně na vzduchu.

#### 6.2.7.1 4-((5-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(4-nitrofenylsulfonamido)-1*H*-pyrazol-4-yl) diazenyl)fenyl *tert*-butyl karbonát (**33**; Dmb-Boc-Nos-pyrazol)

620 mg, 95%; žluto-hnědá krystalická látka, t.t. = 90-92 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3433, 3332, 3104, 2979, 2938, 2838, 2362, 1758, 1614, 1530, 1509, 1468, 1349, 1273, 1210, 1146, 1033, 842, 738, 602, 551, 464; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.26 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 8.06 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.68 (d, *J*=9.2 Hz, 2H), 7.31 (br s, 2H), 7.23 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.61 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.55 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J*=2.6, 8.3 Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 1.51 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 27.3, 44.9, 55.2, 55.5, 83.3, 98.4, 104.2, 115.8, 116.2, 121.7, 124.0, 126.9, 128.8, 128.9, 140.0, 142.3, 146.1, 149.4, 150.1, 150.2, 151.1, 157.5, 160.2 ppm.

### 6.2.7.2 *N*-(5-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-((4-((triisopropylsilyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-4-nitrobenzenesulfonamid (**35**; Dmb-Nos-TIPS-pyrazol)

674 mg, 95%: oranžová krystalická látka, t.t. = 90–92 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3428, 3330, 3106, 2945, 2867, 2344, 1614, 1595, 1532, 1508, 1465, 1391, 1349, 1266, 1209, 1170, 909, 846, 739, 684, 548, 489; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.27 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 8.06 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.47 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.30 (br s, 1H), 7.14 (br s, 2H), 6.87 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.60 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 6.56 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J*=2.4, 8.6 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 1.33 - 1.20 (m, 3H), 1.08 (d, *J*=7.5 Hz, 18H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 12.1, 17.7, 44.9, 55.2, 55.5, 98.4, 104.2, 115.6, 116.3, 119.7, 122.3, 124.0, 128.7, 128.8, 130.1, 146.4, 146.9, 149.3, 150.6, 155.7, 157.4, 160.2 ppm.

## 6.3 Acylované pyrazoly v roztoku

### 6.3.1 Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu

#### 6.3.1.1 Obecný postup acylace 4-((3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenolu

##### Postup A (acyl chloridy):

K roztoku 4-((3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenol **1** (218 mg, 1.0 mmol) v suchém pyridinu (5 ml) byl za chlazení 2-5 °C přikapán zředěný acyl chlorid (1 mmol v 0.5 ml DCM). Reakční směs byla míchána při 2-5 °C po dobu 30 minut a pak za laboratorní teploty po dobu 18 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (10 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (50 ml). Vzniklá sraženina **40a-e** byla odfiltrována a sušena na volně na vzduchu.

##### Postup B (DIC protokol):

K roztoku kyseliny (2.00 mmol; pro **40a**: benzoová kyselina (244 mg, 2.00 mmol), pro **40b**: 4-nitrobenzoová kyselina (334 mg, 2.00 mmol), pro **40c**: thiofen-2-karboxylová kyselina (256 mg, 2.00 mmol), pro **40d**: octová kyselina (114 µl, 2.00 mmol)) v suchém THF (4 ml) byl přidán *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC; 155 µl, 1.00 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min. Poté byl za chlazení 2-5 °C přikapán roztok pyrazolu **1** (218 mg, 1.00 mmol), triethylaminu (TEA; 139 µl, 1 mmol) and 4-dimethylaminopyridinu (DMAP; 24 mg, 0.20 mmol) v suchém THF (2 ml). Reakční směs byla za laboratorní teploty

míchána po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (3 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (15 ml). Vzniklá sraženina **40a-d** byla odfiltrována a sušena na volně na vzduchu.

#### **6.3.1.1.1 (3,5-Diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-yl)(fenyl)**

##### **methanon (40a)**

Postup A: 260 mg, 81%: žlutá krystalická látka.

Postup B: 196 mg, 61%: žlutá krystalická látka, t.t. = 194–196 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3291, 3210, 3170, 3059, 1689, 1660, 1626, 1570, 1496, 1414, 1368, 1280, 1217, 840, 816, 695; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.82 (s, 1H), 8.08 (br s, 2H), 7.96 (d, *J*=7.0 Hz, 2H), 7.71 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.62 - 7.46 (m, 3H), 6.84 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.18 (br s, 2H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 112.3, 115.4, 122.7, 127.6, 130.0, 131.6, 133.3, 145.8, 146.1, 152.5, 158.1, 169.0 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (322.33) [M + H]<sup>+</sup> 323.1251, naměřeno 323.1252.

#### **6.3.1.1.2 (3,5-Diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-yl)(4-nitrofenyl)**

##### **methanon (40b)**

Postup A: 359 mg, 98%: oranžová krystalická látka.

Postup B: 264 mg, 72%: žlutá krystalická látka, t.t. = 238–240 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3297, 3175, 3114, 3041, 1662, 1632, 1591, 1571, 1518, 1498, 1477, 1415, 1349, 1273, 840, 813, 712; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.82 (s, 1H), 8.33 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 8.13 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.72 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.83 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.27 (br s, 2H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 112.3, 115.5, 122.8, 122.9, 131.0, 139.5, 146.1, 148.8, 152.9, 158.3, 167.4 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> (367.33) [M + H]<sup>+</sup> 368.1102, naměřeno 368.1117.

#### **6.3.1.1.3 (3,5-Diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-yl)(thiofen-2-yl)**

##### **methanon (40c)**

Postup A: Surový produkt byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 40:1) a poskytl čistý methanon **40c** (325 mg, 99% surového produktu; 134 mg, 41% po chromatografii): žlutá krystalická látka.

Postup B: 224 mg, 68%: žlutá krystalická látka, t.t. = 220–222 °C;  $R_f = 0.34$ , IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3411, 1649, 1618, 1590, 1566, 1502, 1409, 1381, 1227, 839, 812, 729, 607;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 9.81$  (br s, 1H), 8.31 (d,  $J=2.7$  Hz, 1H), 8.15 – 8.05 (m, 3H), 7.71 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.26 (t,  $J=4.4$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 6.34 (br s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta = 112.8, 115.9, 123.3, 127.6, 133.5, 137.5, 138.3, 145.8, 146.5, 152.9, 158.7, 161.2$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (328.35)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  329.0815, naměřeno 329.0812.

#### **6.3.1.1.4 1-(3,5-Diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-yl)ethanon (40d)**

Postup A: Surový produkt byl purifikován flash chromatografií ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  30:1) a poskytl čistý ethanon **40d** (146 mg, 56% surového produktu; 94 mg, 36% po chromatografii): žlutá krystalická látka

Postup B: 107 mg, 41%: žlutá krystalická látka

##### Alternativní postup 1:

K roztoku pyrazolu **1** (218.2 mg, 1.00 mmol) v DMF (2 ml) byla přidána Meldrumova kyselina (2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion; 144.1 mg, 1.00 mmol). Reakční směs byla míchána při 60 °C po dobu 6 h. Poté byla reakční směs nakapána do ledové vody (10 ml). Sraženina byla odsáta a sušena volně na vzduchu. 161.0 mg, 62%: žlutá krystalická látka.

##### Alternativní postup 2:

K roztoku pyrazolu **1** (218.2 mg, 1.00 mmol) v DMF (2 ml) byl přidán acethanhydrid (94.4  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol). Reakční směs byla míchána při 60 °C po dobu 6 h. Poté byla reakční směs nakapána do ledové vody (10 ml). Sraženina byla odsáta a sušena volně na vzduchu. 254.7 mg, 98%: žlutá krystalická látka.

##### Alternativní postup 3:

K roztoku pyrazolu **1** (218.2 mg, 1.00 mmol) v pyridin (2 ml) byl přikapán acetyl chlorid (71.1  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol) při 5 °C. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 6 h. Poté byla reakční směs přikapána do ledové vody (10 ml). Sraženina byla odsáta a sušena volně na vzduchu. 136.1 mg, 52%: žlutá krystalická látka.

#### Alternativní postup 4:

K roztoku kyseliny octové (57  $\mu$ l, 1.00 mmol) v suchém DMF (1 ml) byl přidán *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC; 155  $\mu$ l, 1.00 mmol) a 1-hydroxybenzotriazol hydrát (HOBT; 153 mg, 1.00 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min. Poté byl k reakční směsi přikapán roztok pyrazolu **1** (218 mg, 1.00 mmol) v suchém DMF (2 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty pod dobu 18 h. Poté byl roztok nakapán do ledové vody (15 ml). Sraženina byla odfiltrována a sušena volně na vzduch. 114 mg, 44%: žlutá krystalická látka; t.t. = 228–230 °C;  $R_f$  = 0.17; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3423, 3291, 3208, 1678, 1598, 1576, 1499, 1422, 1266, 1220, 1158, 1137, 1099, 842, 810;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.76 (br s, 1H), 7.88 (br s, 2H), 7.67 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H), 6.82 (d,  $J$ =8.4 Hz, 2H), 6.15 (br s, 2H), 2.42 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 22.9, 112.4, 115.4, 122.7, 144.7 (br s), 146.0, 152.0 (br s), 158.1, 172.5 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$  (260.26)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  261.1095, naměřeno 261.1093.

#### **6.3.1.1.5 Ethyl 3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (40e)**

Surový produkt byl purifikován flash chromatografií ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  20:1) a poskytl čistý ethyl karboxylát **40e** (264 mg, 91% surového produktu; 187 mg, 65% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 234–236 °C;  $R_f$  = 0.25; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3488, 3416, 3395, 3375, 3290, 1720, 1620, 1601, 1555, 1499, 1467, 1449, 1428, 1375, 1311, 1287, 1138, 841, 750, 537;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.75 (br s, 1H), 7.66 (d,  $J$ =8.6 Hz, 3H), 6.82 (d,  $J$ =8.6 Hz, 2H), 6.06 (br s, 2H), 4.33 (q,  $J$ =7.1 Hz, 2H), 1.31 (t,  $J$ =7.1 Hz, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 14.1, 63.0, 112.2, 115.4, 122.6, 146.0, 151.3, 152.0 (br s), 158.0 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_3$  (290.28)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  291.1200, naměřeno 291.1200.

#### **6.3.1.1.6 *N,N'*-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diyl)dibenzamid (59)**

4-((3,5-Diamino-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenol **26** (338 mg, 1.00 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (3 ml) a k tomuto roztoku byl za chlazení 2-5 °C přikapán benzoyl chlorid (256  $\mu$ l, 2.20 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (3 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (15 ml). Vzniklá sraženina byla odfiltrována a sušena volně na

vzduchu. Surový produkt byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 60:1) a poskytl čistý dibenzamid **59**; (464 mg, 85% surového produktu; 372 mg, 68% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 82–84 °C; R<sub>f</sub> = 0.27; IR (cm<sup>-1</sup>) 3313, 1731, 1680, 1624, 1601, 1577, 1544, 1514, 1412, 1389, 1267, 1248, 1192, 1178, 1062, 707; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 10.53 (br s, 1H), 8.14 (d, *J*=7.1 Hz, 2H), 7.98 (d, *J*=6.6 Hz, 2H), 7.75 (d, *J*=6.8 Hz, 2H), 7.65 - 7.50 (m, 6 H), 7.41 (br s, 1H), 7.36 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 7.27 (d, *J*=7.7 Hz, 2 H), 6.94 (d, *J*=7.9 Hz, 2 H), 6.70 (br s, 1H), 5.14 (br s, 2 H), 3.74 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 49.2, 55.1, 113.9, 121.7, 122.5, 127.6, 128.6, 128.7, 128.9, 129.0, 129.8, 131.8, 134.0, 134.1, 150.1, 150.8, 158.7, 164.6; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (546.59) [M + H]<sup>+</sup> 547.2088, naměřeno 547.2086.

### 6.3.2 Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na aminoskupině)

#### 6.3.2.1 Obecný postup pro acylaci *tert*-butyl 3,5-diamino-4-((4-((*tert*-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-karboxylátu **37**

K roztoku **37** (200 mg, 0.48 mmol) v suchém pyridinu (4 ml) byl přikapán/přidán acyl chlorid (pro **44a**: benzoyl chlorid (62 μl, 0.53 mmol) zředěný DCM (1 ml); pro **44b**: 4-nitrobenzoyl chlorid (98 mg, 0.53 mmol); pro **44c**: thiophene-2-carbonyl chlorid (57 μl, 0.53 mmol zředěný DCM (1 ml); pro **44d**: acetyl chlorid (68 μl, 0.96 mmol) zředěný DCM (1 ml); pro **44e**: ethyl carbonochloridát (91 μl, 0.96 mmol) zředěný DCM (1 ml)) při teplotě 2-5 °C. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl rozpuštěn v methanolu (3 ml). Methanolický roztok byl nakapán do ledové vody (15 ml). Sraženina byla odfiltrována a sušenav volně na vzduchu.

##### 6.3.2.1.1 *Tert*-butyl 5-amino-3-benzamido-4-((4-*tert*-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (**44a**)

242 mg, 97%: žlutá krystalická látka, t.t. = 100-102 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3446, 3312, 3239, 2981, 2934, 1758, 1728, 1689, 1626, 1584, 1538, 1494, 1424, 1393, 1371, 1353, 1330, 1274, 1257, 1222, 1145, 893, 842, 784, 702, 637; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 10.17 (s, 1H), 8.05 (br s, 2H), 7.99 (d, *J*=7.1, 2H), 7.69 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.55 (d, *J*=7.1 Hz, 2H), 7.48 (t, *J*=7.1 Hz, 1H), 7.25 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 1.59 (s, 9H), 1.47 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 27.7, 28.1, 83.9, 85.9, 116.1, 122.4, 122.5, 128.2, 129.1, 129.7, 133.9, 144.2,



146.7, 150.0, 150.7, 151.1, 151.5, 166.0 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{26}H_{30}N_6O_6$  (522.55)  $[M+H]^+$  523.2300, naměřeno 523.2302.

**6.3.2.1.2 *Tert-butyl 5-amino-4-((4-tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-3-(4-nitrobenzamido)-1H-pyrazol-1-karboxylát (44b)***

266 mg, 98%: žlutá krystalická látka, t.t. = 120-122 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 3449, 3321, 2983, 2936, 1758, 1728, 1696, 1605, 1585, 1530, 1424, 1394, 1371, 1331, 1275, 1222, 1145, 847, 786, 712;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 11.08 (s, 1H), 8.37 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 8.20 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 8.06 (br s, 2H), 7.69 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 1.59 (s, 9H), 1.49 (s, 9H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 27.7, 28.1, 83.9, 86.0, 116.1, 122.5, 122.5, 124.2, 129.8, 139.5, 144.0, 146.3, 149.9, 150.0, 150.7, 151.2, 151.5, 164.8 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{26}H_{29}N_7O_8$  (567.55)  $[M-H]^-$  566.1994, naměřeno 566.1987.

**6.3.2.1.3 *Tert-butyl 5-amino-4-((4-tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-3-(thiofen-2-karboxamido)-1H-pyrazol-1-karboxylát (44c)***

247 mg, 98%: žlutá krystalická látka, t.t. = 116-118 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 34447, 3320, 2980, 2935, 1758, 1730, 1675, 1625, 1586, 1539, 1422, 1393, 1371, 1328, 1274, 1257, 1222, 1145, 1010, 824, 784, 740, 657, 575, 533;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 10.78 (s, 1H), 8.05 (br s, 2H), 8.00 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J=5.2$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.67 (t,  $J=3.8$  Hz, 1H), 7.26 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.47 (s, 9H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 27.7, 28.1, 83.9, 85.9, 116.2, 122.5, 128.8, 130.5, 132.9, 139.2, 143.8, 146.5, 149.9, 150.7, 151.2, 151.5, 160.7 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{24}H_{28}N_6O_6S$  (528.58)  $[M+H]^+$  529.1864, naměřeno 529.1863.

**6.3.2.1.4 *Tert-butyl 3-acetamido-5-amino-4-((4-tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (44d)***

218 mg, 99%: žlutá krystalická látka, t.t. = 96-98 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 3449, 3302, 2981, 2935, 1759, 1728, 1694, 1614, 1584, 1536, 1476, 1425, 1393, 1372, 1310, 1274, 1257, 1224, 1145, 1010, 893, 844, 820, 784, 761, 657, 589, 535;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 10.08 (s, 1H), 8.03 (br s, 2H), 7.79 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 2.12 (s, 3H) 1.57 (s, 9H), 1.48 (s, 9H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta$  = 23.8, 27.7, 28.1, 83.9, 85.7, 115.4, 122.4, 122.6, 143.0, 146.9, 150.0, 150.8, 151.1, 151.5, 169.4 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{21}H_{28}N_6O_6$  (460.48)  $[M+H]^+$  461.2143, naměřeno 461.2144.

### 6.3.2.1.5 *Tert-butyl 5-amino-4-((4-tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-3-((ethoxykarbonyl)amino-1H-pyrazol-1-karboxylát (44e)*

229 mg, 98%: žlutá krystalická látka, t.t. = 80-82 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3449, 3317, 2982, 2936, 1758, 1729, 1618, 1554, 1477, 1395, 1371, 1325, 1274, 1258, 1222, 1205, 1145, 1048, 844, 766, 583, 536; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 9.71 (s, 1H), 8.32 (br s, 2H), 7.79 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.28 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 4.09 (q, *J*=7.0 Hz, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.18 (t, *J*=7.0 Hz, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 14.9, 27.7, 28.1, 61.2, 83.9, 85.7, 115.3, 122.4, 122.6, 143.2, 146.7, 150.0, 150.8, 151.1, 151.5, 153.6 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> (490.51) [M+H]<sup>+</sup> 491.2249, naměřeno 491.2268.

### 6.3.2.2 **Obecný postup acylace *tert*-butyl (4-((3,5-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl) karbonátu**

K roztoku sloučeniny **31** (300 mg, 0.640 mmol) v suchém pyridinu (6 ml) byl přikapán/přidán acyl chlorid (pro **45a**: benzoyl chloride (0.082 ml, 0.706 mmol) naředěn DCM (1 ml); pro **45b**: 4-nitrobenzoyl chloride (131 mg, 0.708 mmol); pro **45c**: thiofen-2-karbonyl chlorid (0.075 ml, 0.701 mmol) naředěn v DCM (0.5 ml); pro **45d**: acetyl chloride (0.090 ml, 1.26 mmol) naředěn DCM (1.5 ml) pro **45e**: ethyl karbonochloridát (0.067 ml, 0.704 mmol) naředěn DCM (6 ml)) za chlazení 2-5 °C. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (3 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (15 ml). Vzniklá sraženina **45a-e** byla odfiltrována a sušena na volně na vzduchu.

#### 6.3.2.2.1 *4-((5-Amino-3-benzamido-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl tert-butyl karbonát (45a)*

349 mg, 95%; žlutá krystalická látka, t.t. = 110–112 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3316, 2979, 2837, 1757, 1689, 1614, 1575, 1540, 1391, 1273, 1210, 1147, 1035, 824, 704; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 10.49 (br s, 1H), 7.96 (d, *J*=7.1 Hz, 2H), 7.69 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.63 – 7.50 (m, 3H), 7.28 (br s, 1H), 7.25 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 6.61 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J*=2.0, 8.3 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 1.49 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 27.2, 45.0, 55.3, 55.6, 83.3, 98.4, 104.6, 116.6, 116.8, 121.6, 121.9, 127.6, 128.5, 129.0, 129.3, 131.8, 134.0, 141.9 (br s), 150.1, 150.7, 151.1,

157.5, 160.2 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{30}H_{32}N_6O_6$  (572.63)  $[M + H]^+$  573.2456, naměřeno 573.2453.

**6.3.2.2.2 4-((5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(4-nitrobenzamido)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl tert-butyl karbonát (45b)**

380 mg, 96%: oranžovo-hnědá krystalická látka, t.t. = 126–128 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 3437, 3341, 3109, 2976, 1756, 1726, 1639, 1616, 1603, 1581, 1541, 1389, 1344, 1273, 1209, 1145, 820, 782, 711;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMF- $d_7$ )  $\delta$  = 10.86 (br s, 1H), 8.46 (m, 2H), 8.31 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.81 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.31 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.54 (dd,  $J=2.4, 8.4$  Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.54 (s, 9H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMF- $d_7$ )  $\delta$  = 27.2, 45.5, 55.3, 55.5, 83.5, 98.5, 104.8, 117.1, 122.1, 124.0, 129.1, 129.5, 131.1, 137.2, 140.6, 142.9, 149.9, 151.0, 151.4, 151.9, 158.1, 161.0, 164.2, 166.2 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{30}H_{31}N_7O_8$  (617.62)  $[M + H]^+$  618.2307, naměřeno 618.2308.

**6.3.2.2.3 4-((5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(thiofen-2-karboxamido)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl tert-butyl karbonát (45c)**

336 mg, 91%: žlutá krystalická látka, t.t. = 110–112 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 3315, 3222, 3098, 2978, 2936, 2836, 1757, 1673, 1615, 1574, 1542, 1509, 1422, 1390, 1371, 1273, 1209, 1147, 1034, 841, 823, 737, 573, 534;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMF- $d_7$ )  $\delta$  = 10.62 (br s, 1H), 8.10 (d,  $J=3.5$  Hz, 1 H), 7.91 (dd,  $J=1.1, 5.1$  Hz, 1 H), 7.81 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.32 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.28 (m, 1H), 6.93 (d,  $J=8.6$  Hz, 1 H), 6.65 (d,  $J=2.5$  Hz, 1 H), 6.54 (dd,  $J=2.4, 8.5$  Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 1.54 (s, 9H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMF- $d_7$ )  $\delta$  = 27.2, 44.9, 55.3, 55.6, 83.3, 98.4, 104.6, 116.5, 117.0, 121.6, 121.9, 128.2, 129.0, 129.4, 131.9, 139.3, 141.4 (br s), 142.4 (br s), 150.1, 150.7, 151.1, 157.5, 160.3 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{25}H_{30}N_6O_6$  (510.55)  $[M + H]^+$  511.2221, naměřeno 511.2298.

**6.3.2.2.4 4-((3-Acetamido-5-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl tert-butyl karbonát (45d)**

285 mg, 87%: žlutá krystalická látka, t.t. = 92–94 °C; IR ( $cm^{-1}$ ) 3410, 3303, 2980, 2938, 2837, 1758, 1689, 1616, 1572, 1537, 1509, 1387, 1372, 1273, 1210, 1147, 1034, 842, 825, 782, 578, 535;  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.77 (br s, 1H), 7.76 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.27 (d,  $J=8.4$  Hz, 4H), 6.76 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.59 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J=2.0, 8.4$

Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.50 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 23.2, 27.3, 44.9, 55.3, 55.6, 83.4, 98.4, 104.6, 116.2, 116.6, 121.8, 121.9, 128.8, 140.6 (br s), 143.4 (br s), 150.1, 150.8, 151.2, 157.5, 160.2, 168.6 (br s) ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6$  (510.55)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  511.2300, naměřeno 511.2298.

#### **6.3.2.2.5 Ethyl (5-amino-4-(4-((tert-butoxykarbonyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1-(2,4-dimethoxybenzyl) -1H-pyrazol-3-yl)karbamát (45e)**

Surový produkt byl purifikován na semipreparativním HPLC (319 mg, 92% surového produktu; 128 mg, 37 % po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 86–88 °C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3566, 3413, 2980, 2949, 1756, 1618, 1558, 1273, 1209, 1146, 1044, 892, 781, 630;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.31 (s, 1H), 7.75 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.27 (d,  $J=8.8$  Hz, 4H), 6.76 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.59 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J=2.0, 8.4$  Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.06 (q,  $J=7.0$  Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 1.50 (s, 9H), 1.18 (t,  $J=7.0$  Hz, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 14.5, 27.3, 44.8, 55.3, 55.6, 60.3, 83.3, 98.4, 104.6, 116.2, 116.6, 121.7, 121.9, 122.1, 128.8, 150.0, 150.8, 151.2, 153.7, 157.5, 160.0, 160.2 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_7$  (540.58)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  541.2405, naměřeno 541.2404.

#### **6.3.2.3 Obecný postup pro odchránění Boc protektivní skupiny**

Sloučenina **45a-e** (0.5 mmol) byla rozpuštěna v 10 % TFA/DCM (15 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 1 h bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn vodou (20 ml). Přídavkem amoniaku bylo pH upraveno na 10. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty pod dobu 2 h. Surový product **46a-e** byl odfiltrován a sušen volně na vzduchu.

##### **6.3.2.3.1 N-(5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl) -4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)benzamid (46a)**

234 mg, 99%: oranžovo-hnědá krystalická látka, t.t. = 140–142 °C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3650, 3465, 3180, 2941, 2834, 1671, 1582, 1544, 1507, 1455, 1393, 1293, 1267, 1208, 1157, 1137, 1030, 838, 698, 536;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.45 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 7.96 (d,  $J=7.1$  Hz, 2 H), 7.61 - 7.50 (m, 5H), 7.02 (br s, 2H), 6.81 (d,  $J=8.4$  Hz, 3H), 6.60 (d,  $J=2.2$  Hz, 1H), 6.50 (dd,  $J=2.2, 8.4$  Hz, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.75 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 44.9, 55.3, 55.6, 98.4, 104.6, 115.5, 116.0, 116.8, 122.3, 127.5, 128.5, 128.9,

131.7, 134.1, 141.5, 142.0, 145.9, 157.5, 157.9, 160.2 165.3 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{25}H_{24}N_6O_4$  (472.51)  $[M + H]^+$  473.1932, naměřeno 473.1932.

#### 6.3.2.3.2 *N*-(5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)4-nitrobenzamid (46b)

Surový 4-nitrobenzamid **46b** byl purifikován flash chromatografií ( $CHCl_3/MeOH$  40:1) a poskytl čistý product **46b** (204 mg, 79% surového produktu; 134 mg, 52% po chromatografii): oranžová krystalická látka, t.t. = 150–152 °C,  $R_f = 0.28$ ; IR ( $cm^{-1}$ ) 3412, 3177, 2950, 2836, 1673, 1602, 1582, 1540, 1525, 1510, 1452, 1347, 1294, 1272, 1209, 1158, 1033, 841, 831, 705, 613, 533;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 10.69$  (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.37 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 8.16 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.05 (s, 2H), 6.80 (d,  $J=8.6$  Hz, 3H), 6.60 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J=2.3, 8.3$  Hz, 1 H), 5.04 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.74 (s, 3H) ppm;  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 44.9, 55.3, 55.6, 98.4, 104.6, 115.5, 116.1, 116.7, 122.5, 123.7, 129.0, 129.1, 139.8, 141.1, 141.8, 145.8, 149.3, 157.5, 158.0, 160.2, 164.2$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{25}H_{23}N_7O_6$  (517.51)  $[M + H]^+$  518.1783, naměřeno 518.1783.

#### 6.3.2.3.3 *N*-(5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl)thiofen-2-karboxamid (46c)

Surový karboxamid **46c** byl purifikován flash chromatografií ( $CHCl_3/MeOH$  40:1) a poskytl čistý produkt **46c** (233 mg, 98% surového produktu; 134 mg, 56% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 132–134 °C,  $R_f = 0.15$ ; IR ( $cm^{-1}$ ) 3549, 3469, 3413, 1637, 1618, 1578, 1543, 1508, 1422, 1397, 1293, 1268, 1209, 1157, 964, 838, 719, 622, 538, 481;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 10.39$  (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.94 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J=4.8$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.22 (dd,  $J=3.8, 4.8$  Hz, 1 H), 7.03 (s, 2H), 6.84 - 6.77 (m, 3H), 6.60 (d,  $J=2.2$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J=2.2, 8.4$  Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.75 (s, 3H) ppm;  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta = 44.9, 55.3, 55.6, 98.4, 104.6, 115.5, 116.3, 116.7, 122.4, 128.2, 129.0, 129.3, 131.7, 139.4, 141.0, 141.8, 145.9, 157.5, 158.0, 160.1, 160.2$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{23}H_{22}N_6O_4S$  (478.53)  $[M + H]^+$  479.1496, naměřeno 479.1495.

#### **6.3.2.3.4 *N*-(5-Amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl) -4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)acetamid (46d)**

143 mg, 69%: žlutá krystalická látka, t.t. = 136–138 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3420, 3205, 3024, 2934, 2838, 1680, 1613, 1573, 1537, 1508, 1454, 1395, 1294, 1267, 1237, 1209, 1157, 1119, 1035, 937, 841, 674, 538; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.73 (s, 1H), 7.59 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.00 (br s, 2H), 6.82 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.73 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J*=2.2, 8.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.03 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 23.1, 44.8, 55.3, 55.6, 98.4, 104.6, 115.5, 116.8, 122.5, 128.7, 140.3 (br s), 142.8, 146.0, 155.9 (br s), 157.4, 157.9, 160.1, 168.7 (br s) ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (410.44) [M + H]<sup>+</sup> 411.1775, naměřeno 411.1777.

#### **6.3.2.3.5 Ethyl (5-amino-1-(2,4-dimethoxybenzyl) -4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl) karbamát (46e)**

207 mg, 94%: žlutá krystalická látka, t.t. = 118–120 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3430, 3337, 2933, 2836, 1727, 1614, 1568, 1507, 1465, 1399, 1294, 1267, 1209, 1157, 1041, 840, 738, 539, 438; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 9.73 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 7.58 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.98 (br s, 2H), 6.82 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.73 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J*=2.1, 8.3 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.05 (q, *J*=7.1 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 1.17 (t, *J*=7.0 Hz, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 14.5, 44.7, 55.3, 55.6, 60.3, 98.4, 104.6, 115.5, 115.5, 116.8, 122.4, 128.7, 140.5, 142.4, 146.0, 153.9, 157.4, 157.9, 160.1 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (440.46) [M + H]<sup>+</sup> 441.1883, naměřeno 441.1881.

### **6.3.2.4 Obecný postup pro odchránění Dmb a Boc protektivních skupin**

#### Postup A: odchránění Dmb a Boc skupiny:

Sloučenina **45a-e** (0.5 mmol) byla rozpuštěna v koncentrované TFA (15 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 4 h bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn vodou (20 ml). Přídavkem amoniaku bylo pH upraveno na 10. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 h. Surový produkt **47a-e** byl odfiltrován a sušen volně na vzduchu.

#### Postup B: odchránění dvou Boc skupin:

Sloučenina **44a-e** (0.5 mmol) byla rozpuštěna v 10% TFA/DCM (15 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 2.5 h bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn vodou (20 ml). Přídavkem amoniaku bylo pH

upraveno na 10. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty pod dobu 2 h. Surový produkt **47a-e** byl odfiltrován a sušen volně na vzduchu.

#### **6.3.2.4.1 *N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl) benzamid (47a)**

Postup A: Surový benzamid **47a** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (159 mg, 99% surového produktu; 95.1 mg, 59% po chromatografii): žlutá krystalická látka.

##### Postup B:

148 mg, 92%: žlutá krystalická látka, t.t. = 262–264 °C;  $R_f = 0.2$ ; IR (cm<sup>-1</sup>) 3317, 3221, 3110, 2924, 2847, 1686, 1634, 1580, 1448, 1506, 1394, 1239, 1203, 1037, 833, 695, 531; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta = 11.65$  (br s, 1H), 10.58 (br s, 1H), 9.72 (s, 1H), 7.97 (d,  $J=7.6$  Hz, 2H), 7.60 (t,  $J=7.6$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J=7.6$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.56 (br s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta = 116.0, 116.5, 122.9, 128.1, 129.1, 132.4, 134.3, 141.3, 144.2, 146.3, 158.5, 165.8$  ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (322.33) [M + H]<sup>+</sup> 323.1251, naměřeno 323.1251.

#### **6.3.2.4.2 *N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl) 4-nitrobenzamid (47b)**

Postup A: Surový 4-nitrobenzamid **47b** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (182 mg, 99% surového produktu; 102 mg, 56% po chromatografii): žlutá krystalická látka.

##### Postup B:

182 mg, 95%: červená krystalická látka, t.t. = 232–234 °C,  $R_f = 0.2$ ; IR (cm<sup>-1</sup>) 3712, 3346, 3003, 2924, 2834, 1676, 1587, 1572, 1508, 1467, 1340, 1315, 1301, 1278, 1203, 1038, 842, 814, 704, 532; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta = 11.74$  (br s, 1H), 10.67 (br s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.37 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 8.18 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.70 (br s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta = 115.9, 116.6, 122.9, 124.2, 129.6, 140.2, 142.2, 142.5, 146.3, 149.8, 158.5, 164.6$  ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> (367.33) [M + H]<sup>+</sup> 368.1102, naměřeno 368.1101.

#### 6.3.2.4.3 *N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)thiofen-2-karboxamid (47c)

Postup A: 142 mg, 87%: žluto-hnědá krystalická látka.

Postup B:

Surový karboxamid **47c** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (159 mg, 97% surového produktu; 57 mg, 35% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 284–286 °C; R<sub>f</sub> = 0.31; IR (cm<sup>-1</sup>) 3311, 3219, 3113, 2994, 2950, 2833, 1673, 1632, 1577, 1545, 1506, 1396, 1296, 1243, 1203, 1037, 835, 726, 530; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.83 (br s, 1H), 10.48 (br s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 7.98 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=4.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.24 ddt, *J*=4.7, 4.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.64 (br s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 116.0, 116.7, 122.9, 128.7, 129.9, 132.4, 139.7, 142.0, 142.7, 146.3, 158.5, 160.6 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S (328.35) [M + H]<sup>+</sup> 329.0815, naměřeno 329.0813.

#### 6.3.2.4.4 *N*-(5-Amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)acetamid (47d)

Postup A: Surový acetamid **47d** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (97.3 mg, 75% surového produktu; 51.5 mg, 40% po chromatografii): žluto-hnědá krystalická látka.

Postup B:

Surový acetamid **47d** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (121 mg, 93% surového produktu; 26 mg, 20% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 158–160 °C; R<sub>f</sub> = 0.16; IR (cm<sup>-1</sup>) 3128, 2925, 2834, 1674, 1603, 1594, 1552, 1506, 1454, 1294, 1268, 1240, 1203, 1039, 841, 663, 633, 526; Dva rotační izomery A a B (v poměru 2:1) A: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 11.61 (br s, 1H), 10.50 (br s, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.61 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.00 (br s, 2H), 2.11 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 23.6, 115.4, 115.9, 123.1, 142.6, 145.5, 146.4, 158.4, 169.3 ppm; B: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 11.77 (br s, 1H), 9.71 (s, 1H), 9.51 (br s, 1H), 7.61 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 6.81 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.67 (br s, 2H), 2.11 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 23.6, 115.4, 115.9, 123.1, 142.6, 145.5, 146.4, 158.4, 169.3 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (260.26) [M + H]<sup>+</sup> 261.1095, naměřeno 261.1093.



#### 6.3.2.4.5 Ethyl (5-amino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-3-yl) karbamát (47e)

Postup A: Surový karbamát **47e** byl purifikován na semipreparativním HPLC (92.7 mg, 64% surového produktu; 29.5 mg, 20% po chromatografii): žlutá krystalická látka.

#### Postup B:

Surový karbamát **47e** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:1) a poskytl čistý produkt (95 mg, 66 surového produktu; 45 mg, 31% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 170–172 °C; R<sub>f</sub> = 0.13; IR (cm<sup>-1</sup>) 3180, 3108, 2939, 2834, 1731, 1589, 1565, 1506, 1452, 1296, 1270, 1222, 1204, 1172, 1096, 1037, 837, 815, 530; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 11.54 (br s, 1H), 9.69 (s, 1H), 9.26 (br s, 1H), 7.57 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 6.79 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.52 (br s, 2H), 4.09 (q, *J*=7.3 Hz, 2H), 1.19 (t, *J*=7.0 Hz, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 15.0, 61.0, 115.9, 116.0, 123.0, 142.4, 143.0, 146.5, 154.3, 158.3 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (290.28) [M + H]<sup>+</sup> 291.1200, naměřeno 291.1199.

### 6.3.3 Acyl na fenolické hydroxy skupině pyrazolu

#### 6.3.3.1 Obecný postup pro acylaci mono-Boc chráněného pyrazolu (36) vedoucí k 41a-d podle DIC protokolu

K roztoku kyseliny (4.00 mmol nebo 8 mmol; pro **41a**: benzoová kyselina (489 mg, 4.00 mmol), pro **41b**: 4-nitrobenzoová kyselina (669 mg, 4.00 mmol), pro **41c**: thiofen-2-karboxylová kyselina (513 mg, 4.00 mmol), pro **41d**: octová kyselina (458 μl, 8.00 mmol)) v suchém THF (4 ml) byl přidán *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC; pro **41a-c** 310 μl, 2.00 mmol; pro **41d** 619 μl, 4.00 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min. Poté byl za chlazení 2-5 °C přikapán roztok pyrazolu **36** (318 mg, 1.00 mmol), triethylamin (TEA; pro **41a-c** 279 μl, 2 mmol; pro **41d** 558 μl; 4 mmol) a 4-dimethylaminopyridinu (DMAP; 30 mg, 0.25 mmol) v suchém THF (2 ml). Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl naředěn methanolem (3 ml) a tento roztok byl za chlazení a míchání nakapán do ledové vody (15 ml). Vzniklá sraženina **41a-d** byla odfiltrována a sušena na volně na vzduchu.

### **6.3.3.1.1 *Tert-butyl 3,5-diamino-4-((4-(benzoyloxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (41a)***

362 mg, 86%: žlutá krystalická látka.

#### Alternativní postup:

K roztoku pyrazolu **36** (318 mg, 1.00 mmol) v suchém DMF (10 ml) byl přidán triethylamin (TEA; 209  $\mu$ l, 1.50 mmol). K reakční směsi byl za chlazení na 2-5 °C přikapán benzoylchlorid (175  $\mu$ l, 1.50 mmol) zředěný DCM (3 ml). Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 18 h. Poté byla reakční směs nakapána do ledové vody (50 ml). Sraženina **41a** byla odfiltrována a sušena volně na vzduchu. Surový produkt byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 160:1) a poskytl čistý **41a** (199 mg, 47% surového produktu; 61 mg, 14 % po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 188-190 °C,  $R_f$  = 0.18 (160:1); IR (cm<sup>-1</sup>) 3445, 3396, 3331, 3262, 3202, 3167, 2970, 2932, 2360, 1731, 1717, 1623, 1573, 1521, 1487, 1420, 1362, 1313, 1270, 1256, 1193, 1177, 1151, 1066, 1085, 1023, 882, 765, 711, 676, 533, 475; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 8.14 (d,  $J$ =7.6 Hz, 2H); 7.88 (d,  $J$ =8.8 Hz, 2H), 7.87 (br s, 2H), 7.74 (t,  $J$ =7.5 Hz, 1H), 7.61 (t,  $J$ =7.6 Hz, 2H), 7.35 (d,  $J$ =8.8 Hz, 2H), 6.18 (br s, 2H), 1.54 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 28.2, 84.3, 113.7, 122.4, 122.8, 129.4, 129.5, 130.3, 134.5, 144.0, 150.5, 150.7, 151.3, 151.4, 165.1 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (422.17) [M+H]<sup>+</sup> 423.1775, naměřeno 423.1774.

### **6.3.3.1.2 *Tert-butyl 3,5-diamino-4-((4-((4-nitrobenzoyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (41b)***

462 mg, 99%: žluto-oranžová krystalická látka, t.t. = 160-162 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3469, 3436, 3341, 3300, 2970, 1740, 1721, 1698, 1627, 1522, 1494, 1423, 1368, 1347, 1319, 1263, 1185, 1156, 1078, 1013, 850, 803, 792, 716, 564, 497; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 8.39 (qq,  $J$ =2.0, 8.8 Hz, 4H), 7.89 (dd,  $J$ =1.6, 8.9 Hz, 2H), 7.87 (br s, 2H), 7.40 (dd,  $J$ =1.9, 8.8 Hz, 2H), 6.15 (br s, 2H), 1.54 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 28.2, 84.3, 113.7, 122.4, 122.7, 124.7, 131.8, 134.9, 142.2, 150.2, 150.6, 151.5, 151.1, 151.6, 163.6 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> (467.16) [M+H]<sup>+</sup> 468.1626, naměřeno 468.1626.

### **6.3.3.1.3 *Tert-butyl 3,5-diamino-4-((4-((thiofen-2-karbonoyl)oxy)fenyl)diazenyl)-1H-pyrazol-1-karboxylát (41c)***

406 mg, 95%: žlutá krystalická látka, t.t. = 158-160 °C, IR (cm<sup>-1</sup>) 3485, 3436, 3276, 3208, 3163, 3100, 2986, 2931, 2361, 1728, 1697, 1636, 1573, 1511, 1488, 1437, 1415, 1398, 1356, 1319, 1268, 1187, 1148, 1057, 1015, 863, 793, 743, 712, 535; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 8.09 (dd, *J*=1.3, 5.3 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J*=1.3, 3.6 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J*=1.6, 8.9 Hz, 2H), 7.84 (br s, 2H), 7.33 (dd, *J*=1.9, 8.8 Hz, 2H), 7.30 (m, 1H), 6.17 (br s, 2H), 1.54 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 20.2, 84.3, 113.7, 122.4, 122.8, 129.2, 132.3, 135.7, 134.8, 142.6, 150.0, 150.7, 151.2, 151.4, 160.5 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (428.46) [M+H]<sup>+</sup> 429.1340, naměřeno 429.1338.

#### 6.3.3.1.4 *Tert-butyl 4-((4-acetoxifenyl)diazenyl)-3,5-diamino-1H-pyrazol-1-karboxylát (41d)*

Surový karboxylát **41d** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 160:1) poskytl čistý produkt (270 mg, 75 % surového produktu; 129 mg, 36 % po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 142–144 °C; R<sub>f</sub> = 0.16; IR (cm<sup>-1</sup>) 3435, 3319, 3277, 3164, 2982, 2931, 1759, 1716, 1627, 1570, 1490, 1421, 1365, 1316, 1221, 1151, 1011, 917, 851, 797, 763, 748, 618, 496; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 7.84 (br s, 2H), 7.81 (dd, *J*=1.9, 8.9 Hz, 2H), 7.17 (dd, *J*=1.9, 8.8 Hz, 2H), 6.15 (br s, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.54 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 21.3, 28.2, 84.3, 113.6, 122.3, 122.7, 144.1, 150.4, 150.6, 151.2, 151.9, 169.6 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (360.15) [M+H]<sup>+</sup> 361.1619, naměřeno 361.1616.

#### 6.3.3.2 **Obecný postup pro acylaci Dmb chráněného pyrazolu (29) podle DIC protokolu**

K roztoku kyseliny (2.2 mmol pro **42a** (264 mg benzoové kyseliny) a **42b** (363 mg 4-nitrobenzoové kyseliny); 1.2 mmol pro **42c** (154 mg of 2-thiofenkarboxylové kyseliny); 2.7 mmol pro **42d** (156 μl octové kyseliny)) v suchém THF (2 ml) byl za laboratorní teploty přidán DIC (168 μl, 1.1 mmol pro **42a-c**; 210 μl, 1.36 mmol pro **42d**). Reakční směs byla míchána po dobu 10 min. Poté byl přidán roztok 4-((3,5-diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenolu **29** (200 mg, 0.54 mmol), TEA (76 μl, 0.54 mmol) a DMAP (14 mg, 0.1 mmol) v suchém THF (2 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a odparek byl naředěn methanolem (5 ml). Methanolický roztok byl nakapán do ledové vody (5 ml). Získané produkty **42a-d** byly purifikovány s použitím chromatografie.

### 6.3.3.2.1 4-((3,5-Diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl benzoát (42a)

Surový benzoát **42a** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:1) a poskytl čistý produkt (227 mg, 88 % surového produktu; 162 mg, 63 % po chromatografii): žluto-oranžová krystalická látka, t.t. = 204–206 °C; R<sub>f</sub> = 0.17; IR (cm<sup>-1</sup>) 3454, 3276, 3137, 2924, 2837, 1736, 1610, 1572, 1511, 1492, 1465, 1391, 1293, 1265, 1209, 1187, 1108, 1081, 1063, 1024, 819, 706; 2 rotační izomery A a B (v poměru 3:2): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 8.14 (d, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.78 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.76 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.61 (t, *J*=7.7 Hz, 2H), 7.30 (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 7.30 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.78 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 6.56 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 6.56 (s, 1H), 6.46 (dd, *J*=2.0, 8.7 Hz, 1H), 5.95 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 5.28 (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 4.81 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 44.9, 55.7, 56.0, 98.7, 105.0, 114.5, 117.6, 121.7, 122.6, 129.2, 129.4, 130.2, 134.5, 134.6, 139.5 (B), 146.5 (B), 148.8 (A), 149.4, 152.0, 153.6 (A), 157.9, 160.4, 165.1 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (472.50) [M+H]<sup>+</sup> 473.1932, naměřeno 473.1930.

### 6.3.3.2.2 4-((3,5-Diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl 4-nitrobenzoát (42b)

Surový 4-nitrobenzoát **42b** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 60:1) a poskytl čistý produkt (278 mg, 99 % surového produktu; 81 mg, 29 % po chromatografii): červená krystalická látka, t.t. = 222–224 °C; R<sub>f</sub> = 0.19; IR (cm<sup>-1</sup>) 3445, 3312, 3216, 3113, 3002, 2978, 2948, 2840, 2024, 1951, 1738, 1703, 1622, 1563, 1515, 1421, 1399, 1348, 1274, 1188, 1158, 1116, 1075, 1042, 1012, 878, 853, 797, 717, 565, 539, 495; 2 rotační izomery A a B (v poměru 3:2): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 8.39 (qq, *J*=2.3, 9.3 Hz, 4H), 7.78 (dd, *J*=2.2, 8.8 Hz, 2H), 7.35 (dd, *J*=2.2, 8.8 Hz, 2H), 7.28 (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 6.77 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.59 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 6.56 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J*=2.2, 8.5 Hz, 1H), 5.96 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 5.28 (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 4.81 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.73 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 44.9, 55.7, 56.0, 98.7, 105.0, 114.6, 117.6, 121.7, 122.5, 124.2, 129.2, 131.2, 137.0, 139.5 (B), 146.5 (B), 148.8 (A), 149.2, 151.0, 152.2, 153.7 (A), 157.9, 160.4, 163.7 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> (517.49) [M+H]<sup>+</sup> 518.1783, naměřeno 518.1783.

### 6.3.3.2.3 4-((3,5-Diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl tiofen-2-karboxylát 42c

Surový thiofen-2-karboxylát **42c** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 60:1) a poskytl čistý produkt (229 mg, 88 % surového produktu; 104 mg, 40 % po chromatografii): oranžová krystalická látka, t.t. = 172–174 °C; R<sub>f</sub> = 0.13; IR (cm<sup>-1</sup>) 3418, 3273, 3174, 2910, 2834, 1727, 1614, 1571, 1510, 1487, 1414, 1390, 1339, 1293, 1268, 1209, 1185, 1060, 1020, 741; 2 rotační izomery A a B (v poměru 3:2): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 8.08 (dd, *J*=1.3, 5.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J*=1.3, 3.9 Hz, 1H), 7.76 (dd, *J*=2.2, 8.9 Hz, 2H), 7.30 (tt, *J*=1.3, 4.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J*=2.2, 8.8 Hz, 2H), 7.28, (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 6.78 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.58 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 6.56 (d, *J*=2.2 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J*=2.2, 8.5 Hz, 1H), 5.96 (br s, 1H, NH<sub>A</sub>), 5.29 (br s, 1H, NH<sub>B</sub>), 4.82 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>) δ = 45.0, 55.7, 56.0, 98.7, 105.0, 114.6, 117.6, 121.7, 122.5, 129.2, 129.3, 132.4, 135.6, 135.7, 139.5 (B), 146.5 (B), 148.8 (A), 149.0, 152.1, 153.6 (A), 157.9, 160.4, 160.7 ppm; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S (478.52) [M+H]<sup>+</sup> 479.1496, naměřeno 479.1492.

### 6.3.3.2.4 4-((3,5-Diamino-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl acetát 42d

Surový produkt byl purifikován na semipreparativním HPLC (219 mg, 99% surového produktu; 22 mg, 10% po chromatografii): žlutá krystalická látka, t.t. = 70–72 °C; IR (cm<sup>-1</sup>) 3430, 3292, 3187, 3004, 2934, 2835, 2349, 1755, 1733, 1313, 1567, 1508, 1489, 1463, 1420, 1392, 1366, 1340, 1292, 1209, 1187, 1157, 1120, 1030, 914, 846, 742, 681, 620, 535; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.72 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.77 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 6.6 (br s, 2H), 6.47 (dd, *J*=1.9, 8.3 Hz, 1H), 5.94 (br s, 2H), 4.82 (br s, 2H), 3.81 (s, 3 H), 3.73 (s, 3 H), 2.27 (s, 3 H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 20.9, 44.4, 55.2, 55.5, 98.2, 104.5, 114.0, 117.1, 121.1, 122.0, 128.7, 146.4, 148.9, 151.3, 151.6, 157.4, 160.0, 169.3; HRMS (HESI, *m/z*) vypočteno pro C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (410.43) [M+H]<sup>+</sup> 411.1775, naměřeno 411.1779.

### 6.3.3.3 Obecný postup pro odchránění Dmb/Boc protektivní skupiny

#### Postup A:

Sloučenina **42a-d** (0.5 mmol) byla rozpuštěna v koncentrované TFA (15 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 1.5 h bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační

odparce a získaný odparek byl naředěn vodou (20 ml). Přídavkem amoniaku bylo pH upraveno na 10. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 h. Surový produkt **43a-d** byl odfiltrován a sušen volně na vzduchu.

Postup B:

Sloučenina **41a-d** (0.5 mmol) byla rozpuštěna v 10% TFA/DCM (15 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 1 h bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl naředěn vodou (20 ml). Přídavkem amoniaku bylo pH upraveno na 10. Suspenze byla míchána za laboratorní teploty pod dobu 2 h. Surový produkt **43a-d** byl odfiltrován a sušen volně na vzduchu.

**6.3.3.3.1 4-((3,5-Diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl benzoát (43a)**

Postup A:

Surový benzoát **43a** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (160 mg, 99 % surového produktu; 62 mg, 39 % po chromatografii): žlutá krystalická látka.

Postup B: 160 mg, 99 %, žlutá krystalická látka, mp 196-198 °C, t.t. = 194–196 °C;  $R_f$  = 0.18; IR (cm<sup>-1</sup>) 3389, 3296, 3185, 3058, 2919, 2850, 1901, 1738, 1616, 1565, 1515, 1494, 1450, 1427, 1370, 1274, 1192, 1086, 1065, 1025, 877, 824, 694, 533; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 10.75 (br s, 1H), 8.14 (d,  $J$ =7.9 Hz, 2H), 7.74 (d,  $J$ =8.8 Hz, 2H), 7.74 (tt,  $J$ =1.3, 7.1 Hz, 1H), 7.60 (t,  $J$ =7.8 Hz, 2H), 7.29 (dd,  $J$ =2.0, 8.8 Hz, 2H), 6.30 (br s, 2H), 5.87 (br s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>7</sub>)  $\delta$  = 114.7, 121.7, 122.6, 129.4, 130.0, 130.2, 134.5, 144.5, 149.5, 151.5, 152.0, 165.1 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (322.32) [M+H]<sup>+</sup> 323.1251, naměřeno 323.1250.

**6.3.3.3.2 4-((3,5-Diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl 4-nitrobenzoát (43b)**

Postup A:

Surový 4-nitrobenzoát **43b** byl purifikován flash chromatografií (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1) a poskytl čistý produkt (171 mg, 93 % surového produktu; 62 mg, 34 % po chromatografii): oranžová krystalická látka.

Postup B:

140 mg, 76 %, žlutá krystalická látka, t.t. = 196–198 °C;  $R_f = 0.22$ ; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3427, 3389, 3339, 3295, 3113, 3082, 3055, 2926, 2851, 1731, 1620, 1565, 1516, 1491, 1424, 1382, 1347, 1322, 1297, 1267, 1195, 1118, 1081, 1012, 851, 711;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_7$ )  $\delta = 10.67$  (br s, 1H), 8.39 (dd,  $J=3.1, 8.2$  Hz, 2H), 8.30 (dd,  $J=3.1, 8.5$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.36 (br s, 2H), 5.86 (br s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_7$ )  $\delta = 114.8, 121.7, 122.5, 124.5, 131.5, 134.9, 140.0, 146.3, 150.5, 152.2, 153.6, 167.8$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_7\text{O}_4$  (367.32)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  368.1102, naměřeno 368.1099.

**6.3.3.3 4-((3,5-Diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl thiofen-2-karboxylát (43c)**

Postup A:

Surový thiofen-2-karboxylát **43c** byl purifikován flash chromatografií ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5:1) poskytl čistý produkt (163 mg, 99 % surového produktu; 54 mg, 33 % po chromatografii): žlutá krystalická látka.

Postup B:

163 mg, 99 %, žlutá krystalická látka, t.t. = 192–194 °C;  $R_f = 0.21$ ; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3396, 3304, 3271, 3198, 3175, 2930, 2836, 1720, 1616, 1566, 1517, 1494, 1420, 1357, 1280, 1199, 1021, 866, 734, 708, 528;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_7$ )  $\delta = 10.73$  (br s, 1H), 8.08 (dd,  $J=1.1, 4.8$  Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J=1.1, 3.9$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.30 (d,  $J=4.4$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.31 (br s, 2H), 5.93 (br s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz,  $\text{DMSO-}d_7$ )  $\delta = 114.8, 121.7, 122.6, 129.2, 132.4, 135.6, 135.7, 145.1, 149.0, 151.5, 152.0, 160.7$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$  (328.35)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  329.0815, naměřeno 329.0815.

**6.3.3.3.4 4-((3,5-Diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)fenyl acetát (43d)**

Postup A:

Surový acetát **43d** byl purifikován flash chromatografií ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10:1) poskytl čistý produkt (129 mg, 99 % surového produktu; 46 mg, 35 % po chromatografii): žlutá krystalická látka.

### Postup B:

112 mg, 86 %, žlutá krystalická látka, t.t. = 164–166 °C;  $R_f = 0.28$ ; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3407, 3301, 3197, 3003, 2926, 2833, 1757, 1617, 1565, 1509, 1453, 1427, 1372, 1299, 1230, 1202, 1189, 1117, 1038, 917, 848, 815, 620, 526;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta = 10.72$  (br s, 1H), 7.68 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 7.12 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.23 (br s, 2H), 5.84 (br s, 2H), 2.25 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_7$ )  $\delta = 21.3, 114.6, 121.6, 122.5, 144.7, 149.4, 151.5, 151.8, 169.7$  ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$  (260.25)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  261.1095, naměřeno 261.1092.

## **6.4 Acylované pyrazoly na pevné fázi**

### **Navázání BALu na 2-aminomethylovou pryskyřici (pryskyřice 72)**

Do stříkačky (20 ml) byl navážen 1.00 g 2-aminomethylové pryskyřice (0.98 mmol/g, 100-200 mesh) a k tomu bylo přidáno 10 ml 10 % TEA/DMF, vše bylo třepáno 10 min. Pryskyřice byla 3x promyta DMF a byl k ní přidán roztok 4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)máselné kyseliny (BAL; 371 mg, 1.56 mmol), 1-hydroxybenzotriazol hydrát (HOBt; 239 mg, 1.56 mmol) a  $N,N'$ -diisopropylkarbodiimid (DIC; 420  $\mu\text{l}$ , 2.68 mmol) ve směsi rozpouštědel DMF (5 ml) a DCM (5 ml). Vše bylo třepáno přes noc. Druhý den byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. Výsledek reakce byl zkontrolován testem s bromfenolovou modří.

### **Reduktivní aminace BAL linkeru (pryskyřice 74)**

Do stříkačky (20 ml) bylo naváženo 500 mg BAL-pryskyřice **72**, promyto suchým DMF a byl přidán roztok  $\beta$ -alanin ethyl esteru hydrochloridu (384 mg, 2.50 mmol) v 10 % roztoku octové kyseliny v suchém DMF (5 ml), vše třepáno přes noc. Poté byl přidán triacetoxyborohydrid sodný (528 mg, 2.5 mmol), uvolňování vodíku zajištěno jehlou, třepáno po dobu 5 h. Byl přidán další podíl triacetoxyborohydridu sodného (528 mg, 2.5 mmol) a vše třepáno po dobu 3 h. Pryskyřice byla promyta 5 % roztokem kyseliny octové v DMF, 3x DMF, neutralizována 5 % piperidinem v DMF, DCM. Kvantifikace byla provedena po reakci vzorku s Fmoc-Osu.

**Kvantifikace pryskyřice a loading:** k vzorku pryskyřice byl přidán Fmoc-Osu (169 mg, 0.5 mmol) v DCM (1 ml) a za laboratorní teploty bylo třepáno 40 min. Pryskyřice byla promyta 5x DCM, 3x MeOH a sušena dusíkem. 10 mg pryskyřice bylo štěpeno z pryskyřice 50% TFA v DCM po dobu 30 min. Štěpící koktejl byl odpařen proudem dusíku a odštěpená sloučenina byla extrahována do MeOH (1 ml). Tento vzorek derivatizovaný Fmocem byl analyzován



pomocí LC-MS a kvantita byla srovnána s analýzou standardu (Fmoc-Ala-OH, koncentrace 1 mg/ml). Loading byl určen pomocí externí standardní metody.

### **Acylace aromatickou karboxylovou kyselinou/bromoctovou kyselinou/sulfonylace (pryskyřice 75, resp. 78)**

**Acylace aromatickou karboxylovou kyselinou:** Pryskyřice (**74**; 250 mg) byla promyta DCM a byl k ní přidán roztok karboxylové kyseliny (1.00 mmol), HOBt (153 mg, 1.00 mmol), DIC (155  $\mu$ l, 1.00 mmol) ve směsi rozpouštědel DMF (1.5 ml) a DCM (1.5). Pryskyřice byla třepána přes noc, druhý den promyta DMF a DCM.

**Acylace bromoctovou kyselinou a následná výstavba dioxopiperazinového cyklu:** Roztok bromoctové kyseliny (176 mg, 1.27 mmol) a DIC (98  $\mu$ l, 0.64 mmol) v DCM (2.5 ml) byl třepán ve stříkačce po dobu 5 min, poté byla diisopropyl močovina odfiltrována a ke zbylému roztoku bylo přidáno DIEA (110  $\mu$ l, 0.63 mmol). Tento reakční roztok byl přidán k pryskyřici (**74**; 250 mg) promyté v DCM, 1 h třepáno. Pryskyřice byla promyta DCM a DMF, poté k ní byl přidán roztok glycin ethyl esteru hydrochloridu (350 mg, 2.51 mmol) a DIEA (436  $\mu$ l, 2.50 mmol) v DMF (2.5 ml). Pryskyřice byla třepána po dobu 2 h, poté promyta DMF a DCM. Byl odebrán malý vzorek, který byl nechán reagovat s Fmoc-Osu a poté byla provedena kvantifikace.

Pryskyřice byla promyta DCM a THF, poté k ní byl přidán roztok Fmoc-Tyr(tBu)-OH (1.15 g, 2.50 mmol) a DIC (193  $\mu$ l, 1.25 mmol) v THF (2.5 ml) a vše třepáno přes noc. Druhý den promyto THF a DCM.

**Uzavření dioxopiperazinového cyklu:** Pryskyřice promyta DMF, poté přidán 50% piperidin/DMF (2 ml) a třepáno 20 min. Promyto DMF a DCM.

**Sulfonylace:** Pryskyřice (**74**; 250 mg) byla promyta DCM, poté k ní byl přidán roztok 4-toluensulfonyl chloridu (191 mg, 1.00 mmol) a lutidinu (128  $\mu$ l, 1.11 mmol) v DCM (3 ml). Vše třepáno přes noc, druhý den promyto DCM.

### **Hydrolýza, aktivace, navázání pyrazolu (pryskyřice 76)**

**Hydrolýza esteru:** Pryskyřice (**75**, 250 mg) byla promyta DCM a THF, poté byl přidán roztok NaOH (0.2 ml 10 M NaOH) ve směsi rozpouštědel THF (2 ml) a MeOH (2 ml), vše třepáno 1 h. Pryskyřice promyta THF, 3% roztokem kyseliny octové v THF, DCM.

**Aktivace:** Pryskyřice byla promyta DCM, poté byl přidán roztok HOBt (153 mg, 1 mmol) a DIC (155  $\mu$ l, 1.00 mmol) ve směsi rozpouštědel DMF (1.5 ml) a DCM (1.5 ml). Třepáno 1h, poté byl aktivační roztok odstraněn a bez promývání pryskyřice byl přidán roztok pyrazolu.

**Roztok pyrazolu:** k pryskyřici byl přidán roztok chráněného pyrazolu A/B (300 mg) pro A: rozpuštěno ve směsi rozpouštědel DMF (1.5 ml); pro B: rozpuštěno v DMF (3 ml). Třepáno přes noc. Druhý den byla pryskyřice promyta DMF a DCM.

### Štěpení produktu z pryskyřice a izolace

Pryskyřice (**76**) byla promyta DCM, poté k ní byl přidán štěpící koktejl 50% TFA v DCM (3 ml), třepáno 90 min. Pryskyřice byla odfiltrována, kyselý roztok uchován a pryskyřice byla znovu promyta 3x 50% TFA v DCM. Kyselé roztoky byly spojeny a odpařeny proudem dusíku, odparek byl analyzován na LC-MS. Produkty byly purifikovány na semi-preparativním HPLC. Všechny produkty byly charakterizovány pomocí LC-MS, HRMS a  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR.

#### 6.4.1 Acyl na endocyklickém dusíku pyrazolu

##### 6.4.1.1 *N*-(3-(3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-4-(trifluoromethyl)benzamid (**77(1,1,1)**)

14.0 mg (32%), žlutá amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.05 - 9.71 (m, 1H), 8.83 (t,  $J=5.3$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.91 (br s, 2H), 7.85 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 7.67 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.17 (br s, 2H), 3.67 - 3.59 (m, 2H), 3.17 (t,  $J=6.6$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.2, 35.1, 112.4, 115.5, 122.7, 125.3, 125.4, 128.1, 146.0, 158.2, 165.2, 173.0 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_3$  (461.14)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  462.1496, naměřeno 462.1494.

##### 6.4.1.2 *N*-(3-(3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-

**oxopropyl)-4-(trifluoromethyl)benzamid 77(1,1,2)-F2** (z 500 mg pryskyřice)

19.5 mg (23%), oranžová amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.80 (t,  $J=5.3$  Hz, 1H), 8.67 (d,  $J=6.3$  Hz, 2H), 8.01 (d,  $J=8.2$  Hz, 4H), 7.97 (br s, 2H), 7.83 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 6.82 (br s, 1H), 6.44 (br s, 1H), 3.63 (dd,  $J=6.7, 12.1$  Hz, 2H), 3.15 (t,  $J=6.7$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.4, 34.9, 116.0, 122.6, 125.3 (q,  $J=32.0$  Hz, 1C),

128.08, 131.07 (q,  $J=3.8$  Hz, 1C), 138.1, 158.0, 165.2, 169.4 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{19}H_{17}F_3N_8O_2$  (446.14)  $[M+H]^+$  447.1499, naměřeno 447.1496.

#### 6.4.1.3 *N*-(3-(3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)benzamid (77(2,1,1)-F2)

4.3 mg (12%), oranžová amorfnní látka;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.76 (s, 1H), 8.57 (t,  $J=5.3$  Hz, 1H), 7.90 (br s, 2H), 7.83 (d,  $J=7.0$  Hz, 2H), 7.67 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.55 - 7.43 (m, 3H), 6.81 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 6.15 (br s, 2H), 3.63 - 3.58 (m, 2H), 3.15 (t,  $J=6.7$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.4, 34.9, 112.4, 115.4, 122.7, 127.2, 128.3, 131.1, 134.4, 146.0, 158.1, 166.3, 173.1 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{19}H_{19}N_7O_3$  (393.15)  $[M+H]^+$  394.1622, naměřeno 394.1620.

#### 6.4.1.4 *N*-(3-(3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)benzamid (77(2,1,2))

4.5 mg (13%), žlutá amorfnní látka;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.60 (d,  $J=5.9$  Hz, 2H), 8.57 (t,  $J=5.3$  Hz, 1H), 7.85 - 7.81 (m, 2H), 7.74 (d,  $J=5.5$  Hz, 2H), 7.55 - 7.42 (m, 3H), 6.60 (br s, 2H), 6.28 (br s, 2H), 3.62 (dd,  $J=5.5, 12.1$  Hz, 2H), 3.16 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.5, 34.8, 115.1, 115.5, 127.1, 128.2, 131.1, 134.4, 150.2, 158.2, 166.3, 173.3 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{18}H_{18}N_8O_2$  (378.16)  $[M+H]^+$  379.1626, naměřeno 379.1626.

#### 6.4.1.5 *N*-(3-(3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl)diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-4-methoxybenzamid (77(3,1,1))

3.4 mg (9%), oranžová amorfnní látka;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.75 (br s, 1H), 8.42 (t,  $J=5.3$  Hz, 1H), 7.89 (br s, 2H), 7.81 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 7.67 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 6.15 (br s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.58 (dd,  $J=5.5, 12.1$  Hz, 2H), 3.14 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.5, 34.9, 55.3, 112.4, 113.4, 115.4, 122.7, 126.6, 129.0, 146.0, 158.0, 161.5, 165.8, 173.1 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{20}H_{21}N_7O_4$  (423.17)  $[M+H]^+$  424.1728, naměřeno 424.1730.

**6.4.1.6 *N*-(3-(3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-4-methoxybenzamid (77(3,1,2))**

8.1 mg (17%), žlutá amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.60 (d,  $J$ =6.3 Hz, 2H), 8.42 (t,  $J$ =5.3 Hz, 1H), 7.81 (d,  $J$ =9.0 Hz, 2H), 7.72 (d,  $J$ =5.9 Hz, 2H), 6.98 (d,  $J$ =8.6 Hz, 2H), 6.57 (br s, 2H), 6.27 (br s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (d,  $J$ =5.5 Hz, 2H), 3.14 (t,  $J$ =6.7 Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 34.6, 34.8, 55.3, 113.4, 115.1, 115.3, 126.6, 129.0, 150.5, 158.0, 161.5, 165.8, 173.4 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_3$  (408.17)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  409.1731, naměřeno 409.1731.

**6.4.1.7 *N*-(3-(3,5-diamino-4-((4-hydroxyfenyl) diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-4-methylbenzensulfonamid (77(4,1,1))**

14.5 mg (35%), žlutá amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.78 (s, 1H), 7.85 (br s, 2H), 7.67 (dd,  $J$ =5.4, 8.1 Hz, 5H), 7.39 (d,  $J$ =8.5 Hz, 2H), 6.81 (d,  $J$ =8.8 Hz, 2H), 6.17 (br s, 2H), 3.06 (t,  $J$ =5.7 Hz, 2H), 3.00 (d,  $J$ =5.6 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 21.0, 34.7, 37.7, 112.4, 115.5, 122.7, 126.6, 129.7, 137.2, 142.7, 146.0, 158.1, 172.4 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$  (443.14)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  444.1449, naměřeno 444.1448.

**6.4.1.8 *N*-(3-(3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-4-methylbenzensulfonamid (77(4,1,2)-F2) (z 500 mg pryskyřice)**

12.1 mg (26%), červená amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.60 (d,  $J$ =5.5 Hz, 2H), 7.74 - 7.65 (m, 7H), 7.39 (d,  $J$ =7.8 Hz, 4H), 3.13 - 3.06 (m, 2H), 3.03 - 2.97 (m, 2H), 2.36 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 21.0, 34.8, 37.6, 115.2, 126.6, 129.7, 129.7, 137.1, 137.2, 142.7, 142.8, 150.6, 157.9, 168.6 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_3\text{S}$  (428.14)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  429.1452, naměřeno 429.1452.

**6.4.1.9 *N*-(3-(3,5-diamino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl)-3-oxopropyl)-2-(3-(4-hydroxybenzyl)-2,5-dioxopiperazin-1-yl)acetamid (82)**

9.2 mg (18%), červená amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.59 (d,  $J$ =6.3 Hz, 2H), 8.24 - 8.19 (m, 1H), 7.71 (d,  $J$ =5.9 Hz, 2H), 6.90 (d,  $J$ =8.6 Hz, 2H), 6.65 (dd,  $J$ =2.0, 8.6 Hz, 2H), 6.62 - 6.60 (m, 2H), 6.17 (br s, 2H), 3.98 - 4.12 (m, 3H), 3.54 (dd,  $J$ =6.3, 9.4 Hz, 2H), 3.27 - 3.18 (m, 2H), 3.06 - 2.92 (m, 2H), 2.77 (dd,  $J$ =4.7, 13.3 Hz, 2H) ppm; Směs izomerů:  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 21.9, 22.5, 23.3, 32.4, 34.0, 34.5, 47.9, 50.1,

55.8, 58.4, 114.6, 115.0, 115.1, 116.5, 125.6, 130.9, 150.4, 150.7, 151.9, 156.3, 157.8, 158.8, 164.9, 166.1, 166.9, 167.0, 167.2, 173.2 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{24}H_{26}N_{10}O_5$   $[M+H]^+$  (534.21) 535.2160, naměřeno 535.2157.

## 6.4.2 Acyl na exocyklickém dusíku pyrazolu (na aminoskupině)

### 6.4.2.1 *N*-(3-((5-amino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-3-oxopropyl)-4-(trifluoromethyl)benzamid (77(1,1,2)-F1) (z 500 mg pryskyřice)

8.1 mg (10%), oranžová amorfnní látka;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.92 - 8.85 (m, 1H), 8.69 (d,  $J=6.5$  Hz, 2H), 8.06 - 7.99 (m, 5H), 7.81 (d,  $J=8.5$  Hz, 3H), 3.59 (q,  $J=6.3$  Hz, 4H), 2.82 (br s, 2H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 35.1, 35.8, 116.1, 122.6, 125.3 (q,  $J=3.0$  Hz, 1C), 127.4, 128.1, 130.9, 131.2, 134.2, 138.1, 143.6 (q,  $J=2.3$  Hz, 1C), 157.8, 165.1 ppm; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{19}H_{17}F_3N_8O_2$  (446.14)  $[M+H]^+$  447.1499, naměřeno 447.1496.

### 6.4.2.2 *N*-(3-((5-amino-4-((4-hydroxyfenyl) diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-3-oxopropyl)benzamid (77(2,1,1)-F1)

2.1 mg (6%), žlutá amorfnní látka; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{19}H_{19}N_7O_3$  (393.15)  $[M+H]^+$  394.1622, naměřeno 394.1621.

### 6.4.2.3 (*E*)-*N*-(5-diamino-4-(pyridin-4-yl diazenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-3-(4-methylfenylsulfonamido)propanamid (77(4,1,2)-F1) (z 500 mg pryskyřice)

4.9 mg (6%), červená amorfnní látka;  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.65 (d,  $J=5.9$  Hz, 2H), 7.82 (d,  $J=5.5$  Hz, 2H), 7.73 - 7.61 (m, 4H), 7.39 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 3.00 (q,  $J=6.7$  Hz, 2H), 2.69 - 2.59 (m, 2H), 2.39 - 2.35 (m, 3H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 21.0, 115.6, 125.6, 126.6, 129.3, 129.6, 137.2, 142.7; HRMS (HESI,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{18}H_{20}N_8O_3S$  (428.14)  $[M+H]^+$  429.1452, naměřeno 429.1451.

## 6.5 Bicykly

### Odchránění Fmoc-protektivní skupiny (Pryskyřice 84(1))

Rinkova pryskyřice (100-200 mesh, 0.66 mmol/g, 1 g) byla promyta 3x DCM a 3x DMF a poté třepána s 50% piperidinem v DMF po dobu 20 min za laboratorní teploty. Pryskyřice byla promyta 3x DMF a 3x DCM.

### **Acylace Rinkovy pryskyřice Fmoc-amino kyselinou (Pryskyřice 84(2))**

K pryskyřici **84(1)** (1 g) nabobtnané v DCM byl přidán 0.3 M roztok Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (3 mmol, 1.379 g), HOBt (3 mmol, 460  $\mu$ l) a DIC (3 mmol, 464  $\mu$ l) v 10 ml DCM/DMF (1:1). Pryskyřice byla třepána za laboratorní teploty přes noc, poté promyta 3x DMF a 3x DCM. Následovalo odchránění Fmoc protektivní skupiny.

### **Reakce Wangovy pryskyřice s CDI a s 1,3-diaminopropanem (Pryskyřice 84(3))**

K Wangově pryskyřici (100-200 mesh, 1.1 mmol/g, 1g) nabobtnané v DCM byl přidán roztok CDI (5 mmol, 810 mg) a pyridinu (5 mmol, 400  $\mu$ l) v DCM (10 ml). Pryskyřice byla třepána za laboratorní teploty po dobu 2 h. Poté byla pryskyřice promyta 3x DCM a byl přidán roztok 1,3-diaminopropanu (5 mmol, 421  $\mu$ l) v DCM (10 ml). Pryskyřice byla třepána přes noc za laboratorní teploty, promytá 5x DCM. Loading pryskyřice byl kvantifikován po reakci s Fmoc-OSu.

### **Reakce Wangovy pryskyřice s trichloroacetonitrilem a s 2-(Fmoc-amino)ethanolem, odchránění Fmoc skupiny (Pryskyřice 84(4))**

K Wangově pryskyřici (100-200 mesh, 1.1 mmol/g, 1g) nabobtnané v bezvodém DCM byl přidán roztok trichloroacetonitrilu (15 mmol; 1.5 ml) v bezvodém DCM (10 ml). Pryskyřice byla dána do mrazáku po dobu 30 min. Poté k ní byl přidán ještě roztok DBU (0.67 mmol; 100  $\mu$ l) v bezvodém DCM (2 ml) a vše bylo třepáno po dobu 1 h. K pryskyřici promyté 3x bezvodým DCM a 3x bezvodým THF byl přidán roztok 2-(Fmoc-amino)ethanolu (3 mmol; 849 mg) v bezvodém THF (10 ml) a za probublávání suspendované pryskyřice následovalo přikapání  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.3 mmol; 63  $\mu$ l). Pryskyřice byla třepána po dobu 30 min za laboratorní teploty. Poté byla promyta 3x THF, 3x MeOH a 3x DCM. Vzorek byl sušen, 10 mg bylo štěpeno 50% TFA v DCM, 30 min a produkt byl kvantifikován. Po kvantifikaci byla Fmoc-protektivní skupina odštěpena.

### **Acylace Pryskyřice 84(3) bromoctovou kyselinou (Pryskyřice 84(5))**

**Pryskyřice 84(3)** byla promyta 3x DMF a 3x DCM, poté byl ve stříkačce připraven roztok bromoctové kyseliny (5 mmol, 700 mg) a DIC (2.5 mmol, 386  $\mu$ l) v DCM (10 ml). Tento roztok byl 5 min třepán, vyloučená diisopropylmočovina byla odfiltrována a byl přidán DIEA (2.5 mmol, 436  $\mu$ l). Tento roztok byl přidán k promyté **pryskyřici 84(3)** a třepán za laboratorní teploty po dobu 1 h, poté byla pryskyřice promyta 3x DCM.

### **Acylace bromoctovou kyselinou a reakce s aminoacetaldehyd dimethyl acetalem (Pryskyřice 84(5); *Postup I*)**

**Pryskyřice 84(1)-84(3)** byly acylovány bromoctovou kyselinou za vzniku **prykyřice 84(5)**.

Po acylaci byla prykyřice (1 g) nabobtnána v DCM a promyta 3x DMF. K promyté prykyřici byl přidán roztok aminoacetaldehyd dimethyl acetalu (10 mmol, 1.09 ml) a DIEA (10 mmol, 1.74 ml) v DMF (10 ml) a vše bylo třepáno za laboratorní teploty po dobu 2 h. Poté byla prykyřice promyta 3x DMF a 3x DCM. Kvantifikace: ke vzorku prykyřice byl přidán roztok Fmoc-OSu v DCM, 40 min třepat, prykyřice promyta DCM, MeOH, sušena proudem dusíku a cca. 10 mg bylo štěpeno 50% TFA v DCM, 30 min, LC-MS, integrace při 300 nm.

### **Reakce s 4-Nos-Cl, Mitsunobu alkylace s glykolaldehyd dimethyl acetalem a odchránění Nos skupiny (Pryskyřice 85; *Postup II*)**

K **prykyřici 84(3)** nebo **84(4)** (1 g) promyté v DCM byl přidán roztok 4-Nos-Cl (3 mmol, 665 mg) a lutidinu (3.3 mmol, 383  $\mu$ l) v DCM (10 ml) a vše bylo třepáno za laboratorní teploty přes noc. Poté byla prykyřice promyta 3x DCM.

Prykyřice (1g) byla přemístěna do 20 ml stříkačky a promyta 3x bezvodým THF a byl k ní přidán 0.1 M roztok glycolaldehyd dimethyl acetalu (2 mmol, 202  $\mu$ l) a PPh<sub>3</sub> (2 mmol, 525 mg) v bezvodém THF (10 ml). Do 10 ml stříkačky byl připraven 0.1 M roztok DIAD (2 mmol, 404  $\mu$ l) v bezvodém THF (10 ml). Obě stříkačky byly spojeny spojkou a dány do mrazáku po dobu 30 min, poté byl roztok DIAD vsříknut do stříkačky s prykyřicí. Vše bylo třepáno za laboratorní teploty po dobu 10 min, poté byla suspence s prykyřicí přemístěna do skleněné vialky při zahřívání na 50 °C třepána po dobu 16 h. Pak byla prykyřice promyta 3x THF a 3x DCM. V případě nedoreagování byla reakce opakována až do dosažení kvantitativní alkylace. Odštěpení Nos skupiny: prykyřice (1 g) byla promyta DMF, Nos byl odštěpen 0.6 M roztokem 2-merkptoethanolem (6 mmol, 420  $\mu$ l) a 0.2 M DBU (2 mmol, 300  $\mu$ l) v DMF (10 ml) po dobu 5 min, poté promyto DMF, DCM.

### **Acylace Fmoc-amino kyselinami (Pryskyřice 86; *Postup I*)**

**Prykyřice 85** (1 g) byla nabobtnána DCM a promyta 3x THF, poté k ní byl přidán roztok Fmoc-amino kyseliny (10 mmol) a DIC (5 mmol, 775  $\mu$ l) v THF (10 ml). Prykyřice byla třepána za laboratorní teploty přes noc, následně byla promyta 3x THF a 3x DCM.

### **Acylace Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (Pryskyřice 86; *Postup II*)**

**Pryskyřice 85** (1 g) byla nabobtnána DCM a poté k ní byl přidán 0.3 M roztok Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (3 mmol, 1.15 g), HOBt (3 mmol, 460  $\mu$ l) a DIC (3 mmol, 464  $\mu$ l) v DCM/DMF (1:1; 10 ml). Pryskyřice byla třepána za laboratorní teploty přes noc a poté byla promyta 3x DMF a 3x DCM.

### **Štěpení Fmoc-protektivní skupiny a reakce s aromatickým sulfonyl chloridem (Pryskyřice 87)**

**Pryskyřice 86** (250 mg) byla promyta 3x DCM a 3x DMF, poté byla třepána s 50% roztokem piperidinu v DMF po dobu 20 min. Následně byla pryskyřice promyta 3x DMF a 3x DCM a byl k ní přidán roztok aromatického sulfonylchloridu (0.75 mmol) a lutidinu (0.83 mmol, 96  $\mu$ l) v DCM (2.5 ml) a vše bylo třepáno za laboratorní teploty přes noc. Pryskyřice byla promyta 3x DCM.

### **Štěpení, cyklizace a izolace (2, 89)**

**Pryskyřice 87** (250 mg) byla třepána s 50% TFA v DCM (*Postup I*) nebo s 95% TFA ve vodě (*Postup II*) po dobu 90 min. TFA roztok byl uchován, pryskyřice byla promyta ještě 3x 10% TFA v DCM, kyselé roztoky byly spojeny a odpařeny proudem dusíku, odparek byl analyzován pomocí LC/MS. Produkty byly purifikovány na semi-preparativním HPLC. Všechny produkty byly charakterizovány pomocí LC/MS, HRMS a  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR.

#### **6.5.1 (1S,5S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl 3-(2-amino-2-oxoethyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane-8-carboxylate 2(1,1,1)**

13.7 mg (41%), amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.89 (d,  $J=7.6$  Hz, 2H), 7.70 - 7.76 (m, 2H), 7.45 - 7.48 (m, 1H), 7.42 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J=7.6$  Hz, 3H), 7.08 (br s, 1H), 4.75 (m, 2H), 4.20 - 4.33 (m, 2H), 4.05 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.99 (dd,  $J=12.0$ , 7.9 Hz, 1H), 3.82 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.59 (dd,  $J=8.7$ , 16.0 Hz, 1H), 3.36 - 3.44 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 170.2, 169.9, 155.7, 143.9, 140.7, 127.7, 127.1, 125.3, 120.1, 97.7, 65.8, 60.1, 55.1, 53.7, 51.0, 46.6 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$  (407.15)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  408.1554, naměřeno 408.1547.

#### **6.5.2 2-((1S,5S)-8-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,2)**

3.5 mg (12%); amorfnní látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.90 (d,  $J=8.9$  Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.13 (d,  $J=8.9$  Hz, 2H), 7.05 (br s, 1H), 6.00 (br s, 1H), 4.62 (d,  $J=5.3$  Hz,



1H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.75 - 3.69 (m, 2H), 3.49 (dd,  $J=2.8, 11.9$  Hz, 1H), 3.23 (d,  $J=11.7$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J=5.6, 7.9$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 169.0, 166.2, 163.6, 130.3, 128.7, 114.8, 85.4, 68.6, 58.9, 55.9, 55.0, 46.2 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  (355.08)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  356.0911, naměřeno 356.0904.

### 6.5.3 2-((1S,5S)-2-oxo-8-tosyl-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,3)

13.1 mg (47%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.86 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.43 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.40 (br s, 1H), 7.06 (br s, 1H), 6.02 - 6.00 (m, 1H), 4.65 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 3.87 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.75 - 3.69 (m, 2H), 3.50 (dd,  $J=2.8, 12.2$  Hz, 1H), 3.23 (d,  $J=11.7$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J=5.6, 7.9$  Hz, 1H), 2.41 (s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 167.0, 166.1, 144.9, 134.5, 130.0, 127.9, 85.3, 68.6, 58.9, 54.9, 46.2, 21.1 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  (339.09)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  340.0962, naměřeno 340.0961.

### 6.5.4 2-((1S,5S)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,4)

11.8 mg (36%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.16 (d,  $J=9.1$  Hz, 1H), 7.66 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H), 7.39 (br s, 1H), 7.35 (dd,  $J=2.4, 9.0$  Hz, 1H), 7.06 (br s, 1H), 6.07 - 6.05 (m, 1H), 4.70 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 3.95 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (d,  $J=16.4$ , 1H), 3.68 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.50 (dd,  $J=2.8, 12.2$  Hz, 1H), 3.35 (dd,  $J=5.4, 8.1$  Hz, 1H), 3.29 (d,  $J=12.3$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.9, 165.7, 164.1, 149.4, 132.9, 120.6, 117.6, 110.2, 85.2, 69.3, 59.0, 56.9, 54.6, 46.1 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$  (400.07)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  401.0762, naměřeno 401.0791.

### 6.5.5 2-((1S,5S)-8-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,5)

15.2 mg (50%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.31 (dd,  $J=0.9, 7.9$  Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J=0.9, 7.9$  Hz, 1H), 7.99 (td,  $J=1.2, 7.9$  Hz, 1H), 7.90 (td,  $J=0.9, 7.9$  Hz, 1H), 7.41 (br s, 1H), 7.08 (br s, 1H), 6.12 - 6.11 (m, 1H), 4.78 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 4.01 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.92 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.71 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.54 (dd,  $J=2.6, 12.3$  Hz, 1H), 3.42 (dd,  $J=5.3, 8.2$  Hz, 1H), 3.33 (d,  $J=12.0$  Hz, 1H, překryv s vodou) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.9, 165.6, 147.6, 136.1, 132.9, 131.0, 129.9, 124.7, 85.2, 69.6, 59.2, 54.6,

46.2 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{13}H_{14}N_4O_7S$  (370.06)  $[M+H]^+$  371.0656, naměřeno 371.0677.

#### **6.5.6 2-((1S,5S)-8-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,6)**

11.1 mg (37%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.41 (dd,  $J=2.0, 7.0$  Hz, 2H), 8.28 (dd,  $J=2.0, 7.0$  Hz, 2H), 7.41 (br s, 1H), 7.07 (br s, 1H), 6.15 - 6.12 (m, 1H), 4.82 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 3.88 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.80 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.73 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J=2.8, 12.2$  Hz, 1H), 3.27 (d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 2.97 (dd,  $J=5.4, 8.4$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.9, 165.9, 150.7, 142.8, 129.6, 124.7, 85.3, 68.8, 58.7, 54.8, 46.2 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{13}H_{14}N_4O_7S$  (370.06)  $[M+H]^+$  371.0656, naměřeno 371.0649.

#### **6.5.7 2-((1S,5S)-8-((2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,7)**

14.4 mg (41%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.67 (d,  $J=1.2$  Hz, 1H), 8.55 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 8.30 (dd,  $J=1.2, 8.2$  Hz, 1H), 7.42 (br s, 1H), 7.09 (br s, 1H), 6.15 - 6.13 (m, 1H), 4.83 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 4.04 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.92 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.72 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J=2.8, 12.5$  Hz, 1H), 3.50 (dd,  $J=5.3, 8.2$  Hz, 1H), 3.37 - 3.32 (m, 1H, překryv s vodou) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.9, 165.5, 147.7, 135.0 (q,  $J=34.2$  Hz, 1 C), 133.8, 132.5, 129.9 (q,  $J=3.4$  Hz, 1 C), 122.5 (q,  $J=3.3$  Hz, 1 C), 122.2 (q,  $J=273.8$  Hz, 1 C), 85.2, 69.8, 59.1, 54.5, 46.2 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{14}H_{13}F_3N_4O_7S$  (438.05)  $[M+H]^+$  439.0530, naměřeno 439.0538.

#### **6.5.8 2-((1S,5S)-8-((2,4-dinitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,1,8)**

21.6 mg (55%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.00 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 8.61 (dd,  $J=2.0, 8.5$  Hz, 1H), 8.59 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.43 (br s, 1H), 7.09 (br s, 1H), 6.16 - 6.13 (m, 1H), 4.83 (d,  $J=5.0$  Hz, 1H), 4.04 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.91 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.74 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J=2.6, 12.3$  Hz, 1H), 3.52 (dd,  $J=5.4, 8.4$  Hz, 1H, překryv s vodou) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.9, 165.4, 150.9, 147.6, 134.8, 132.8, 127.4, 120.5, 85.3, 69.8, 59.1, 54.5, 46.2 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{13}H_{13}N_5O_9S$  (415.04)  $[M+H]^+$  416.0507, naměřeno 416.0523.

**6.5.9 2-((1S,5S)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-7-methyl-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(1,2,4)**

23.9 mg (69%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.15 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.67 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 7.39 - 7.35 (m, 2H), 7.07 (br s, 1H), 5.97 (m, 1H), 4.44 (q,  $J=6.4$  Hz, 1H), 4.33 (m, 1H), 3.98 (d,  $J=16.7$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.60 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.40 (dd,  $J=2.9, 12.3$  Hz, 1H), 3.27 (d,  $J=12.3$  Hz, 1H), 1.09 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 169.0, 166.2, 163.5, 148.8, 132.2, 123.5, 117.6, 110.7, 85.4, 78.1, 63.2, 56.9, 54.4, 46.2, 19.7 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$  (414,08)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  415.0918, naměřeno 415.0926.

**6.5.10 (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((1S,5S)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamido)propanamide 2(2,1,4)**

8.7 mg (27%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.18 (br s, 1H), 8.16 (d,  $J=9.1$  Hz, 1H), 8.14 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 7.41 (br s, 1H), 7.37 (dd,  $J=2.5, 9.0$  Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.98 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 6.63 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 6.04 - 6.02 (m, 1H), 4.70 (d,  $J=5.0$  Hz, 1H), 4.32 (td,  $J=8.7, 5.3$  Hz, 1H), 4.03 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.93 (s, 1H), 3.91 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 3.65 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.41 (dd,  $J=2.6, 12.3$  Hz, 1H), 3.10 (d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J=5.0, 13.8$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J=13.8, 5.0$  Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J=9.1, 13.8$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 172.8, 166.7, 165.7, 164.2, 155.8, 149.4, 132.9, 130.1, 127.9, 120.6, 117.6, 114.9, 110.2, 85.2, 69.3, 59.0, 57.0, 54.4, 54.1, 46.4, 37.0 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$  (563,13)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  564.1395, naměřeno 564.1422.

**6.5.11 2-(2-((1S,5S)-8-((2,4-dinitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamido)-3-(4-hydroxyphenyl)propanamide 2(2,1,8)**

5.5 mg (17%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.00 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 8.61 (dd,  $J=2.4, 8.8$  Hz, 1H), 8.56 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 8.16 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.42 (br s, 1H), 7.05 (br s, 1H), 6.98 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 6.11 - 6.09 (m, 1H), 4.81 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 4.32 (td,  $J=5.0, 8.7$  Hz, 1H), 4.02 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.98 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 3.68 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.51 (dd,  $J=5.4, 8.4$  Hz, 1H), 3.45 (dd,  $J=2.6, 12.3$  Hz, 1H), 3.15 (d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J=4.8, 13.7$  Hz, 1H), 2.62 (dd,  $J=9.1, 13.8$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR

(151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 172.1, 166.7, 165.4, 155.8, 150.9, 147.6, 134.7, 132.8, 130.1, 127.9, 127.4, 120.5, 114.9, 85.2, 69.8, 59.1, 54.3, 54.2, 46.3, 37.0 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S (578,11) [M+H]<sup>+</sup> 579.1140, naměřeno 579.1179.

**6.5.12 (1S,5S)-3-(3-aminopropyl)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-one 2(3,1,4)**

6.6 mg (23%); amorfni látka; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.16 (d,  $J$ =9.1 Hz, 1H), 7.68 (d,  $J$ =2.4 Hz, 1H), 7.39 (dd,  $J$ =2.5, 9.0 Hz, 1H), 6.11 - 6.09 (m, 1H), 4.69 (d,  $J$ =5.0 Hz, 1H), 3.96 (d,  $J$ =8.2 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (br s, 2H, překryv s vodou), 3.46 (dd,  $J$ =2.5, 12.5 Hz, 1H), 3.40 (dd,  $J$ =5.3, 8. Hz, 1H), 3.34 (dt,  $J$ =7.0, 13.9 Hz, 1H), 3.30 (d,  $J$ =12.3 Hz, 1H), 3.22 (dt,  $J$ =6.8, 13.9 Hz, 1H), 2.65 (t,  $J$ =7.3 Hz, 2H), 1.68 (dt,  $J$ =7.1, 14.5 Hz, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 165.6, 164.2, 149.4, 132.9, 120.5, 117.6, 110.3, 85.1, 69.7, 59.3, 57.0, 53.5, 41.6, 36.9, 22.5 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S (400,11) [M+H]<sup>+</sup> 401.1125, naměřeno 401.1149.

**6.5.13 (1S,5S)-3-(2-hydroxyethyl)-8-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-one 2(4,1,4)**

4.8 mg (14%); amorfni látka; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.14 (d,  $J$ =9.1 Hz, 1H), 7.66 (d,  $J$ =2.6 Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$ =2.6, 9.1 Hz, 1H), 6.05 - 6.04 (m, 1H), 4.77 - 4.73 (m, 1H), 4.65 (d,  $J$ =5.3 Hz, 1H), 3.93 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.54 (dd,  $J$ =2.6, 12.6 Hz, 1H), 3.47 - 3.43 (m, 1H), 3.40 (d,  $J$ =12.3 Hz, 1H), 3.31 - 3.27 (m, 2H), 3.22 - 3.17 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 165.3, 164.2, 149.4, 132.9, 120.5, 117.6, 110.2, 85.2, 69.5, 59.3, 58.2, 57.0, 54.8, 47.0 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S (387,07) [M+H]<sup>+</sup> 388.0809, naměřeno 388.0819.

**6.5.14 N-(3-aminopropyl)-2-((1S,5S)-8-((2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-2-oxo-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)acetamide 2(5,1,7)**

9.3 mg (12%); amorfni látka; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.68 (d,  $J$ =1.2 Hz, 1H), 8.54 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 8.31 (dd,  $J$ =1.2, 8.5 Hz, 1H), 8.24 (t,  $J$ =5.6 Hz, 1H), 6.14 (m, 1H), 4.83 (d,  $J$ =5.0 Hz, 1H), 4.46 (br s, 2H, překryv s vodou), 4.03 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 3.95 (d,  $J$ =16.1 Hz, 1H), 3.74 (d,  $J$ =16.4 Hz, 1H), 3.56 (dd,  $J$ =2.8, 12.2 Hz, 1H), 3.50 (dd,  $J$ =5.3, 8.2

Hz, 1H), 3.34 (d,  $J=12.3$  Hz, 1H), 3.11 (q,  $J=6.5$  Hz, 2H), 2.69 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H), 1.62 (quin,  $J=7.0$  Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.2, 165.5, 147.7, 135.1 (q,  $J=35.3$ , 1C), 133.7, 132.5, 129.9 (q,  $J=3.4$ , 1C), 122.5 (q,  $J=3.4$ , 1C), 122.2 (q,  $J=273.8$ , 1C), 85.2, 69.8, 59.1, 54.6, 5, 37.0, 35.8, 28.5 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$  (495,10)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  496.1108, naměřeno 496.1142.

**6.5.15 (S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl 4-(2-amino-2-oxoethyl)-2-(hydroxymethyl)-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-1(2H)-carboxylate 89(1,1,1)**

15.3 mg (46%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.93 - 7.88 (m, 2H), 7.67 (d,  $J=6.5$  Hz, 2H), 7.46 - 7.39 (m, 2H), 7.38 - 7.31 (m, 2H), 7.17 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H), 6.25 - 6.15 (m, 1H), 5.78 - 5.73 (m, 1H), 5.19 - 5.13 (m, 1H), 4.57 (br s, 1H), 4.53 (br s, 1H), 4.45 (d,  $J=6.8$  Hz, 1H), 4.37 - 4.33 (m, 1H), 4.07 (dd,  $J=16.4$ , 25.5 Hz, 1H), 3.97 (dd,  $J=16.4$ , 28.5 Hz, 1H), 3.67 - 3.62 (m, 1H), 3.58 - 3.53 (m, 1H), 3.48 - 3.42 (m, 1H), 3.20 - 3.14 (m, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 169.0, 163.5, 152.2, 143.6, 140.8, 127.8, 127.2, 125.1, 120.2, 113.7, 107.3, 67.6, 61.4, 60.7, 59.7, 46.5 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$  (407,15)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  408.1554, naměřeno 408.1564.

**6.5.16 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,2)**

9.1 mg (30%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.71 (d,  $J=8.9$  Hz, 2H), 7.26 (br s, 1H), 7.11 (br s, 1H), 7.09 (d,  $J=8.9$  Hz, 2H), 6.04 - 6.01 (m, 2H), 5.28 (br s, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.92 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.71 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.64 - 3.58 (m, 1H), 3.50 - 3.46 (m, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.6, 163.0, 162.5, 129.4, 128.9, 119.6, 114.6, 106.4, 61.3, 60.3, 55.8, 47.5 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  (355,08)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  356.0911, naměřeno 356.0913.

**6.5.17 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-2-oxo-4-tosyl-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,3)**

10.8 mg (39%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.66 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 7.23 (br s, 1H), 7.11 (br s, 1H), 6.05 (dd,  $J=1.2$ , 5.6 Hz, 1H), 6.03 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 4.31 (ddd,  $J=1.2$ , 4.3, 5.9 Hz, 1H), 3.91 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.72 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.62 (dd,  $J=6.5$ , 11.4 Hz, 1H), 3.49 (dd,  $J=4.4$ , 11.4 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.6, 162.4, 144.0, 134.9, 129.9, 126.6, 119.5, 106.4, 61.3,

60.4, 47.5, 21.1 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{14}H_{17}N_3O_5S$  (339,09)  $[M+H]^+$  340.0962, naměřeno 340.0958.

**6.5.18 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,4)**

7.7 mg (24%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.95 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.31 (dd,  $J=2.6, 8.8$  Hz, 1H), 7.15 (br s, 1H), 6.12 (dd,  $J=1.5, 5.6$  Hz, 1H), 6.09 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 5.32 - 5.28 (m, 1H), 4.40 (ddd,  $J=1.2, 4.4, 6.2$  Hz, 1H), 4.03 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.99 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.67 - 3.61 (m, 1H), 3.53 - 3.48 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.7, 163.2, 162.5, 149.1, 131.5, 122.0, 119.1, 117.7, 110.1, 105.9, 61.1, 60.5, 56.8, 47.9 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{14}H_{16}N_4O_8S$  (400,07)  $[M+H]^+$  401.0762, naměřeno 401.0779.

**6.5.19 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,5)**

3.2 mg (11%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.06 (dd,  $J=0.6, 7.9$  Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J=0.6, 7.9$  Hz, 1H), 7.91 (td,  $J=0.9, 7.6$  Hz, 1H), 7.84 (td,  $J=0.9, 7.6$  Hz, 1H), 7.42 (br s, 1H), 7.15 (br s, 1H), 6.17 (dd,  $J=1.5, 5.6$  Hz, 1H), 6.12 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 5.31 (t,  $J=6.0$  Hz, 1H), 4.42 (ddd,  $J=1.2, 4.3, 5.9$  Hz, 1H), 4.07 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 4.00 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.64 (dt,  $J=6.1, 11.9$  Hz, 1H), 3.54 - 3.49 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.7, 162.4, 147.45, 135.0, 133.1, 130.9, 129.4, 124.8, 119.4, 105.9, 60.9, 60.7, 47.9 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{13}H_{14}N_4O_7S$  (370,06)  $[M+H]^+$  371.0656, naměřeno 371.0690.

**6.5.20 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-4-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,6)**

3.0 mg (10%); amorfni látka;  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 8.37 (dd,  $J=2.0, 7.0$  Hz, 2H), 8.03 (dd,  $J=1.8, 7.0$  Hz, 2H), 7.26 (br s, 1H), 7.04 (br s, 1H), 6.11 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 6.08 (dd,  $J=1.2, 5.6$  Hz, 1H), 5.29 (t,  $J=6.2$  Hz, 1H), 4.36 (ddd,  $J=1.2, 4.4, 6.2$  Hz, 1H), 3.85 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.79 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.61 - 3.56 (m, 1H), 3.49 - 3.44 (m, 1H) ppm;  $^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 168.4, 162.0, 150.1, 142.8, 128.2, 124.8, 121.1, 105.5, 60.6, 47.7 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $C_{13}H_{14}N_4O_7S$  (370,06)  $[M+H]^+$  371.0656, naměřeno 371.0661.

**6.5.21 (S)-2-(3-(hydroxymethyl)-4-(4-methoxybenzoyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamide 89(1,1,10)**

13.0 mg (50%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.52 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 7.46 (br s, 1H), 7.21 (br s, 1H), 7.03 (d,  $J=8.8$  Hz, 2H), 6.03 (br s, 1H), 5.74 (br s, 1H), 5.22 (br s, 1H), 4.90 (br s, 1H), 4.16 - 4.09 (m, 1H), 4.07 - 4.01 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.73 (br s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 169.3, 167.4, 164.2, 161.1, 130.5, 126.4, 113.7, 113.5, 110.6, 61.1, 58.4, 55.4, 48.1 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$  (319,12)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 320.1241, naměřeno 320,1249.

**6.5.22 (S)-2-(2-((S)-3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-2-oxo-3,4-dihydropyrazin-1(2H)-yl)acetamido)-3-(4-hydroxyphenyl)propanamide 89(2,1,4)**

5.4 mg (17%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.18 (br s, 1H), 8.15 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J=9.1$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H), 7.38 (br s, 1H), 7.29 (dd,  $J=2.5, 9.0$  Hz, 1H), 7.06 (br s, 1H), 6.97 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 6.62 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H), 6.10 (dd,  $J=1.5, 5.6$  Hz, 1H), 5.95 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 5.25 (t,  $J=5.7$  Hz, 1H), 4.38 (ddd,  $J=1.3, 4.6, 6.5$  Hz, 1H), 4.33 (td,  $J=5.6, 8.4$  Hz, 1H), 4.09 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 4.01 (d,  $J=16.4$  Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.61 - 3.55 (m, 1H), 3.50 - 3.45 (m, 1H), 2.86 (dd,  $J=5.3, 13.8$  Hz, 1H), 2.63 (dd,  $J=8.7, 13.7$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 172.7, 166.4, 163.2, 162.4, 155.8, 149.1, 131.4, 130.1, 127.7, 122.1, 119.0, 117.7, 114.9, 110.2, 105.9, 60.6, 60.6, 56.8, 54.2, 47.8, 36.9 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$  (563,13)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  564.1395, naměřeno 564.1428.

**6.5.23 (S)-1-(2-hydroxyethyl)-3-(hydroxymethyl)-4-((4-methoxy-2-nitrophenyl)sulfonyl)-3,4-dihydropyrazin-2(1H)-one 89(4,1,4)**

2.7 mg (8%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.86 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J=2.6, 9.1$  Hz, 1H), 6.17 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 6.05 (dd,  $J=1.8, 5.6$  Hz, 1H), 5.24 - 5.20 (m, 1H), 4.73 (br s, 1H), 4.38 (ddd,  $J=1.5, 4.7, 6.8$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.56 - 3.50 (m, 2H), 3.50 - 3.44 (m, 2H), 3.31 - 3.23 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 163.4, 162.1, 149.1, 131.5, 121.4, 119.9, 117.4, 109.9, 105.7, 60.7, 60.1, 58.5, 56.8, 47.6 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$  (387,07)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  388.0809, naměřeno 388.0803.

#### 6.5.24 2-methoxy-4-tosylmorpholine 94

8.7 mg (32%); amorfni látka;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.61 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J=8.1$  Hz, 2H), 4.58 (t,  $J=3.1$  Hz, 1H), 3.81 (ddd,  $J=2.9, 8.3, 11.4$  Hz, 1H), 3.54 (ddd,  $J=3.2, 5.0, 11.7$  Hz, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.02 - 2.97 (m, 1H), 2.89 (dd,  $J=3.4, 11.6$  Hz, 1H), 2.75 (dd,  $J=2.4, 11.7$  Hz, 1H), 2.69 (ddd,  $J=2.9, 8.4, 11.6$  Hz, 1H), 2.41 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 144.0, 131.6, 130.0, 127.7, 95.9, 59.4, 54.8, 48.5, 45.0, 21.1 ppm; HRMS (FAB,  $m/z$ ) vypočteno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$  (271,09)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  272.0951, naměřeno 272.0981.



## 7 Literatura

1. Cicenás, J.; Valius, M. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2011**, *137* (10), 1409-1418.
2. Diaz-Padilla, I.; Siu, L. L.; Duran, I. *Invest. New Drugs* **2009**, *27* (6), 586-594.
3. Krystof, V.; Cankar, P.; Frysova, I.; Slouka, J.; Kontopidis, G.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Srovnal, J.; de, A.; Orsag, X. M.; Paprskarova, M.; Rolcik, J.; Latr, A.; Fischer, P. M.; Strnad, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (22), 6500-6509.
4. O'Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17* (5), 435-446.
5. Quirante, J.; Vila, X.; Bonjoch, J.; Kozikowski, A. P.; Johnson, K. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (6), 1383-1391.
6. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17* (3), 215-234.
7. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (7), 1022-1037.
8. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752-6756.
9. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis. 2nd Ed*; John Wiley and Sons, Inc.: 1991.
10. Fischer, E.; Bergmann, M. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1918**, *51*, 1760-1804.
11. Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1932**, *65B*, 1192-1201.
12. Barany, G.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (22), 7363-7365.
13. Barany, G.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (17), 4936-4942.
14. Sakakibara, S.; Fujii, T. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1969**, *42* (5), 1466.
15. Grehn, L.; Ragnarsson, U. *Angew. Chem.* **1984**, *96* (4), 291-292.
16. Chivikas, C. J.; Hodges, J. C. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (16), 3591-3594.
17. Yoshino, T.; Nagata, Y.; Itoh, E.; Hashimoto, M.; Katoh, T.; Terashima, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (20), 3475-3478.
18. Buckle, D. R.; Rockell, C. J. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1982**, (2), 627-630.
19. Kamijo, T.; Yamamoto, R.; Harada, H.; Iizuka, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31* (4), 1213-1221.
20. Subramanyam, C. *Synth. Commun.* **1995**, *25* (5), 761-774.
21. Takaku, H.; Kamaike, K.; Tsuchiya, H. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (1), 51-56.
22. White, J. D.; Amedio, J. C., Jr. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (4), 736-738.
23. Taylor, A. W.; Dean, D. K. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29* (15), 1845-1848.
24. Webber, J. A.; Van, H.; Vasileff, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (20), 5674-5675.
25. Dehaven-Hudkins, D. L.; Dority, J. A., Jr.; Earley, W. G.; Kumar, V.; Mallamo, J. P.; Miller, M. S.; Subramanyam, C. US5554620A, Sep 10, 1996.

26. Williams, R. M.; Maruyama, L. K. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (18), 4044-4047.
27. Akiyama, T.; Nishimoto, H.; Ozaki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63* (11), 3356-3357.
28. Akiyama, T.; Takesue, Y.; Kumegawa, M.; Nishimoto, H.; Ozaki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64* (7), 2266-2269.
29. Sekine, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (10), 2321-2326.
30. Schulz, B. S.; Pfeleiderer, W. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (34), 3587-3590.
31. Claesen, C. A. A.; Pistorius, A. M. A.; Tesser, G. I. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (32), 3859-3862.
32. Jones, S. S.; Reese, C. B.; Sibanda, S.; Ubasawa, A. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (47), 4755-4758.
33. Takaku, H.; Ueda, S.; Ito, T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (48), 5363-5366.
34. Takahashi, Y.; Yamashita, H.; Kobayashi, S.; Ohno, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34* (7), 2732-2742.
35. Werner, A.; Sanchez-Migallon, A.; Fruchier, A.; Elguero, J.; Fernandez-Castano, C.; Foces-Foces, C. *Tetrahedron* **1995**, *51* (16), 4779-4800.
36. Rigby, J. H.; Gupta, V. *Synlett* **1995**, (Spec. Issue), 547-548.
37. Singh, S. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (12), 2009-2012.
38. Yamaura, M.; Suzuki, T.; Hashimoto, H.; Yoshimura, J.; Shin, C. *Chem. Lett.* **1984**, (9), 1547-1548.
39. Danishefsky, S. J.; DeNinno, S. L.; Chen, S. H.; Boisvert, L.; Barbachyn, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (15), 5810-5818.
40. Smith, A. B., III; Leahy, J. W.; Noda, I.; Remiszewski, S. W.; Liverton, N. J.; Zibuck, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (8), 2995-3007.
41. Rzepecki, P.; Wehner, M.; Molt, O.; Zadnard, R.; Harms, K.; Schrader, T. *Synthesis* **2003**, (12), 1815-1826.
42. Rigby, J. H.; Mateo, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (51), 12655-12656.
43. Yamato, M.; Takeuchi, Y.; Ikeda, Y. *Heterocycles* **1987**, *26* (1), 191-197.
44. Yamaura, M.; Suzuki, T.; Hashimoto, H.; Yoshimura, J.; Okamoto, T.; Shin, C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58* (5), 1413-1420.
45. Eskildsen, J.; Kristensen, J.; Vedso, P.; Begtrup, M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8654-8656.
46. Ruder, S. M.; Ronald, R. C. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (2), 135-138.

47. Taylor, J. E.; Jones, M. D.; Williams, J. M. J.; Bull, S. D. *Org. Lett.* **2010**, *12* (24), 5740-5743.
48. Richards, J. J.; Reed, C. S.; Melander, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (15), 4325-4327.
49. Verschueren, W. G.; Dierynck, I.; Amssoms, K. I. E.; Hu, L.; Boonants, P. M. J. G.; Pille, G. M. E.; Daeyaert, F. F. D.; Hertogs, K.; Surleraux, D. L. N. G.; Wigerinck, P. B. T. P. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (6), 1930-1940.
50. Congreve, M. S.; Fazal, L. H.; Frederickson, M.; Murray, C. W.; O'Brien, M. A.; Woodhead, A. J.; Lyons, J. F.; Thompson, N. T. WO2008044027A2, Apr 17, 2008.
51. Lyons, J. F.; Thompson, N. T. WO2008044054A2, Apr 17, 2008.
52. Rowley, M.; Leeson, P. D.; Williams, B. J.; Moore, K. W.; Baker, R. *Tetrahedron* **1992**, *48* (17), 3557-3570.
53. Forbes, I. T.; Johnson, C. N.; Thompson, M. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 1* **1992**, (2), 275-281.
54. Roth, H. J.; Eger, K. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger. )* **1975**, *308* (3), 179-185.
55. Morris, J.; Wishka, D. G. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (11), 3549-3556.
56. Eller, G. A.; Holzer, W. *Heterocycles* **2004**, *63* (11), 2537-2555.
57. Rosenberg, A. J.; Zhao, J.; Clark, D. A. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1764-1767.
58. Williams, R. M.; Kwast, E. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (4), 451-454.
59. Smith, A. B., III; Noda, I.; Remiszewski, S. W.; Liverton, N. J.; Zibuck, R. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (13), 3977-3979.
60. Yoshimura, J.; Yamaura, M.; Suzuki, T.; Hashimoto, H. *Chem. Lett.* **1983**, (7), 1001-1002.
61. Yoshimura, J.; Yamaura, M.; Suzuki, T.; Hashimoto, H. *Chem. Lett.* **1984**, (12), 2157-2158.
62. Williams, R. M.; Sabol, M. R.; Kim, H. D.; Kwast, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (17), 6621-6633.
63. Williams, R. M.; Armstrong, R. W.; Dung, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (19), 5748-5750.
64. Zavialov, I. A.; Dahanukar, V. H.; Nguyen, H.; Orr, C.; Andrews, D. R. *Org. Lett.* **2004**, *6* (13), 2237-2240.
65. Trost, B. M.; Krische, M. J.; Radinov, R.; Zanoni, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (26), 6297-6298.

66. Dehaven-Hudkins, D. L.; Dority, J. A., Jr.; Earley, W. G.; Kumar, V.; Mallamo, J. P.; Miller, M. S.; Subramanyam, C. US5554620A, Sep 10, 1996.
67. Smith, A. B., III; Rano, T. A.; Chida, N.; Sulikowski, G. A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (4), 1136-1138.
68. Tsuji, T.; Kataoka, T.; Yoshioka, M.; Sendo, Y.; Nishitani, Y.; Hirai, S.; Maeda, T.; Nagata, W. *Tetrahedron Lett.* **1979**, (30), 2793-2796.
69. Yang, B. V.; O'Rourke, D.; Li, J. *Synlett* **1993**, (3), 195-196.
70. Er-Rhaimini, A.; Mohsinaly, N.; Mornet, R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (40), 5757-5760.
71. Dragovich, P. S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Marakovits, J. T.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Lee, C. A.; Ford, C. E.; Burke, B. J.; Rejto, P. A.; Hendrickson, T. F.; Tuntland, T.; Brown, E. L.; Meador, J. W., III; Ferre, R. A.; Harr, J. E. V.; Kosa, M. B.; Worland, S. T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (7), 1213-1224.
72. Arikawa, Y.; Dong, Q.; Feher, V.; Jones, B.; Lam, B.; Nie, Z.; Smith, C.; Takahashi, M. US20110152273A1, Jun 23, 2011.
73. Old, D. W. US20090239867A1, Sep 24, 2009.
74. Imamura, S.; Ishihara, Y.; Hattori, T.; Kurasawa, O.; Matsushita, Y.; Sugihara, Y.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Hashiguchi, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52* (1), 63-73.
75. Gijzen, H. J. M.; Verbist, B. M. P.; Surkyn, M. WO2009077533A1, Jun 25, 2009.
76. Jin, H.; Metobo, S.; Jabri, S.; Mish, M.; Lansdown, R.; Chen, X.; Tsiang, M.; Wright, M.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (8), 2263-2265.
77. Palmer, B. D.; Thompson, A. M.; Booth, R. J.; Dobrusin, E. M.; Kraker, A. J.; Lee, H. H.; Lunney, E. A.; Mitchell, L. H.; Ortwine, D. F.; Smaill, J. B.; Swan, L. M.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (16), 4896-4911.
78. Altman, M. D.; Bienstock, C. E.; Butcher, J. W.; Childers, K. K.; Di, F.; Donofrio, A.; Ellis, J. M.; Fischer, C.; Haidle, A. M.; Jewell, J. P.; Knowles, S. L.; Northrup, A. B.; Otte, R. D.; Peterson, S. L.; Smith, G. F. WO2013052394A1, Apr 11, 2013.
79. Lemoucheux, L.; Rouden, J.; Ibazizene, M.; Sobrio, F.; Lasne, M. C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (19), 7289-7297.
80. Mallagaray, A.; Dominguez, G.; Gradillas, A.; Perez-Castells, J. *Org. Lett.* **2008**, *10* (4), 597-600.
81. McAlonan, H.; Stevenson, P. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6* (1), 239-244.
82. Rosenberg, A. J.; Clark, D. A. *Org. Lett.* **2012**, *14* (17), 4678-4681.

83. Schlessinger, R. H.; Bebernitz, G. R.; Lin, P.; Poss, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (6), 1777-1778.
84. Schlessinger, R. H.; Bebernitz, G. R. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (8), 1344-1346.
85. DeShong, P.; Ramesh, S.; Elango, V.; Perez, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (18), 5219-5224.
86. Boeckman, R. K., Jr.; Starrett, J. E., Jr.; Nickell, D. G.; Sum, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (18), 5549-5559.
87. Rosen, T.; Fernandes, P. B.; Marovich, M. A.; Shen, L.; Mao, J.; Pernet, A. G. *J. Med. Chem.* **1989**, *32* (5), 1062-1069.
88. Shimshock, S. J.; Waltermire, R. E.; DeShong, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (23), 8791-8796.
89. Chen, M.; Roush, W. R. *Org. Lett.* **2012**, *14* (1), 426-428.
90. Wood, J. L.; Stoltz, B. M.; Dietrich, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (41), 10413-10414.
91. Wood, J. L.; Stoltz, B. M.; Dietrich, H. J.; Pflum, D. A.; Petsch, D. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (41), 9641-9651.
92. Jones, M. I.; Froussios, C.; Evans, D. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, (12), 472-473.
93. Overman, L. E.; Osawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (6), 1698-1701.
94. Ali, I. A. I.; El, A.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron* **2004**, *60* (22), 4773-4780.
95. Heaney, H.; Papageorgiou, G.; Wilkins, R. F. *Tetrahedron* **1995**, *51* (39), 10737-10750.
96. Locher, C. *Synth. Commun.* **2001**, *31* (19), 2895-2911.
97. Molander, G. A.; Sandrock, D. L. *Org. Lett.* **2007**, *9* (8), 1597-1600.
98. Watson, D. J.; Dowdy, E. D.; Li, W. S.; Wang, J.; Polniaszek, R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (10), 1827-1830.
99. Wood, J. L.; Stoltz, B. M.; Goodman, S. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (43), 10656-10657.
100. Smaill, J. B.; Baker, E. N.; Booth, R. J.; Bridges, A. J.; Dickson, J. M.; Dobrusin, E. M.; Ivanovic, I.; Kraker, A. J.; Lee, H. H.; Lunney, E. A.; Ortwine, D. F.; Palmer, B. D.; Quin, J., III; Squire, C. J.; Thompson, A. M.; Denny, W. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (6), 1276-1296.
101. Jacobi, P. A.; Lee, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (18), 4295-4303.

102. Webber, S. E.; Marakovits, J. T.; Dragovich, P. S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Lee, C. A.; Srinivasan, B.; Moran, T.; Ford, C. E.; Brothers, M. A.; Harr, J. E. V.; Meador, J. W.; Ferre, R. A.; Worland, S. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (20), 2683-2686.
103. Grunder-Klotz, E.; Ehrhardt, J. D. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (6), 751-752.
104. Huffman, W. F.; Holden, K. G.; Buckley, T. F., III; Gleason, J. G.; Wu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2352-2353.
105. Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Van, d. V.; Amin, S. G.; Fernandez, I. F.; Gala, K.; Gruska, R.; Kapur, J. C.; Khajavi, M. S. *Tetrahedron* **1981**, *37* (13), 2321-2334.
106. Dragovich, P. S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Johnson, T. O.; Hua, Y.; Luu, H. T.; Sakata, S. K.; Brown, E. L.; Maldonado, F. C.; Tuntland, T.; Lee, C. A.; Fuhrman, S. A.; Zalman, L. S.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Wu, E. Y.; Guo, M.; Borer, B. C.; Nayyar, N. K.; Moran, T.; Chen, L.; Rejto, P. A.; Rose, P. W.; Guzman, M. C.; Doval Santos, E. Z.; Lee, S.; McGee, K.; Mohajeri, M.; Liese, A.; Tao, J.; Kosa, M. B.; Liu, B.; Batugo, M. R.; Gleeson, J. P.; Wu, Z. P.; Liu, J.; Meador, J. W., III; Ferre, R. A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (21), 4572-4585.
107. Dragovich, P. S.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Prins, T. J.; Reich, S. H.; Kephart, S. E.; Rui, Y. WO2001010894A2, Feb 15, 2001.
108. Dragovich, P. S.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Prins, T. J.; Kwok, A. K.; Okano, K.; Fuhrman, S. A.; Zalman, L. S.; Maldonado, F. C.; Brown, E. L.; Meador, J. W., III; Patick, A. K.; Ford, C. E.; Brothers, M. A.; Binford, S. L.; Matthews, D. A.; Ferre, R. A.; Worland, S. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (1), 45-48.
109. Creighton, C. J.; Reitz, A. B. *Org. Lett.* **2001**, *3* (6), 893-895.
110. Abell, A. D.; Brown, K. M.; Coxon, J. M.; Jones, M. A.; Miyamoto, S.; Neffe, A. T.; Nikkel, J. M.; Stuart, B. G. *Peptides (N. Y., NY, U. S.)* **2005**, *26* (2), 251-258.
111. Cankar, P.; Frisova, I.; Krystof, V.; Lenobel, R.; Slouka, J.; Strnad, M.; Fisher, P. M. WO2006024858A1, Mar 9, 2006.
112. Schutznerova, E.; Popa, I.; Krystof, V.; Koshino, H.; Travnicek, Z.; Hradil, P.; Cankar, P. *Tetrahedron* **2012**, *68* (21), 3996-4002.
113. Munson, M. C.; Garcia-Echeverria, C.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (11), 3013-3018.
114. Gage, J. L.; Onrust, R.; Johnston, D.; Osnowski, A.; MacDonald, W.; Mitchell, L.; Ueroegdi, L.; Rohde, A.; Harbol, K.; Gragerov, S.; Dorman, G.; Wheeler, T.; Florio, V.; Cutshall, N. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (14), 4155-4159.

115. Gribble, G. W. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27 (6), 395-404.
116. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93 (12), 2897-2904.
117. Jacobi, P. A.; Buddhu, S. C. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (38), 4823-4826.
118. Baumgarten, H. E.; Hwang, D. R.; Rao, T. N. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23 (3), 945-949.
119. Baddar, F. G.; Al-Hajjar, F. H.; El-Rayyes, N. R. *J. Chem. Eng. Data* **1982**, 27 (2), 213-217.
120. Mitsunobu, O.; Yamada, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40 (10), 2380-2382.
121. Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, (1), 1-28.
122. Amin, S.; Hecht, S. S.; Hoffman, D. *J. Org. Chem.* **1981**, 46 (11), 2394-2398.
123. Chen, L.; Wu, J.; Yuwen, L.; Shu, T.; Xu, M.; Zhang, M.; Yi, T. *Langmuir* **2009**, 25 (15), 8434-8438.
124. Kraus, M.; Biskup, E.; Richling, E.; Schreier, P. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2006**, 49 (13), 1151-1162.
125. Li, X.; Wang, J.; Li, J.; Wu, J.; Li, Y.; Zhu, H.; Fan, R.; Xu, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17 (8), 3053-3060.
126. Nicoletti, T. M.; Raston, C. L.; Sargent, M. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, (1), 133-138.
127. Fujihara, T.; Yoshida, S.; Terao, J.; Tsuji, Y. *Org. Lett.* **2009**, 11 (10), 2121-2124.
128. Percec, V.; Won, B. C.; Peterca, M.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (36), 11265-11278.
129. Biel, J. H.; Drukker, A. E.; Mitchell, T. F.; Sprengeler, E. P.; Nuhfer, P. A.; Conway, A. C.; Horita, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 2805-2813.
130. Tsao, M. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 6495-6496.
131. Kumar, P.; Narasimhan, B.; Sharma, D. *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S. )* **2008**, (13), 159-178.
132. Fieser, L. F.; Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*; Wiley: 1967.
133. Baillet, S.; Buisine, E.; Horvath, D.; Maes, L.; Bonnet, B.; Sergheraert, C. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4 (6), 891-899.
134. Pietta, P. G.; Biondi, P. A.; Brenna, O. *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (4), 703-704.
135. Landi, J. J., Jr.; Ramig, K. *Synth. Commun.* **1991**, 21 (2), 167-171.
136. Sharma, R. K.; Fry, J. L. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (12), 2112-2114.
137. Cygler, M.; Przybylska, M.; Eloffson, R. M. *Can. J. Chem.* **1982**, 60 (22), 2852-2855.

138. Mulder, P. P. J.; RamaKrishna, N. V. S.; Cremonesi, P.; Rogan, E. G.; Cavaliere, E. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6* (5), 657-661.
139. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (22), 3404-3409.
140. Fukuyama, T.; Jow, C. K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (36), 6373-6374.
141. Wang, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (4), 1328-1333.
142. Bleicher, K. H.; Boehm, H. J.; Mueller, K.; Alanine, A. I. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2* (5), 369-378.
143. Falco, J. L.; Borrell, J. I.; Teixido, J. *Mol. Diversity* **2003**, *6* (2), 85-92.
144. Zaragoza, F.; Stephensen, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (7), 2555-2557.
145. Gadekar, S. M.; Ross, E. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 613-615.
146. Pinney, K. G.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (9), 3125-3133.
147. Okuzumi, T.; Nakanishi, E.; Tsuji, T.; Makino, S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (29), 5539-5542.
148. Brase, S.; Kobberling, J.; Enders, D.; Lazny, R.; Wang, M.; Brandtner, S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (11), 2105-2108.
149. Dahmen, S.; Brase, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39* (20), 3681-3683.
150. Ma, W.; Zhang, S. Y.; Wu, J. Y.; Tian, Y. P.; Fun, H. K. *Yingyong Huaxue* **2003**, *20* (9), 862-866.
151. Tu, S. J.; Rong, L. C.; Gao, Y.; Guo, S. M.; Lu, S. H.; Yang, X. J. *Youji Huaxue* **2002**, *22* (5), 364-366.
152. Stauffer, S. R.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2* (4), 318-329.
153. Forns, P.; Sevilla, S.; Erra, M.; Ortega, A.; Fernandez, J. C.; De, L. F.; Fernandez-Forner, D.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (36), 6907-6910.
154. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vagner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5441-5452.
155. Motorina, I. A.; Huel, C.; Quiniou, E.; Mispelter, J.; Adjadj, E.; Grierson, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (1), 8-17.
156. Polyak, F.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (4), 1171-1180.
157. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
158. Vago, I.; Greiner, I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (34), 6039-6041.
159. Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, (7), 572-574.
160. Luo, G.; Xu, L.; Poindexter, G. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (49), 8909-8912.



161. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646-10647.
162. Han, S. Y.; Kim, Y. A. *Tetrahedron* **2004**, *60* (11), 2447-2467.
163. Koenig, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103* (3), 788-798.
164. Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Cohen, J. H.; Turchi, I. J.; Maryanoff, C. A. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S. )* **2004**, *104* (3), 1431-1628.
165. Yazici, A.; Pyne, S. G. *Synthesis* **2009**, (3), 339-368.
166. Yazici, A.; Pyne, S. G. *Synthesis* **2009**, (4), 513-541.
167. Cheng, J. F.; Chen, M.; Arrhenius, T.; Nadzan, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (36), 6293-6295.
168. Kumar, A.; Gupta, M. K.; Kumar, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (35), 4521-4525.
169. Blumenkopf, T. A.; Overman, L. E. *Chem. Rev.* **1986**, *86* (5), 857-874.
170. Jazzar, R.; Dewhurst, R. D.; Bourg, J. B.; Donnadieu, B.; Canac, Y.; Bertrand, G. *Angew. Chem. , Int. Ed.* **2007**, *46* (16), 2899-2902, S2899-1.
171. El, K.; Grimaud, L.; Purumandla, S. R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (11), 4728-4733.
172. Amorde, S. M.; Jewett, I. T.; Martin, S. F. *Tetrahedron* **2009**, *65* (16), 3222-3231.
173. Veerman, J. J. N.; Bon, R. S.; Hue, B. T. B.; Girones, D.; Rutjes, F. P. J. T.; van, M.; Hiemstra, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (11), 4486-4494.
174. Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (33), 3787-3790.
175. Munson, M. C.; Cook, A. W.; Josey, J. A.; Rao, C. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (40), 7223-7226.
176. Hanessian, S.; Xie, F. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (8), 733-736.
177. Lelievre, D.; Chabane, H.; Delmas, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (52), 9675-9678.
178. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646-10647.
179. Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (9), 2301-2302.
180. Konig, W.; Geiger, R. *Chem Ber* **1970**, *103* (3), 788-798.
181. Brickner, S. J.; Hutchinson, D. K.; Barbachyn, M. R.; Manninen, P. R.; Ulanowicz, D. A.; Garmon, S. A.; Grega, K. C.; Hendges, S. K.; Toops, D. S. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (3), 673-679.
182. Jaffe, H. H. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S. )* **1953**, *53*, 191-261.
183. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (2), 165-195.
184. Beteringhe, A. *Cent. Eur. J. Chem.* **2005**, *3* (4), 585-591.

185. Verma, M.; Chaudhry, A. F.; Fahrni, C. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (8), 1536-1546.
186. Schuetznerova, E.; Oliver, A. G.; Zajicek, J.; Krchnak, V. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 2013 (15), 3158-3165.
187. Albericio, F.; Kneib-Cordonier, N.; Biancalana, S.; Gera, L.; Masada, R. I.; Hudson, D.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55 (12), 3730-3743.
188. Palasz, P. D.; Utley, J. H. P.; Hardstone, J. D. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 2* **1984**, (4), 807-813.
189. Bartsch, H.; Kropp, W.; Pailer, M. *Monatsh. Chem.* **1979**, 110 (2), 267-278.
190. Lalli, C.; Trabocchi, A.; Sladojevich, F.; Menchi, G.; Guarna, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15 (32), 7871-7875, S7871-1.
191. Kim, J. H.; Lee, Y. S.; Kim, C. S. *Heterocycles* **1998**, 48 (11), 2279-2285.
192. Huber, V.; Urban, J.; Nakanishi, H.; Eguchi, M.; Mathew, J.; Lee, M. S. WO2003018587A1, Mar 6, 2003.
193. Lee, S. C.; Park, S. B. *J. Comb. Chem.* **2007**, 9 (5), 828-835.
194. Vankova, B.; Brulikova, L.; Wu, B.; Krchnak, V. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (26), 5075-5084, S5075-1.
195. Vojkovsky, T.; Weichsel, A.; Patek, M. *J. Org. Chem.* **1998**, 63 (10), 3162-3163.
196. Eguchi, M.; Lee, M. S.; Nakanishi, H.; Stasiak, M.; Lovell, S.; Kahn, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (51), 12204-12205.
197. Eguchi, M.; Lee, M. S.; Stasiak, M.; Kahn, M. *STetrahedron Lett.* **2001**, 42 (7), 1237-1239.
198. Pluth, M. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (1), 58-63.
199. Chenon, M. T.; Coupry, C.; Grant, D. M.; Pugmire, R. J. *J. Org. Chem.* **1977**, 42 (4), 659-661.
200. Claramunt, R. M.; Garcia, M. A.; Lopez, C.; Trofimenko, S.; Yap, G. P. A.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43 (1), 89-91.
201. Litchman, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101 (3), 545-547.