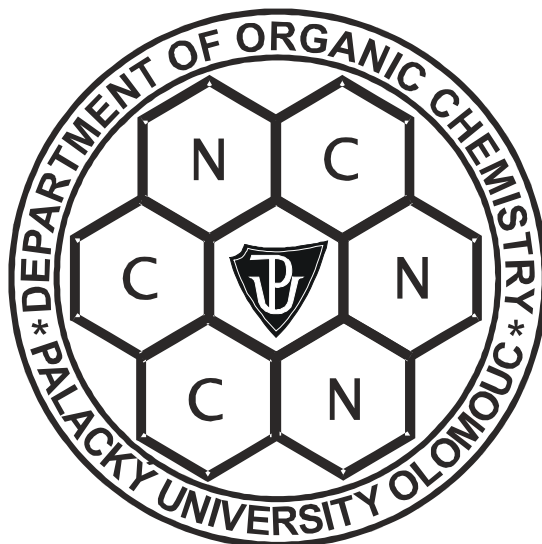


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Syntéza derivátů 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-
3,5-diaminu**

Vypracoval:

Lukáš Jedinák

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Cankař, Ph.D.

Studijní obor:

Organická chemie

Olomouc 2010

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

V Olomouci 18. května 2010

Lukáš Jedinák

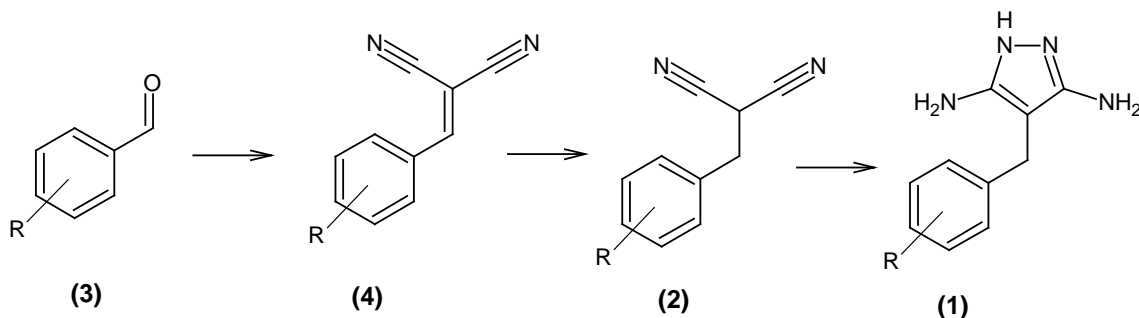
Upřímné poděkování všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci, především RNDr. Petrovi Cankařovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi při plnění zadaného úkolu poskytl.

Obsah

1. Úvod	5
2. Teoretická část	7
2.1. Příprava aryl(methylen)malononitrilů	7
2.2. Příprava aryl(methyl)malononitrilů	13
2.3. Reakce hydrazinu s malononitrilem a jeho deriváty	19
2.4. Inhibitory CDK	22
3. Výsledky a diskuse	27
3.1. Příprava aryl(methylen)malononitrilů	28
3.2. Příprava aryl(methyl)malononitrilů	30
3.3. Příprava 4-aryl(methyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-3,5-diaminu	32
4. Experimentální část	34
5. Závěr	42
6. Literatura	44

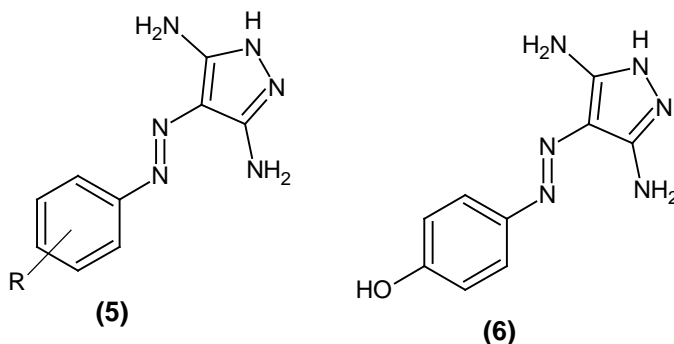
1. Úvod

V práci je popsána příprava derivátů 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**1**). Jedna z nejobecnějších metod syntézy pyrazolů je reakce hydrazinu s vhodně substituovanými β -dikarboxylovými sloučeninami. V případě výstavby 3,5-diaminopyrazolového cyklu je vhodnou výchozí komponentou substituovaný malononitril (**2**)¹. Deriváty aryl(methyl)malononitrilu (**2**) lze připravit nejlépe ve dvou krocích z komerčně dostupných derivátů benzaldehydu (**3**), z nichž kondenzací s malononitrem vzniká aryl(methylen)malononitril (**4**)^{2 - 14}. Dvojná vazba intermediátu (**4**) je díky konjugaci s dvěma nitrilovými skupinami dosti reaktivní a je možno ji redukovat běžnými hydridovými činidly, jako například tetrahydroboritanem sodným^{15, 16}. Takto lze ve třech krocích připravit deriváty pyrazolu (**1**) z dobře dostupných derivátů benzaldehydu (**3**).



Připravované deriváty 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**1**) jsou strukturně podobné derivátům 4-arylazo-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**5**), jenž jsou selektivní inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK)¹⁷. Nejúčinnější derivát (**6**) vykazuje poměrně solidní inhibiční aktivitu na CDK2/cyklin E. Zároveň se pyrazol (**6**) stal jedním z nejúčinnějších inhibitorů komplexu CDK9/cyklin T1, který je pyrazolem (**6**) inhibován v submikromolární koncentraci ($IC_{50} = 0,35 \mu M$). Inhibitory CDK jsou ceněny mimo jiné pro svou antitumorovou aktivitu, jako příklad lze uvést roscovitin, který je v současné době ve druhé fázi klinického testování na rakovinu plic¹⁸. Z tohoto pohledu má nesporný význam příprava analogů inhibitorů

CDK na bázi 3,5-diaminopyrazolu. Připravované pyrazoly (**1**) budou testovány jak na inhibici CDK, tak bude studována i jejich antiproliferační aktivita na buněčné úrovni.



Cílem práce je vypracovat obecnou metodu na přípravu řady derivátů 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**1**). Syntéza vychází z komerčně dostupných derivátů benzaldehydu (**3**). V prvním kroku bude třeba nalézt vhodný katalyzátor pro kondenzaci aldehydu (**3**) s malononitrilem a stanovit vhodné množství dávkovaného katalyzátoru. Dále bude nutné nalézt vhodné činidlo a podmínky pro redukci C=C vazby konjugované s dvěma nitrilovými skupinami. Ve dvou krocích připravené deriváty malonitrilu (**4**), pak bude třeba převést na pyrazoly (**1**).

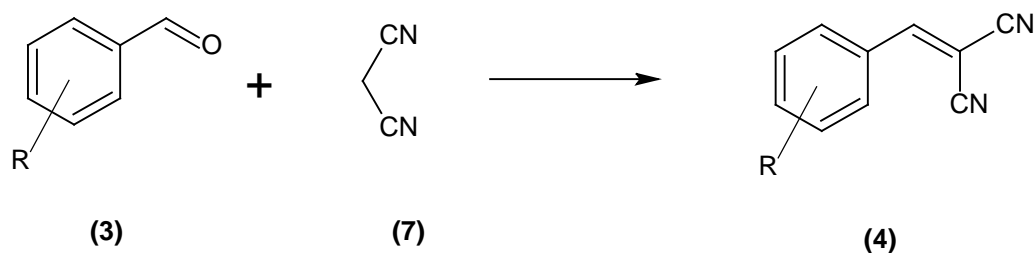
Předložená práce je strukturně členěna do šesti kapitol, z nichž některé jsou dále rozvedeny do menších podkapitol. V teoretické části je pojednáno o popsání syntéz jednotlivých intermediátů a některých pyrazolů. Vzhledem k tomu, že připravované pyrazoly budou testovány na CDK, je jedna podkapitola z teoretické části věnována známým inhibitorům CDK. Experimentální část obsahuje obecné návody na přípravu intermediátů (**2**) a (**4**) a pyrazolů (**1**). Rovněž lze v této části nalézt charakteristiky všech připravených látek. Stěžejní část práce je třetí kapitola, kde jsou diskutovány provedené experimenty. Čtenář se zde dozví, jak bylo postupováno při zdolávání překážek, které nastaly během vlastní syntézy. Dosažené výsledky jsou stručně shrnuty v závěru (pátá kapitola). V šesté kapitole jsou uvedeny citované publikace.

2. Teoretická část

V této části jsou popsány vybrané publikace týkající se přípravy intermediátů (2) a (4) a reakce hydrazinu s malononitrilem a jeho deriváty. Vzhledem k tomu, že budou připravované pyrazoly (1) testovány na CDK, je jedna podkapitola věnována známým inhibitorům CDK.

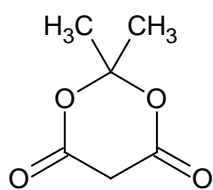
2.1 Příprava aryl(methylen)malononitrilů (4)

Arylmethylenmalononitrily (4) se připravují kondenzací derivátů benzaldehydu (3) s malononitrilem (7)^{2 - 14}.

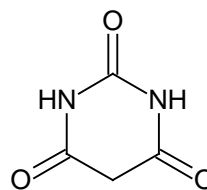


Obecně je reakce aldehydů či ketonů s látkami obsahujícími aktivní methylenovou skupinu známa jako Knoevenagelova kondenzace^{2 - 14}. Reakce patří mezi základní syntetické metody tvorby vazby uhlík – uhlík.

Knoevenagelova reakce je významná syntetická metoda sloužící k přípravě olefinů, u kterých je dvojná vazba konjugována se skupinami přitahujícími elektrony, jako je nitrilová či karboxylová skupina. Mezi používané C-kyseliny patří malononitril, ethyl kyanacetát, diethyl malonát, kyanacetamid, barbiturová kyselina (8) nebo 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion, tzv. meldrumová kyselina (9).

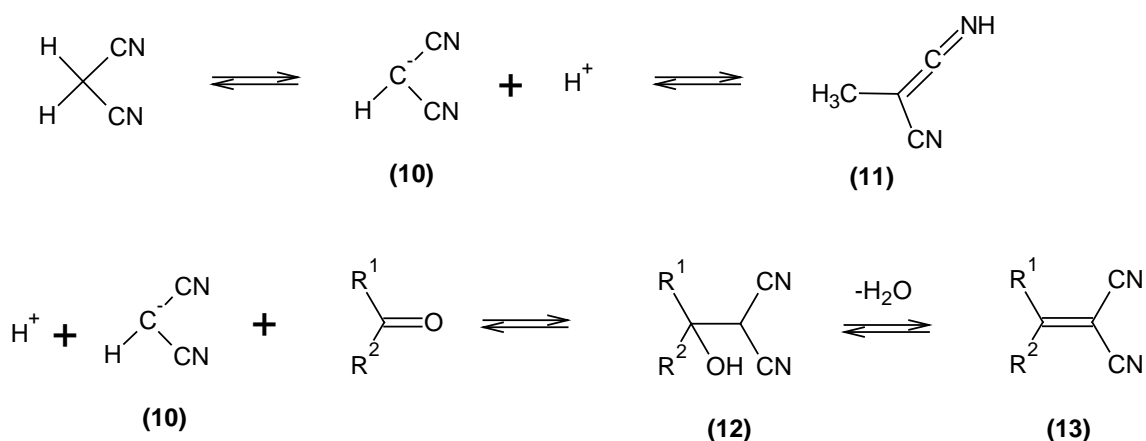


(9)



(8)

Obecně lze při Knoevenagelově kondenzaci využít jak bazickou, tak kyselou katalýzu. Cope navrhl mechanismus Knoevenagelovy reakce zahrnující bazickou i kyselou katalýzu². Vyšel přitom z pozorování, že soli amoniaku respektivě aminů s organickými kyselinami jsou účinnějšími katalyzátory než volné báze. Podle něj nejprve dochází k enolizaci C-kyseliny přes anion **(10)**. Poté dojde k nukleofilní adici enolu **(11)** nebo aniontu **(10)** na aldehyd nebo keton a vzniká intermediát **(12)**. Následně se z intermediátu **(12)** eliminuje voda a vytvoří se olefin **(13)**. Platí, že všechny popsané kroky jsou reverzibilní. Enolizace C-kyseliny je katalyzována jak kyselinami, tak bázemi. Eliminace vody z intermediátu **(12)** je katalyzována především kyselinami.



V literatuře je popsána řada příkladů využití Knoevenagelovy reakce pro tvorbu C=C vazby. Reakce probíhá v nejrůznějších protických i aprotických

organických rozpouštědlech^{2,3}, ve vodě⁴ a nověji i v iontových kapalinách^{5,6}. Také je popsána řada syntéz bez použití rozpouštědla^{7,8}. K urychlení reakce se užívají organické báze⁹ nebo jejich soli s organickými kyselinami^{2,3}, Lewisovy kyseliny¹⁰ a různé heterogenní katalyzátory¹¹. Je však popsána i řada případů, kdy Knoevenagelova kondenzace probíhá velmi hladce i bez přítomnosti katalyzátoru⁴. Dále jsou popsány reakce probíhající za mikrovlnného ozařování¹². V následujících odstavcích jsou popsány vybrané příklady využití Knoevenagelovy kondenzace. Jsou vybrány především takové příklady, kdy dochází ke kondenzaci derivátů benzaldehydu **(3)** s malononitrilem a produktem jsou aryl(methylen)malononitrily **(4)**.

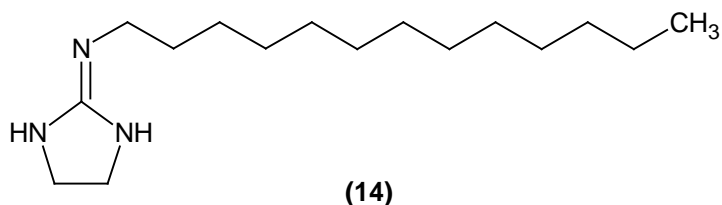
Cope² pozoroval, že soli amoniaku nebo aminů s organickými kyselinami efektivněji katalyzují Knoevenagelovu reakci než volné báze. Zkoušel reakci nejrůznějších aldehydů a ketonu s ethyl kyanacetátem v benzenu. Vznikající vodu odděloval azeotropní destilací přímo z reakční směsi. Přitom použil nejrůznější katalyzátory, z nichž se nejvíce vyplatil piperidin butyrát, piperidin oleát a triethylamin acetát. Naopak soli jako octan sodný, jodid sodný nebo tetramethylamonium jodid, které jsou v benzenu jen málo rozpustné se ukázaly být málo účinnými katalyzátory.

Z Copeho poznatků vyšel Franklin³, který zkoušel reakci karbonylových sloučenin s C-kyselinami urychlit pomocí aminokyselin, aminofenolů a aminobenzensulfonových kyselin. Jako reakční médium opět zvolil benzen a vznikající vodu odděloval azeotropní destilací. Problém byl, že většina aminokyselin a aminobenzen sulfonových kyselin jsou v benzenu špatně rozpustné. Efektivními katalyzátory byly dostatečně rozpustné aminokyseliny jako ϵ -aminokapronová kyselina, α -aminofenyloctová kyselina, β -alanin a lysin. Katalyzátory zkoušel na modelové reakci acetofenonu, acetonu a cyklohexanonu s malononitrilem nebo ethyl kyanoacetátem. Používal 0,5 molárních % katalyzátoru. Reakční doba se pohybovala v rozmezí 1 – 12 hodin a většina olefinů byla získána s výtěžky přes 70 %.

Přípravu řady arylmethylenmalononitrilů **(4)** z derivátů benzaldehydu a malononitrilu popsal Liu¹³. Reakce probíhá za laboratorní teploty v polyethylenglykolu za katalýzy L-prolinem. Reakční doba se pohybuje v rozmezí 2 – 12 hodin a závisí na substituci benzenového jádra. Aldehydy nesoucí na

aromatickém jádře skupiny, které odebírají z aromatického cyklu elektrony (např. NO₂), reagují rychleji než aldehydy se skupinami dodávajícími elektrony (např. OCH₃). Výtěžky se pohybují v rozmezí 69 – 90 %.

Guanidin⁹ a jeho deriváty katalyzují kondenzaci aromatických i alifatických aldehydů s malononitrilem a ethyl kyanoacetátem. Ze studovaných guanidinů vykazoval největší katalytickou aktivitu derivát **(14)**. Reakce probíhá v dichlormethanu v přítomnosti 10 % katalyzátoru. Přitom odreagují všechny deriváty benzaldehydu do 10 hodin s výtěžky přes 90 %. Nejrychleji reagují aldehydy s NO₂ skupinou na aromatickém jádře. Naopak pomaleji probíhá reakce u aldehydů nesoucí na aromatickém jádře skupiny s +M efektem jako je methoxy skupina.



Kondenzace aromatických aldehydů **(3)** s malononitrilem probíhá i v pevné fázi bez přítomnosti rozpouštědla. Pro tento případ je popsáno uspořádání, kde je katalyzátorem AlPO₄-Al₂O₃ (75:25 wt %) ⁷. Příslušné arylmethylenmalononitrily **(4)** se získají ve výtěžku kolem 80 %. V závislosti na substituci benzenového jádra je reakční doba 15 až 60 minut. Analogická reakce je popsána v přítomnosti 10 mol % močoviny⁸. Při 100 °C odreagují všechny studované deriváty benzaldehydu **(3)** do deseti minut. Po ukončení reakce se odstraní nadbytečná močovina jednoduše promytím vodou. Takto se získají příslušné arylmethylenmalononitrily **(4)** v 94 až 100 % výtěžku.

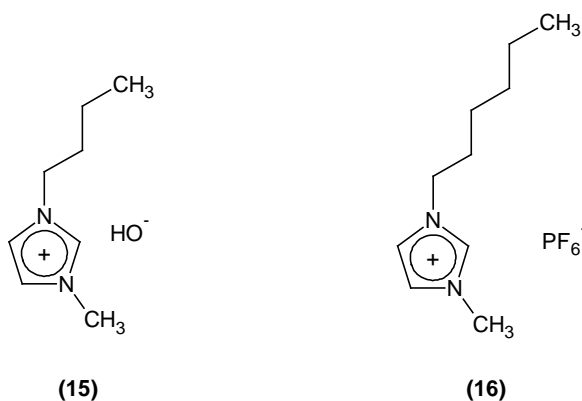
Popsané jsou příklady Knoevenagelovy kondenzace v přítomnosti heterogenního katalyzátoru. Výhodou heterogenních katalyzátorů je obvykle jejich snadná izolace z reakční směsi filtrací. Například je popsáno použití fluoridu hořečnatého v ethanolu, kdy reakce probíhá s vysokými výtěžky ¹⁰. Kondenzace

za katalýzy fluoridem hořečnatým probíhají 3 až 8 hodin. Mg-Al-O-tBu hydrotalcit katalyzuje kondenzaci aromatických aldehydů s malononitrilem nebo ethyl kyanacetátem ¹¹. Reakce se provádí v DMF při laboratorní teplotě. Reakční doba se pohybuje kolem 10 minut. Výtěžky aryl(methylen)malononitrilů (**4**) přesahují 90 %. Mg-Al-O-tBu lze s výhodou regenerovat beze ztráty katalytické aktivity.

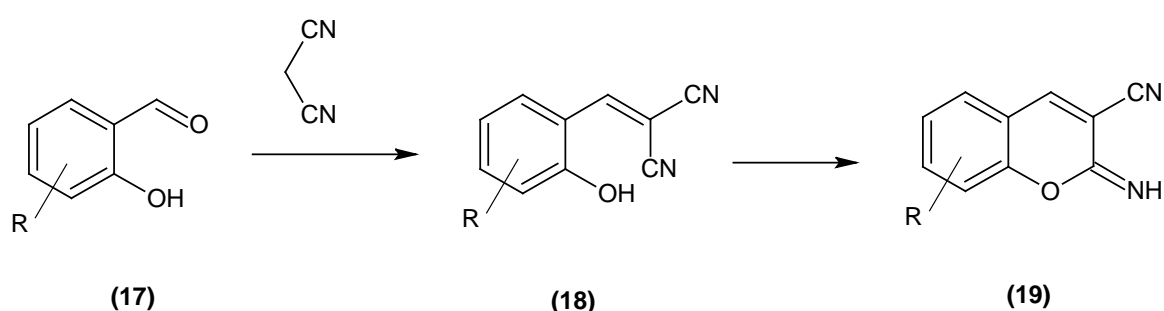
Yadav ¹² a spol. připravily řadu derivátů aryl(methylen)malononitrilu (**4**) za mikrovlnného ozařování. Kondenzace probíhá v mikrovlnném reaktoru (450 W, 2450 MHz) v přítomnosti dvaceti molárních procent trifenylfosfinu. Všechny produkty se získávají ve výtěžku přes osmdesát procent.

Jsou popsány rovněž nekatalyzované Knoevenagelovy kondenzace. Ve vodném prostředí probíhá reakce malononitrilu s aromatickými aldehydy až překvapivě hladce ⁴. Reakce probíhá se značnou selektivitou a vzniklé aryl(methylen)malononitrily (**4**) není třeba překrystalizovat. Reakční doba se pohybuje od pěti po třicet minut a výtěžky přesahují devadesát procent.

Pouze pro úplnost zmíním dvě práce, které se zabývají Knoevenagelovou kondenzací v iontových kapalinách. V poslední době se řada autorů snaží dobře probádané organické reakce vyzkoušet právě v těchto rozpouštědlech. Tito autoři považují iontové kapaliny za „zelenou“ alternativu k těkavým a hořlavým organickým rozpouštědlům. Opomíjejí však jednu značnou nevýhodu iontových kapalin a tou je jejich vysoká cena. Popsána je kondenzace nejrůznějších aldehydů a ketonů s C-kyselinami v [bmim]OH (1-butyl-3-methylimidazolium hydroxid **15**)⁵ nebo v [hmim][PF] (1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát **16**)⁶.



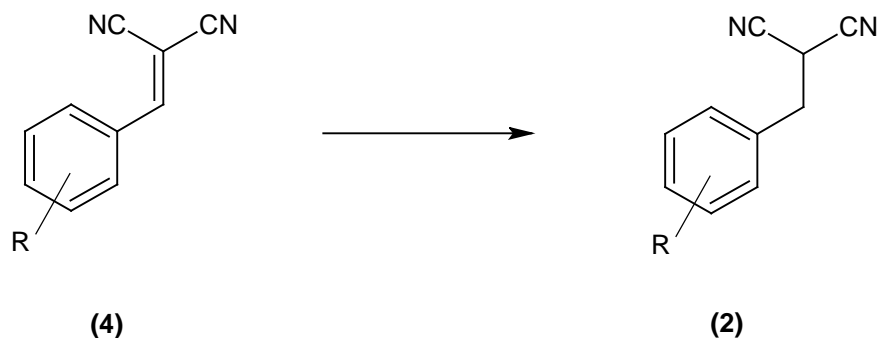
Za zmínku stojí odlišný průběh kondenzace malononitrilu s aromatickými aldehydy, které mají v ortho poloze hydroxylovou funkci (deriváty salicylaldehydu **17**)¹⁴. Kondenzační produkt **(18)** přechází již při laboratorní teplotě na derivát 2-iminochromenu **(19)**. Stejný produkt se získá, když se reakce provádí v dichlormethanu, vodném hydrogenuhličitanu nebo v methanolu s přidávkem katalytického množství triethylaminu.



Knoevenagelova kondenzace je užitečná metoda tvorby vazby C=C. Využívá se k přípravě olefinů, které mají dvojnou vazbu v konjugaci s elektronakceptorními skupinami, jako je například funkce -CN. Na výše vybraným příkladech je vidět robustnost této metody. Reakce je popsána jednak v klasickém uspořádání s použitím nejrůznějších katalyzátorů^{2,3}, dále pak v iontových kapalinách^{5,6}, bez rozpouštědla^{7,8} nebo v mikrovlnném reaktoru¹².

2.2 Příprava aryl(methyl)malononitrilů (2)

Tvorba vazby uhlík – uhlík patří mezi velmi důležité reakce v přípravě organických látek, například substituovaných malononitrilů. Nejpřímochařejší metodou přípravy aryl(methyl)malononitrilů (2) je alkylace malononitrilu benzylbromidy či benzylchloridy¹⁹. Alkylační procedura však poskytuje směs mono a disubstituovaných malononitrilů, krom toho zůstává v reakční směsi nezreagovaný malononitril. Selektivnější metoda přípravy monosubstituovaných aryl(methyl)malononitrilů (2) obecně zahrnuje dva reakční kroky. Nejprve se provede Knoevenagelova kondenzace^{2 - 14} derivátu benzaldehydu (3) s malononitrilem a poté se vzniklý olefin redukuje na aryl(methyl)malononitril (4)^{15, 16}. Knoevenagelova kondenzace je detailněji rozebrána v předešlé kapitole. Zde bude popsána metodika redukce elektron deficitní vazby C=C derivátů aryl(methylen)malononitrilu (4).



Jedna ze starších metod popisující redukcí α,β -nenasycených nitrilů a dinitrilů na jejich nasycené analoga využívá redukčních vlastností hořčíku²⁰. Redukce kovovým hořčíkem v methanolu probíhá s výtěžky 60 až 100 %.

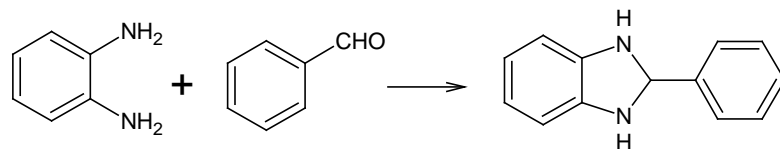
Vazbu C=C aryl(methylen)malononitrilu (4, R = H) lze redukovat azeotropní směsí kyseliny mravenčí a triethylaminu v dimethylformamidu²¹. Výtěžek reakce dosahuje 91 %. Reakce probíhá za teploty místnosti a reakční doba je 2 hodiny.

Redukce samotnou kyselinou mravenčí probíhá až za vyšších teplot (přes 100 °C) a s nižšími výtěžky. Rovněž použití jiných rozpouštědel než dimethylformamidu, například tetrahydrofuranu, prodlužuje dobu reakce a zároveň se snižuje výtěžek.

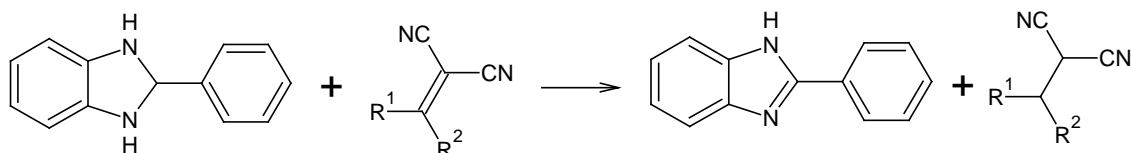
Řada publikací popisuje redukcí deaktivovaných olefinů pomocí borohydridu sodného^{15, 16, 22, 23}. Redukce C=C vazby konjugované s dvěma nitrilovými skupinami probíhá obvykle velmi rychle. Selektivita redukce C=C vazby a s tím spojené výtěžky souvisí značně na reakčních podmínkách. Zdá se, že vhodné je provádět redukcí borohydridem sodným v alkoholickém roztoku za chlazení (při 0 °C). Takto byly připraveny aryl(methyl)malononitrily (**2**) ve výtěžku 60 až 87 % (cit. 22), nebo v jiné práci byly popsány výtěžky kolem 80 % (cit. 16). Při takzvané „one pot“ proceduře přípravy aryl(methyl)malononitrilů (**2**) se smíchá aldehyd, malononitril a borohydrid sodný najednou¹⁵. Jde prakticky o reduktivní alkylaci, kombinuje se Knoevenagelova kondenzace a redukce C=C vazby. Autoři uvádějí, že redukční činidlo (borohydrid sodný) zřejmě působí katalyticky i na Knoevenagelovu kondenzaci. Nevýhodou tohoto provedení je konkurenční redukce aldehydické skupiny. Vzniklé alkoholy se musí od substituovaných malononitrilů dělit chromatograficky.

Rovněž je popsáno použití borohydridu sodného v přítomnosti 20 molárních procent InCl_3 (cit. 23). Redukce aryl(methylen)malononitrilů (**4**) na aryl(methyl)malononitrily (**2**) se takto provádí v acetonitrilu. Reakční doba se pohybuje kolem čtyř hodin a výtěžky bývají kolem 80 %.

Dostatečně aktivovaná C=C vazba je redukovatelná některými organickými redukčními činidly. Například 2-fenylbenzimidazolin (**PBI**) se ukazuje být vhodné, mírné a selektivní činidlo pro redukcí elektron deficitních olefinů (**20**)²⁴. PBI se připravuje in situ z o-fenylendiaminu a benzaldehydu v alkoholickém roztoku, do kterého se posléze přidá olefin (**21**).



(PBI)

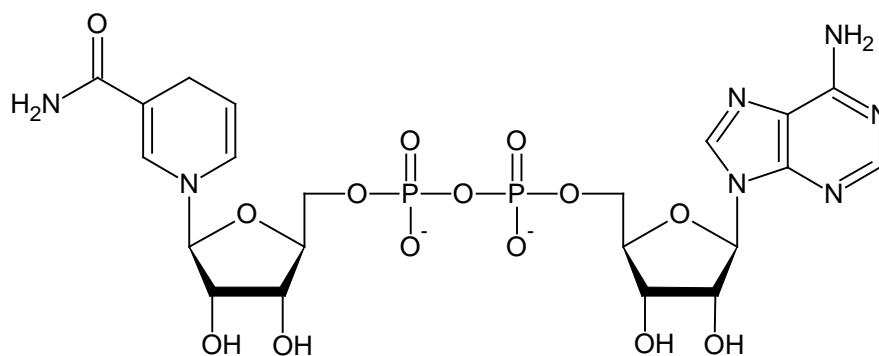


(PBI)

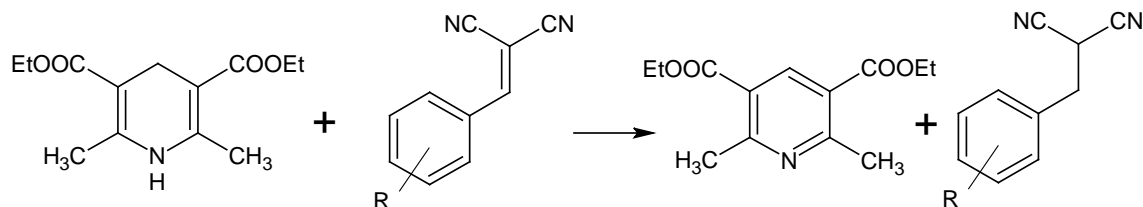
(20)

(21)

S vysokou selektivitou probíhá redukce aryl(methylen)malononitrilů (4) na aryl(methyl)malononitrily (2) pomocí Hantzschova esteru (22)^{25 - 29}. 1,4-dihydropyridin je velmi zajímavé redukční činidlo, jehož analogii lze spatřit v biologických systémech, kde působí redukováná forma nikotinamid adenin dinukleotidu (23).



(23)



(22)

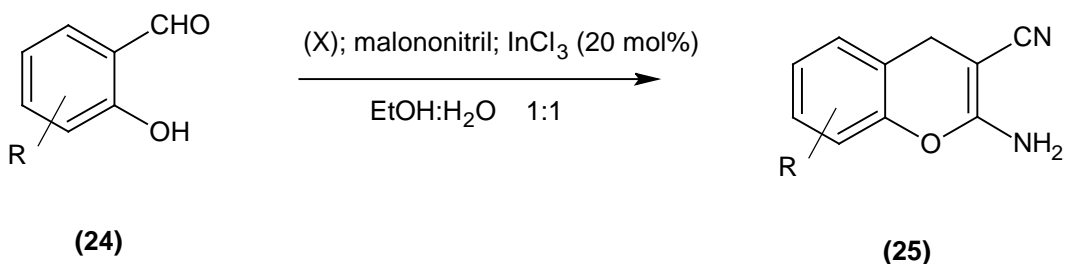
(4)

(2)

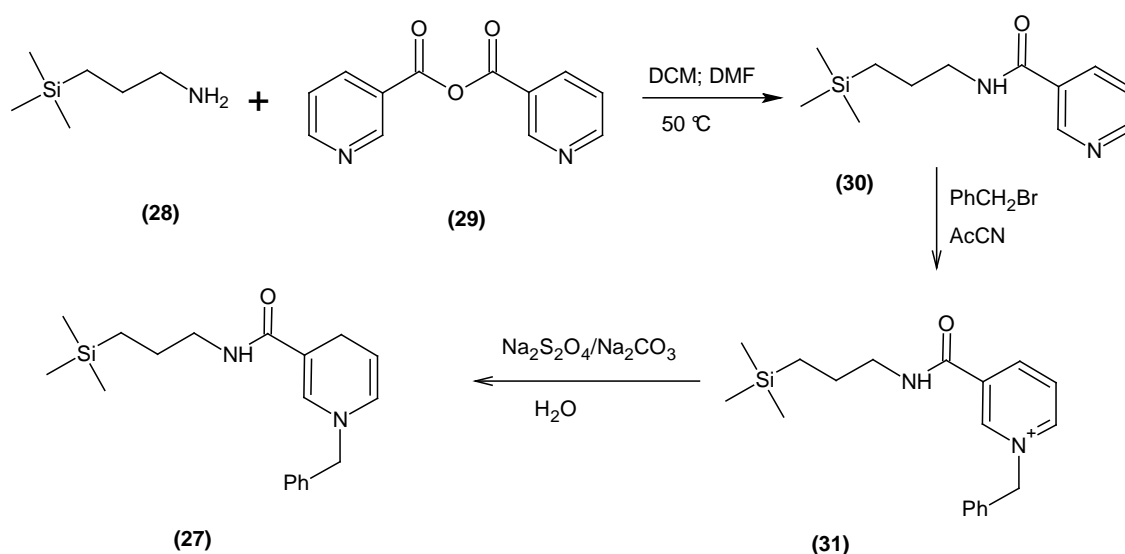
Pomocí deuteriem značeného dihydropyridinu (**22**) byl studován mechanismus redukce aryl(methylen)malononitrilů (**4**)^{25, 26}. Dihydropyridin (**22**) deuterovaný v poloze 4 vykazuje kinetický izotopový efekt 5,3 až 6,0. Kinetický izotopový efekt dihydropyridinu (**22**) deuterovaného v poloze jedna je 1,2 až 1,3. Tato data ukazují, že v rychlost určujícím kroku reakce dochází k štěpení vazby C₄-H, nikoli vazby N-H. Dalšími kinetickými studii bylo ukázáno, že štěpení vazby C₄-H je heterolytické. Elektronový pár si odnáší vodík a vzniklý hydridový anion se váže do methylenové skupiny aryl(methylen)malononitrilu. Tuto skutečnost podporuje fakt, že v případě C₄ značeného dihydropyridinu se deuterium objeví v benzylové poloze aryl(methyl)malononitrilu. Následně dojde k odtržení protonu z polohy 1 dihydropyridinu (heterolýza vazby N-H) a jeho navázání do α polohy dinitrilu (**2**).

Byla popsána tak zvaná reduktivní benzylace malononitrilu²⁷. Působením derivátů benzaldehydu na malononitril v přítomnosti dihydropyridinu (**22**) vznikají ve vysokém výtěžku aryl(methyl)malononitrily (**2**). Reakce se provádí bez rozpouštědla. Lépe reagují elektron-deficitní aldehydy, tedy například takové, které nesou na aromatickém jádře nitroskupinu. Naopak deriváty benzaldehydu, u nichž je elektronový deficit na karbonylovém uhlíku snižován přítomností elektron donorových skupin, reagují obtížněji. Příkladem aldehydu, který za daných podmínek nereaguje vůbec je 4-(dimethylamino)benzaldehyd (**3**).

Analogicky je popsána takzvaná „one pot“ reduktivní benzylace malononitrilu deriváty salicylaldehydu (**24**)²⁸. V tomto případě však není konečným produktem aryl(methyl)malononitril, ale dojde k adici nitrilové skupiny na hydroxylovou skupinu v ortho poloze aldehydu (**24**). Produktem reakce jsou deriváty 2-aminochromenu (**25**). Reakce probíhá ve směsi ethanol – voda (1:1) v přítomnosti 20 molárních procent InCl₃. Reakční doba se pohybuje v rozmezí 25 až 40 minut. Výtěžky přesahují 80 %.



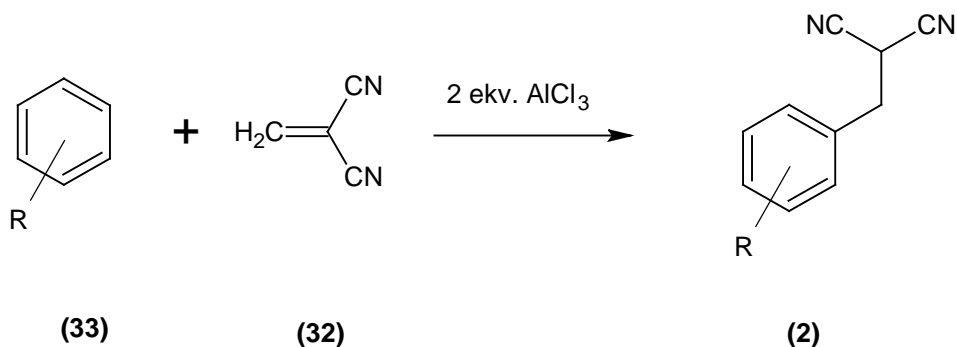
Při redukci elektron-deficitních olefinů deriváty dihydropyridinu je třeba použít minimálně ekvivalent příslušného dihydropyridinu. V reakční směsi je po proběhnutí reakce přítomná oxidovaná forma použitého činidla, tedy derivát pyridinu. Pyridin lze posléze odstranit chromatograficky nebo extrakcí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou²⁸. Další alternativou je použití dihydropyridinu vázaného na polymerním nosiči, ten pak lze po proběhnutí reakce snadno odstranit filtrací²⁹.



Příkladem dihydropyridinu vázaného na polymerním nosiči, který byl použit pro redukci aryl(methylen)malononitrilů (4) na aryl(methyl)malononitrily (2), je 1-benzyl-1,4-dihydronikotinamid (BNAH, 26)²⁹. V článku je popsána příprava BNAH na polysiloxanu (polysiloxan-BNAH, 27). Nejprve se aminopolysiloxan (28) acyluje anhydridem nikotinové kyseliny (29). Vzniklý polysiloxan – nikotinamid (30) se

alkyluje působením benzyl bromidu. Následně se kvartérní pyridiniová sůl **(31)** redukuje účinkem dithioničitanu sodného ve vodném bazickém prostředí a vzniká polysiloxan–BNAH. Tento polymer pak slouží k redukci aryl(methylen)malononitrilů **(4)** na aryl(methyl)malononitrily **(2)**. Reakce běží v acetonitrilu při teplotě místnosti. Výtěžky se pohybují od 65 po 90 procent. Po dokončení reakce se polymer odfiltruje a lze jej znovu regenerovat dithioničitanem sodným, tak jak bylo popsáno při jeho přípravě.

Alternativní metodou přípravy aryl(methyl)malononitrilů **(2)** je reakce methylenmalononitrilu **(32)** s aromáty **(33)** za podmínek Friedel-Craftsovy reakce³⁰. Reakce se provádí v chlorovaných rozpouštědlech v přítomnosti dvou ekvivalentů chloridu hlinitého. Stejně jako u Friedel-Craftsových reakcí jsme i zde omezeni reaktivitou použitého aromátu. Dobře reagují fenoly či fenylethery. Aromát by měl mít reaktivitou při elektrofilních substitucích alespoň takovou, jakou má benzen. Desaktivované aromáty (například nitro skupinou) nereagují. Výtěžky aryl(methyl)malononitrilů **(2)** se pohybují od 37 po 67 %.

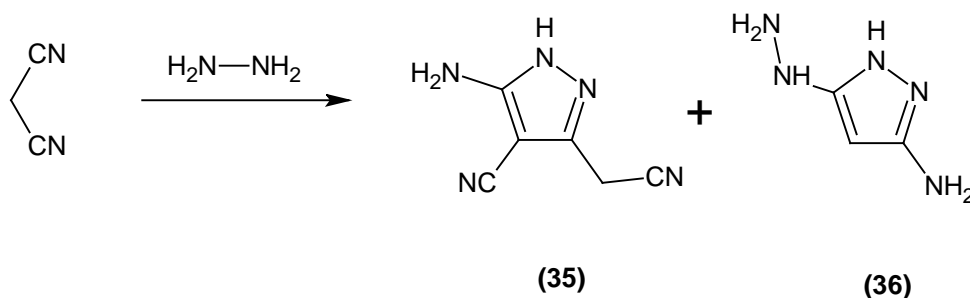


Aryl(methyl)malononitrily **(2)** jsou dostupné několika metodami. Přímá benzylace malononitrilu působením benzylbromidu či benzylchloridu obvykle poskytuje pouze směsi látek¹⁹. Pro dostatečně reaktivní aromáty je zde metoda využívající methylenmalononitril **(32)**³⁰, který s aromatickými sloučeninami reaguje v přítomnosti chloridu hlinitého za vzniku aryl(methyl)malononitrilů **(2)**. Daleko nejčastěji se volí nepřímá cesta, kdy se nejprve připraví Knoevenagelovou reakcí olefin **(4)**²⁻¹⁴ a ten se následně redukuje^{15,16}. Pro redukci elektrondeficitní vazby C=C je popsána řada metod. Využívá se například borohydrid sodný^{22,23}, dihydropyridiny²⁵⁻²⁹ nebo 2-fenylbenzimidazolin **(PBI)**²⁴.

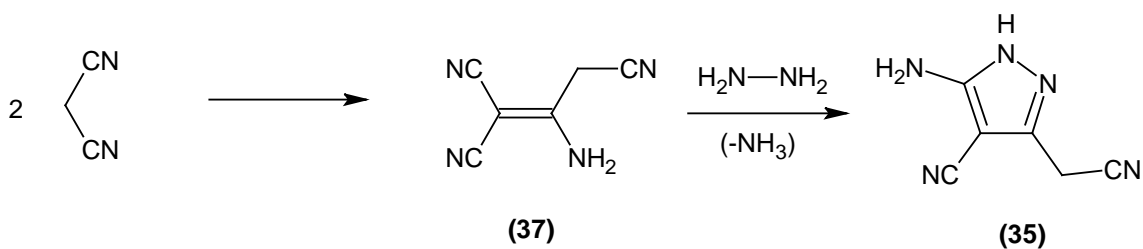
2.3 Reakce hydrazinu s malononitrilem a jeho deriváty

V této části bude zmíněno několik prací, které popisují přípravu 3,5-diaminopyrazolového cyklu, a to jak samotného pyrazol-3,5-diaminu (**34**), tak jeho derivátů substituovaných v poloze čtyři. Obecně půjde o tradiční přípravu pyrazolu, tedy reakce hydrazinu s vhodně substituovanými β -dikarbonylovými sloučeninami.

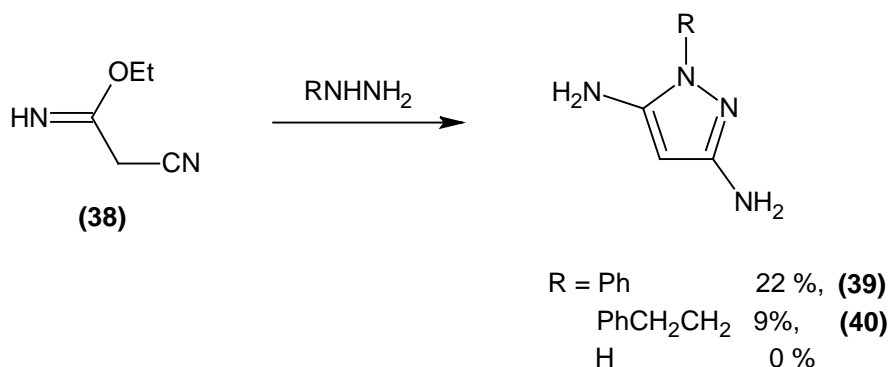
Syntéza samotného 3,5-diaminopyrazolu (**34**) byla popsána v roce 1894 Rothenburgem ³¹. Jednalo se o reakci malononitrilu s hydrazinem v alkoholickém roztoku. Později se však ukázalo, že Rothenburg látku nesprávně charakterizoval a že touto cestou nelze připravit pyrazol (**34**). Bylo zjištěno, že reakcí ekvivalentu malononitrilu s hydrazinem vzniká krystalická látka (**35**) a olejovitá látka (**36**) ³²⁻³⁴.



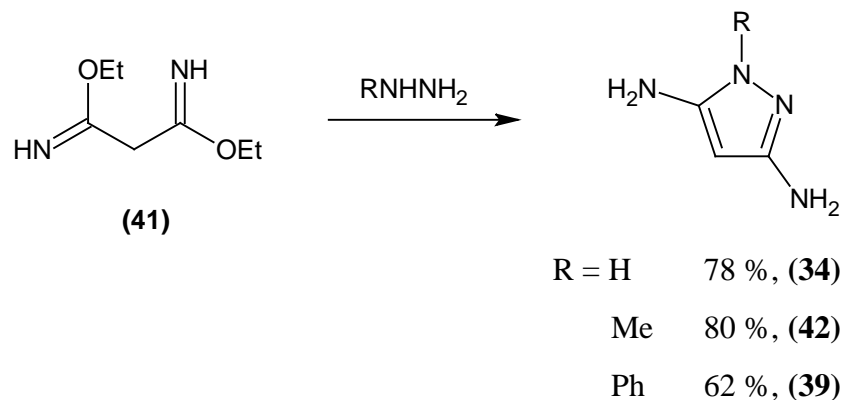
5-amino-4-kyano-pyrazol-3-yl-acetonitril (**35**) vzniká rovněž reakcí dimeru malononitrilu (**37**) s hydrazinem ³⁵. Proto je velmi pravděpodobné, že při přímé reakci malononitrilu s hydrazinem nejprve působí hydrazin jako bazický katalyzátor na zdvojení malononitrilu a vzniká dimer (**37**). Poté reaguje dimer (**37**) s hydrazinem za současného uvolnění jedné molekuly amoniaku a produktem je pyrazol (**35**).



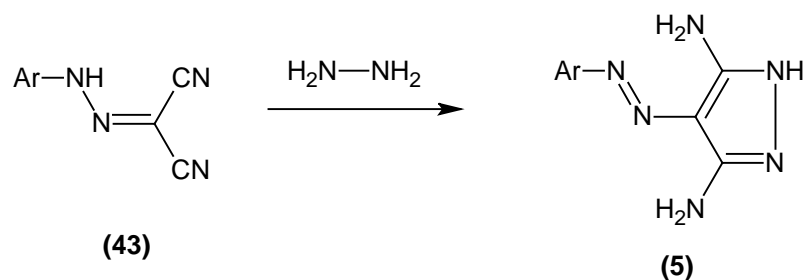
Iminoether malononitrilu (**38**) poskytuje reakcí s fenylhydrazinem 1-fenylpyrazol-3,5-diamin (**39**) ve výtěžku dvaceti procent. 1-fenylethylpyrazol-3,5-diamin (**40**) se získá z iminoetheru (**38**) a fenylethylhydrazinu ve výtěžku devíti procent. Samotný 1*H*-pyrazol-3,5-diamin (**34**) však touto cestou připravit nelze³⁶.



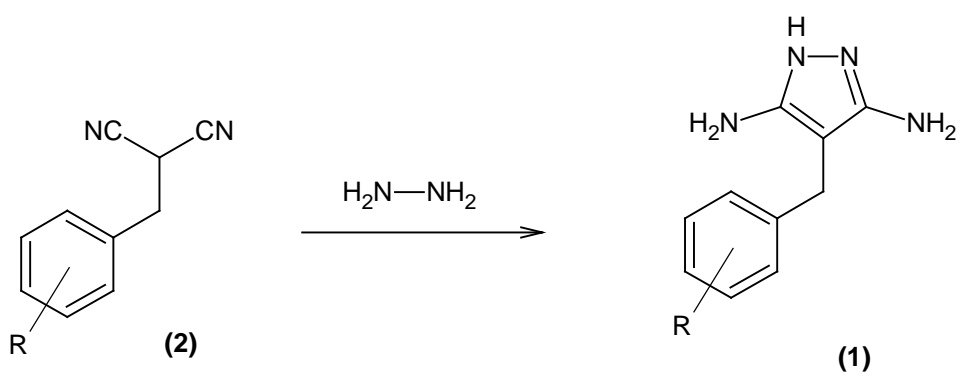
Samotný 1-*H*-pyrazol-3,5-diamin (**34**) je dostupný reakcí hydrazinu s iminoetherem (**41**) ve vroucím ethanolu. Pyrazol (**34**) se takto získá v 78 % výtěžku. Obdobně lze touto cestou připravit příslušné pyrazoly (**39**) a (**42**) z methylhydrazinu, respektive fenylhydrazinu. V obou případech probíhá reakce s velmi slušným výtěžkem³⁷.



Reakce hydrazinu s arylhydrazonomalononitrily (**43**) probíhá jako jednoduchá cykloadice. Vzniklé deriváty 4-arylazo-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**5**) působí jako kompetitivní inhibitory CDK¹⁷.



V literatuře je popsáno několik derivátů 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**1**). Pyrazoly (**1**) se připravují reakcí aryl(methyl)malononitrilů (**2**) s hydrazinem ve vroucím ethanolu¹.



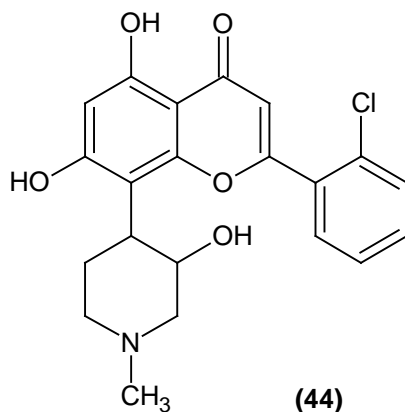
R = H	73 %
4-Me	70 %
4-Cl	72 %
3-NO ₂	42 %

2.4 Inhibitory CDK

Připravované deriváty 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**1**) jsou strukturně příbuzné k derivátům 4-arylazo-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**5**), které kompetitivně inhibují cyklin dependentní kinasy (CDK) ¹⁷. U připravovaných pyrazolů (**1**) lze tedy potencionálně předpokládat aktivitu na CDK.

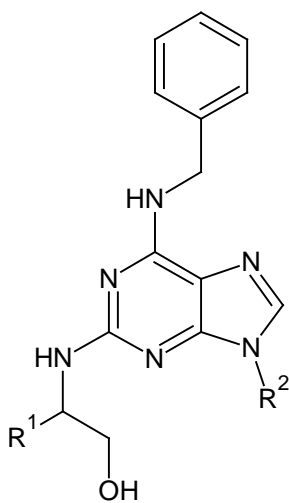
Inhibitory cyklin dependentních kinas jsou studovány pro jejich potenciál býtí budoucími cytostatiky či antivirotiky. Cyklin dependentní kinasy patří do skupiny serin/threonin protein kinas. Holoenzym CDK se skládá z proteinu s katalytickou funkcí (protein kinasa) a pozitivního regulátoru (cyklin). Jednotlivé CDK se účastní například regulace buněčného cyklu, apoptózy nebo transkripce. Spouštění jednotlivých fází buněčného cyklu je závislé na aktivitě CDK. Ztráta nad regulací buněčného dělení, vedoucí k řadě nádorových onemocnění, je spojena s pozměněnou aktivitou CDK. Látky schopné inhibovat aktivitou některých CDK vykazují cytostatickou aktivitou jak *in vivo*, tak *in vitro*. Inhibitory těch CDK, které se účastní regulace transkripce na úrovni RNA polymerasy II, představují slibný cíl pro vývoj nových virostatik ³⁸.

Mezi nízkomolekulárními inhibitory CDK můžeme nalézt nejrůznější strukturní typy látek, příkladem mohou být flavonoidy. Flavonoidy jsou po dlouhou dobu známy svou schopností inhibovat nejrůznější kinasy a řada z flavonových sloučenin v důsledku toho způsobuje



změny v buněčném růstu ³⁸. Jeden z neúčinnějších inhibitorů CDK z této skupiny látek je flavopiridol (**44**) ³⁹. Flavopiridol významně blokuje aktivitu CDK1 ($IC_{50} = 0,3 \mu M$), CDK2 ($IC_{50} = 0,4 \mu M$) a CDK4 ($IC_{50} = 0,4 \mu M$). Dále bylo zjištěno, že flavopiridol působí jako kompetitivní inhibitor vzhledem k ATP. Cytotoxické účinky flavopiridolu byly úspěšně testovány na mnoha nádorových liniích. Flavopiridol se stal prvním nízkomolekulárním inhibitorem CDK, který byl zařazen do klinických zkoušek.

Deriváty purinu byly známy jako slabé a málo specifické inhibitory CDK. První popsany purinový derivát specificky inhibující CDK1 a CDK2 byl olomoucín (**45**). Olomoucín se stal prototypem pro vývoj další řady purinových inhibitorů CDK, z nichž významné aktivity dosahovaly zejména C2, C6 a N9 substituované puriny. Byly tak objeveny účinnější látky, jako například bohemin (**46**) či roscovitin (**47**).

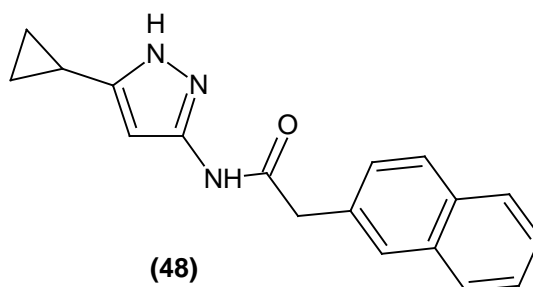


X, $R^1 = H$; $R^2 = Me$, (**46**)

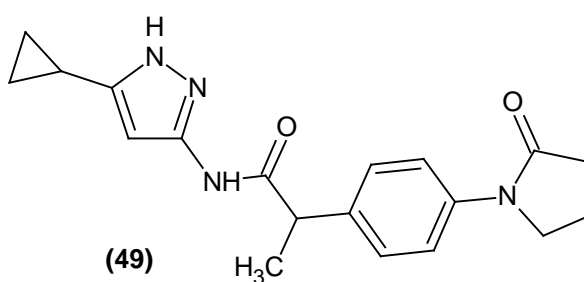
X, $R^1 = Et$; $R^2 = iPr$, (**47**)

Velmi účinné inhibitory CDK byly nalezeny v řadě derivátů 3-aminopyrazolu ^{42, 43}. Byly připraveny a testovány deriváty 3-aminopyrazolů substituované v poloze 5 alkylem, z nichž nejvýhodnější se ukázal být cyklopropylový zbytek. Zároveň byly zkoušeny různé acylové zbytky na dusíku aminoskupiny vázané v poloze 3. Výsledkem tohoto zkoumání byla látka PNU-292137 (**48**) ⁴², která inhibuje CDK2/cyklin A již v nanomolárních koncentracích ($IC_{50} = 37 \text{ nM}$). Látka (**48**) prokázala cytostatické účinky v in vitro testech. Analýzou buněčného cyklu se

prokázalo, že antiproliferační aktivita pyrazolu (**48**) je způsobena inhibicí CDK2. Následně byl pyrazol (**48**) testován in vivo na myši s implantovanou rakovinou vaječníku. Při podání 7,5 mg pyrazolu (**48**) na 1 kg tělesné váhy myši dvakrát denně po dobu 10 dní, dochází k potlačení růstu tumoru o 53 %.



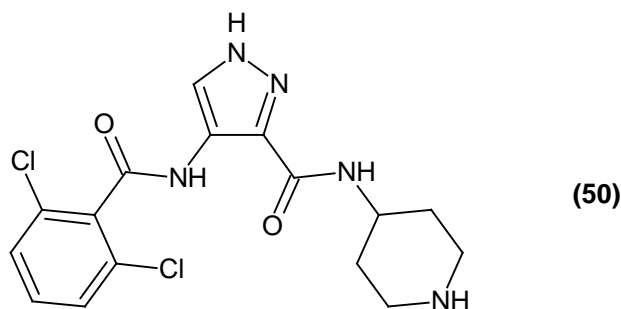
Pyrazol PNU-292137 (**48**) byl dále modifikován, tak aby se zlepšily jeho fyzikálně-chemické a farmakokinetické vlastnosti, jmenovitě rozpustnost a vazba na plazmatické proteiny. Pyrazol (**48**) je jen velmi málo rozpustný ve vodném pufru (pH 7), což ztěžuje jeho případnou intravenózní aplikaci. Zároveň se látka silně váže na sérový albumin ⁴³.



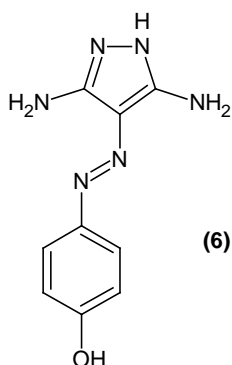
Systematickým obměňováním struktury pyrazolu (**48**) byla získána látka PHA-533533 (**49**) ⁴³, která vykazuje obdobnou inhibiční aktivitu na CDK2/cyklin A (IC₅₀ = 37 nM) jako PNU-292137. PHA-533533 (**49**) je však asi desetkrát rozpustnější ve vodném pufru. Současně se snížila vazba na sérový albumin z 99 % na 74 % oproti PNU-292137 (**48**). PHA-533533 (**49**) snižuje růst tumoru vaječníku implantovaného

myši o 73 % (dávka 7,5 mg/kg; aplikace dvakrát denně po dobu deseti dní). Přitom nebyly na myši pozorovány žádné významné projevy toxicity. Imunohistochemickou analýzou in vivo bylo prokázáno, že cytostatická aktivita látky **(49)** souvisí s inhibicí CDK2. Pyrazol **(49)** se tak stal kandidátem pro další preklinické studie.

Jednou z látek, která úspěšně absolvovala preklinické zkoušení, je pyrazolový derivát AT7519 **(50)** ⁴⁴. Pyrazol **(50)** inhibuje CDK2 již v nanomolárních koncentracích ($IC_{50} = 47$ nM). Při in vivo testech byl používán hydrochlorid pyrazolu **(50)**, ten potlačuje růst rakoviny vaječníku implantovaného myši o 86 % (aplikace 7,5 mg/kg; dvakrát denně po dobu osmi dní). Poté, co pyrazol AT7519 prošel úspěšně preklinickými zkouškami, byl zařazen do klinického testování.



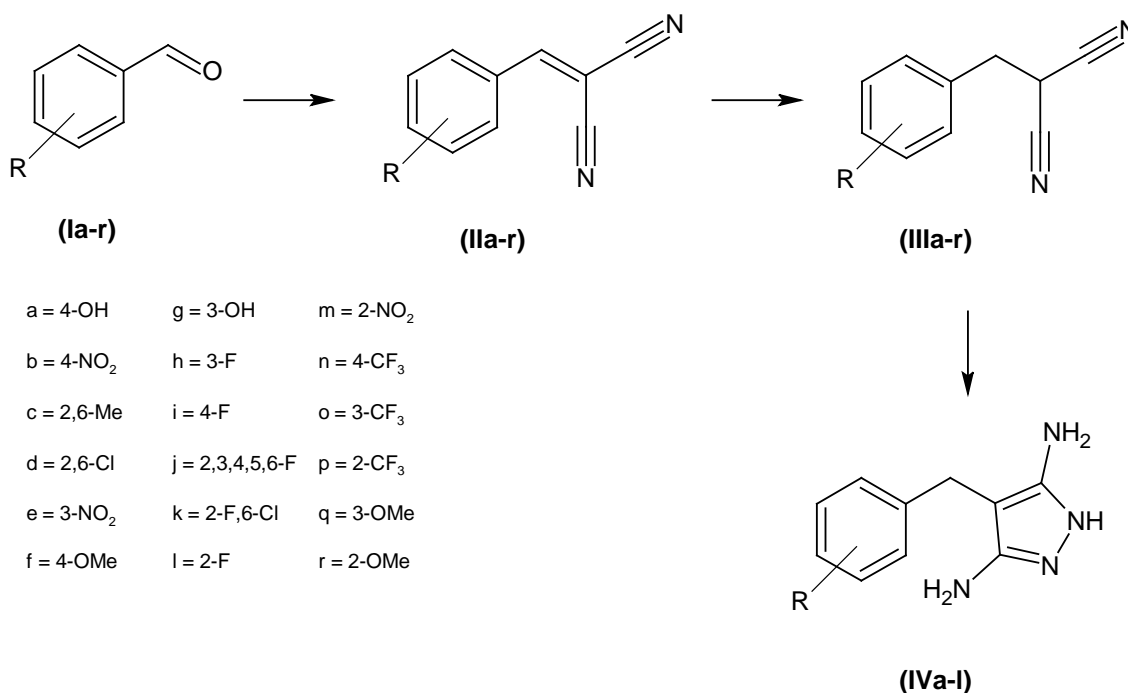
Moje práce prakticky navazuje na 4-arylo-1*H*-pyrazol-3,5-diaminy **(5)** ¹⁷, které vykazují inhibiční aktivitu na CDK. Nejúčinnější derivát **(6)** působí jako kompetitivní inhibitor CDK2/cyklin E vůči ATP, což bylo potvrzeno rentgenostrukturní analýzou.



Zároveň se pyrazol **(6)** stal jedním z nejúčinnějších inhibitorů komplexu CDK9/cyklin T1, který je pyrazolem **(6)** inhibován v submikromolární koncentraci ($IC_{50} = 0,35 \mu M$). Látka **(6)** byla testována na několika nádorových liniích. Pyrazol **(6)** blokuje proliferaci a indukuje apoptózu nádorových buněk in vitro. Na úspěchy, kterých bylo dosaženo při hledání CDK inhibitorů na bázi 3,5-diaminopyrazolového kruhu, se snažíme navázat přípravou 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu **(1)**.

3. Výsledky a diskuse

Deriváty pyrazolu (**IV**) byly připraveny cykloadicí hydrazinu na aryl(methyl)malononitrily (**III**), které se získají dvoustupňovou reakcí z komerčně dostupných derivátů benzaldehydu (**I**). Nejprve kondenzuje aldehyd (**I**) s malononitrilem a poté se vzniklý aryl(methylen)malononitril (**II**) redukuje na aryl(methyl)malononitril (**III**).



V následujícím textu jsou diskutovány přípravy pyrazolů (**IV**) a meziproductů (**II**) a (**III**). Text je členěn do podkapitol, přičemž každá podkapitola je věnována danému reakčnímu kroku. Jsou zmíněny experimentální podmínky, jako je teplota, rozpouštědlo a reakční doba, popřípadě použití katalyzátoru. Dále jsou popsány postupy izolace a purifikace připravených látek a jejich výtěžky. Charakteristiky připravených látek a podrobné návody lze najít v experimentální části (kapitola 3).

3.1 Příprava aryl(methylen)malononitrilů (II)

Aryl(methylen)malononitrily (II) byly připraveny kondenzací derivátů benzaldehydu (I) s malononitrilem v THF v přítomnosti katalytického množství piperidinu. Takto byly připraveny ve vysokém výtěžku aryl(methylen)malononitrily (IIa-d). Tyto látky byly také plně charakterizovány na základě ^1H a ^{13}C NMR spekter. Ostatní aryl(methylen)malononitrily (IIe-r) nebyly izolovány a charakterizovány, ale byly rovnou redukovány na aryl(methyl)malononitrily (III, viz kapitola 4.2.)

Metodika přípravy aryl(methylen)malononitrilů (II) z aldehydů (I) byla nejprve zkoušena na modelové reakci 4-hydroxybenzaldehydu (Ia) a 4-nitrobenzaldehydu (Ib) s malononitrilem. Cílem bylo porovnat odlišný vliv substituce na benzenovém jádře na reaktivitu aldehydu s malononitrilem. Teoreticky by měla reakce 4-nitrobenzaldehydu (Ib) s malononitrilem probíhat rychleji než obdobná reakce 4-hydroxybenzaldehydu (Ia). Důvodem je záporný mezomerní efekt nitro skupiny, která odčerpáváním elektronů zvyšuje elektronový deficit na karbonylovém uhlíku v para poloze, čímž usnadňuje adici malononitrilu na vazbu C=O. Opačně působí kladný mezomerní efekt hydroxy skupiny, která snižuje elektronový deficit na karbonylovém uhlíku v poloze para a tím snižuje ochotu karbonylového uhlíku adovat nukleofily.

Nejprve byly zkoušeny kondenzace aldehydu (Ia) a (Ib) s malononitrilem bez katalýzy. Ačkoli je v literatuře popsáno ⁴, že kondenzace derivátů benzaldehydu s malononitrilem proběhne hladce ve vodě během několika minut. Reakce malononitrilu s aldehydy (Ia) a (Ib) v THF bez přídavku vody nedoběhla ani po 3 dnech. Reakce v samotné vodě byla zkoušena také, avšak bylo od ní upuštěno, jelikož reakce probíhá v suspenzi, a je tak jen obtížně kontrolovatelná, navíc vyžaduje velmi kvalitní míchání.

Pro urychlení kondenzace aldehydu (Ia) a (Ib) s malononitrilem v homogenním prostředí (v THF), byla využita bazická katalýza. Byly odzkoušeny běžně dostupné báze, konkrétně piperidin, morfolin, uhličitán draselný a octan sodný. Báze byly dávkovány v množství pěti molárních procent do reakce 4-

hydroxybenzaldehydu (**Ia**) s malononitrilem. Přitom byl získán příslušný aryl(methylen)malononitril (**IIa**) ve vysokém výtěžku do 24 hodin.

Zopakování reakce s 4-nitrobenzaldehydem (**Ib**) však vedlo jen ke směsi látek, ze které se nepodařilo aryl(methylen)malononitril (**IIb**) izolovat. Nízká selektivita reakce byla způsobena příliš velkým množstvím dávkovaného katalyzátoru (5 mol %). Optimalizace dávkování katalyzátoru byla dále testována pouze s piperidinem. Množství použitého piperidinu bylo sníženo na dvě molární procenta. Za těchto podmínek reakce doběhne do 24 hodin, ale aryl(methylen)malononitril (**IIb**) se získá v nevalné čistotě. Z tohoto důvodu bylo množství piperidinu sníženo až na jedno molární procento. Reakce doběhne do 24 hodin při laboratorní teplotě. Produkt (**IIb**) se po odreagování jednoduše sráží z reakční směsi vodou. Surový produkt se získá ve výtěžku 96 % a taje v rozmezí 150-158 °C. Jednou rekrystalizací z EtOH se získá analyticky čistá látka o bodu tání 158-159 °C.

Optimalizované podmínky (laboratorní teplota, 24 hodin, 1 % piperidinu) byly rovněž uplatněny na kondenzaci 4-hydroxybenzaldehydu (**Ia**) s malononitrilem. (4-Hydroxybenzyliden)malononitril (**IIa**) byl získán v 94 % výtěžku. Surový produkt je dostatečně čistá dobře krystalizující látka o bodu tání 188-189 °C, lze jej krystalizovat například z vodného alkoholu.

Po ověření optimálních reakčních podmínek (laboratorní teplota, 24 hodin, 1 % piperidinu) byla provedena paralelně kondenzace malononitrilu se všemi aldehydy (**Ia-r**), kromě 2,6-dimethylbenzaldehydu (**Ic**), který vyžadoval delší reakční dobu (48 hodin) velmi pravděpodobně z důvodů sterického bránění. Z aryl(methylen)malononitrilů (**IIa-r**) byly izolovány a charakterizovány pouze aryl(methylen)malononitrily (**IIa-d**). Aryl(methylen)malononitrily (**IIe-r**) jsou již známé látky, které byly bez izolace ihned redukovány na aryl(methyl)malononitrily (**IIIe-r**, viz kapitola 4.2.).

Novými popsanými látkami ze skupiny aryl(methylen)malononitrilů jsou (2,6-dimethylbenzyliden)malononitril (**IIc**) a (2,6-dichlorbenzyliden)malononitril (**IIId**). Nově popsané látky (**IIc**) a (**IIId**) se byly získány ve výtěžku 98 % a 80 %.

3.2. Příprava aryl(methyl)malononitrilů (III)

Aryl(methyl)malononitrily (**IIIa-j**) a (**III n-r**) byly připraveny redukcí příslušných aryl(methylen)malononitrilů (**II**) pomocí NaBH_3CN v přítomnosti kyseliny octové. Aryl(methyl)malononitrily (**IIIk-m**) byly nasyntetizovány kondenzací příslušných aldehydů (**Ik-m**) s malononitrem v přítomnosti ekvivalentního množství dihydropyridinu (**V**).

Metodu na redukcí $\text{C}=\text{C}$ vazby aryl(methylen)malononitrilů (**II**) byla vypracována na derivátech (**IIa**) a (**IIb**). Nejprve byl učiněn pokus redukovat aryl(methylen)malononitril (**IIa**) pomocí kyanoborohydridu sodného v THF, avšak byla získána pouze pestrá směs látek, ze které se aryl(methyl)malononitril (**IIIa**) nepovedlo izolovat. Dále byla testována změna rozpouštědla, namísto THF byl zkoušen MeOH, avšak ani změna z aprotického na protické prostředí nevedla k úspěchu. Reakce v aprotickém prostředí THF byla znovu provedena, ale tentokrát byla navíc přidána kyselina octová. Redukce (**IIa**) pomocí NaBH_3CN v systému THF-AcOH proběhla úspěšně. Aryl(methyl)malononitril (**IIIa**) se povedlo izolovat a jednou krystalizací přečistit na analyticky čistou látku. Přitom bylo použito desetimolárního přebytku AcOH vzhledem k aryl(methylen)malononitrilu (**IIa**). Množství AcOH bylo dále optimalizováno na dvoumolární přebytek, jenž bohatě dostačoval na úspěšné provedení redukce. Kyselina octová plní roli pufru, díky tomu je pH udržováno ve výhodném rozmezí pro redukcí

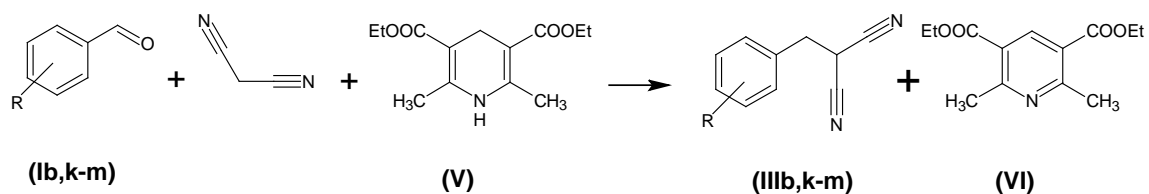
Za optimalizovaných podmínek byla zkoušena redukce aryl(methylen)malononitrilu (**IIb**) na aryl(methyl)malononitril (**IIIb**). I zde se kyanoborohydrid sodný v THF a v přítomnosti dvou ekvivalentů kyseliny octové vyplatil.

Oba aryl(methyl)malononitrily (**IIIa**) a (**IIIb**) byly získány redukcí izolovaných aryl(methylen)malononitrilů (**IIa**) a (**IIb**). Bylo třeba vyzkoušet, jestli je nutné pracovat s izolovanými a přečištěnými aryl(methylen)malononitrily (**II**), nebo zdali lze provést redukcí ihned po kondenzaci, aniž by bylo nutné meziprodukty (**II**) izolovat. Proto byla provedena kondenzace aldehydů (**Ia**) i (**Ib**) s malononitrem v přítomnosti katalytického množství piperidinu (viz kapitola 4.1.). Po doběhnutí kondenzace (24 hodin), bez izolace produktu, byla do reakční směsi přidána AcOH a

následně NaBH_3CN v THF. Tímto postupem se podařilo získat oba aryl(methyl)malononitrily (**IIIa**) a (**IIIb**). Obě látky lze z reakční směsi velmi snadno izolovat. Stačí zahustit reakční směs a poté srážet produkt přidáním vody. Oba produkty (**IIIa**) a (**IIIb**) jsou dobře krystalizující látky, ze kterých se po jedné krystalizaci ze směsi MeOH-voda získají analyticky čisté vzorky.

Jakmile byl vyvinut obecný návod na přípravu aryl(methyl)malononitrilů (**III**) z aldehydů (**I**), který byl vypracován na aldehydech (**Ia**) a (**Ib**), byla provedena paralelně syntéza i s aldehydy (**Ic-j**) a (**In-r**). Tímto postupem byly získány aryl(methyl)malononitrily (**IIIc-j, n-r**) ve výtěžcích 37 až 70 %. Všechny produkty byly získány v čisté formě a byly plně charakterizovány na základě ^1H a ^{13}C NMR spekter. Aryl(methyl)malononitrily (**IIIa,b,d,e,i,j**) byly snadno z reakční směsi izolovány, stačilo je jen vysrážet přidáním vody a látky poté překrystalizovat ze směsi MeOH-voda. Aryl(methyl)malononitrily (**IIIc,f-h,n-r**) se přidáním vody nesrážely, ale vytvořily emulze, tudíž izolační postup musel být upraven. Produkty byly z reakční směsi nejprve extrahovány a poté přečištěny na koloně.

Aryl(methyl)malononitrily (**IIIk-m**) byly připraveny alternativním postupem, který byl nejprve odzkoušen na přípravě aryl(methyl)malononitrilu (**IIIb**). 4-nitrobenzaldehyd (**Ib**) byl ponechán reagovat ve vřoucím ethanolu s malononitrem v přítomnosti ekvivalentního množství dihydropyridinu (**V**), který působí jako katalyzátor reakce a redukční činidlo zároveň. Reakce je ukončena po 3 hodinách. Směs stačí ochladit na laboratorní teplotu a aryl(methyl)malononitril (**IIIb**) vykryštalizuje z ethanolického roztoku. Po odfiltrování byl produkt promyt zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, aby se odstranily zbytky pyridinu (**VI**). Touto alternativní metodou byl získán aryl(methyl)malononitril (**IIIb**) ve výtěžku 77 %. a o bodu tání 150-151 °C. Pro přípravu aryl(methyl)malononitrilu (**IIIb**) je tato metoda daleko výhodnější než výše popsaná kondenzace katalyzovaná piperidinem a následná redukce pomocí NaBH_3CN . Metodou využívající redukční vlastnosti dihydropyridinu (**V**) byly připraveny aryl(methyl)malononitrily (**IIIk-m**) ve výtěžku 72, 70 a 97 %. Všechny tři reakce byly provedeny ve vřoucím ethanolu a produkty (**IIIk-m**) byly vyizolovány po extrakci a následné chromatografické separaci v čisté formě.



b = 4-NO₂

k = 2-Cl,6-F

l = 2-F

m = 2-NO₂

Celkem bylo dvěma různými metodami připraveno a charakterizováno osmnáct aryl(methyl)malononitrilů (**IIIa-r**). Všechny látky byly získány v čistém stavu a byly plně charakterizovány na základě ¹H a ¹³C NMR spekter. Nově popsány látkami jsou aryl(methyl)malononitrily (**IIIc,k,l,o,p**).

3.3. Příprava 4-aryl(methyl)-1H-pyrazol-3,5-diaminu (**IV**)

Pyrazoly obecného vzorce (**IV**) byly připraveny cykloadicí hydrazinu na aryl(methyl)malononitrily (**III**). Nejprve byla zkoušena reakce 2-(4-hydroxybenzyl)malononitrilu (**IIIa**) s hydrátem hydrazinu v tetrahydrofuranu. Po odreagování a odpaření rozpouštědla zůstala lepivá sirupovitá hmota. Na základě HPLC-MS analýzy bylo vidět, že je příslušný pyrazol (**IVa**) ve směsi přítomen, ale nepodařilo se jej izolovat a přečistit. Pokud se reakce provede ve vroucím methanolu, získá se po odpaření methanolu krystalická látka, kterou lze překrystalizovat např. ze směsi MeOH-AcOEt. V této formě je pyrazol (**IVa**) o bodu tání 203 až 205 °C dostatečně čistý.

Reakce hydrátu hydrazinu s 2-(4-nitrobenzyl)malononitrilem (**IIIb**) v tetrahydrofuranu vede pouze k lepivé sirupovité látce, která podle HPLC-MS sice obsahuje pyrazol (**IVb**), ten se ale nepovedlo izolovat a vyčistit. Pokud se reakce provede ve vroucím methanolu, získá se pyrazol (**IVb**) opět v krystalické formě. Rekrystalizaci lze provést stejně jako u pyrazolu (**IIIa**) ze směsi MeOH-AcOEt.

Další možností přečištění pyrazolu (**IVb**), je jeho převedení na hydrochlorid rozpustný ve vodě a po promytí ethyl acetátem byl pyrazol znovu vysrážen pomocí vodného roztoku amoniaku.

Pyrazoly (**IVc-l**) byly získány z příslušných aryl(methyl)malononitrilů (**IIIc-l**) zahříváním s 1,2 ekvivalenty hydrazinu v methanolu. Po odreagování (4 až 9 hodin) se methanol odpaří a zbytek se rozetře s dichlormethanem a odfiltruje. Většinou se získají dostatečně čisté produkty (ve výtěžku 28 – 88 %), případně je lze překrystalizovat například ze směsi MeOH-AcOEt.

Z aryl(methyl)malononitrilů (**III m-r**) se příslušné pyrazoly sice podařilo připravit, ale nebyly získány dostatečně čisté, tak aby je bylo možno charakterizovat. Aryl(methyl)malononitrily (**III m-r**) byly zahřívány s 1,2 ekvivalenty hydrazinu hydrátu. Po odreagování výchozího aryl(methyl)malononitrilu se odstranil MeOH. V olejovitém odparku byl na základě HPLC-MS identifikován žádaný produkt. Pyrazoly (**IV m-r**) byly poté převedeny na hydrochloridy pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. U těchto hydrochloridů byly učiněny pokusy o přečištění rekrytalizací nebo extrakcí mezi vodou a organickou fází (DCM případně AcOEt). Po nezdárném průběhu izolace těchto produktů v čistém stavu byly pyrazoly (**IV m-r**) alternativně zkoušeny přečistit ve formě acetátů či vinnanů, avšak i tyto pokusy nebyly úspěšné.

Celkem bylo připraveno a charakterizováno dvanáct pyrazolů (**IVa-l**). Pyrazol (**IVe**) byl již dříve popsán, zatímco pyrazoly (**IVa-d,f-l**) jsou nově popsané látky. Všechny pyrazoly (**IVa-l**) byly získány v čisté formě a byly charakterizovány na základě bodu tání, HPLC-MS, ^1H NMR a ^{13}C NMR.

4. Experimentální část

Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 MHz DRX spectrometer v deuterovaném DMSO. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách. LC-MS spektra byla měřena na UHPLC-MS systému UHPLC Accela, trojitý kvadrupól TSQ Quntum Access (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

Obecná příprava aryl(methylen)malononitrilu (II)

5 mmol malononitrilu se rozpustí v 5 ml THF a přidá se 5 mmol aldehydu a 0,05 mmol piperidinu. Směs se míchá za laboratorní teploty 24 hodin. Potom se produkt sráží přidávkem 25 ml vody a odfiltruje se. Surový produkt se přičestí krystalizací.

2-(4-hydroxybenzyliden)malononitril (IIa)

Připraven z 4-hydroxybenzaldehydu. 0,80 g (94 %), mp 188–189 °C (EtOH/H₂O). MS (-APCI, *m/z*): 168.97. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.96 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 7.88 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 8.27 (s, 1 H), 11.05 (br, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 75.1, 114.1, 115.1, 116.6, 122.7, 133.8, 160.4, 163.9.

2-(4-nitrobenzyliden)malononitril (IIb)

Připraven z 4-nitrobenzaldehydu. 0,96 g (96 %), mp 159-160 °C (EtOH). MS (+APCI, *m/z*): 198.85. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.13 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H), 8.43 (d, *J*=8.7, 2 H), 8.72 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 85.9, 112.5, 113.6, 124.3, 131.4, 136.6, 149.7, 159.2.

2-(2,6-dimethylbenzyliden)malononitril (IIc)

Připraven z 2,6-dimethylbenzaldehydu. 0,89 g (98 %), mp 78-80 °C. MS (-APCI, *m/z*): 181.93. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.28 (s, 6 H), 7.18 (d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 7.30 (t, *J*=7.5 Hz, 1 H), 8.85 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 19.5, 90.3, 112.0, 112.9, 127.9, 130.3, 131.1, 135.7, 165.6.

2-(2,6-dichlorbenzyliden)malononitril (II d)

Připraven z 2,6-dichlorbenzaldehydu. 0,89 g (80 %), mp 73-74 °C. MS (-APCI, *m/z*): 221.87, 223.88. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.02 - 7.93 (m, 3H), 8.85 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 93.1, 111.0, 112.0, 128.9, 129.1, 132.7, 133.4, 159.5.

Obecná příprava aryl(methyl)malononitrilu (III).

Metoda A

5 mmol malononitrilu v THF (5 ml) se přidá k 5 mmol aldehydu. Za míchání se přidá 0,05 mmol piperidinu a míchá se 24 hodin za laboratorní teploty. Potom se přidá 0,6 ml AcOH a následně 5 mmol NaBH₃CN v THF (15 ml). Po 3 hodinách se rozpouštědla odpaří na RVO a ke zbytku se přidá 30 ml H₂O. Vyloučené krystalky se odsají a rekrystalizují z MeOH/H₂O. V případě, že se produkt vyloučí ve formě oleje, extrahuje se do 20 ml DCM a čistí chromatograficky (eluent DCM).

Metoda B

Malononitril (5 mmol), aldehyd (5 mmol), diethyl 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát (5,02 mmol) a 20 ml EtOH se přivedou k varu. Po vymizení výchozí látky na TLC se EtOH odpaří na RVO. Odparek se rozpustí v 20 ml DCM a promyje se 3x 20 ml 1M HCl. DCM se odpaří na RVO a odparek se čistí chromatograficky (eluent DCM).

2-(4-hydroxybenzyl)malononitril (IIIa)

Připraven z 4-hydroxybenzaldehydu (metoda A). 0,54 g (63 %), mp 173-176 °C (MeOH, H₂O). MS (-APCI, *m/z*): 170.96. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.19 (d, *J*=6.7 Hz, 2 H), 4.99 (t, *J*=6.8 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H), 7.16 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 9.49 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 25.3, 36.1, 112.2, 116.1, 125.1, 130.6, 156.0.

2-(4-nitrobenzyl)malononitril (IIIb)

Připraven z 4-nitrobenzaldehydu (metoda B). 0,51 g (51 %), mp 153-154 °C (MeOH). MS (-APCI, *m/z*): 199.86. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.54 (d, *J*=7.1 Hz, 2 H), 5.22 (t, *J*=7.0 Hz, 1 H), 7.67 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 8.27 (d, *J*=8.7 Hz, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.8, 33.8, 113.7, 123.7, 130.8, 142.4, 147.2.

2-(2,6-dimethylbenzyl)malononitril (IIIc)

Připraven z 2,6-dimethylbenzaldehydu (metoda A). 0,45 g (49 %), mp 71-73 °C. MS (-APCI, *m/z*): 183.04. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.37 (s, 6 H), 3.44 (d,

$J=8.2$ Hz, 2 H), 4.99 (t, $J=8.2$ Hz, 1 H), 6.85 - 7.25 (m, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 19.5, 21.6, 28.7, 114.0, 127.6, 128.3, 131.2, 137.2.

2-(2,6-dichlorobenzyl)malononitril (III d)

Připraven z 2,6-dichlorobenzaldehydu (metoda A). 0,79 g (70 %), mp 84-86 °C (MeOH/H₂O). MS (-APCI, m/z): 222.82. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.68 (d, $J=7.8$ Hz, 2 H), 5.17 (t, $J=7.9$ Hz, 1 H), 7.44 (dd, $J=8.7$, 7.3 Hz, 1 H), 7.57 (d, $J=7.8$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.2, 30.5, 113.3, 128.9, 130.1, 131.0, 135.4.

2-(3-nitrobenzyl)malononitril (III e)

Připraven z 3-nitrobenzaldehydu (metoda A). 0,54 g (54 %), mp 126-128 °C (MeOH). MS (-APCI, m/z): 199.91. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.56 (d, $J=7.3$, 2 H), 5.22 (t, $J=7.2$, 1 H), 7.71 (t, $J=8.0$ Hz, 1 H), 7.86 (d, $J=7.7$, 1 H), 8.22 (dd, $J=8.2$, 1.2, 1 H), 8.34 (s, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 23.9, 33.6, 113.7, 122.9, 124.2, 130.1, 136.2, 136.9, 147.8.

2-(4-methoxybenzyl)malononitril (III f)

Připraven z 4-methoxybenzaldehydu (metoda A). 0,34g (40 %), mp 80-81 °C MS (-APCI, m/z): 184.98. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.26 (d, $J=6.7$ Hz, 2 H), 3.75 (s, 3 H), 5.03 (t, $J=6.8$ Hz, 1 H), 6.95 (d, $J=8.6$ Hz, 2 H), 7.29 (d, $J=8.6$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.5, 33.8, 55.0, 114.0, 114.0, 126.4, 130.5, 158.9.

2-(3-hydroxybenzyl)malononitril (III g)

Připraven z 3-hydroxybenzaldehydu (metoda A). 0,52 g (60 %), mp 77-78 °C. MS (-APCI, m/z): 170.88. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.23 (d, $J=6.7$ Hz, 2 H), 5.05 (t, $J=6.8$ Hz, 1 H), 6.63 - 6.86 (m, 3 H), 7.18 (t, $J=7.8$ Hz, 1 H), 9.54 (s, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.2, 34.5, 114.1, 114.9, 116.1, 119.8, 129.6, 135.9, 157.4.

2-(3-fluorbenzyl)malononitril (III h)

Připraven z 3-fluorobenzaldehydu (metoda A). 0,42 g (48 %). MS (-APCI, m/z): 172.91. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.38 (d, $J=6.9$ Hz, 2 H), 5.14 (t, $J=7.1$ Hz, 1 H), 7.09 - 7.31 (m, 3 H), 7.45 (td, $J=7.9$, 6.4 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.0, 34.0, 113.8, 114.6, 114.9, 115.9, 116.2, 125.50, 125.53, 130.5, 130.6, 137.3, 137.4, 160.3, 163.6.

2-(4-fluorbenzyl)malononitril (IIIi)

Připraven z 4-fluorobenzaldehydu (metoda A). 0,55 g (64 %), mp 107-110 °C (MeOH/H₂O). MS (-APCI, *m/z*): 172.94. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.34 (d, *J*=7.1 Hz, 2 H), 5.08 (t, *J*=6.9 Hz, 1 H), 7.08 – 7.31 (m, 2 H), 7.36 – 7.51 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.3, 33.6, 113.9, 115.3, 115.5, 130.91, 130.93, 131.3, 131.4, 160.2, 163.4, 220.8.

2-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)malononitril (IIIj)

Připraven z 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehydu (metoda A). 0,73 g (60 %), mp 95-98 °C (MeOH/H₂O). MS (-APCI, *m/z*): 244.84. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3,55 (s).

2-(2-chloro-6-fluorbenzyl)malononitril (IIIk)

Připraven z 2-chloro-6-fluorobenzaldehydu (metoda B). 0,75 g (72 %), mp 119-120 °C. MS (-APCI, *m/z*): 206.94, 208.93. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.55 (dd, *J*=7.3, 1.4 Hz, 2 H), 5.15 (t, *J*=7.4 Hz, 1 H), 7.24 - 7.39 (m, 1 H), 7.39 - 7.56 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.9, 26.3, 26.4, 113.4, 114.6, 114.9, 120.1, 120.3, 125.82, 125.87, 131.1, 131.3, 134.82, 134.89, 159.5, 162.8.

2-(2-fluorbenzyl)malononitril (IIIl)

Připraven z 2-fluorobenzaldehydu (metoda B). 0,60 g (70 %), mp 68-70 °C. MS (-APCI, *m/z*): 173.01. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.41 (d, *J*=6.7 Hz, 2 H), 5.14 (t, *J*=6.9 Hz, 1 H), 7.16 - 7.34 (m, 2 H), 7.36 - 7.55 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.4, 28.02, 28.05, 113.8, 115.4, 115.7, 121.3, 121.5, 124.74, 124.78, 130.3, 130.1, 131.7, 131.8, 159.0, 162.2.

2-(2-nitrobenzyl)malononitril (III m)

Připraven z 2-nitrobenzaldehydu (metoda B). 0,97 g (97 %), mp 85-86 °C. MS (-APCI, *m/z*): 199.99. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.73 (d, *J*=7.5 Hz, 2 H), 5.23 (t, *J*=7.4 Hz, 1 H), 7.57 - 7.74 (m, 2 H), 7.77 - 7.91 (m, 1 H), 8.16 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.3, 32.0, 113.7, 125.4, 129.5, 129.9, 133.1, 134.2, 148.5.

2-(4-trifluormethylbenzyl)malononitril (III n)

Připraven z 4-trifluormethylbenzaldehydu (metoda A). 0,62 g (55 %). MS (-APCI, *m/z*): 222.87. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.48 (d, *J*=6.9 Hz, 2 H), 5.18 (t, *J*=7.0 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.78 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz,

DMSO-*d*₆) δ ppm 23.8, 33.9, 113.7, 122.2, 125.3, 125.4, 125.4, 125.8, 128.2, 128.6, 130.2, 139.4.

2-(3-trifluormethylbenzyl)malononitril (IIIo)

Připraven z 3-trifluormethylbenzaldehydu (metoda A). 0,54 g (48 %). MS (-APCI, *m/z*): 222.93. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.49 (d, *J*=6.9 Hz, 2 H), 5.18 (t, *J*=7.1 Hz, 1 H), 7.59 - 7.75 (m, 3 H), 7.79 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.8, 33.9, 113.7, 122.2, 125.3, 125.4, 125.4, 125.8, 128.2, 128.6, 130.2, 139.4.

2-(2-trifluormethylbenzyl)malononitril (IIIp)

Připraven z 2-trifluormethylbenzaldehydu (metoda A). 0,72 g (64 %). MS (-APCI, *m/z*): 229.94. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.54 (d, *J*=7.6 Hz, 2 H), 5.22 (t, *J*=7.6 Hz, 1 H), 7.49 - 7.64 (m, 1 H), 7.65 - 7.88 (m, 3 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.4, 31.0, 113.5, 122.2, 125.8, 126.1, 126.1, 126.2, 126.3, 127.5, 127.9, 128.6, 131.5, 132.5, 132.8.

2-(3-methoxybenzyl)malononitril (IIIq)

Připraven z 3-methoxybenzaldehydu (metoda A). 0,35 g (37 %). MS (-APCI, *m/z*): 184.96. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.31 (d, *J*=6.9 Hz, 2 H), 3.76 (s, 3 H), 5.11 (t, *J*=7.2 Hz, 1 H), 6.85 - 7.01 (m, 3 H), 7.30 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.1, 34.5, 55.0, 113.1, 114.0, 115.0, 121.3, 129.6, 136.1, 159.2.

2-(2-methoxybenzyl)malononitril (IIIr)

Připraven z 2-methoxybenzaldehydu (metoda A). 0,53 g (57 %). MS (-APCI, *m/z*): 184.98. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.30 (d, *J*=6.9, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 5.02 (t, *J*=7.2 Hz, 1 H), 6.96 (td, *J*=7.4, 0.9 Hz, 1 H), 7.05 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H), 7.24-7.41 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.7, 29.8, 55.3, 111.0, 114.0, 120.3, 122.2, 129.6, 130.8, 157.2.

Obecná příprava 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (IV)

2,5 mmol benzylmalononitrilu se rozpustí v MeOH (17 ml), přidá se 2,75 mmol N₂H₄*H₂O a refluxuje se do vymizení výchozí látky na TLC (4 až 9 hodin). Poté se MeOH odpaří na RVO a zbytek se rozetře s 20 ml DCM. Krystalky se odsají a promyjí 2x 20 ml DCM. Surový produkt se rekrystalizuje ze směsi MeOH - AcOEt.

4-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)methyl]fenol (IVa).

Připraven z 2-(4-hydroxybenzyl)malononitrilu (IIIa). 0,31 g (60 %), mp 203-205 °C. MS (+APCI, *m/z*): 205.8. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.37 (s, 2 H), 4.21 (NH), 6.61 (d, *J*=8.2 Hz, 2 H), 7.00 (d, *J*=8.2 Hz, 2 H), 9.51 (OH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.1, 87.4, 114.7, 129.0, 132.4, 149.2, 155.0.

4-(4-nitrobenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVb)

Připraven z 2-(4-nitrobenzyl)malononitrilu (IIIb). 0,28 g (47 %), mp 155-156 °C. MS (+APCI, *m/z*): 234.06. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.65 (s, 2 H), 4.43 (NH), 7.48 (d, *J*=8.7 Hz, 2 H), 8.11 (d, *J*=8.7 Hz, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.3, 85.3, 123.1, 129.2, 145.4, 149.5, 151.2.

4-(2,6-dimethylbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVc)

Připraven z 2-(2,6-dimethylbenzyl)malononitrilu (IIIc). 0,15 g (29 %), mp 170-173 °C. MS (+APCI, *m/z*): 217.14. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.24 (s, 6 H), 3.48 (s, 2 H), 6.98 – 7.03 (m, 3 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 19.8, 22.6, 83.4, 125.8, 127.9, 136.4, 136.5, 148.7.

4-(2,6-dichlorobenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVd)

Připraven z 2-(2,6-dichlorobenzyl)malononitrilu (IIIId). 0,38 g (59 %), mp 182-190 °C. MS (+APCI, *m/z*): 257.07; 258.95. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.74 (s, 2 H), 4.26 (NH), 7.13 – 7.33 (m, 1 H), 7.44 (d, *J*=8.0, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.1, 83.3, 128.4, 134.7, 135.7, 148.9.

4-(3-nitrobenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVe)

Připraven z 2-(3-nitrobenzyl)malononitril (IIIe). 0,42 g (72 %), mp 147-149 °C. MS (+APCI, *m/z*): 234.14. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.67 (s, 2 H); 4.71 (NH); 7.47 - 7.59 (m, 1 H); 7.71 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H); 8.00 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H), 8.09 (s, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.4, 85.7, 120.5, 122.7, 129.3, 135.3, 145.2, 147.7, 149.6.

4-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVf)

Připraven z 2-(4-methoxybenzyl)malononitrilu (IIIff). 0,48 g (88 %), mp 143-145 °C. MS (+APCI, *m/z*): 219.12. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.43 (s, 2 H); 3.69 (s, 3 H); 4.22 (NH); 6.79 (d, *J*=8.6, 2 H); 7.13 (d, *J*=8.6, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.0, 54.9, 87.2, 113.3, 129.0, 134.3, 149.4, 157.1.

3-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)methyl]fenol (IVg)

Připraven z 2-(3-hydroxybenzyl)malononitrilu (IIIg). 0,34 g (68 %), mp 217-219 °C. MS (+APCI, *m/z*): 205.16. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.44 (s, 2 H), 4.33 (NH), 6.52 (dd, *J*=7.8, 1.7, 1 H), 6.63 (s, 1H), 6.66 (d, *J*=7.3, 1 H), 7.01 (t, *J*=7.8, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.9, 86.6, 112.4, 115.2, 118.9, 128.8, 143.8, 149.5, 157.2.

4-(3-fluorbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVh)

Připraven z 2-(3-fluorobenzyl)malononitrilu (IIIh). 0,23 g (44 %), mp 123-124 °C. MS (+APCI, *m/z*): 207.12. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.52 (s, 2 H), 4.37 (NH), 6.92 (td, *J*=8.6, 2.3, 1 H), 7.01 (d, *J*=10.6, 1 H), 7.08 (d, *J*=7.6, 1 H), 7.19 - 7.30 (m, 1 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.6, 86.25, 111.7, 112.0, 114.6, 114.8, 124.2, 124.3, 129.5, 129.7, 145.81, 145.89, 160.5, 163.8.

4-(4-fluorbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVi)

Připraven z 2-(4-fluorobenzyl)malononitrilu (IIIi). 0,26 g (52 %), mp 150-152 °C. MS (+APCI, *m/z*): 207.10. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.49 (s, 2 H), 4.36 (NH), 7.04 (t, *J*=8.9, 2 H), 7.16 - 7.33 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 26.0, 86.8, 114.3, 114.6, 129.7, 129.8, 138.70, 138.73, 149.3, 158.8, 162.0.

4-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVj)

Připraven z 2-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)malononitrilu (IIIj). 0,23 g (33 %), mp 200-202 °C. MS (+APCI, *m/z*): 279.05. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.60 (s, 2 H), 4.24 (NH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 14.4, 83.5.

4-(2-chloro-6-fluorbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVk)

Připraven z 2-(2-chloro-6-fluorobenzyl)malononitrilu (IIIk). 0,39 g (66 %), mp 161-168 °C (MeOH, AcOEt). MS (+APCI, *m/z*): 241.02, 243.01. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H), 4.48 (NH), 7.08 - 7.23 (m, 1 H), 7.24 - 7.39 (m, 2 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 18.8, 18.9, 84.2, 114.2, 114.5, 125.4, 125.5, 126.4, 126.6, 128.3, 128.4, 133.9, 134.0, 149.0, 159.4, 162.6.

4-(2-fluorbenzyl)-1H-pyrazol-3,5-diamin (IVl)

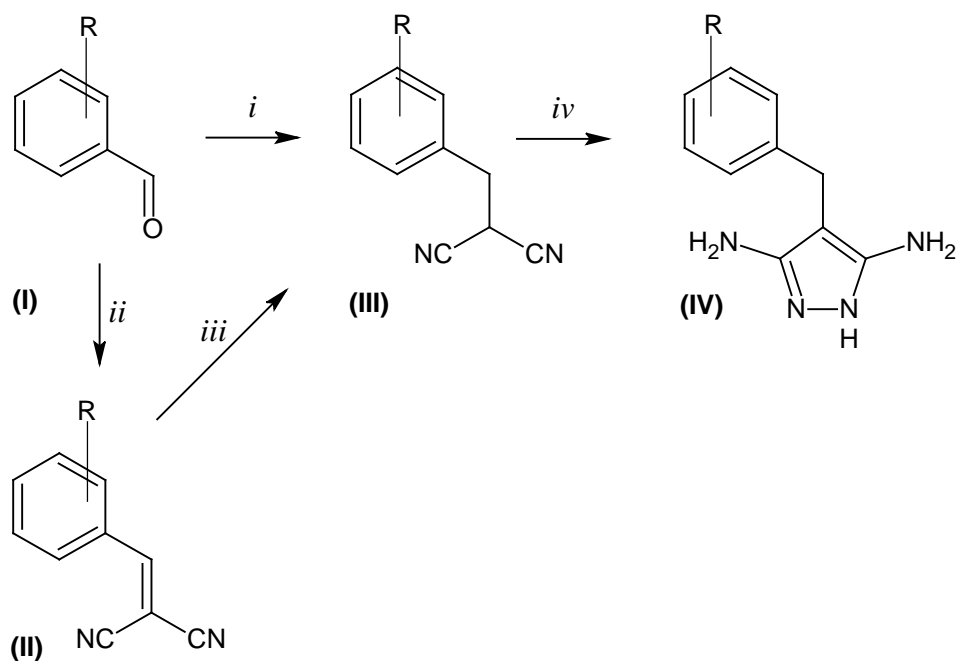
Připraven z 2-(2-fluorobenzyl)malononitrilu (IIIl). 0,34 g (67 %), mp 150-151 °C. MS (+APCI, *m/z*): 207.15. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.55 (s, 2 H), 4.35 (NH), 6.78 - 7.32 (m, 4 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 19.7, 19.8, 84.2,

114.5, 114.7, 123.9, 124.0, 127.2, 127.3, 128.5, 128.7, 130.22, 130.28, 149.6, 158.8,
162.0.

|

5. Závěr

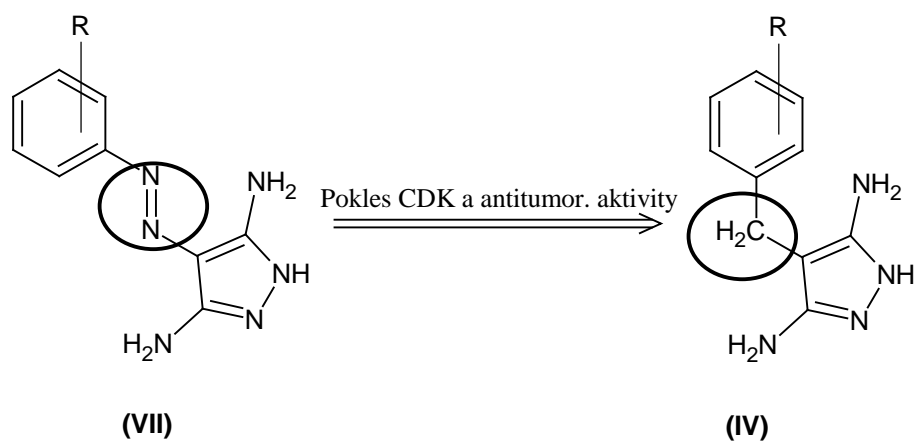
Byla vypracována tříkroková syntéza derivátů 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminu (**IV**), která vychází z komerčně dostupných derivátů benzaldehydu (**I**). Celkem bylo připraveno dvanáct pyrazolů (**IVa-l**) reakcí aryl(methyl)malononitrilů (**IIIa-l**) s $N_2H_4 \cdot H_2O$ v methanolicém roztoku. Pyrazoly (**IVm-r**), připravované z nitrilů (**IIIm-r**), byly identifikovány ve směsi na základě HPLC-MS, ale nepodařilo se je izolovat a charakterizovat na základě NMR spekter. Aryl(methyl)malononitrily (**IIIa-j,n-r**) byly připraveny ve dvou krocích. Nejprve se kondenzací aldehydů (**Ia-j,n-r**) s malononitrem v přítomnosti katalytického množství piperidinu připravily deriváty aryl(methylen)malononitrilu (**IIa-j,n-r**). Nenasycené nitrily (**IIa-j,n-r**) pak byly bez izolace redukovány pomocí $NaBH_3CN$ v přítomnosti AcOH na nasycené nitrily (**IIIa-j,n-r**). Aryl(methyl)malononitrily (**IIIb,k-m**) byly připraveny alternativním postupem tak, že příslušné aldehydy byly refluxovány v ethanolickém roztoku s ekvivalentním množstvím malononitrilu a diethyl 1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylátu (**V**).



*i) malononitril, diethyl 1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát, EtOH, reflux
ii) 1% piperidin, THF, rt, 24h iii) $NaBH_3CN$, AcOH, THF, rt, 4h iv)
 $N_2H_4 \cdot H_2O$, MeOH, reflux.*

U připravených derivátů pyrazolu (**IVa-l**) byla studována inhibiční aktivita na CDK2/cyklinE a antiproliferační aktivita na nádorové lince K562 (myelogenní leukémie) a MCF7 (rakovina prsu). Enzymová aktivita byla testována při maximální koncentraci inhibitoru 100 μM , při těchto koncentracích nebyl ani jeden z pyrazolů (**IVa-l**) účinný inhibitor. Taktéž žádný z pyrazolů (**IVa-l**) nevykazoval cytotoxicitu na nádorové lince K562 a MCF7.

4-arylazo-1*H*-pyrazol-3,5-diaminy (**VI**) jsou poměrně účinnými inhibitory CDK¹⁷, nejúčinnější z nich (**VII**) inhibuje CDK2/cyklinE v koncentraci 3,5 μM a také vykazuje antiproliferační aktivitu na nádorové lince K562 a MCF7. 4-aryl(methyl)-1*H*-pyrazol-3,5-diaminy (**IVa-l**) jsou neúčinné jak na CDK, tak na nádorové buňky. Z těchto faktů lze vyvodit závěr, že záměnou azo skupiny za methylenovou skupinu u diskutovaných látek se snižuje aktivita jak na CDK, tak na nádorové buňky.



6. Literatura

1. Vaquero, J. J.; Fuentes, L.; Castillo, J. C. D.; Perez, M. I.; Garcia, J. L.; Soto, J. L. *Synthesis* **1987**, 33 – 35.
2. Cope, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, 59, 2327 – 2330.
3. Franklin, S. P. *J. Org. Chem.* **1953**, 18, 928 – 933.
4. Deb, M. L.; Bhuyan, P. J. *Tetrahedron Let.* **2005**, 46, 6453 – 6456.
5. Ranu, B. C.; Jana, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3767 – 3770.
6. Forbes, D. C.; Law, A. M.; Morrison, D. W. *Tetrahedron Let.* **2006**, 47, 1699 – 1703
7. Cabello, J. A.; Campelo, J. M.; Garcia, A.; Luna, D.; Marinas, J. M. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 5195 – 5197.
8. Qi, S.; Lan-Xiang, S.; Ze-Me, G.; Tie-Ming, C.; Run-Tao, L. *Chinese J. Chem.* **2005**, 23, 745 – 748.
9. Han, J.; Xu, Y.; Su, Y.; She, X.; Pan, X. *Catal. Commun.* **2008**, 9, 2077 – 2079.
10. Kumbhare, R. M.; Sridhar, M. *Catal. Commun.* **2008**, 9, 403 – 405.
11. Choudary, B. M.; Kantam, M. L.; Kavita, B.; Reddy, Ch. V.; Figueras, F. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9357 – 9364.
12. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Basak, A. K.; Visali, B.; Narsaiah, A. V.; Nagaiah, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 546 – 551.
13. Liu, Y.; Linag, J.; Liu, X. H.; Fan, J. C.; Shang, Z. C. *Chinese Chemical Letters*, **2008**, 19, 1043 – 1046.
14. Costa, M.; Areias, F.; Abrunhosa, L.; Vennicio, A.; Proena, F. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1954 – 1962.
15. Dunham, J. C.; Richardson, A. D.; Sammelson, R. E. *Synthesis* **2006**, 680 – 686.
16. Tayyari, F.; Wood, D. E.; Fanwick, P. E.; Sammelson, R. E. *Synthesis* **2008**, 279 – 285.
17. Kryštof, V.; Cankař, P.; Fryšová, I.; Slouka, J.; Kontopidis, G.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Srovnal, J.; Azevedo, W. F. Jr.; Orság, M.; Paprskářová, M.;

- Rolčik, J.; Látr, A.; Fischer, P. M.; Strnad, M. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6500 – 6509.
18. <http://www.cyclacel.com>
19. Wu, Z. L.; Li, Z. Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 2133 – 2142.
20. Profitt, J. A.; Watt, D. S. *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 127 – 128.
21. Nanjo, K.; Suzuki, K.; Sekiya, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 25, 2396 – 2400.
22. Fuentes, L.; Lorente, A.; Soto, J. L. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, 16, 273 – 276.
23. Ranu, B. C.; Samanta, S. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7901 – 7906.
24. Chikashita, H.; Nishida, S.; Miyazaki, M.; Morita, Y.; Itoh, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 737 – 746.
25. Zhu, X.; Zou, H.; Yuan, P.; Liu, Y.; Cao, L.; Cheng, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 1857 – 1861.
26. Garden, S. J.; Guimaraes, C. R. W.; Correa, M. B.; Oliveira, C. A. F.; Pinto, A. C.; Alencastro, R. B. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8815 – 8822.
27. Zhang, Z.; Gao, J.; Xia, J.; Wang, G. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1617 – 1619.
28. Ramachary, D. B.; Kishor, M.; Reddy, Y. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 975 – 993.
29. Zhang, B.; Zhu, X.; Lu, J.; He, J.; Wang, P. G.; Cheng, J. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3295 – 3298.
30. Westfahl, J. C.; Gresham, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1076 – 1080.
31. Rothenburg, R. *Ber.* **1894**, 27, 685.
32. Taylor, E. C.; Hartake, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 2452 – 2455.
33. Taylor, E. C.; Hartake, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 2456 – 2464.
34. Sato, T. *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 963 – 966.
35. Carboni, R. A.; Coffman, D. D.; Howard, E. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2838 – 2840.
36. Fanshawe, W. J.; Bauer, V. J.; Safir, S. R. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 942 – 943.
37. Settepani, J.; Stokes, J. B. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 2606 – 2606.
38. Kryštof, V.; Strnad, M. *Chem. Listy* **2001**, 95, 295 – 300.

39. Losiewicz, M. D.; Carlson, B. A.; Kaur, G. K.; Sausville, E. A.; Worland, P. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 201, 589.
40. Veselý, J.; Havlíček, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Denella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 224, 771.
41. Azevedo, W. F.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Havlíček, L.; Strnad, M.; Kim, S. H.; *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 518.
42. Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Amici, R.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Corti, L.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Villa, M.; Pierce, B. S.; Pulici, M.; Giordano, P.; Martina, K.; Fritzen, E. L.; Nugent, R. A.; Casale, E.; Cameron, A.; Ciomei, M.; Roletto, F.; Isacchi, A.; Fogliatto, G.; Pesenti, E.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Leach, K.; Clare, P. M.; Fiorentini, F.; Varasi, M.; Vulpetti, A.; Warpehoski, M. A. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3367 – 3380.
43. Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Longo, A.; Nesi, M.; Orzi, F.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Varasi, M.; Cameron, A.; Vulpetti, A.; Roletto, F.; Alzani, R.; Ciomei, M.; Albanese, C.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Fiorentini, F.; Bischoff, J. R.; Mercurio, C. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2944 – 2956.
44. Wyatt, P. G.; Woodhead, A. J.; Berdini, V.; Boulstridge, J. A.; Carr, M. G.; Cross, D. M.; Davis, D. J.; Devine, L. A.; Early, T. R.; Feltell, R. E.; Lewis, E. J.; McMenamain, R. L.; Navarro, E. F.; O'Brien, M. A.; O'Reilly, M.; Reule, M.; Saxt, G.; Seavers, L. C. A.; Smith, D. M.; Squires, M. S.; Trewartha, G.; Walker, M. T.; Woolford, A. J. A. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4986 – 4999.