

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

**Cross-coupling halogenovaných aminopyrazolů s aryl-,  
heteroaryl- a styrylboronovými kyselinami (Suzuki-  
Miyauraova reakce)**

Bakalářská práce

Autor:

Renáta Zátopková

Vedoucí práce:

Mgr. Lukáš Jedinák, Ph.D.

Studijní program:

B1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2016

# Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora</b>	Renáta Zátopková
<b>Název práce</b>	Cross-coupling halogenovaných aminopyrazolů s aryl-, heteroaryl- a styrylboronovými kyselinami (Suzuki-Miyaurova reakce)
<b>Typ práce</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště</b>	Katedra organické chemie
<b>Vedoucí práce</b>	Mgr. Lukáš Jedinák, Ph.D.
<b>Rok obhajoby</b>	2016
<b>Abstrakt</b>	<p>Cílem bakalářské práce byla příprava derivátů aminopyrazolu strukturně podobných <b>CAN508</b>, jež byl připraven v Laboratoři růstových regulátorů UP a který je inhibítozem CDK s preferencí k CDK9-cyklin T1. Nové pyrazoly byly testovány pro potenciální inhibici CDK a rovněž se sledovala jejich cytotoxicita na některé nádorové linie. Jeden z připravených aminopyrazolů způsoboval 50 % inhibici růstu rakovinných buněk K562 a MCF7 shodně při koncentraci 9.6 <math>\mu</math>M, avšak s analogem <b>CAN508</b> se liší v mechanismu inhibice.</p>
<b>Klíčová slova</b>	Suzuki – Miyaurova reakce, aminopyrazol, biologická aktivita
<b>Počet stran</b>	64
<b>Jazyk</b>	Čeština

## Bibliographical identification

<b>Author's first name and surname</b>	Renáta Zátopková
<b>Title</b>	Cross-coupling of halogenated pyrazoles with aryl-, heteroaryl, and styrylboronic acids (Suzuki-Miyaura reaction)
<b>Type of thesis</b>	Bachelor
<b>Department</b>	Department of Organic Chemistry
<b>Supervisor</b>	Mgr. Lukáš Jedinák, Ph.D.
<b>The year of presentation</b>	2016
<b>Abstract</b>	<p>The aim of this thesis was to prepare aminopyrazole derivatives that are structurally related to <b>CAN508</b>, which was prepared in the Laboratory of growth regulators UP and which is a selective inhibitor of CDK with the preference for CDK9-cyclin T1. New pyrazoles were tested for potential inhibitory effect to CDK and its antiproliferative activity against human tumor cell lines. The most potent aminopyrazole caused 50 % growth inhibition of cancer cells at concentration of 9.6 <math>\mu</math>M for both K562 and MCF7, however the inhibitory mechanism of <b>CAN508</b> and this aminopyrazole are different.</p>
<b>Keywords</b>	Suzuki – Miyaura cross - coupling, aminopyrazole, biological activity
<b>Number of pages</b>	64
<b>Language</b>	Czech

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

V Olomouci dne.....

.....  
Podpis

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat Mgr. Lukášovi Jedinákovi, Ph. D. za odborné vedení, velmi cenné rady a připomínky při vypracovávání bakalářské práce, spoustu stráveného času a především za trpělivost. Dále bych ráda poděkovala celé Katedře organické chemie PřF UP v Olomouci za přívětivé pracovní podmínky a přátelský přístup při plnění zadaného úkolu. Velký dík rovněž patří Laboratoři růstových regulátorů UP, kde byly provedeny testy na biologickou aktivitu připravených aminopyrazolů.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže na UP s reg. číslem IGA-PrF-2016-020.

# Obsah

1. Úvod .....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Suzuki – Miyaurova reakce .....	8
2.1.1. Mechanismus Suzukiho couplingu .....	8
2.2. Katalytické systémy .....	10
2.3. Problematika Suzukiho couplingu a dusíkatých heterocyklů.....	20
2.4. Vývoj inhibitorů CDK.....	23
2.4.1. Cyklin-dependentní kinázy .....	23
2.4.2. Vybrané inhibitory CDK.....	24
3. Výsledky a diskuze.....	27
3.1. Příprava 3-methyl derivátů aminopyrazolu <b>88 - 90</b> .....	27
3.2. Příprava 3-fenyl derivátů aminopyrazolu <b>92 - 93</b> .....	30
3.3. Optimalizace Suzukiho couplingu.....	32
3.4. Studium dehalogenace pyrazolu <b>88</b> .....	38
3.5. Syntéza aminopyrazolů <b>95a – 95g</b> .....	40
3.6. Protekce amino skupiny pyrazolu <b>86 (88)</b> .....	41
3.7. Příprava boronových sloučenin <b>111 a 113</b> .....	44
3.8. Suzukiho coupling pyrazolu <b>99</b> .....	46
3.9. Biologické testování aminopyrazolů <b>95a – 95f</b> .....	47
4. Experimentální část.....	50
4.1. Příprava 4-halogen aminopyrazolů .....	50
4.2. Syntéza aminopyrazolů <b>95a – 95f</b> .....	52
4.3. Protekce amino skupiny pyrazolu <b>86 (88)</b> .....	54
4.4. Syntéza boronových sloučenin <b>111 - 113</b> .....	56
5. Závěr .....	58
6. Summary .....	59
7. Literatura.....	60
8. Seznam použitých zkratk .....	63
9. Přílohy – kopie NMR spekter .....	65

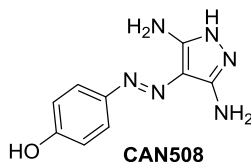
# 1. Úvod

Cílem předložené práce je syntéza aminopyrazolů s potenciální biologickou aktivitou, které jsou připraveny Suzuki – Miyauraovou reakcí. Jedná se o cross – couplingovou reakci, která je v organické chemii poměrně hodně využívána, protože dochází ke tvorbě C-C vazby. To umožňuje usnadnění syntézy a snížení počtu reakčních kroků. Reakčními partnery jsou boronové kyseliny nebo estery, a halogenidy. Suzukiho reakce probíhá v přítomnosti báze za použití katalytického množství palladia. Katalytické systémy se skládají z palladia a ligandu, některé skupiny katalyzátorů, které vznikly obměnou ligandů, jsou popsány v teoretické části.

Syntéza nových pyrazolů s možnou biologickou aktivitou se odráží od derivátu aminopyrazolu, **CAN508** (obrázek 1), který byl objeven při rutinním testování v Laboratoři růstových regulátorů UP. Jedná se o selektivní inhibitor CDK s preferencí pro CDK9-cyklin T1. Cyklin-dependentní kinázy jsou skupinou enzymů, které hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a jejichž pozměněná aktivita může způsobit až rakovinné bujení. Inhibice těchto enzymů se stala cílem vývoje nových chemoterapeutik, z nichž se některé dostaly do II nebo III fáze klinického testování, například roscovitin (rakovina plic) nebo dinaciclib (leukémie).

Na začátku této práce je potřeba optimalizovat Suzuki – Miyaura cross – coupling a najít vhodné podmínky pro průběh reakce aminopyrazolu nesoucího nesubstituovanou NH a NH<sub>2</sub> skupinu a *p*-tolylboronové kyseliny. Po nalezení vhodných podmínek pro efektivní průběh reakce budou provedeny couplingové reakce s dalšími aryl-, heteroaryl- a styrylboronovými kyselinami a syntetizovány nové aminopyrazoly.

Poslední část bakalářské práce se zabývá testováním připravených aminopyrazolů na inhibici CDK2-cyklin E a tyrosinového enzymu AbI, a to ve spojitosti s antiproliferační aktivitou potenciálních inhibitorů těchto enzymů.



**Obrázek 1.** *Selektivní inhibitor CDK*

## 2. Teoretická část

V následující kapitole je uvedena Suzuki - Miyaurova cross couplingová reakce, která je v dnešní době velmi využívána a stále zkoumána. Tato reakce umožňuje syntézu široké škály sloučenin, v případě heterocyklických struktur se často jedná o látky využívané v agroprůmyslu či farmacii. Jsou popsány katalytické systémy, skládající se z palladia a linagdu, které jsou nezbytné pro průběh reakce a jsou rozděleny do dvou podkapitol na základě použitých ligandů. Další kapitola se zabývá problematikou využití dusíkatých heterocyklů jako substrátů pro Suzuki coupling. Poslední část je věnována vývoji inhibitorů cyklin-dependentních kinas, kterými mohou být mimo jiné i diamino-substituované pyrazoly.

### 2.1. Suzuki – Miyaurova reakce

Palladiem katalyzované cross-couplingové reakce boronových kyselin s organickými elektrofilny jsou v dnešní době hojně užívány pro tvorbu C-C vazby.<sup>1</sup> Tato reakce, probíhající za mírných podmínek, tolerující nejrůznější funkční skupiny a reaktanty, je stereo- a regio-specifická, je vhodná pro tvorbu nejrůznějších biarylů. Zaznamenány jsou vysoké výtěžky produktů.

Suzukiho reakce je účinným nástrojem organické syntézy, která je široce využívána pro tvorbu vazby uhlík-uhlík. Svým uplatněním spadá od totální syntézy přírodních produktů, přes modifikace heterocyklů pro medicínální chemii, až po přípravu látek pro materiálovou chemii.<sup>2, 3</sup> Jedná se o reakci alkyl-, alkenyl- či aryl- boronových kyselin nebo jejich esterů s alkyl-, alkenyl- nebo aryl- halogenidy a pseudohalogenidy, která je katalyzována palladiem a probíhá v přítomnosti báze.<sup>1, 4, 5</sup> Tato reakce má mnoho výhod: probíhá za mírných reakčních podmínek, může být prováděna ve vodných roztocích,<sup>6</sup> dochází k tvorbě netoxických nebo málo toxických produktů a meziproduktů, vykazuje vysokou toleranci k funkčním skupinám a je poměrně snadné odstranit vedlejší produkty z reakční směsi.<sup>7</sup> Navíc jsou boronové kyseliny, jež se při reakcích využívají, snadno dostupné, netoxické a stabilní vůči vzdušné vlhkosti.

#### 2.1.1. Mechanismus Suzuki – Miyaurovy reakce

Katalytický cyklus cross-couplingu s organickými halogenidy se nejlépe popisuje na komplexu palladia, viz schéma 1.<sup>8</sup> Katalytický cyklus začíná oxidativní adicí halogenidu **1** na



palladium **2** za tvorby organopalladnatého komplexu Ar-Pd-X **3**. Po oxidativní adici následuje výměna halogenidového iontu z komplexu **3** na organopalladnatý alkoxid Ar-Pd-OR nebo hydroxid Ar-Pd-OH **4**, to záleží na použité bázi. Tyto alkoxydy nebo hydroxydy **4** jsou reaktivnější než odpovídající organopalladnaté halogenidy **3**. Vzniklý alkoxid či hydroxid **4** následně podléhá transmetalaci při reakci s organoboronovou kyselinou, při které vzniká nový organopalladnatý komplex **5**. Posledním krokem katalytického cyklu je redukční eliminace, při které dochází k regeneraci katalyzátoru a tvorbě C-C vazby vzniklého produktu **6**.

Mechanismus oxidativní adice i redukční eliminace byl důkladně zkoumán a v dnešní době je již poměrně dobře pochopen.<sup>9, 10</sup> Mnohem méně je však známa transmetalace a její přesný mechanismus je stále zkoumán. Usuzuje se, že transmetalace probíhá mechanismem nukleofilní substituce a roli elektrofilu hraje organopalladnatý komplex **4**.<sup>11</sup>

**Schéma 1.** Katalytický cyklus Suzuki – Miyauraovy reakce

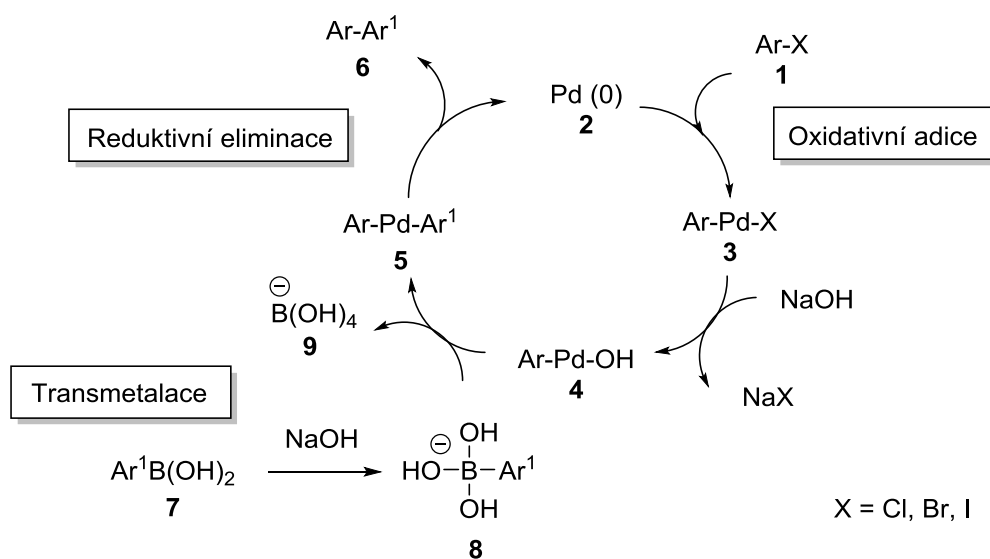


Schéma 1 rovněž ukazuje, že pro katalytický cyklus jsou potřeba dva ekvivalenty báze. První ekvivalent báze se využívá při výměně halogenu a tvorbě organopalladnatého alkoxydu či hydroxydu **4**. Tyto komplexy jsou při transmetalaci reaktivnější, což potvrzuje fakt, že vazba Pd-O je polárnější než Pd-halogen a elektrofilita komplexu Ar-Pd-OH je vyšší než Ar-Pd-halogen, čímž je usnadněna transmetalace. Druhý ekvivalent báze je použit na tvorbu komplexu boru, a protože boronová kyselina zde plní roli Lewisovy kyseliny, vzniká tetravalentní boronový komplex **8**.<sup>9</sup> Toto schéma jasně ukazuje, proč pokusy o cross-coupling bez přítomnosti báze většinou selhávají.

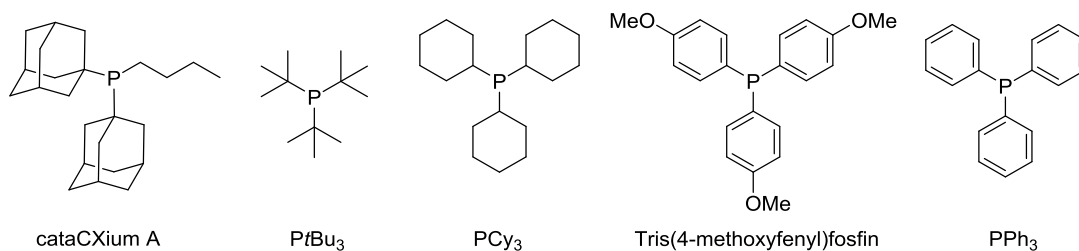
## 2.2. Katalytické systémy

Pro průběh Suzukiho reakce je nezbytné použití katalyzátoru, který se skládá z ligandu a přechodného kovu, což bývá v případě Suzukiho reakce nejčastěji palladium. Nejpoužívanějším Pd (0) katalyzátorem je Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, který byl široce využíván v začátcích Suzuki reakce a stále lze pro většinu běžných reakcí použít. Dalšími hojně využívanými katalyzátory jsou Pd(dba)<sub>2</sub> nebo Pd(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub>. Vhodné je také použití komplexu Pd (II), např. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub> a Pd(OAc)<sub>2</sub>. Při použití těchto komplexů je potřeba redukovat neaktivní pre-katalyzátor Pd (II), např. přebytkem organokovu, aby vznikl aktivní pre-katalyzátor Pd (0).<sup>2</sup> Aktivita katalytických systémů je značně ovlivněna stereo-elektronickými vlastnostmi ligandu. Zástupcem klasického ligandu je trifenylofosfin PPh<sub>3</sub>, výhodnější jsou však elektronově bohaté nebo stericky objemné fosfíny (např. dialkyl biaryl fosfíny<sup>12, 13</sup> trialkyl fosfíny<sup>14</sup> nebo bidentátní ligandy na bázi difosfinů, dusíkatých heterocyklů, nebo aminofosfinů), využívané jsou i N-heterocyklické karbeny (NHC).<sup>15</sup> Výběr vhodného katalytického systému ligand-prekatalyzátor bývá pracný, často je potřeba reakci optimalizovat.

### 2.2.1. Katalyzátory založené na Pd (0) nebo Pd (II) derivátech a elektronově bohatých a objemných fosfinech

Klasickými ligandy pro Suzukiho reakci jsou třívazné deriváty fosforu (fosfíny) nesoucí alkyl nebo aryl substituenty. Výše zmíněný trifenylofosfin (PPh<sub>3</sub>) je takovým prototypickým a běžně používaným ligandem, nemá však vhodné vlastnosti pro složitější typy Suzukiho reakcí: to je reakce zahrnující per-fluorované boronové kyseliny, heterocyklické aryl halogenidy nebo aryl boronové kyseliny, dále pak stericky náročné aryl halogenidy nebo aryl boronové kyseliny. Pro tyto případy je třeba použít efektivnější ligandy.

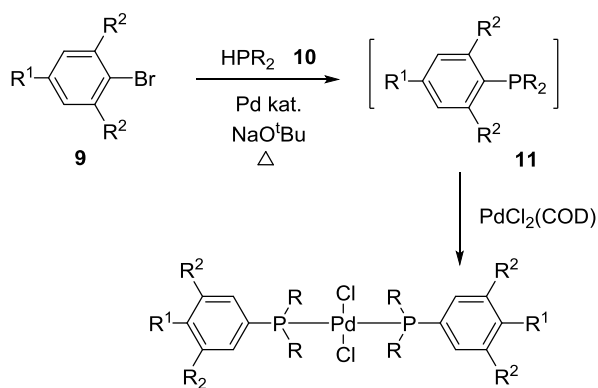
Pro Suzukiho reakci obecně platí, že efektivní ligand se vyznačuje vyšší elektronovou hustotou a větší sterickou náročností kolem heteroatomu – fosforu. Proto jsou tak výhodné alkyl fosfíny působící kladným indukčním efektem. Když se k tomu přičtou ještě sterické efekty objemných alkylů, výsledné trialkylfosfíny vykazují velkou efektivitu pro cross-couplingové reakce. Příkladem vhodných alkylových zbytků může být isopropyl, *tert*-butyl, cyklohexyl, cyklopentyl nebo adamantyl. Reprezentativní vzorce elektronově bohatých a stericky objemných fosfinů zobrazuje obrázek 2.



**Obrázek 2.** Elektronově bohaté a stericky objemné fosfiny

Problematickými substráty pro cross – couplingové reakce jsou heteroatomické sloučeniny, a to z toho důvodu, že se tyto substráty mohou vázat na kovová centra katalyzátoru a tím tvořit neaktivní komplexy.<sup>16, 17</sup> V minulosti byly heteroaryl chloridy, nesoucí funkční skupiny s kyselým protonem, např. -OH, -COOH, -SH a -NH<sub>2</sub>, považovány za nevhodné partnery couplingu a pro úspěšný průběh reakce vyžadovaly protekci výše zmíněných funkčních skupin.<sup>16, 17</sup> Katalytické systémy, které popsal Guram dokáží efektivně katalyzovat i Suzukiho reakce mezi substrát obsahující OH, NH<sub>2</sub> a podobné funkční skupiny, včetně reakcí heterocyklů. Jedná se o komplexy palladia a dialkylfenylfosfinů obecného vzorce PdCl<sub>2</sub>{PR<sub>2</sub>(Ph-R<sup>1</sup>)}<sub>2</sub> **11** - **16**.

**Schéma 2.** Syntéza komplexů PdCl<sub>2</sub>{PR<sub>2</sub>(Ph-R<sup>1</sup>)}<sub>2</sub>



**12:** R = *t*Bu, R<sup>1</sup> = CF<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H

**13:** R = *t*Bu, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H

**13':** R = Cy, R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H

**14:** R = *t*Bu, R<sup>1</sup> = OMe, R<sup>2</sup> = OMe

**15:** R = *t*Bu, R<sup>1</sup> = OMe, R<sup>2</sup> = H

**16:** R = *t*Bu, R<sup>1</sup> = N(Me)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H

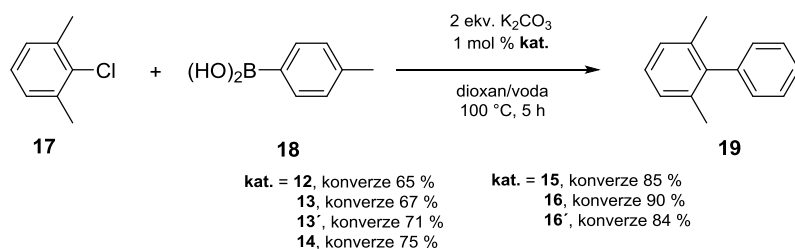
**16':** R = Cy, R<sup>1</sup> = N(Me)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H

Prekatalyzátory PdCl<sub>2</sub>{PR<sub>2</sub>(Ph-R<sup>1</sup>)}<sub>2</sub> **12** - **16** byly připraveny ve dvou krocích (schéma 2). Prvním krokem byla reakce komerčně dostupných aryl bromidů **9** s di-*tert*-butyl fosfinem **10** nebo dicyklohexyl fosfinem **10'** za katalýzy palladiem. Vzniklé dialkylfenylfosfiny **11** byly podrobeny reakci s PdCl<sub>2</sub>(COD) za vzniku prekatalyzátorů **12** -

**16, 13', 16'**. Připravené komplexy  $\text{PdCl}_2\{\text{PR}_2(\text{Ph-R}^1)\}_2$  **12 - 16** byly navrženy s tím cílem, aby se prověřil vliv substituentu na aromatickém jádře ( $\text{Ph-R}^1$ ) na efektivitu ligandu pro Suzukiho reakci. Takto byly prověřeny neutrální substituenty (-H), substituenty odčerpávající elektrony (-CF<sub>3</sub>) a substituenty dodávající elektrony (-NMe<sub>2</sub> a OMe).<sup>16, 17</sup>

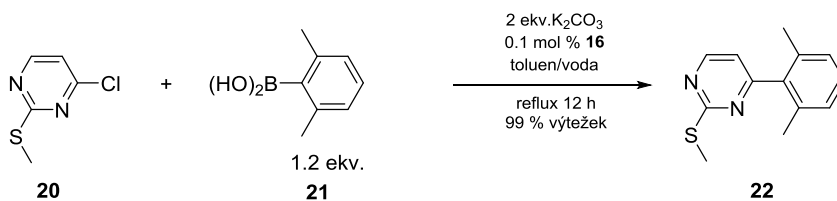
Na modelové reakci 2-chlor-*m*-xylylu **17** a *p*-tolylboronové kyseliny **18** byla hodnocena aktivita připravených prekatalyzátorů **12 - 16, 13', 16'** (schéma 3). Katalytická aktivita jednotlivých prekatalyzátorů stoupala s rostoucí bazicitou (respektive nukleofilitou) fosfinového ligandu. Katalyzátor **12**, který nese na fenylu CF<sub>3</sub> skupinu snižující elektronovou hustotu, vykazoval nejnižší konverzi žádaného produktu, zatímco katalyzátor **16**, obsahující na fenylu NMe<sub>2</sub> substituent zvyšující elektronovou hustotu, vykazoval nejvyšší konverzi. Analogické katalyzátory (**13** vs **13'**, **16** vs **16'**), nesoucí *tert*-butyl nebo cyklohexyl, znamenaly pro modelovou reakci srovnatelné výsledky.<sup>16, 17</sup>

**Schéma 3.** Hodnocení katalytické aktivity  $\text{PdCl}_2\{\text{PR}_2(\text{Ph-R}^1)\}_2$  prekatalyzátorů pro cross – couplingové reakce aryl chloridů



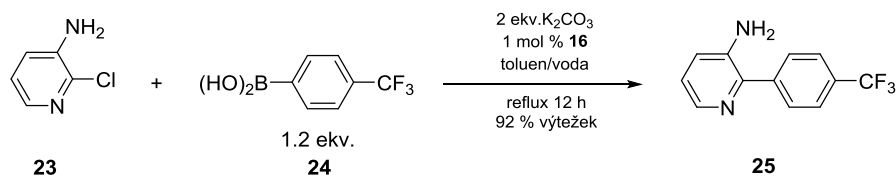
Pro efektivní průběh Suzuki – Miyaura cross – couplingových reakcí, zahrnujících šestičlenné heteroaryl chloridy nesoucí substituenty jako –SR (schéma 4), -NH<sub>2</sub> (schéma 5), -OR, a také pětičlenné heteroaryl halogenidy<sup>18, 19</sup> (schéma 6), byl nejvhodnějším prekatalyzátorem komplex **16**. Tento komplex umožňoval nejrychlejší průběh reakce s nejvyšší konverzí produktu (89 – 99 %), má vysokou toleranci k chelatujícím substrátům (např. 4-aminopyridin) a rovněž není náchylný k deaktivaci katalytického komplexu vlivem heteroatomických sloučenin.

**Schéma 4.** Suzuki – Miyauraova reakce pyrimidinu za katalýzy prekatalyzátoru **16**

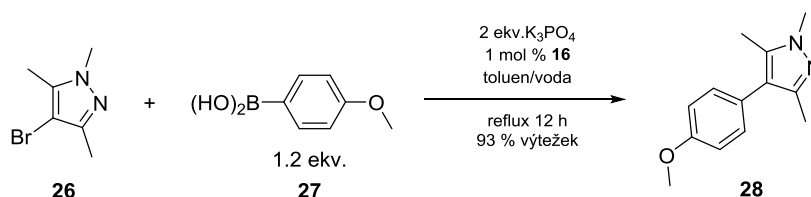


Efektivitu ligandu **16** dokazuje i to, že se stal po vydání publikace komerčně dostupný, prodává se pod názvem A-Phos.<sup>16, 17</sup>

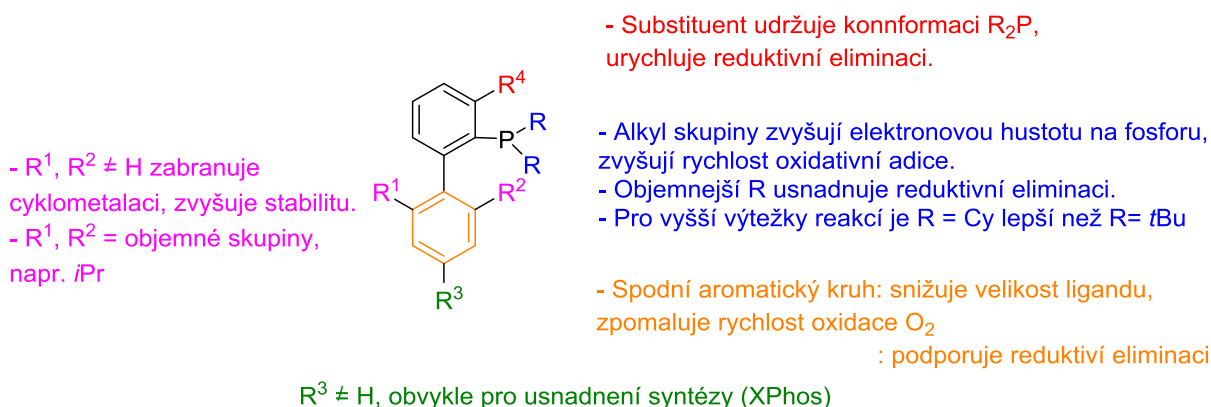
**Schéma 5.** Suzuki – Miyauraova reakce pyridinu za katalýzy prekatalyzátoru **16**



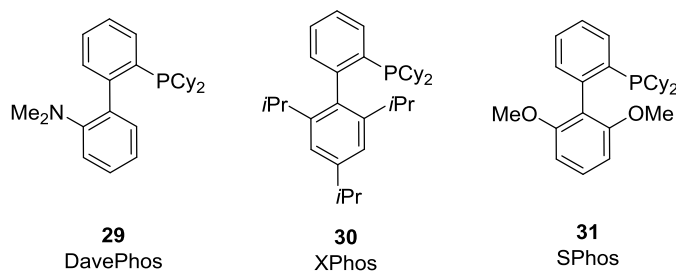
**Schéma 6.** Suzuki – Miyauraova reakce pyrazolu za katalýzy prekatalyzátoru **16**



Od roku 1998 je Buchwaldovým týmem intenzivně zkoumáno použití dialkylbifenyl fosfinových ligandů (obrázek 3), pro které se posléze vžil název Buchwaldovy ligandy, respektive Buchwaldovy fosfiny. Tyto byly a jsou úspěšně používány pro celou řadu aplikací, nejen pro Suzukiho reakce, ale například i Sonogashirovu reakci, Heckův coupling, nebo Buchwald-Hartwigovu aminaci. Obecnou strukturu Buchwaldových ligandů, možné místa pro modifikace a jejich vliv na katalýzu shrnuje obrázek 3.<sup>20</sup>



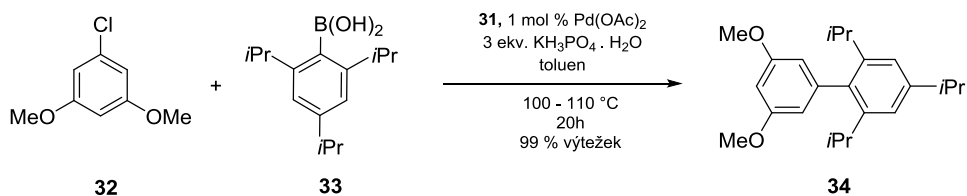
**Obrázek 3.** Struktura dialkylbifenyl fosfinů a vliv substituentů na účinnost katalýzy při použití těchto ligandů<sup>20</sup>



**Obrázek 4.** Buchwaldovy ligandy založeny na 1-di(cyklo)alkylfosfinbifenyly

Fosfin **29** (DavePhos, obrázek 4) je velmi dobrý ligand pro Suzukiho reakci při laboratorní teplotě jak u elektronově bohatých, tak deficientních aryl chloridů.<sup>21</sup> Jeden z hlavních katalytických komplexů pro Suzuki coupling neaktivovaných aryl tosylátů a aryl boronových kyselin vznikl sloučením 2 mol % Pd(OAc)<sub>2</sub> a 5 mol % ligandu **30** (XPhos, obrázek 4).<sup>22</sup> Při vylepšení sterických a elektronových vlastností dialkylbifenyly fosfinů byl získán ligand **31** (SPhos, obrázek 4), který byl úspěšně použit v kombinaci s Pd(OAc)<sub>2</sub> a při couplingu elektronově bohatého aryl chloridu **32** a velmi bráněné 2,4,6-triisopropyl(fenyl)boronové kyseliny **33** v toluenu při 100 – 110 °C v přítomnosti K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O jako báze (schéma 7).<sup>23</sup>

**Schéma 7.** Suzuki coupling elektronově bohatého aryl chloridu a stericky bráněné boronové kyseliny

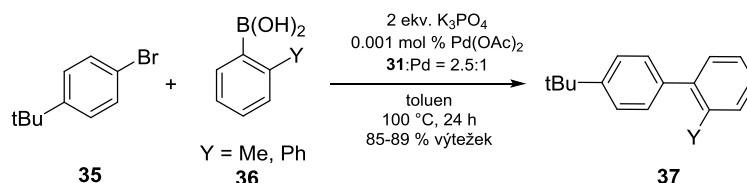


Katalytický systém složený z ligandu **31** a Pd(OAc)<sub>2</sub> v molárním poměru 2.5:1 je velmi účinný při cross-couplingu neaktivovaných aryl bromidů **35** a 2-metyl nebo 2-fenyl boronových kyselin **36** (schéma 8). Cross – couplingová reakce může probíhat již s množstvím 10 ppm Pd, což je nejmenší množství katalyzátoru, které kdy bylo použito při couplingových reakcích *o*-substitovaných boronových kyselin a neaktivovaných aryl bromidů.<sup>23, 24</sup>

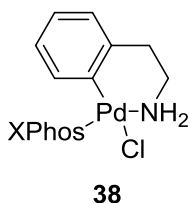
Suzuki – Miyaura cross – couplingové reakce nestabilních boronových kyselin (např. polyfluorofenyl- a 2-heteroaryl- boronových kyselin) a (hetero)aryl halogenidů a triflátů jsou velmi zajímavé pro syntézu farmaceutických a agrochemických produktů. Tyto reakce

obvykle probíhají při zvýšené teplotě a pro reakční dobu typicky vyžadují několik hodin. Problémem nestabilních boronových kyselin je jejich rychlý rozklad a deboronace v bazickém prostředí.<sup>25, 26</sup>

**Schéma 8.** Suzuki coupling neaktivovaných aryl bromidů a *o*-substituovaných boronových kyselin při použití ligandu **31**

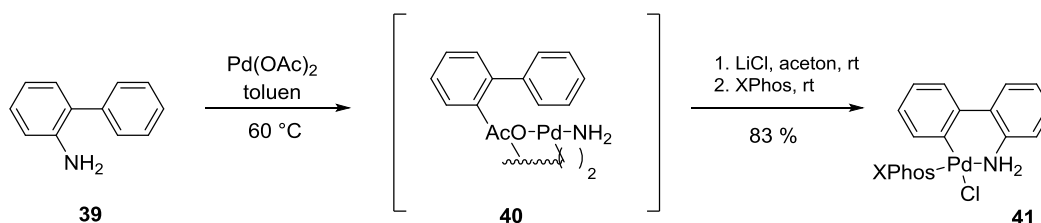


Protože použití  $Pd(OAc)_2$  nebo  $Pd(dba)_2$  neposkytlo uspokojivé výsledky, bylo potřeba najít katalyticky aktivní prekatalyzátor, který rychle a za mírných podmínek generuje efektivní katalyzátor Ligand-Pd(0). Prekatalyzátor **38** (obrázek 5) je excelentním zdrojem katalyticky aktivního LPd(0) komplexu, nicméně je jeho aktivace slabou bází pomalá a probíhá pouze při zvýšené teplotě a jeho syntéza je složitá.<sup>27</sup> Prekatalyzátor **41** je pro dané reakce vhodnější, vyšší acidita vazby Pd-amin umožňuje aktivaci komplexu téměř okamžitě a při pokojové teplotě. Syntéza **41** je snadná a rychlá, prekatalyzátor vzniká reakcí  $Pd(OAc)_2$  a 2-aminobifenylu **39**, následovanou přidávkem LiCl a ligandu XPhos (schéma 9).<sup>25</sup>



**Obrázek 5.** Prekatalyzátor **38**

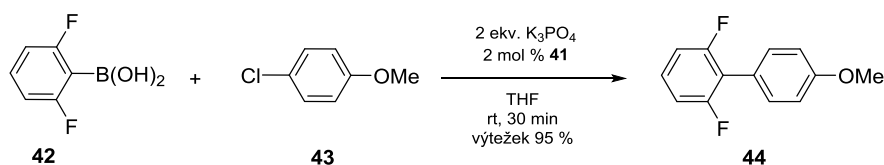
**Schéma 9.** Syntéza prekatalyzátoru **41**



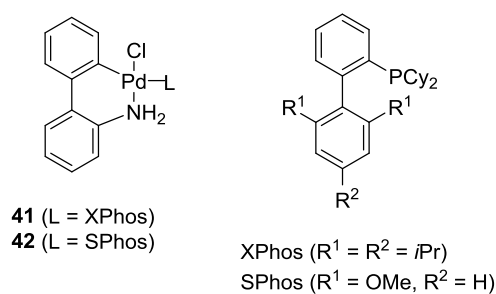
Při použití prekatalyzátoru **41** jsou umožněny Suzuki – Miyaura reakce nestabilních boronových kyselin (např. **42**) a celé škály (hetero)aryl halogenidů a triflátů díky tomu, že

reakce probíhá velmi rychle a při pokojové teplotě nebo při 40 °C. Za takových podmínek je deboronace potlačena a žádaný produkt je získán s vysokým výtěžkem (schéma 10).<sup>25</sup>

**Schéma 10.** *Coupling nestabilní difluorfenylboronové kyseliny 42 a aryl halogenidu 43*



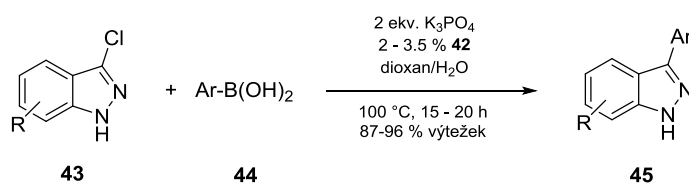
Další skupinou látek, pro kterou byly hledány nejefektivnější katalytické systémy, byly dusíkaté heterocykly nesoucí poměrně kyselou NH skupinu. Cross-couplingové reakce dusíkatých heterocyklů byly realizovány s prekatalyzátory **41** a **42** (obrázek 6), a dále s Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> a Pd(OAc)<sub>2</sub>. Nejvyšší výtěžky byly dosaženy při použití prekatalyzátorů **41** a **42**.<sup>28</sup>



**Obrázek 6.** *Prekatalyzátory 41 a 42*

Cross-coupling 3-chloroindazolů **43** a boronových kyselin **44** (schéma 11), probíhá nejlépe v přítomnosti prekatalyzátoru obsahující SPhos **42**, byly získány nejvyšší výtěžky a docházelo k nejmenší míře protodeboronace. Tento katalytický systém je vhodný pro Suzukiho reakce jak elektronově bohatých aryl halogenidů, tak boronových kyselin.<sup>28</sup>

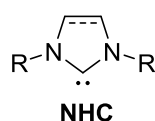
**Schéma 11.** *Suzuki coupling 3-chloroindazolů 43 a boronových kyselin za použití prekatalyzátoru 42*





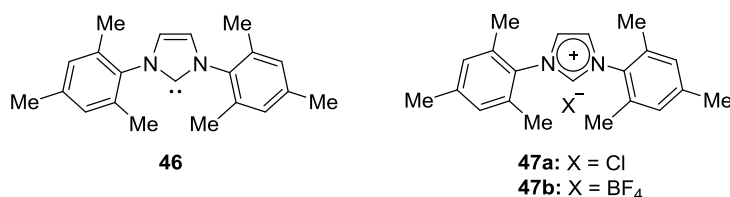
## 2.2.2. Katalytické systémy založené na Pd(0) nebo Pd(II) derivátech a N-heterocyklických karbenových ligandech

N-heterocyklické karbeny (NHC), např. imidazol-2-ylideny (obrázek 7), jsou možnou alternativou široce využívaných fosfinových ligandů v homogenních katalyzátorech.<sup>29</sup> Díky tepelné stabilitě vazby Pd-NHC nevyžaduje katalytický komplex přebytek ligandu, elektronově bohatá povaha NHC zvyšuje rychlost oxidativní adice a sterická náročnost ligandu usnadňuje tvorbu katalyticky aktivního komplexu NHC-Pd(0) a zvyšuje rychlost redukční eliminace.<sup>30</sup>



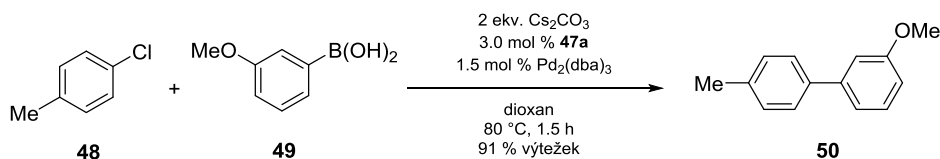
**Obrázek 7.** N-heterocyklické karbeny (NHC)

Komplexy imidazol-2-ylidenů, např. IMes **46** nebo soli **47a** a **47b** (obrázek 8) jsou aktivními katalyzátory reakcí aktivovaných a deaktivovaných aryl chloridů a arylboronových kyselin. Pro efektivní aktivaci elektro-neutrálních a elektronově bohatých aryl chloridů však tyto katalytické systémy vyžadují teploty vyšší než 75 °C.<sup>31</sup> IMes **46** je méně stabilní vůči vzdušné vlhkosti než odpovídající imidazolinová sůl **47a** a **47b**, proto jsou převážně tyto soli hojně využívány jako ligandy v katalytickém komplexu s Pd.<sup>30, 31</sup> Typická reakce katalyzována *in situ* připraveným komplexem z Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> a ligandu **47a** v přítomnosti Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> je zobrazena na schématu 12.



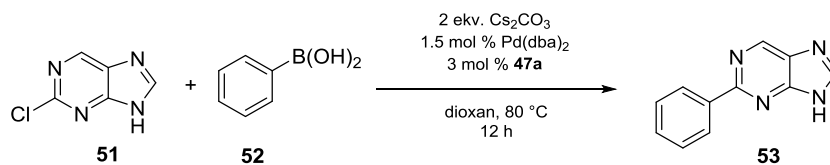
**Obrázek 8.** Ligandy na bázi NHC

**Schéma 12.** *Cross – couplingová reakce za přítomnosti ligandu 47a na bázi N-heterocyklických karbenů*



Komplex připraven z  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  a imidazolinové soli **47a** nebo **47b** se využívá pro přípravu mnoha purinových derivátů cross-couplingovou reakcí chloropurinů **51** a boronových kyselin **52** (schéma 13).<sup>32</sup>

**Schéma 13.** *Syntéza C2 substituovaných purinů Suzuki couplingovou reakcí použitím NHC ligandu 26a*

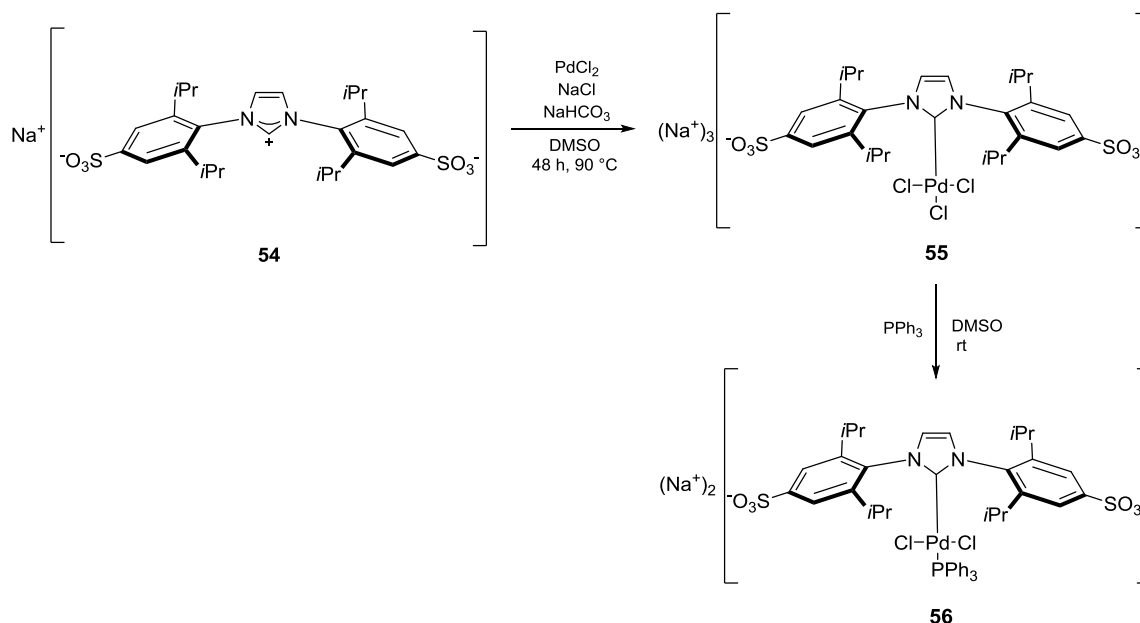


Při dřívějším použití NHC ligandů byly využívány tradiční hydrofobní ligandy, nicméně velmi zajímavé je využití ve vodě rozpustných NHC.<sup>33</sup> Ve vodě rozpustné NHC lze získat například zavedením sulfonové kyseliny do struktury ligandu. Příklady hydrofilních ve vodě rozpustných NHC a jejich syntézu ukazuje schéma 14.<sup>34</sup>

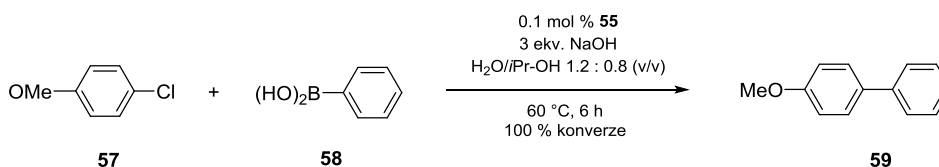
Komplexy **55** a **56** jsou nerozpustné ve většině organických rozpouštědel (aceton, většina alkoholů, THF, DCM), ale jsou rozpustné ve vodě, metanolu a DMSO. Ve vodě jsou stále při neutrálním pH, ale v přítomnosti vzdušného kyslíku se rozkládají a ztrácejí katalytickou aktivitu; proto je většina reakcí s Pd-NHC prováděna pod inertní atmosférou. Existují však i případy, kdy nebyla při aerobních podmínkách ve vodných roztocích pozorována ztráta katalytické aktivity.<sup>34</sup>

Na modelové reakci (schéma 15) jsou znázorněny podmínky cross – couplingových reakcí s využitím katalytického komplexu **55**, který je aktivnější než komplex **56**. Tyto reakce probíhají při teplotách 60 – 100 °C a s nízkým množstvím NHC-Pd katalyzátoru (0.1 mol % Pd).<sup>34, 35</sup>

**Schéma 14.** Syntéza ve vodě rozpustných NHC komplexů

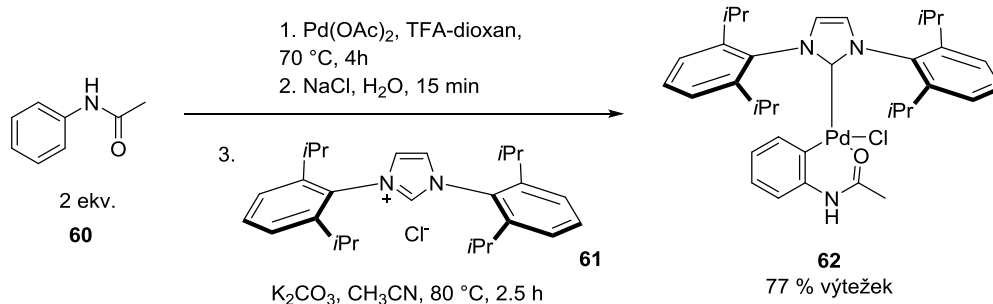


**Schéma 15.** Syntéza bifenyľů Suzuki – Miyaurovou reakcí při použití komplexu **55**



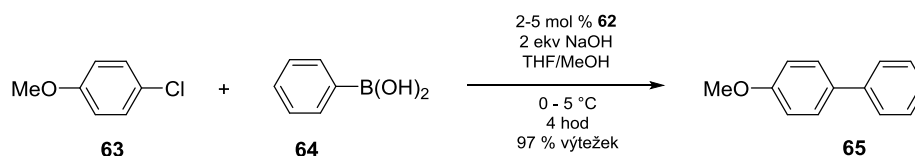
Vývoj v oblasti NHC ligandů se neomezil jen na samotný ligand, nýbrž i na vhodný zdroj aktivního komplexu NHC-Pd(0), čili na prekatalyzátor. Pro reakce málo stabilních boronových kyselin je potřeba generovat katalyticky aktivní komplex NHC-Pd(0) rychle a za mírných podmínek, k tomu slouží prekatalytický systém obsahující jak NHC, tak palladium, které se zde obvykle nalézá v oxidačním stavu 2. Nejběžnějším systémem tohoto typu jsou takzvané palladacykly, tedy organokovové heterocykly obsahující palladium v rámci jednoho z kruhů. Vhodnou volbou a optimalizací palladacyklu lze docílit toho, že NHC palladacyklus je schopen již za velmi mírných podmínek uvolnit atomární Pd(0), a to reaktivní eliminací  $\sigma$  vazby. Příklad přípravy takového palladacyklu **61** z octanu palladnatého, acetanilidu **60** a ligandu **55** je vyobrazen ve schématu 16.<sup>36-38</sup>

### Schéma 16. Syntéza prekatayzátoru 62



Katalyzátor **62** například umožňuje průběh Suzukiho reakce při teplotě 0 °C, která při množství katalyzátoru 5 mol % a reakčním čase čtyř hodin proběhla téměř kvantitativně (schéma 17).<sup>38</sup> Jedná se o historicky první příklad Suzukiho reakce, který probíhal při teplotě nižší než je laboratorní teplota.

### Schéma 17. Cross – couplingová reakce deaktivovaného *p*-chloranisolu a fenylboronové kyseliny při 0 °C za katalýzy **61**

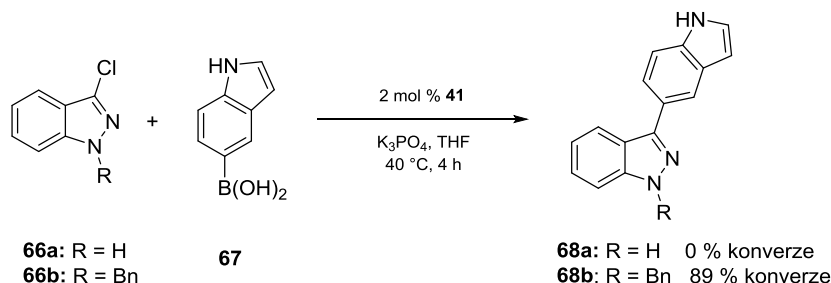


## 2.3. Problematika kompatibility Suzukiho reakce a dusíkatých heterocyklů

Heterocyklické sloučeniny obsahující v aromatickém kruhu dusík jsou často součástí biologicky aktivních molekul a celá škála léčiv obsahuje pyrazoly, imidazoly, benzimidazoly, indoly a indazoly.<sup>28</sup> Proto je velice užitečné mít v repertoáru metodu, která by umožnila takovéto sloučeniny modifikovat nebo inkorporovat do jiných struktur pomocí Suzukiho reakce. Avšak většina couplingových reakcí ztroskotává v přítomnosti kyselých NH skupin, reakce dosahují nízkých výtěžků a pro průběh reakce jsou často vyžadovány protekční skupiny chránící endocyklický dusík NH azolů.<sup>39-41</sup> Při porovnání couplingů substituovaných (**66b**) a nesubstituovaných (**66a**) analogů dusíkatých heterocyklů je zřejmé,

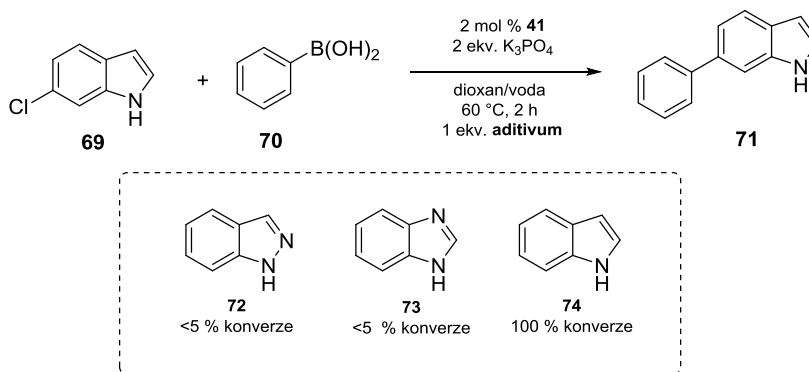
že při podmínkách, kdy ostatní Suzukiho reakce probíhají s vysokými výtěžky, heterocykly s neochráněnou NH skupinou (**66a**) neposkytují žádný produkt (schéma 18).<sup>28</sup>

**Schéma 18.** Suzuki – Miyaura cross – coupling chráněného a nechráněného 3-chloroindazolu



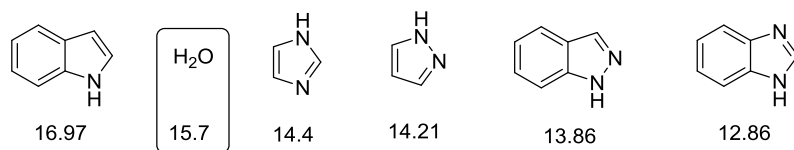
Tento jev, kdy některé dusíkaté heterocykly nereagují podle očekávání byl dlouho znám, avšak až Buchwald se jej rozhodl studovat do detailu. Z toho důvodu experimentoval s reakcí 6-chloroindolu **69** a fenyloboronové kyseliny **70**. Při standardních podmínkách probíhala reakce 6-chloroindolu s vysokým výtěžkem, při přidavku aditiv jako indazol **72** nebo benzimidazol **73**, byla tvorba produktu inhibována; indol **74** průběh reakce nijak neovlivnil (schéma 19).<sup>28</sup>

**Schéma 19.** Vliv aditiv na průběh Suzuki – Miyaura reakce



Výsledky z výše popsaného experimentu (schéma 19) koreloval Buchwald s hodnotami disociačních konstant daných heterocyklů. Spíše indikativním, než definitivním závěrem pak bylo, že čím kyselější je N-H vazba heterocyklu, tím roste jeho inhibiční účinek na Suzukiho reakci. Předpokladem je, že deprotonovaná forma (konjugovaná báze) má vyšší afinitu k palladiu a vytvoří s ním katalyticky neaktivní komplex. Tím bylo vysvětleno, proč indazol a benzimidazol měli významný inhibiční efekt na reakci 6-chloroindolu **69** s fenyloboronovou

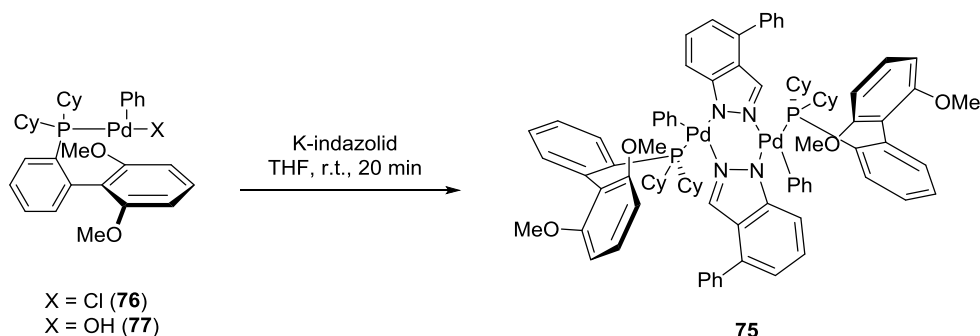
kyselinou **70**, zatímco efekt indolu byl minimální, pro srovnání jsou uvedeny hodnoty pKa vybraných heterocyklů (obrázek 9).<sup>42</sup>



**Obrázek 9.** Hodnoty pKa dusíkatých heterocyklů ve vodě

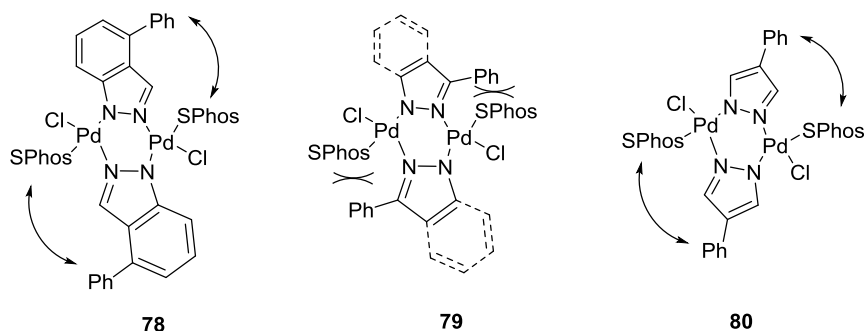
Při snaze charakterizovat struktury potenciálních inhibitorů katalytického cyklu byl připraven a izolován komplex **75**, který obsahoval indazol jako můstkový ligand. Dimerní komplex **75** je možno připravit z [SPhos(Pd)PhCl] **76** nebo [SPhos(Pd)PhOH] **77**, komplex vzniká již během 20 minut při laboratorní teplotě s výtěžkem 63 %, respektive 82 % (schéma 20). Na modelových reakcích bylo potvrzeno, že komplex **75** je katalyticky neaktivní, což potvrzuje hypotézu o inhibici Pd tvorbou komplexu s dusíkatými heterocykly.<sup>28</sup>

**Schéma 20.** Tvorba dimerního komplexu **75** z **76** nebo **77**



Inhibiční efekt azolů nezávisí zdaleka jen hodnotě pKa vazby N-H, ale i na sterických efektech. Například při reakci 4-chlorindazolu byla pozorována nižší konverze než při použití 3-chlorindazolu. Inhibice je zapříčiněna deaktivací katalyzátoru tvorbou dimerního komplexu. Produkty, které nemohou ze sterických důvodů tvořit dimerní struktury (3-chloroindazol), inhibují couplingovou reakci mnohem méně, než 4-chloroindazol, kterému sterické vlastnosti ve tvorbě dimeru nebrání. Obrázek 10 ukazuje rozdíl mezi dimerním komplexem, který by vznikl ze 4-substituovaného indazolu (**78**) a 3-substituovaných azolů (**79**) a vysvětluje snadnost, respektive obtížnost tvorby můstkových komplexů v závislosti na sterických vlastnostem substrátů. V případě 4-substituovaných azolů (**80**) je umožněna snadná tvorba

palladnatého komplexu, čímž dochází k inhibici Suzukiho reakce, a proto jsou například pyrazoly tak problematickými substráty pro cross-couplingy.<sup>28</sup>



**Obrázek 10.** Potenciální sterická interakce dimerů 4-substituovaného indazolu (**78**), 3-substituovaných azolů (**79**) a 4-substituovaného pyrazolu (**80**)

## 2.4. Vývoj inhibitorů cyklin-dependentních kináz

### 2.4.1. Cyklin-dependentní kinázy

Protein kinázy jsou jedním z častých farmakologických cílů pro vývoj léčiv lidských chorob, včetně různých rakovinných a neurodegenerativních onemocnění. Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou třídou serinových a treoninových protein kináz, které hrají hlavní roli v regulaci buněčného cyklu. Aktivita CDK závisí na přítomnosti regulačních proteinů, neboli cyklinů, jejichž exprese je pečlivě kontrolována během různých částí buněčného cyklu.<sup>43</sup> Deregulace CDK, spojená se ztrátou kontroly nad buněčným cyklem a pozměněnou CDK aktivitou, souvisí s mnoha fyziologickými stavy a může vyústit v rakovinné bujení. Proto lze očekávat, že inhibice CDK poskytuje efektivní metodu pro kontrolu rakovinného bujení a jedná se o účinnou zbraň při chemoterapii a rozvoji nových léčiv.<sup>43</sup>

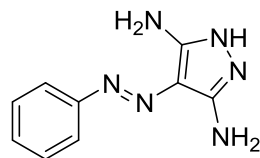
Vývoj buněčného cyklu závisí na aktivitě CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6. Vstup do S fáze podporuje CDK4 v komplexu s cyklinem D1, D2 nebo D3, a zároveň CDK2-cyklin E, což vede k fosforylaci a inaktivaci retinoblastomového proteinu (pRb).<sup>44</sup> CDK2-cyklin A a CDK1-cyklin A provázejí buňku S fází a CDK1-cyklin B je zodpovědný za mitosu.<sup>45, 46</sup> CDK-specifické inhibitory vyvolávají apoptózu potlačením transkripce, nebo narušením buněčného cyklu.<sup>47</sup> Aktivita těchto kináz je úzce regulována na několika stupních, a to prostřednictvím interakce s pozitivními a negativními partnery, aktivací fosforylací nebo

defosforylací a změnami v jejich nitrobuněčném umístění. Narušení regulace buněčného cyklu je spojeno s pozměněnou, často zvýšenou aktivitou CDK a může vést až ke vzniku rakoviny.

V posledních letech bylo identifikováno mnoho účinných a selektivních inhibitorů cyklin dependentních kináz. Tyto inhibitory se skládají ze strukturně odlišných planárních heterocyklů, které vstupují do aktivní části enzymu a soupeří o aktivní místo s ATP, což je demonstrováno enzymovou kinetikou nebo analýzou kokrystalu inhibitor-CDK2. Anti-CDK léčiva vykazují výborné inhibiční vlastnosti vůči rakovinným buňkám jak *in vitro*, tak *in vivo* a několik z nich je hodnoceno v klinickém testování jako nová generace protirakovinných chemoterapeutik.<sup>48</sup>

#### 2.4.2. Vybrané inhibitory cyklin-dependentních kináz

Selektivní CDK inhibitory mohou sloužit jako potenciální terapeutická léčiva proti nádorové invazi a metastázám.<sup>49</sup> Bylo identifikováno několik strukturně odlišných sloučenin, které mají schopnost blokovat CDK fosforylací.<sup>50-52</sup> Prototypickou látkou pro syntézu účinných inhibitorů CDK byl pyrazol **81**(obrázek 11), který způsobuje slabou inhibici CDK2-cyklin E.



**81**

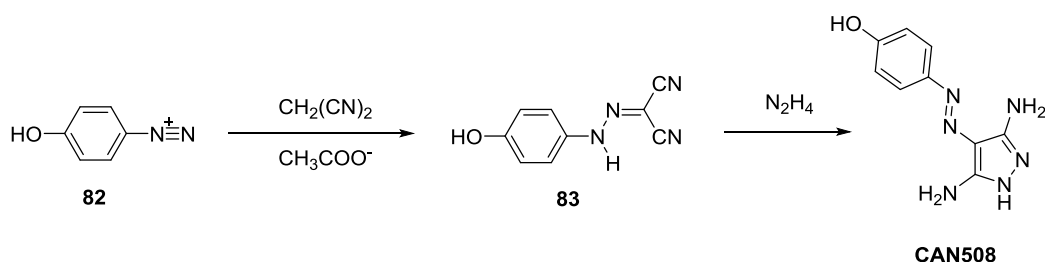
**Obrázek 11.** *Struktura slabého inhibitoru CDK2-cyklin E, pyrazolu 81, který sloužil jako výchozí látka pro syntézu účinnějších CDK inhibitorů*

4-hydroxy derivát pyrazolu **81**, pyrazol **CAN508**, je kompetitivním inhibitorem CDK2-cyklin E vzhledem k ATP a je nejefektivnějším inhibitorem z připravené série látek vůči CDK9-cyklin T1 s účinkem v submikromolární koncentraci ( $IC_{50} = 0.35 \mu M$ ). Syntéza **CAN508** je zobrazena na schématu 21. Buněčná aktivita **CAN508** má vliv na antiproliferační aktivitu lidských nádorových buněčných linií, ostatní deriváty vykazují pouze mírný vliv a jejich slabá aktivita je srovnatelná s olomoucinem, známým, ale slabým inhibitorem CDK1

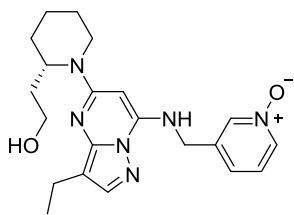


a CDK2.<sup>53, 54</sup> Deriváty substituovány objemnými arylly (sulfonamidy, bis-azo deriváty) vykazují buď velmi nízkou nebo žádnou antiproliferační aktivitu, zatímco některé pyrazoly s malými 4-aryl postranními řetězci poskytují měřitelné IC<sub>50</sub> hodnoty. Selektivní inhibitor **CAN508** neovlivňuje buněčný cyklus na rozdíl od méně selektivního CDK inhibitoru roscovitinu, který blokuje jak G1-S, tak G2-M přechody. Látka **CAN508** je schopna ovlivňovat aktivitu CDK4 a CDK2 v buňce a je také účinná vůči CDK7 a CDK9.<sup>48</sup>

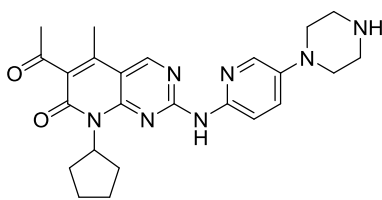
**Schéma 21. Syntéza CDK inhibitoru CAN508**



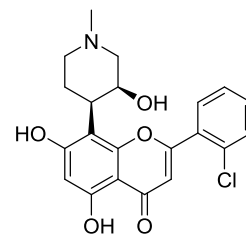
Dinaciclib (Merck, **SCH727965**) a palbociclib (Pfizer, **PD-0332991**) (obrázek 12) jsou inhibitory CDK nové generace, které nedávno pokročily do III fáze klinických testů chronické lymfocytické leukemie.<sup>55</sup> První generace CDK inhibitorů, jako flavopiridol **84**, roscovitin **85**, **SNS-032**<sup>56</sup> a **PHA-793887**<sup>57</sup> (obrázek 12) byly při klinickém testování zastaveny během fáze II nebo III. Na rozdíl od nich je **SCH727965** velmi účinný a selektivní inhibitor CDK2, CDK5, CDK1 a CDK9 s hodnotami IC<sub>50</sub> = 1, 1, 3, a 4 nmol/L, tedy nízkou nanomolární antiproliferační aktivitou vůči většině nádorových buněk.<sup>58, 59</sup> Palbociclib **PD-0332991** je selektivní inhibitor CDK4 a CDK6 v mikromolární koncentraci.<sup>60</sup> **SCH727965** se váže na ATP spletitou sítí vazebných interakcí, což vysvětluje jeho vysokou účinnost a selektivitu vůči CDK2. Porovnáním s flavopiridolem **84** při stejných podmínkách, je **SCH727965** stejně účinný inhibitor CDK1 a CDK9, ale 12 a 14 krát silnější inhibitor vůči CDK2 a CDK5. **SCH727965** je také účinnější inhibitor replikace DNA, a selektivnější inhibitor kináz, na rozdíl od flavopiridolu **84**, který inhibuje celou řadu protein kináz, což přispívá k jeho slabému terapeutickému indexu. Při testování **SCH727965** na antiproliferační aktivitu nádorových buněčných linií, mimo jiné rakovinu plic, prostaty, slinivky, lymfom a leukémie, se nezjistila selektivita vůči specifickému nádorovému onemocnění, **SCH727965** vykazuje širokou antiproliferační aktivitu na velký rozsah nádorů. Celkově se jedná se o účinnější inhibitor CDK než flavopyridol **84** a vykazuje také vyšší toleranci, čili nižší toxicitu.<sup>58</sup>



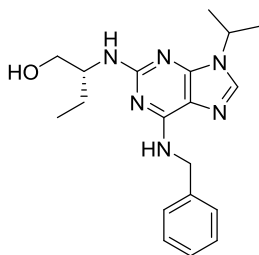
Dinaciclib  
SCH727965



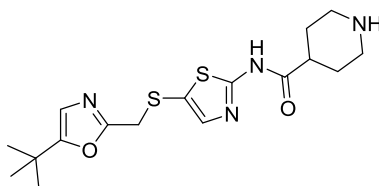
Palbociclib  
PD-0332991



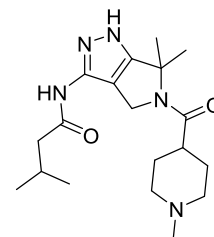
Flavopiridol  
84



Roscovitin  
85



SNS-032



PHA-793887

**Obrázek 12.** *Struktura CDK inhibitorů, které byly klinicky testovány*

### 3. Výsledky a diskuze

Následující kapitola pojednává o přípravě pyrazolů (**88-90** a **92-93**) a jejich využití jako výchozích látek pro Suzukiho reakci. Text je členěn do podkapitol, které jsou věnovány halogenaci methyl- a fenyl- derivátů pyrazolů, optimalizaci Suzuki couplingu, studiu dehalogenace pyrazolu **88**, syntéze aminopyrazolů **95a** – **95g** Suzuki – Miyaurovou reakcí, protekcí amino skupin a tvorbě *N*-ochráněných pyrazolů a přípravě boronových sloučenin a následné couplingové reakci s ochráněným pyrazolem **99**. Poslední kapitola je věnována biologickému testování připravených aminopyrazolů. Jsou zmíněny podmínky jednotlivých kroků, jako je rozpouštědlo, teplota a reakční doba. V textu je popsána purifikace připravovaných látek a jejich výtěžek.

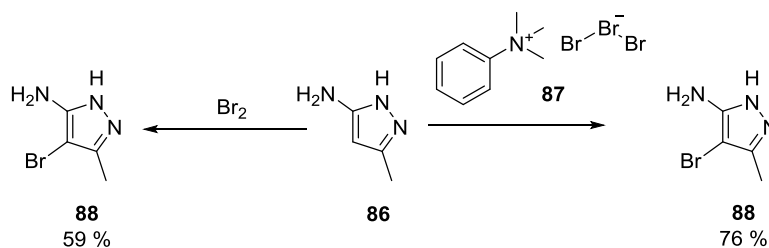
#### 3.1. Příprava derivátů 4-halogen-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**88-90**)

4-halogen-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-aminy byly připraveny halogenací (elektrofilní substitucí) komerčně dostupného pyrazolu **86**. Byla zkoušena bromace, chlorace a jodace pyrazolu **86** do polohy C4. Takto připravené pyrazoly byly následně využity jako výchozí látky pro Suzukiho reakci.

Pro zavedení bromu do polohy C4 se osvědčily tyto metody: bromace komerčně dostupného pyrazolu **86** bromem nebo reakce tohoto pyrazolu s fenyl trimethylammonium tribromidem (schéma 22). Bromace pyrazolu **86** elementárním bromem probíhala v roztoku acetonitrilu a brom byl do reakční směsi přikapáván za chlazení, protože se jednalo o exotermickou reakci. Po ustálení teploty byla směs míchána při laboratorní teplotě a byla dokončena po třech hodinách. Izolace a purifikace pyrazolu **88** zahrnovala neutralizaci reakční směsi, extrakci do ethyl acetátu, chromatografickou separaci a následnou rekrystalizaci produktu ze směsi toluen-petrolether. I když se reakce neobešla beze ztrát, proběhla s dobrým výtěžkem 59 %.

Reakce pyrazolu **86** a fenyl trimethylammonium tribromidu byla realizována při laboratorní teplotě a podle HPLC byla reakce dokončena po jedné hodině. Izolace pyrazolu **88** zahrnovala neutralizaci reakční směsi, extrakci do ethyl acetátu a rekrystalizaci žádaného produktu ze směsi dichlormethan-toluen. Protože se podařilo získat produkt ve vysoké čistotě a s velmi dobrým výtěžkem 76 % bez nutnosti chromatografické separace, byla tato metoda považována za výhodnější oproti reakci s kapalným bromem.

**Schéma 22.** Zavedení bromu do polohy C4 3-methyl-1H-pyrazol-5-aminu: bromace, reakce s fenyl trimethylammonium tribromidem

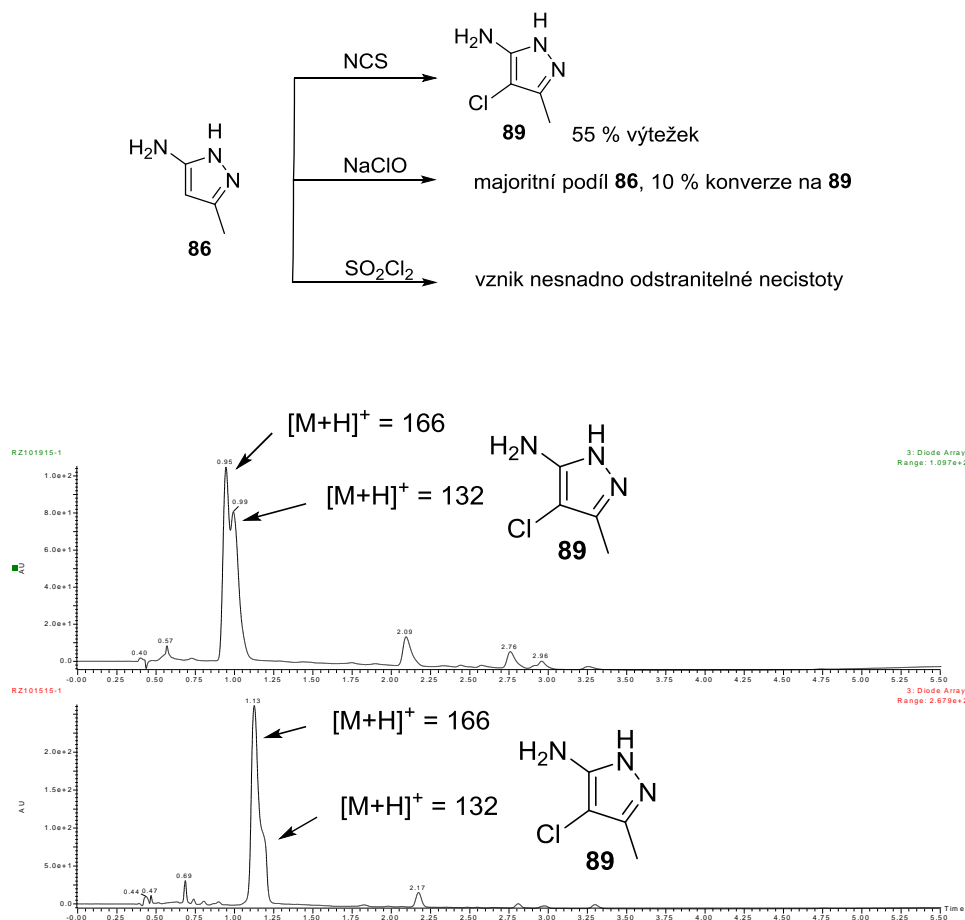


Pro chloraci pyrazolu **89** byly zvoleny tři metody, z nichž pouze jedna vedla k izolaci produktu v dostatečné čistotě (schéma 23). Nejúspěšnější byla reakce pyrazolu **86** s *N*-chlorsukcinimidem v acetonitrilu, při které se však vyskytl problém s odstraněním sukcinimidu, který byl jedním z meziproduktů. Sukcinimid se nepodařilo detekovat na tenkovrstvé chromatografii pomocí běžných vizualizačních činidel (anisaldehyd, manganistan draselný, jod, fosfomolybdenová kyselina), ani jej odstranit rozpuštěním ve vodě. Jak se později ukázalo, byl i znečištěný pyrazol **89** ve vodě rozpustný. Vznikající sukcinimid bylo možné jen stěží odstranit extrakcí, chromatografií a krystalizací, navíc bylo při chromatografii potřeba izolovat pouze úzké rozmezí frakcí, aby se sukcinimid v produktu nevyskytoval. Až kombinací těchto metod se podařilo získat čistý pyrazol, ale pouze s mírným výtěžkem 55 %.

Další chlorační činidlo, které bylo použito pro přípravu pyrazolu **89**, byl chlornan sodný. Tato exotermická reakce byla realizována za chlazení a po ustálení teploty byla míchána po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Ani po této době však nedocházelo k odreagování výchozí látky **86** a konverze produktu se úpravou poměru výchozí látky a chlornanu sodného také nezlepšila. Protože se nenašly vhodné podmínky pro efektivní průběh této chlorace, produkt nebyl izolován a následně bylo od tohoto postupu upuštěno.

Poslední zvolenou metodou zavedení chloru do polohy C4 bylo použití sulfurylchloridu. Podle analogické reakce s fenyl derivátem **91** (viz kapitola 3.2.) bylo stanoveno, že je výhodná přítomnost dvou ekvivalentů sulfurylchloridu. V průběhu experimentu vznikala nečistota, jež se objevovala v téměř stejném retenčním čase jako pyrazol **89** (obrázek 13). Při chromatografické separaci ani následné rekrystalizaci se nepodařilo reakční směs vyčistit a pyrazol **89** nebyl získán v dostatečné čistotě. Proto byla po sérii neúspěšných purifikačních procesů zvolena první metoda (chlorace *N*-chlorsukcinimidem) s 55 % výtěžkem jako dostačující.

**Schéma 23.** Chlorace 3-methyl-1H-pyrazol-5-aminu: reakce s *N*-chlorsukcinimidem, chlornanem sodným a sulfurylchloridem.

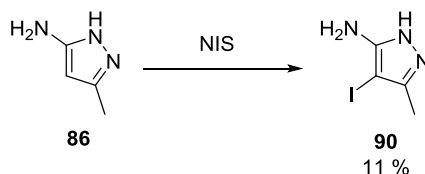


**Obrázek 13.** Vznik pyrazolu **89** a neznámé nečistoty při chloraci pyrazolu **86** použitím SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Jodace C4 polohy pyrazolu **86** byla provedena v acetonitrilu s *N*-jodsukcinimidem (schéma 24). Po extrakci reakční směsi do ethyl acetátu nebyl odstraněn dostatek nečistot, proto byl bazický pyrazol extrahován do kyseliny chlorovodíkové, vyčištěn aktivním uhlím a po neutralizaci extrahován zpět do ethyl acetátu. Následně byl surový produkt krystalizován ze směsi dichlormethan-petrolether, ale stejně jako u analogické reakce s chlorem, byla zjištěna přítomnost sukcinimidu. V <sup>1</sup>H NMR spektru je pro sukcinimid charakteristický chemický posun 2.56 (s, CH<sub>2</sub>) a 11.07 (s, NH), sukcinimid se ve směsi vyskytoval v poměru 1:3.15 k pyrazolu **90**, tedy s 24 % zastoupením, pyrazol **90** zaujímal 66 %. Vzniklá směs byla suspendována ve vodě, aby se rozpustil přítomný sukcinimid, pyrazol **90** se však podařilo získat jen v nízkém výtěžku, pouhých 11 %. Nízká výtěžnost této reakce byla způsobena ztrátami při mnohonásobné extrakci a částečné rozpustnosti produktu ve vodě. Při modelovém

couplingu (viz kapitola 3.3.) se pyrazol **90** jako výchozí látka příliš nevyplatil, protože primárně docházelo k dehalogenaci a vzniku pyrazolu **86**. Konverze modelové Suzukiho reakce byla pouhých 12 %, proto bylo od další optimalizace přípravy jod derivátu pyrazolu **90** upuštěno.

**Schéma 24.** Zavedení jodu do polohy C4 3-methyl-1H-pyrazol-5-aminu pomocí *N*-jodsukcinimidu



### 3.2. Příprava derivátů 4-halogen-3-fenyl-1H-pyrazol-5-aminu (92-93)

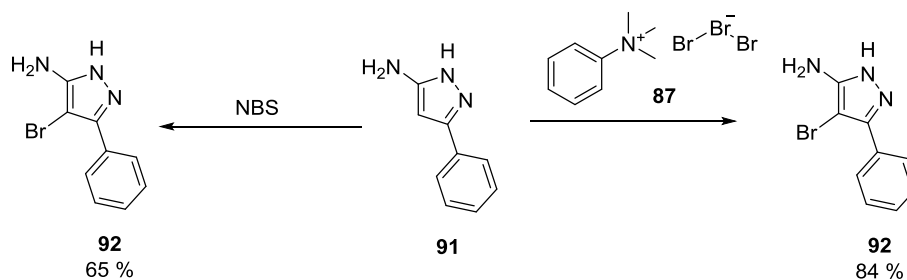
Poté, co byly získány 4-halogen-3-methyl-1H-pyrazol-5-aminy (**88-90**), přesunula se pozornost na přípravu dalších derivátů, 4-halogen-3-fenyl-1H-pyrazol-5-aminů (**92-93**). Podle analogických methyl-derivátů (**88-90**) připadaly v úvahu brom- a chlor-deriváty, které se výše podařilo připravit v dostatečné čistotě a byly dobrými výchozími látkami pro zkoušené cross-couplingové reakce. Příprava jod-derivátu nebyla realizována, protože Suzukiho reakce analogického pyrazolu **90** vedla primárně k redukci jodu v poloze C4 a velmi nízké konverzi produktu.

Pro zavedení bromu do polohy C4 se osvědčila reakce s trimethylfenylammonium tribromidem a bromace *N*-bromsukcinimidem (schéma 25). Reakce s trimethylfenylammonium tribromidem **87** probíhala v acetonitrilu při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Poté byla reakční směs byla extrahována do ethyl acetátu a surový produkt byl čištěn krystalizací ze směsi dichlormethanu a petroletheru. První krystalizace odstranila většinu nečistot, avšak bylo třeba ještě jednou produkt krystalizovat ze směsi methanol – voda. Pyrazol **92** je vzhledem k přítomnosti lipofilního fenylového zbytku nerozpustný ve vodě, takže byl po vysušení získán pyrazol **92** ve vysokém výtěžku 84 %.

Bromace pyrazolu **91** *N*-bromsukcinimidem probíhala v dichlormethanu při laboratorní teplotě. Po odreagování výchozí látky byla směs extrahována do ethyl acetátu, a čištěna chromatograficky. Produkt byl rekrystalizován ze směsi dichlormethan-petrolether a následně

rozmíchán ve vodě. Tímto byl ze směsi odstraněn sukcinimid a byl získán čistý pyrazol **91** s dobrým výtěžkem 65 %.

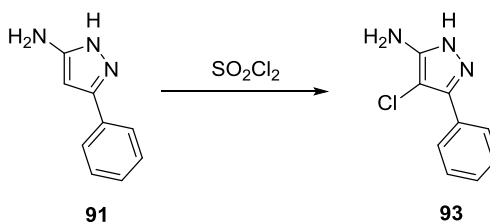
**Schéma 25.** Bromace 3-fenyl-1H-pyrazol-5-aminu: reakce s fenyl trimethylammonium tribromidem a N-bromosukcinimidem



Chlorace pyrazolu **91** byla uskutečněna pomocí sulfurylchloridu (schéma 26). Tuto reakci bylo nutné nejdříve optimalizovat, zjišťoval se poměr pyrazol **92**:sulfurylchlorid, rozpouštědlo a reakční doba. Bylo zjištěno, že optimální je použití dvou ekvivalentů sulfurylchloridu, kdy docházelo k dobré konverzi produktu. Při použití jednoho ekvivalentu sulfurylchloridu neodreagovala výchozí látka, zatímco tři ekvivalenty měly za následek vznik většího množství nečistot. Použitá rozpouštědla, chloroform a kyselina octová neměly na průběh reakce vliv. Dále bylo zjištěno, že s delší reakční dobou výrazně přibývalo vznikajících nečistot. Podle HPLC bylo zjištěno, že pro proběhnutí reakce postačovala doba jedné hodiny za laboratorní teploty.

Při izolaci pyrazolu **93** byla nejprve reakční směs extrahována do ethyl acetátu a čištěna chromatograficky, izolované frakce byly následně čištěny aktivním uhlím, aby se zbavily přítomných nečistot. Izolací úzkého rozmezí frakcí se nepodařilo izolovat čistý pyrazol **93**, jednalo se o směs dvou látek. Následná krystalizace ze směsi dichlormethan-petrolether byla neúspěšná a pyrazol **93** nebyl izolován.

**Schéma 26.** Chlorace 3-fenyl-1H-pyrazol-5-aminu sulfurylchloridem



### 3.3. Optimalizace Suzukiho reakce

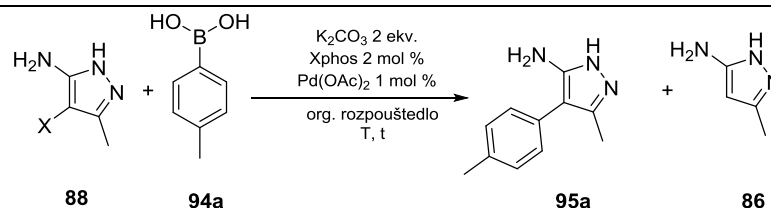
Pro efektivní průběh Suzukiho reakce bylo nezbytné optimalizovat podmínky na modelové reakci 4-halogen-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**88-90**) a *p*-tolylboronové kyseliny. Optimalizační parametry zahrnovaly volbu rozpouštědla, báze a její poměr k výchozí látce, katalytického systému a také příhodnou substituci výchozího pyrazolu **88** halogenem. Rovněž byla zjišťována vhodná teplota, při které reakce probíhala s dobrou konverzí a reakční čas. Při modelové reakci často docházelo k redukci halogenu v poloze C4 a vzniku pyrazolu **86**. Tato látka je typickým vedlejším produktem Suzukiho reakce a při optimalizaci byla snaha jeho tvorbu minimalizovat. Konverze jednotlivých látek byla hodnocena na základě integrace ploch signálů zjištěných z HPLC analýzy.

Volba rozpouštědel (tabulka 1) zahrnovala tyto polární rozpouštědla, které se vždy kombinovala s vodou: etanol, acetonitril, isopropanol, metanol, dimethylformamid a tetrahydrofuran (vstupy 1 až 6). Reakce probíhaly v tlakové zkumavce v olejové lázni při teplotě 90 °C a reakčním čase 20 hodin. Vyplatilo se použití soustavy etanol-voda (vstup 1), kdy docházelo k 56 % konverzi. V reakční směsi však zůstávalo malé množství výchozí látky a docházelo k dehalogenaci a vzniku pyrazolu **86** v množství 29 %. Snížení konverze produktu na 22 % bylo zaznamenáno při použití acetonitrilu (vstup 2). Použití dalších polárních protických rozpouštědel, isopropanolu a metanolu (vstupy 3 a 4), nezvýšilo výtěžnost reakce, v reakční směsi nedocházelo k odreagování výchozí látky a vznikala velká množství pyrazolu **86**. Produkt vznikal jen ze 17 % v případě metanolu, respektive 14 % s použitím isopropanolu. Nejméně se osvědčily reakce v tetrahydrofuranu a dimethylformamidu (vstupy 5 a 6), které vedly primárně k redukci bromu v poloze C4 a vzniku redukovaného pyrazolu **86** v množství 98 %, respektive 96 %.

Značný pokles konverze byl zaznamenán při snížení reakční teploty (položky 7 a 8). Při teplotě 40 °C vznikalo pouhých 7 % produktu a ve směsi zůstávala téměř výhradně výchozí látka **88**. Zvýšení teploty na 70 °C vedlo k nárůstu konverze na 28 %, zároveň byla při vyšší teplotě pozorována zvýšená dehalogenace. Naopak zkrácení nebo prodloužení reakční doby z 20 na 2, 4, resp. 60 hodin nevedlo k výraznému snížení, ani zvýšení konverze produktu (vstupy 9 až 11). Kratší reakční čas způsobil neúplné odreagování výchozí látky, delší reakční čas neměl na reakci vliv, nezvýšila se výtěžnost, ani nepřibývalo nečistot.



**Tabulka 1.** Optimalizace Suzukiho couplingu, rozpouštědla, teplota, čas <sup>a</sup>



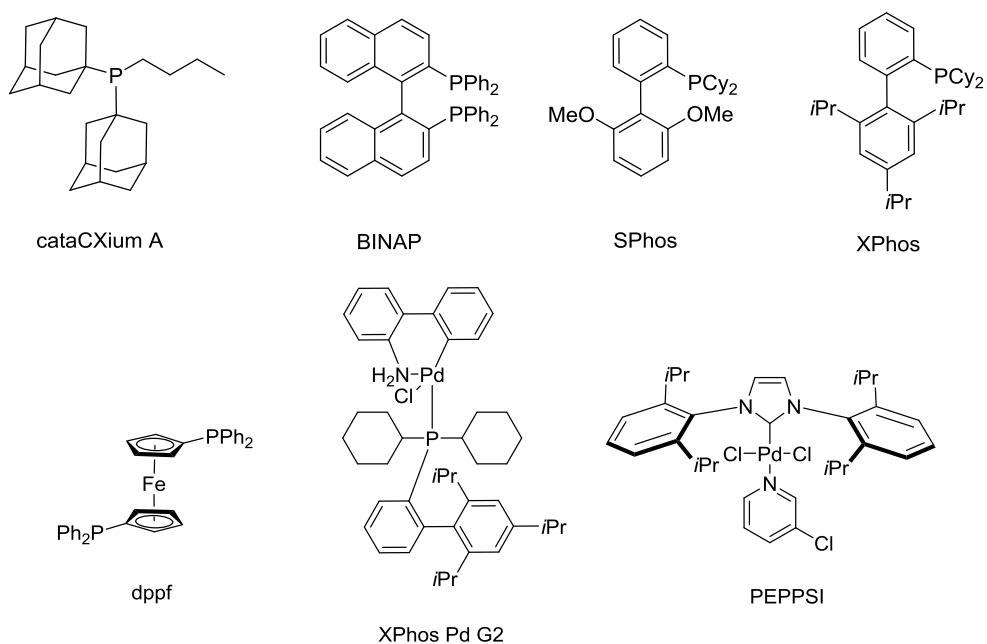
Vstup	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas [hod]	Produkt <b>95a</b> [%]	Pyrazol <b>88</b> [%]	Pyrazol <b>86</b> [%]
1	EtOH	90	20	56	15	29
2	MeCN	90	20	22	10	68
3	<i>i</i> PrOH	90	20	14	10	76
4	MeOH	80	20	17	32	51
5	DMF	90	20	4	0	96
6	THF	90	20	0	2	98
7	EtOH	40	20	7	91	2
8	EtOH	70	20	28	55	18
9	EtOH	90	2	41	40	19
10	EtOH	90	4	53	16	29
11	EtOH	90	60	55	13	32

<sup>a</sup> Reakce byly realizovány za těchto podmínek: pyrazol **88** (0.5 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol), *p*-tolylboronová kyselina (1 mmol), organické rozpouštědlo (2 mL), voda (0.5 mL), XPhos (0.05 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.025 mmol), mícháno pod dusíkem v olejové lázni. Konverze jednotlivých látek byla zaznamenána pomocí HPLC.

Dalšími optimalizovanými parametry byly báze, ligandy a zdroj palladia (tabulka 2). Ze zvolených bází – uhličitanu draselného, uhličitanu cesného, fosforečnanu draselného a fluoridu cesného (položky 1 až 4) se nejvíce vyplatilo použití dvou ekvivalentů uhličitanu draselného (vstup 1). V tomto případě byla konverze 56 %. Při použití silnější báze, CsCO<sub>3</sub> (vstup 2), byl zaznamenán pokles konverze produktu na 36 % a naopak zvýšení podílu dehalogenace. Další snížení konverze produktu, na 19 %, bylo pozorováno v přítomnosti fosforečnanu draselného (vstup 3), kdy docházelo primárně k redukci bromu. Nejhuře hodnocený byl systém s fluoridem cesným (vstup 4), kdy v reakční směsi navíc

neodreagovala výchozí látka **88** a konverze byla pouhých 6 %.

Volba ligandu, tedy katalytického systému (vstupy 5 až 9) byla další důležitou částí optimalizace. Většina systémů byla tvořena uvedeným ligandem a octanem palladnatým, katalytický systém vznikl jejich *in situ* smícháním. Jedním z předpřipravených katalyzátorů byl PEPPSI, který se sestává z palladia i ligandu, dalším kompletním katalytickým systémem byl XPhos Pd G2, který rovněž nevyžadoval přítomnost octanu palladnatého. Použité ligandy jsou znázorněny na obrázku 14. Dobrým katalyzátorem byla kombinace butyldiadamantylfosfinu (cataCXium A) a octanu palladnatého (vstup 5), produkt vznikl s konverzí 58 %, bohužel byla tato reakce provázena zvýšenou dehalogenací. Použití XPhos v kombinaci s octanem palladnatým (vstup 1) neumožňovalo úplné dokončení reakce, produkt vznikl jen z 56 % a ve směsi zůstávala výchozí látka.

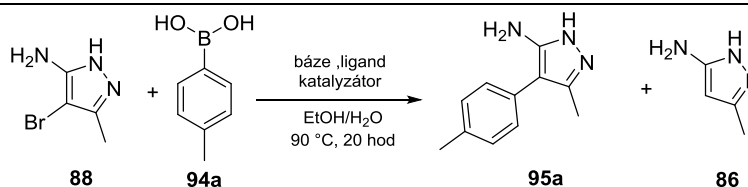


**Obrázek 14.** Ligandy, resp. katalytické systémy využitě při optimalizaci Suzukiho couplingu

Další Buchwaldův ligand, SPhos (vstup 6), nebyl pro modelovou reakci vhodný, produkt vznikl jen s 20 % konverzí. Podobně jako u XPhos, docházelo v případě použití 2,2'-bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftalenu (BINAP) (vstup 7) k neodreagování výchozí látky a k tvorbě pyrazolu **86** ze 45 %, konverze produktu byla pouhých 10 %. Stejný problém se vyskytl i za použití katalyzátoru PEPPSI (vstup 8), konverze produktu byla pouhých 34 %. Ligand na bázi ferrocenu, dppf (vstup 9), se příliš neosvědčil, vznikalo jen 9 % produktu, ve

směsi zůstávala výchozí látka a primárně docházelo k redukci bromu a vzniku pyrazolu **86**. Nakonec byl na modelové reakci testován XPhos Pd G2 (vstup 10), ke kterému byl přidán dodatečný ligand XPhos. Tento systém se pro modelový coupling velmi osvědčil, vykazoval vysokou konverzi produktu, 93 %, a zároveň malé množství vznikajícího pyrazolu **86**.

**Tabulka 2.** Optimalizace Suzukiho couplingu, báze, ligand, zdroj Pd<sup>a</sup>



Vstup	Báze	Ligand	Zdroj Pd	Produkt <b>95a</b> [%]	Pyrazol <b>88</b> [%]	Pyrazol <b>86</b> [%]
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	XPhos	Pd(OAc) <sub>2</sub>	56	15	29
2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	XPhos	Pd(OAc) <sub>2</sub>	36	0	64
3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	XPhos	Pd(OAc) <sub>2</sub>	19	0	81
4	CsF	XPhos	Pd(OAc) <sub>2</sub>	6	46	48
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CataCXium A	Pd(OAc) <sub>2</sub>	58	0	42
6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	SPhos	Pd(OAc) <sub>2</sub>	20	28	80
7	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	BINAP	Pd(OAc) <sub>2</sub>	10	46	44
8	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PEPPSI <sup>b</sup>	-	34	20	46
9	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	dppf	Pd(OAc) <sub>2</sub>	9	24	67
10	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	XPhos	Xphos Pd G2	93	0	7
11	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>c</sup>	XPhos	Xphos Pd G2	36	0	64
12	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>d</sup>	XPhos	Xphos Pd G2	31	0	69

<sup>a</sup> Reakce byly realizovány za těchto podmínek: pyrazol **88** (0.5 mmol), báze (1 mmol), *p*-tolylboronová kyselina (1 mmol), EtOH (2 mL), voda (0.5 mL), ligand (0.05 mmol), zdroj Pd (0.025 mmol), mícháno pod dusíkem v olejové lázni při teplotě 90 °C po dobu 20 hod. Konverze jednotlivých látek byla zaznamenána pomocí HPLC.

<sup>b</sup> Předpřipravený katalyzátor, obsahující palladium a ligand. <sup>c</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v množství 3 ekvivalenty. <sup>d</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v množství 4 ekvivalenty.

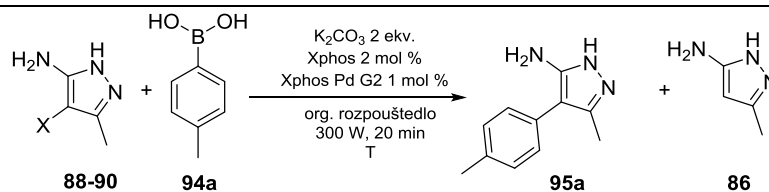
Dále se testovalo, jaké množství uhličitanu draselného v modelové reakci povede k nejvyšší konverzi produktu (vstupy 11 a 12). Při použití dvou ekvivalentů báze byla

konverze produktu 93 % (vstup 10), zvyšování množství ekvivalentů však nevedlo k nárůstu výtěžku. Naopak použitím tří ekvivalentů  $K_2CO_3$  (vstup 11) se rapidně zvýšilo množství vznikajícího dehalogenovaného pyrazolu **86** na 64 %. Při reakci se čtyřmi ekvivalenty  $K_2CO_3$  (vstup 12) se poměr vznikajícího pyrazolu **86** ještě mírně navýšil na 69%. Již toto zjištění ukazovalo, že množství a síla použité báze může mít vliv na rozsah nežádoucí vedlejší reakce - dehalogenace. Proto se dále pokračovalo se dvěma ekvivalenty uhličitanu draselného v kombinaci s katalytickým systémem XPhos Pd G2 a přidaným ligandem XPhos.

Volba substituce výchozího pyrazolu halogenem a stanovení vhodné teploty a rozpouštědla při modelové reakci v mikrovlnném reaktoru (tabulka 3) byla poslední částí celé optimalizace. Tyto reakce byly realizovány v tlakových zkumavkách, tudíž bylo možno pracovat při teplotách nad bodem varu rozpouštědla. Reakce probíhaly za vyšších teplot než v olejové lázni, docházelo k jejich značnému urychlení, a tak byly reakční směsi analyzovány po 20 minutách. Pro všechny experimenty byl nastaven maximální výkon reaktoru 300W. Aktuální výkon se měnil v závislosti na tom, aby se udržela nastavená teplota reakční směsi. Modelová reakce byla prováděna v etanolu a butanolu (vždy ve směsi s vodou). V případě etanolu bylo zkoušeno rozmezí teplot od 100 °C do 135 °C (vstupy 1 až 6), kdy nejvyšší konverze 97 % bylo dosaženo za použití pyrazolu **88** právě při nejvyšší zvolené teplotě 135 °C (vstup 6). Při 100 °C (vstup 1) nedocházelo k odreagování výchozí látky, která se vyskytovala v reakční směsi i po 20 minutách reakce a konverze produktu byla 34 %. Zvýšením teploty na 110 °C (vstup 2) se zvýšila také konverze produktu **95a**, který vznikal ze 74 %, ovšem i v tomto případě byla v reakční směsi stále přítomna výchozí látka **88**. Při 120 °C (vstup 3) proběhla reakce zcela, problémem byl vznikající pyrazol **86**, který vznikal s 25 % konverzí a produkt **95a** s konverzí 75 %. Při zvýšení teploty na 130 °C (vstup 4) se poměr produktu **95a** a dehalogenovaného pyrazolu **86** nezměnil. Snížení podílu boronové kyseliny na jeden ekvivalent (vstup 5) způsobilo také snížení tvorby produktu **95a** na 46 %. Zbývající halogen deriváty (**89 a 90**) byly rovněž použity jako výchozí látky modelové reakce při teplotě 135 °C, která se výše osvědčila (vstupy 7 a 8). Porovnáním konverze jednotlivých reakcí bylo zjištěno, že pyrazol **88** je pro uvedený Suzukiho coupling nejvhodnější, protože dochází ke tvorbě produktu **95a** s excelentní konverzí 97 % a současně vznikající pyrazol **86** se v reakční směsi nacházel pouze v množství 3 %. Pyrazol **89** (vstup 7) byl také velmi dobrým substrátem pro výchozí coupling díky vysoké konverzi na žádaný produkt **95a**, 94 %, a nízkému podílu dehalogenace na pyrazol **86**. Jod derivát **90** (vstup 8) byl ze zvolené škály

nejméně vhodný, po reakci byl ve směsi zjištěn nadbytek pyrazolu **86** a produkt **95a** vznikal pouze s 12 % konverzí.

**Tabulka 3.** *Optimalizace Suzukiho reakce, mikrovlnný reaktor<sup>a</sup>*



Vstup	X	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Boron.kys.(ekviv.)	Produkt <b>95a</b> [%]	Pyrazol <b>88-90</b> [%]	Pyrazol <b>86</b> [%]
1	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	100	2	34	19	47
2	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	110	2	74	4	22
3	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	120	2	75	0	25
4	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	130	2	76	2	22
5	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	135	1	46	0	54
6	Br	EtOH/H <sub>2</sub> O	135	2	97	0	3
7	Cl	EtOH/H <sub>2</sub> O	135	2	94	0	6
8	I	EtOH/H <sub>2</sub> O	135	2	12	0	88
9	Br	BuOH/H <sub>2</sub> O	100	2	81	9	10
10	Br	BuOH/H <sub>2</sub> O	110	2	82	6	12
11	Br	BuOH/H <sub>2</sub> O	120	2	83	1	16
12	Br	BuOH/H <sub>2</sub> O	130	2	87	0	13
13	Br	BuOH/H <sub>2</sub> O	150	2-	75	3	22

<sup>a</sup> Reakce byly realizovány za těchto podmínek: pyrazol **88-90** (0.5 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol), *p*-tolylboronová kyselina (1 mmol), organické rozpouštědlo (2 mL), voda (0.5 mL), XPhos (0.05 mmol), XPhos Pd G2 (0.025 mmol). Reakce probíhaly při výkonu mikrovlnného reaktoru 300 W po dobu 20 min. Konverze jednotlivých látek byla stanovena pomocí HPLC.

Použitím pyrazolu **88** v butanolu při teplotách 100 – 150 °C (vstupy 9 až 13) se nejvyššího výtěžku, 87 %, dočkala reakce při teplotě 130 °C (vstup 12), kdy ve směsi nezůstávala výchozí látka a vznikalo pouze 13 % pyrazolu **86**. Zvyšování teploty na 150 °C

(vstup13) mělo za následek nárůst tvorby pyrazolu **86** (22 %) a konverze na produkt se snížila na 75 %. Teploty 100 a 110 °C (vstupy 9 a 10) se navzájem velmi nelišily, konverze produktu **95a** byla 81 %, resp. 70 % a pyrazol **86** vznikal v množství 10 %. V obou případech byla ve směsi po proběhnutí reakce přítomna výchozí látka **88**. Při teplotě 120 °C (vstup 11) již docházelo k odreagování výchozí látky a 83 % konverzi produktu **95a**. Protože bylo dosaženo vyšších konverzí v systému etanol – voda, byla tato rozpouštědla využita v dalších reakcích.

Tímto byla ukončena optimalizační studie s těmito zjištěnými podmínkami, viz 6. vstup v tabulce 3. Nejvhodnější výchozí látkou byl pyrazol **88**, nejlepší báze a její podíl byly dva ekvivalenty uhličitanu draselného ve směsi rozpouštědel etanol-voda (v poměru 4:1) v mikrovlnném reaktoru při teplotě 135 °C. Aby došlo k úplnému odreagování výchozí látky, dostačovala doba 20 minut.

### 3.4. Studium dehalogenace pyrazolu **88**

V průběhu optimalizace Suzukiho reakce byla vždy pozorována nežádoucí reakce – dehalogenace v poloze C4 u výchozího pyrazolu (**88-90**) a vzniku pyrazolu **86** (v ideálním případě byla tato reakce potlačena na přibližně 5 %). Z tohoto důvodu bylo potřeba zjistit, proč k dehalogenaci dochází, a kterými faktory je tato nežádoucí vedlejší reakce způsobena. Za tímto účelem byly provedeny experimenty, při kterých byly postupně vynechávány jednotlivé komponenty Suzukiho reakce (tabulka 4). Poměr pyrazolů **86** a **88**, a tedy relativní podíl jednotlivých faktorů na dehalogenační reakci, byl stanoven integrací ploch signálů z HPLC chromatogramu.

Nejprve byly provedeny experimenty, kterých se vedle pyrazolu **88** účastnila báze a palladium (vstup 1), respektive báze a boronová kyselina (vstup 2). V obou těchto experimentech byl veškerý výchozí pyrazol redukován za vzniku pyrazolu **86**. Protože nebylo jasné, která z těchto tří komponent pozorovanou dehalogenaci způsobovala, byly provedeny další pokusy, kterých se vedle výchozí látky účastnila jen jedna komponenta.

Pyrazol byl postupně podroben zahřátí v mikrovlnném reaktoru s uhličitanem draselným (vstup 3), *p*-tolylboronovou kyselinou (vstup 4) a s XPhos Pd G2 (vstup 5). Bylo také realizováno zahřívání výchozí látky v samotném rozpouštědle (vstup 6). Samotný uhličitan draselný (vstup 3) způsoboval 100 % redukci výchozí látky na pyrazol **86**. Boronová kyselina (vstup 4) ve směsi zapříčinila částečnou dehalogenaci, avšak 86 % pyrazolu **88**

zůstávalo ve směsi zachováno. Při zahřátí v přítomnosti komplexu palladia, XPhos Pd G2 (vstup 5), k redukci téměř nedocházelo a ve směsi zůstala výchozí látka (99 %). Byl testován také vliv rozpouštědla (vstup 6), nicméně k dehalogenaci v podstatě nedošlo (došlo jen z 1 %). Z výše zjištěných poznatků se usuzovalo, že redukci bromu způsobovala primárně báze a na dehalogenaci mohla mít částečně vliv také boronová kyselina.

**Tabulka 4.** Studium dehalogenace pyrazolu **88** vlivem báze, komplexu palladia a boronové kyseliny<sup>a</sup>

Vstup	Báze			XPhos Pd G2	Boronová kyselina	Pyrazol <b>86</b> [%]	Pyrazol <b>88</b> [%]
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	KOH	KOAc				
1	●	○	○	●	○	100	0
2	●	○	○	○	●	100	0
3	●	○	○	○	○	100	0
4	○	○	○	○	●	13	86
5	○	○	○	●	○	1	99
6	○	○	○	○	○	1	99
7	○	●	○	○	○	100	0
8	○	○	●	○	○	62	38

● komponenta byla použita v reakční směsi, ○ komponenta nebyla použita. <sup>a</sup> Experimenty byly provedeny v mikrovlnném reaktoru za při nastavené teplotě 135 °C, reakčním čase 20 min a výkonu 300 W. Pyrazol **88** (0.5 mmol) byl rozpuštěn v systému EtOH (2 mL) – voda (0,5 mL). Jednotlivá činidla byla přidána v následujícím množství: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol), *p*-tolylboronová kyselina (1 mmol), XPhos Pd G2 (0,025 mmol), KOH (1 mmol), KOAc (1 mmol). Poměr jednotlivých látek byl stanoven pomocí HPLC.

Další experimenty měly objasnit, zdali má také síla báze vliv na dehalogenaci (vstupy 7 a 8). Reakce se silnější bází, hydroxidem sodným, vykazovala 100 % konverzi výchozí látky na pyrazol **86**. Slabší báze KOAc způsobovala dehalogenaci pyrazolu **88** s menší 62 % konverzí a ve směsi bylo i po 20 minutách přítomno 38 % výchozí látky **86**.

Tato krátká studie odhalila, že silnější báze ( $K_2CO_3$  a  $KOH$ ) způsobuje dehalogenaci ve větší míře než báze slabší ( $KOAc$ ) a pozorovaná redukce halogenu může být částečně podpořena boronovou kyselinou. Protože by Suzukiho reakce bez přítomnosti báze nemohla probíhat a jelikož se uhličitan draselný ze zkoušených bází osvědčil při modelové couplingové reakci nejvíce, byly optimalizované podmínky Suzukiho couplingu nezměněny. Pyrazol **86** je možné z reakční směsi odstranit např. chromatografickou separací na silikagelu, neboť je jeho retenční faktor ( $R_f$ ) dostatečně odlišný od retenčního faktoru produktů.

### 3.5. Syntéza pyrazolů **95a - 95g**

Výše zjištěné optimalizované parametry byly aplikovány při syntéze pyrazolů **95a - 95g** z pyrazolu **88** a aryl-, heteroaryl- a styrylboronových kyselin **94a - 94g** (tabulka 5). Typickým vedlejším produktem těchto reakcí byl dehalogenovaný pyrazol **86**, jehož množství se v jednotlivých reakčních směsích téměř nelišilo a standardně se pohybovalo kolem 5 %. Při provedených cross-couplingových reakcích vystupoval pyrazol **88** jako elektrofil a boronová kyselina byla nukleofilním partnerem. Byly použity boronové kyseliny **94a - 94c** obsahující substituenty zvyšující elektronovou hustotu aromatického kruhu, konkrétně obsahující methoxy skupinu v poloze para **94b** a ortho **94c** (+M efekt) a methyl skupinu v poloze para **94a** (+I efekt). Tyto reakce obecně probíhaly s dobrými izolovanými výtěžky mezi 70 až 82 %.

Reakce (*E*)-(4-methoxystyryl)boronové kyseliny **94d** poskytla produkt ve výtěžku 84 %. Při této reakci byla zachována *trans* konfigurace styryl skupiny, což bylo posléze potvrzeno pomocí  $^1H$  NMR analýzy produktu. Naměřená interakční konstanta  $^3J_{HH}$  mezi  $CH=CH$  byla 16.6 Hz, což odpovídá *trans* (*E*) uspořádání dvojné vazby.

Další použitá boronová kyselina **94e** nesla trifluormethylovou skupinu, která vykazuje silný záporný indukční efekt a značně snižuje nukleofilní charakter organoboronové funkční skupiny. Dále je rovněž známo, že trifluormethylová skupina odčerpáváním elektronů snižuje stabilitu C–B vazby, díky čemuž je tato vazba náchylná k protodeborylaci v bazickém prostředí.<sup>61,62</sup> Zřejmě i díky tomu byl produkt **95e** získán jen v nízkém výtěžku 30 %.

Heteroarylboronové kyseliny (**94f - 94g**) jsou poměrně nestabilní a v přítomnosti báze v polárních protických rozpouštědlech obecně tíhnou k protodeborylaci.<sup>63</sup> Reakce pyrazolu **88** a pinacol esteru 5-methylthiofen-2-boronové kyseliny **94f** poskytla produkt pouze



s mírným výtěžkem 57 %. Na druhou stranu cross-coupling furan-3-boronové kyseliny **94g** s pyrazolem **88** vedl ke tvorbě produktu **95g** se 74 % výtěžkem.

**Tabulka 5.** Syntéza pyrazolů **95a-95g**<sup>a</sup>

Boronová kyselina	Produkt	Výtěžek [%]	Boronová kyselina	Produkt	Výtěžek [%]
		79			30
		70			57
		82			74
		84			

<sup>a</sup> Reakce byly realizovány za těchto podmínek: pyrazol **88** (1 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mmol), boronová kyselina (2 mmol), etanol (2 mL), voda (0.5 mL), XPhos (0.1 mmol), XPhos Pd G2 (0.05 mmol). Reakce probíhaly při výkonu mikrovlnného reaktoru 300 W po dobu 20 min.

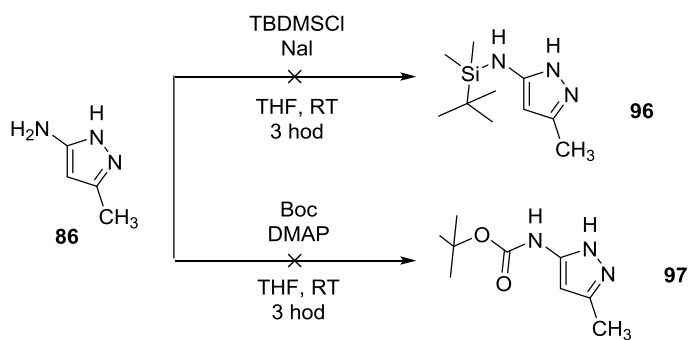
### 3.6. Protekce amino skupiny pyrazolu **86** nebo **88**

Další kapitola této práce byla věnována přípravě pyrazolů **96 – 99**, **101**, **102** a **104** s chráněnou primární amino skupinou a přípravě N1 ochráněného aminopyrazolu **100**, **103**,

**105.** Jako chráničící skupiny byly použity *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (TBDMSCl), di-*tert*-butyldikarbonát (Boc), ftalanhydrid, maleinanhydrid a diethylacetal dimethylformamidu. Důvodem pro tyto protekce byl slibný derivát pyrazolu **95d**, který prokázal velice slibné účinky v biologických testech (viz. kapitola 3.9. týkající se biologického testování). Nebylo zcela jisté, jestli jeho aktivita není náhodou zapříčiněna potenciálními zbytky palladia v produktu. Přestože byl pyrazol **95d** čištěn chromatograficky, struktura aminopyrazolu má určitý předpoklad vázat, respektive chelátovat přechodné kovy. Aby byla tato možnost co nejvíce potlačena, plánovaly se zavést protekční skupiny (protekcce NH<sub>2</sub> a NH). Jedná se tedy o takzvanou protekci před tvorbou komplexů.

*Tert*-butyldimethylsilyl chlorid se používá jako protektivní skupina primárně pro alkoholy, ale také pro aminy nebo amidy. Odstranění této chráničící skupiny se provádí například použitím fluoridových iontů. Byla zkoušena protekce pyrazolu **86** použitím TBDMSCl v přítomnosti hydridu sodného v tetrahydrofuranu při pokojové teplotě v inertní atmosféře (schéma 27). Ani po dvou dnech reakce nebyl v reakční směsi identifikován ochráněný pyrazol **96**, ve směsi se nacházela pouze výchozí látka.

**Schéma 27.** *Chránění amino skupiny pyrazolu 86 *tert*-butyldimethylsilyl chloridem a di-*tert*-butyldikarbonátem*

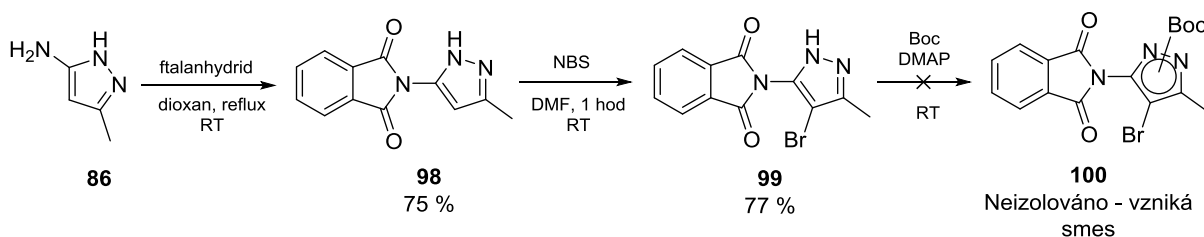


*Tert*-butyloxykarbonylová (Boc) skupina je charakteristická svou stálostí vůči většině nukleofilům a bázím, do substrátu se zavádí pomocí anhydridu Boc<sub>2</sub>O. Štěpí se v kyselém prostředí, například za bezvodých podmínek kyselinou trifluoroctovou nebo chlorovodíkem v dioxanu.<sup>64</sup> Protekce amino skupiny pyrazolu **86** pomocí Boc anhydridu vedla ke směsi produktů a hlavním problémem bylo neodreagování výchozí látky ani při použití nadbytku Boc<sub>2</sub>O (schéma 27), tudíž nebyl pyrazol **97** izolován.

Amino skupinu je možné ochránit také formou ftalimidu reakcí s ftalanhydridem.

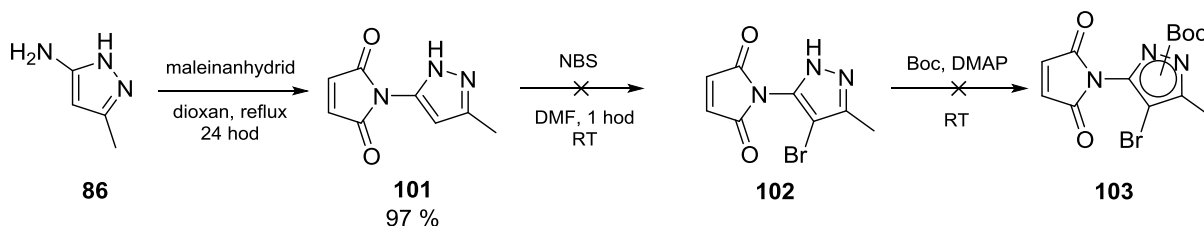
Deprotekci lze uskutečnit jak kyselou, tak bazickou hydrolyzou, nebo hydrazinolýzou.<sup>65</sup> Protekce aminoskupiny byla uskutečněna reakcí pyrazolu **86** s ftalanhydridem ve vroucím dioxanu po dobu 24 hodin. Filtrací byl získán čistý krystalický pyrazol **98** ve výtěžku 75 %, který byl posléze rozpuštěn v dimethylformamidu a C4 poloha byla bromována *N*-bromsukcinimidem při laboratorní teplotě. Po proběhnutí reakce (po jedné hodině od přidavku NBS), byl získán pyrazol **99** a ke směsi přidán Boc<sub>2</sub>O a dimethylaminopyridin jako báze. Přídavek Boc anhydridu způsobil odštěpení bromu a vznik pyrazolu **98**, a navíc ve směsi nedocházelo k odreagování výchozí látky **99**. Poměr **98:99:100** byl zhruba 1:1:1 podle LCMS analýzy. Přídavek dalšího ekvivalentu Boc<sub>2</sub>O a jednoho ekvivalentu triethylaminu zapříčinil vznik směsi produktů, vedle **98**, **99** a **100** docházelo také k deprotekcí a štěpení ftalimidu a vzniku pyrazolu **88** (schéma 28). Proto bylo od Boc protekce opuštěno a místo toho byl izolován derivát **99** obsahující ftalimid na C3(C5) a brom v poloze C4. Izolovaný **99**, s výtěžkem 77 %, byl následně využit jako komponenta Suzukiho reakce.

**Schéma 28.** *Protekce amino skupiny pyrazolu 86 ftalanhydridem, bromace a tvorba N1 substituovaného pyrazolu 100*



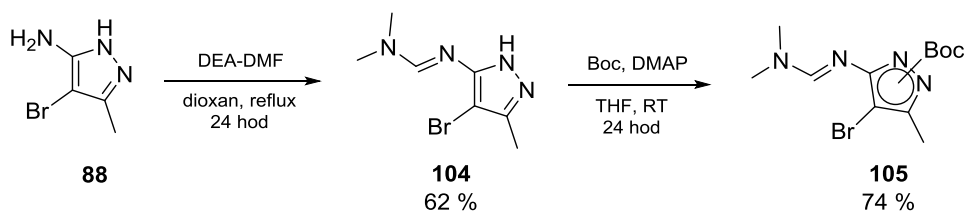
Další možností protekce primární amino skupiny pyrazolu **86** bylo využití maleinanhydridu. Reakce probíhala opět ve vroucím dioxanu po dobu 24 hodin. Filtrací reakční směsi byl získán pyrazol **101** ve formě krystalu s výtěžkem 97 %, který byl následně rozpuštěn v dimethylformamidu a poloha C4 byla bromována *N*-bromsukcinimidem. Po jedné hodině, kdy byla reakce dokončena, byl ke směsi přidán Boc<sub>2</sub>O a dimethylaminopyridin (schéma 29). Ochránění NH skupiny však nebylo úspěšné, ve směsi docházelo k deprotekcí aminoskupiny a vzniku pyrazolu **88** a také nedocházelo k odreagování pyrazolu **102**. Vznik pyrazolu **103** nebyl podpořen ani přidavkem nadbytku Boc<sub>2</sub>O a v reakční směsi nebyl vůbec detekován. Vyčistit a izolovat se podařilo pouze pyrazol **101**, zato s excelentním výtěžkem 97 %.

**Schéma 29.** Protekce amino skupiny pyrazolu **86** maleinanhydridem



Posledním použitým činidlem, které vedlo k protekci amino skupiny, byl diethylacetaldimethylformamid. Jedná se o efektivní chránicí skupinu primárních aminů, jenž se dá odstranit katalytickou hydrogenací nebo hydrolyzou.<sup>66</sup> U této reakce docházelo k protekci amino skupiny pyrazolu **88**. Reakce probíhala zahříváním v dioxanu pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Filtrací a následnou rekrystalizací byl získán krystal **104**, který byl poté podroben Boc protekci v přítomnosti dimethylaminopyridinu (schéma 30). Extrakcí reakční směsi do ethyl acetátu a následnou chromatografickou separací organické fáze byl získán pyrazol **105** ve formě bezbarvého oleje. NMR analýza pyrazolu **105** odhalila přítomnost dvou izomerů, což vzhledem k plánované pozdější deprotekcí nepředstavovalo problém. Ochráněný pyrazol byl získán ve vysokém výtěžku 74 %.

**Schéma 30.** Protekce amino skupiny pyrazolu **88** diethylacetaldimethylformamidem a tvorba N1 substituovaného pyrazolu **105**



### 3.7. Příprava boronových sloučenin **111** a **113**

Nedostatek (*E*)-(4-methoxystyryl)boronové kyseliny a její vysoká cena byla motivací k vlastní přípravě této látky, respektive jejího pinakol esteru. Několika krokovou syntézou byly připravovány boronové sloučeniny, pinakol ester (*E*)-(4-methoxystyryl)boronové kyseliny **111** a (*E*)-(4-methoxystyryl)boronová kyselina **113**. Syntéza těchto sloučenin je znázorněna ve schématu 31.

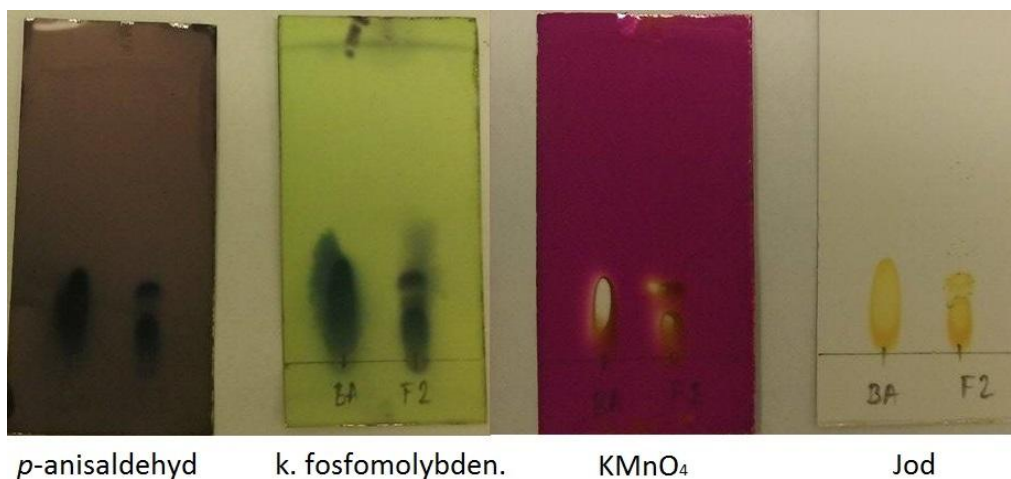
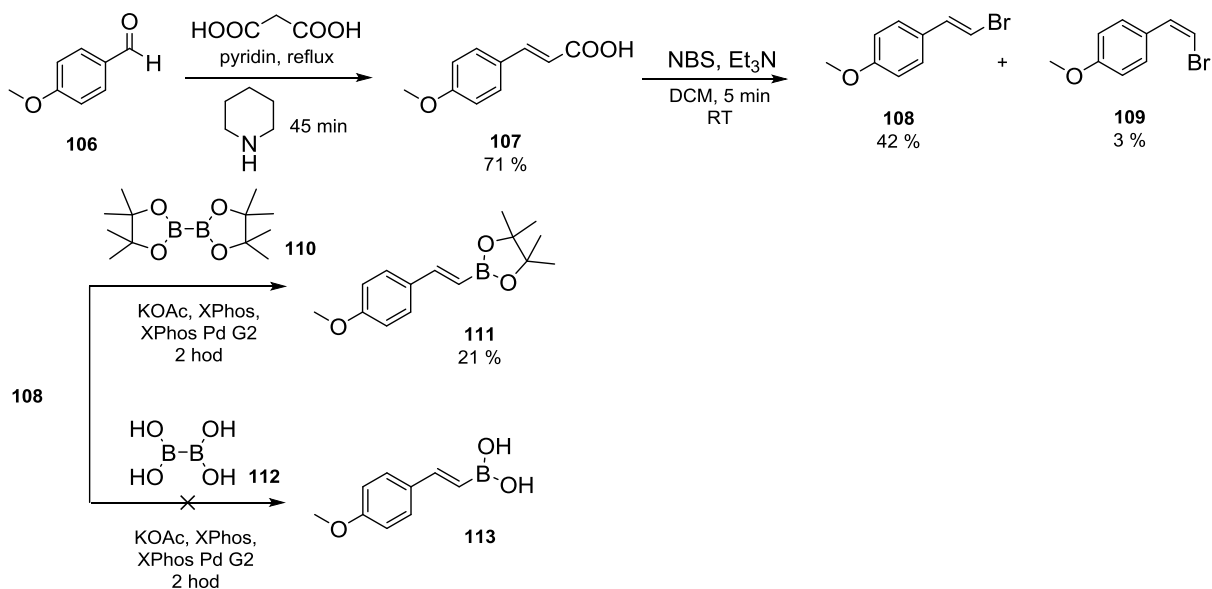
Příprava látek **111** a **113** vycházela z *p*-anisaldehydu **106** a kyseliny maleinové v prostředí pyridinu, směs se zahřívala pod zpětným chladičem a po ochlazení a přidavku kyseliny chlorovodíkové byl získán derivát kyseliny skořicové **107**, a to ve formě bílého krystalu s výtěžkem 71 %.

Dalším krokem byla příprava bromidu **108**, kdy se krystal **107** rozpustil v dichlormethanu a za laboratorní teploty se přidal triethylamin a *N*-bromsukcinimid. Po pěti minutách byla bromace dokončena, reakční směs se extrahovala do ethyl acetátu a čistila se chromatograficky. Byly získány izomery *E* a *Z*, přičemž *E* izomer (**108**) byl získán ve formě bílého krystalu s výtěžkem 42 % a *Z* izomer (**109**) jako bezbarvá kapalná látka a výtěžkem 3%.

*E* izomer byl posléze použit k přípravě boronové kyseliny **113** a pinakol esteru **111**. Příprava sloučeniny **111** probíhala pod inertní atmosférou dusíku ve vroucím EtOH. Nejzdařilejší bylo použití 3 ekvivalentů bispinakol diboronu **110**. Při použití dvou nebo jednoho ekvivalentu se značně snížila konverze produktu **111** a v reakční směsi vznikalo velké množství nečistot. Reakce probíhala v přítomnosti octanu draselného za katalýzy XPhos Pd G2. Reakční doba byla nastavena na čtyři hodiny, delší reakční čas prakticky neměl vliv na konverzi produktu ani vznik dalších nečistot. Po dokončení experimentu byl v reakční směsi přítomen nadbytek bispinakol diboronu **110**, který se podařilo detekovat použitím vizualizačních činidel (anisaldehyd, kyselina fosfomolybdenová, manganistan draselný, jod) na tenkovrstvé chromatografii. Nejlépe viditelná byla **110** při použití fosfomolybdenové kyseliny (obrázek 15). Aby byla reakční směs této látky zbavena, byla extrahována do diethyl etheru a následně několikrát promyta uhličitanem sodným, který štěpí vazbu B-B. Dočištění produktu bylo realizováno chromatografickou separací a po zahuštění byla získána látka **111** ve formě žlutého oleje. Výtěžnost přípravy pinakol esteru **111** však byla pouhých 21 %, ke ztrátám pravděpodobně došlo během několikanásobné extrakce a při chromatografické purifikaci.

Snaha připravit boronovou kyselinu **113** nebyla zdařilá, experiment probíhal pod inertní atmosférou ve vroucím EtOH se třemi ekvivalenty tetrahydroxy diboronu **112** v přítomnosti octanu draselného, ale ani po 24 hodinách nebyla boronová kyselina **113** ve směsi detekována.

### Schéma 31. Příprava boronových sloučenin 111 a 113



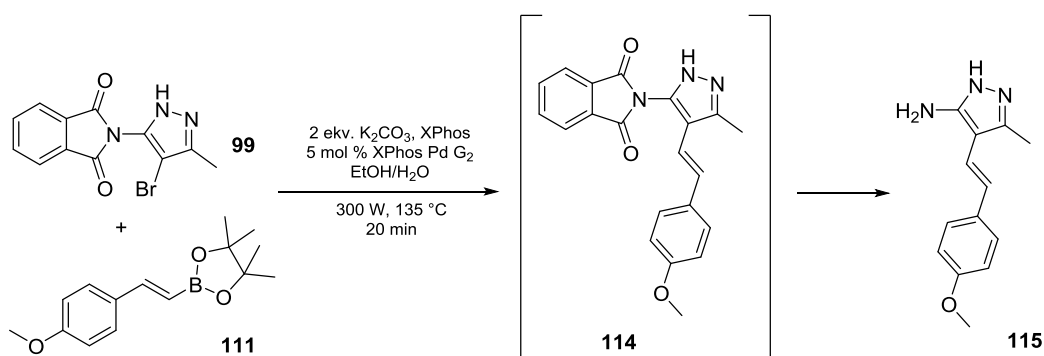
**Obrázek 15.** Detekce bispinacol diboronu 110 (BA) v reakční směsi (F2) použitím vizualizačních činidel, nejefektivnější vizualizace použitím kyseliny fosfomolybdenové (druhá tenká vrstva zleva). Bispinacol diboron je viditelný v reakční směsi F2 „rozmazanou“ skvrnou se stejným  $R_f$ , jako je tomu v případě BA.

### 3.8. Suzuki – Miyaura cross – coupling pyrazolu 99

Připravený pyrazol, nesoucí ochráněnou amino skupinu 99, byl ponechán reagovat s pinakol esterem boronové kyseliny 111 za optimalizovaných podmínek Suzuki reakce (schéma 32), viz kapitola 3.3. V reakční směsi docházelo k silné redukci bromu, odštěpení chránicí skupiny a vzniku pyrazolu 86. Vzhledem ke komplikované purifikaci a ztrátě

protektivní skupiny v průběhu Suzukiho reakce, nebyla tato směs dále zpracována. Tímto experimentem byla také ukončena práce po stránce experimentální, jelikož už se blížilo datum odevzdání závěrečné práce.

**Schéma 32.** Suzuki – Miyaura cross – coupling pyrazolu **99** a esteru boronové kyseliny **111** za optimalizovaných podmínek Suzuki couplingu



### 3.9. Biologické testování pyrazolů **95a** – **95f**

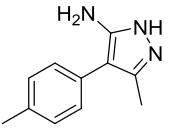
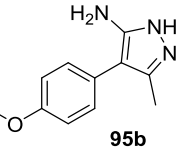
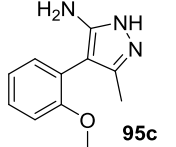
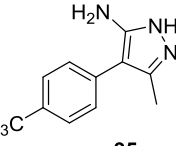
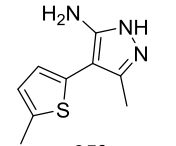
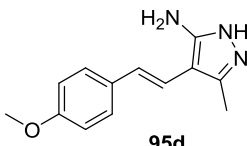
Problematika cyklin-dependentních kináz a využití jejich inhibice, která má vliv na antiproliferační aktivitu lidských nádorových linií, je popsána v kapitole 2.4. Celá bakalářská práce byla věnována syntéze aminopyrazolů s potenciální biologickou aktivitou a odrážela se od strukturního analoga připravovaných aminopyrazolů, **CAN508**. Tento účinný inhibitor CDK2-cyklin E a CDK9-cyklin T1 byl objeven v Laboratoři růstových regulátorů UP, kde bylo také provádělo biologické testování připravených pyrazolů **95a** – **95f**.

U jednotlivých aminopyrazolů byla testována inhibice CDK2/cyklin E a tyrosinové kinázy AbI. Dále byla sledována antiproliferační aktivita lidských nádorových linií K-562 (chronická myeloidní leukemie) a MCF7 (karcinom prsu). Pyrazol **95d**, který vykazoval velmi slibné hodnoty pro výše uvedené nádorové linie, byl následně testován pro HT, MINOD+ a HCT116 (kolorektální karcinom, rakovina tlustého střeva) a i pro tyto nádorové linie poskytl velmi dobré výsledky.

Účinek pyrazolů **95a** – **95g** na inhibici CDK2-cyklin E a antiproliferační aktivitu rakovinných buněk je shrnut v tabulce 6. Pro srovnání jsou zde uvedeny hodnoty roscovitinu, inhibitoru CDK a imatinibu, jež inhibuje tyrosinové kiázy AbI. Vliv inhibice CDK2-cyklin E a proteinu AbI nebyla významná jak pro pyrazol **95a** (vstup 1), nesoucí 4-methylfenylovou

skupinu, tak pro pyrazoly **95b** a **95c** (vstupy 2 a 3), které obsahují methoxyfenylovou skupinu. Rovněž antiproliferační aktivita těchto aminopyrazolů nebyla detekovatelná.

**Tabulka 6.** Biologické testování pyrazolů **95a** – **95f** inhibice CDK2/E a antiproliferační aktivity nádorových linií <sup>a</sup>

Vstup	Vzorek	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>		GI <sub>50</sub> <sup>c</sup>				
		CDK2/E	Abi	K-562	MCF7	HT	MINOD+	HCT116
1	 <b>95a</b>	>100	>100	>100	>100	-	-	-
2	 <b>95b</b>	>100	>100	>100	>100	-	-	-
3	 <b>95c</b>	>100	>100	>100	>100	-	-	-
4	 <b>95e</b>	>100	>100	88,13	>100	-	-	-
5	 <b>95f</b>	>100	>100	>100	>100	-	-	-
6	 <b>95d</b>	>100	>100	9,6	9,6	6,6	10,6	7,2
7	Roscovitin	>100	>100	42	11	-	-	-
8	Imatinib	>100	0,2	0,5	>10	-	-	-

<sup>a</sup> Veškerá měření byla provedena podle metod popsanych ve článku (cit. 54). <sup>b</sup> Hodnota IC<sub>50</sub> udává koncentraci (mM) inhibující 50 % aktivity purifikovaného enzymu. <sup>c</sup> Hodnota GI<sub>50</sub> udává koncentraci (mM) eliminující 50 % buněk v třídením kultivačním testu.

Inhibice CDK nebyla podpořena ani u **95e** (vstup 4), který je nositelem trifluormethylové skupiny, jež je často zodpovědná za biologickou aktivitu pyridinů



a pyrazolů. Takto substituované heterocyklické sloučeniny jsou často využívány v materiálové chemii a vývoji léčiv, mimo jiné jsou součástí komerčně dostupného inhibitoru HIV proteázy.<sup>67</sup> Naopak antiproliferační aktivita pyrazolu **95e** na buněčné linie leukémie byla sice slabá, ale detekovatelná, koncentrace pro  $GI_{50}$  byla  $88 \mu\text{M}$ . Přítomnost heterocyklického substituentu látky **95f** (vstup 5) nezvýšila inhibiční vlastnosti tohoto pyrazolu vůči CDK2/E a AbI, ani jeho antiproliferační aktivitu. Překvapením bylo, že pyrazol **95d** (vstup 6), který je strukturně podobný **CAN508**, inhibitoru CDK2-cyklin E a CDK9-cyklin T1, a jehož inhibice byla při testování na nádorových liniích leukémie, karcinomu prsu a tlustého střeva velmi účinná, nebyl efektivním inhibitorem CDK2/E ani AbI, koncentrace potřebná pro  $IC_{50}$  převyšovala hodnotu  $100 \mu\text{M}$ . Naopak antiproliferační aktivita vůči leukémii (K-562) a karcinomu prsu (MCF7), jež tento aminopyrazol vyvolal, byla detekována shodně při koncentracích  $9.6 \mu\text{M}$ .

Na základě těchto kladných výsledků byly provedeny biologické testy na tři řady kolorektálního karcinomu (HT, MINOD+ a HCT116), které rovněž potvrdily účinnost aminopyrazolu **95d** na dalších nádorových liniích s  $GI_{50}$  koncentracemi 6.6, 10.6 respektive  $7.2 \mu\text{M}$ . Protože pyrazol **95d** nevykazoval detekovatelné inhibiční vlastnosti vůči CDK a AbI se usuzuje, že inhibice  $GI_{50}$  vlivem pyrazolu **95d** probíhá jiným mechanismem, než je tomu u strukturního analoga **CAN508**. Není však možné s jistotou říci, že vysoká biologická aktivita tohoto aminopyrazolu nebyla způsobena či podpořena potenciálními zbytky palladia, které v látce **95d** mohly zůstat neodstraněny.

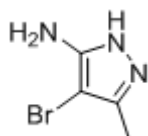
## 4. Experimentální část

Všechny reakce byly provedeny s běžně komerčně dostupnými sloučeninami. Reakce vyžadující vyloučení vzdušné vlhkosti nebo vzdušného kyslíku byly provedeny v inertní atmosféře dusíku, a zároveň s použitím odvzdušněných, respektive vysušených rozpouštědel. Reakce byly monitorovány pomocí TLC nebo HPLC (UHPLC-MS systém, skládající se z UHPLC chromatografu Accela s PDA detektorem a trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, CA, USA); nebo ACQUITY UPLC systému (Waters, USA) s PDA detektorem a hmotnostním spektrometrem s HESI (heated electrospray) a kvadrupólovým analyzátozem s QDA detektorem). Body tání byly měřeny na Koflerově bloku. Protonové, uhlíkové, případně 2D NMR spektra byly pořízeny na spektrometru JEOL ECA 400II o frekvenci 400 MHz. Chemické posuny byly vztaženy vzhledem k reziduálním rozpouštědlům (DMSO *d*<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>COOD nebo CDCl<sub>3</sub>).

### 4.1. Příprava 4-halogenaminopyrazolů

#### 4.1.1. Příprava 4-halogen-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (88-90)

##### 4-brom-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-amin (88)

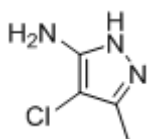


Metoda A: Do roztoku pyrazolu **86** (1.01 g, 10.44 mmol) v ethyl acetátu (25 mL) byl přidán fenytrimethylammonium tribromid (3.93 g, 10.44 mmol) a voda (10 mL). Směs se míchala na elektromagnetické míchačce při pokojové teplotě 1 hodinu, poté byla neutralizována uhličitánem sodným (2.21 g, 20.88 mmol) a extrahována do ethyl acetátu. Organické extrakty byly vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny na vakuové odparce. Surový produkt byl krystalizován ze směsi dichlormethan-toluen. Pyrazol **88** byl získán jako bílá krystalická látka (1.40 g, 76 %), b.t. 102-106 °C.

Metoda B: Do roztoku pyrazolu **86** (5.23g, 54 mmol) v acetonitrilu (105 mL) byl přikapán brom (3.1 mL, 59 mmol) při 0 °C a reakční směs byla míchána 1 hod při 0 °C a poté 1 hod při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidáním vodného roztoku thiosíranu sodného (1.90 g, 50 mmol v 50 mL vody) a uhličitánu sodného (4.00 g, 53 mmol v 50 mL vody). Směs byla extrahována do ethyl acetátu (4 x 40 mL), organické extrakty byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Po zahuštění na odparce byl surový produkt čištěn chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-2 % metanolu v dichlormethanu). Dále byl produkt

krystalizován ze směsi toluen-petrolether. Pyrazol **88** byl získán jako bílá krystalická látka (5.58 g, 59 %), b.t. 116 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 11.63 a 11.47 (br.s, 1H, NH), 5.02 and 4.52 (br.s, 2H, NH $_2$ ) 2.06 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 152.5, 136.7, 79.6, 10.0; HRMS (ESI): vypočteno pro C $_4$ H $_6$ N $_3$ Br [M + H] $^+$  175.9818, 177.9797; nalezeno 175.9821, 177.9796.

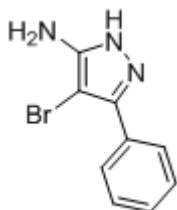
#### 4-chlor-3-methyl-1H-pyrazol-5-amin (**89**)



Do roztoku pyrazolu **86** (1.08 g, 12.42 mmol) v acetonitrilu (10 mL) byl přidán *N*-chlorsukcinimid (1.56 g, 11.70 mmol). Směs se míchala při laboratorní teplotě 1 hod, poté se extrahovala do ethyl acetátu (2x20 mL) a přečistila chromatograficky (SiO $_2$ , mobilní fáze 0-1 % metanolu v dichlormethanu). Produkt byl krystalizován ze směsi dichlormethan-petrolether a pyrazol **89** byl získán jako žlutá krystalická látka (812 mg, 55 %), b.t. 102 – 104 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.08 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 148.1, 137.7, 92.7, 9.6; HRMS (ESI): vypočteno pro C $_4$ H $_6$ N $_3$ Cl [M + H] $^+$  132.0323; nalezeno 132.0325.

#### 4.1.2. Příprava 4-halogen-3-fenyl-1H-pyrazol-5-aminu (**93**)

##### 4-brom-3-fenyl-1H-pyrazol-5-amin (**93**)



Metoda A: Do roztoku pyrazolu **91** (1.00 g, 6.30 mmol) v acetonitrilu (20 mL) byl přidán fenyiltrimethylammonium tribromid (2.37 g, 6.30 mmol) a voda (10 mL). Směs se míchala na elektromagnetické míchačce při laboratorní teplotě 1 hod a poté byla neutralizována uhličitánem sodným (1.34 g, 12.60 mmol) a extrahována do ethyl acetátu (3 x 20 mL). Organická fáze byla zahuštěna na vakuové odparce a surový produkt byl krystalizován ze směsi dichlormethanu a petroletheru. Poté byl pyrazol **93** rekrystalizován ze směsi metanolu a vody, čímž byl získán béžový krystal (1.25 g, 84 %), b.t. 106 – 108 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CD $_3$ COOD)  $\delta$  ppm 7.76 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H), 7.48 – 7.39 (m, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CD $_3$ COOD)  $\delta$  ppm 152.1, 143.7, 130.1, 129.7, 128.2, 127.1, 79.3; HRMS (ESI): vypočteno pro C $_{11}$ H $_8$ N $_3$ Br [M + H] $^+$  175.9818, 177.9797; nalezeno 175.9821, 177.9796.

Metoda B: Do roztoku pyrazolu **91** (2,39 g, 15 mmol) v dichlormethanu (100 mL) byl přidán *N*-bromsukcinimid (2,67 g, 15 mmol). Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny a poté extrahována do ethyl acetátu (3 x 20 mL). Organická fáze byla zahuštěna na

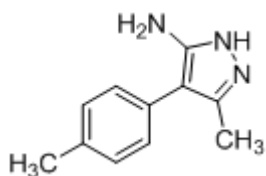
vakuové odparce a čištěna chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-3 % metanolu v dichlormethanu). Surový produkt byl rekrystalizován ze směsi dichlormethanu a petroletheru a následně rozmíchán ve vodě (40 mL) a zfiltrován. Tímto byl získán hnědý krystal (3.32 g, 65 %), b.t. 110 – 112 °C.

## 4.2. Syntéza aminopyrazolů 95a – 95g

### Obecná příprava 3-methyl(aryl/heteroaryl)-1H-pyrazol-5-aminu

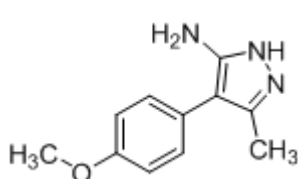
Směs pyrazolu **88** (1 mmol), boronové kyseliny (2 mmol) a uhličitanu draselného (276 mg) se za míchání rozpustí v etanolu (2 mL) a vodě (0.5 mL). Směs se probublává dusíkem 5 minut, poté se přidá XPhos (23 mg, 0.05 mmol) a XPhos Pd G2 (19 mg, 0.025 mmol). Reakce probíhá v mikrovlnném reaktoru za optimalizovaných podmínek (300 W, 135 °C, 20 min). Po proběhnutí reakce se směs přefiltruje přes křemelinu a silikagel, sorbent se promyje 10 % roztokem metanolu v dichlormethanu (10 mL) a poté se čistí chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, eluent metanol v dichlormethanu). Odparek se rozpustí v metanolu a čistí aktivním uhlím, poté se sráží vodou. V případě, že se produkt vyloučí ve formě oleje, odpaří se rozpouštědla na vakuové odparce a voda se odstraní mrazovým sušením (lyofilizace).

### 3-methyl-4-(4-*p*-tolyl)-1H-pyrazol-5-amin (95a)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a *p*-tolyl boronové kyseliny, čištěno chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-2.5 % metanolu v dichlormethanu). Po lyofilizaci byl získán bílý krystal (146 mg, 78 %), b.t. 80 – 82 °C, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COOD) δ ppm 7.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 2.37 (s, 3 H), 2.3 (s, 3 H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COOD) δ ppm 149.8, 143.2, 138.4, 130.7, 129.9, 127.8, 106.2, 21.2, 10.5; HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 188.1182; nalezeno 188.1183.

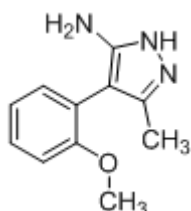
### 3-methyl-4-(4-methoxylyfenyl)-1H-pyrazol-5-amin (95b)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a 4-methoxyfenyl boronové kyseliny, čištěno chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-2 % metanolu v dichlormethanu). Po odpaření metanolu na vakuové odparce byl získán bílý krystal (143 mg, 70 %), b.t. 139 – 141 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 11.32 (br.s, 1 H, NH), 7.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 6.95

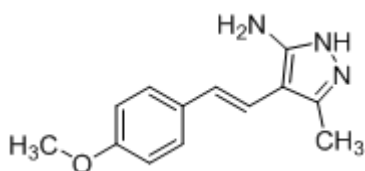
(d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H), 4.32 (br.s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3 H), 2.13 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 156.9, 152.1, 135.2, 129.1, 126.3, 114.0, 104.4, 55.0, 10.8; HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ON<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 204.1131; nalezeno 204.1131.

### 3-methyl-4-(2-methoxyylfenyl)-1H-pyrazol-5-amin (95c)



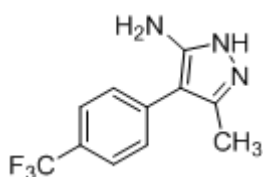
Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a 2-metoxyfenyl boronové kyseliny, čištěno chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-2.5 % metanolu v dichlormethanu). Po lyofilizaci byla získána olejovitá hmota a malé množství krystalu. Tato směs byla rozpuštěna v chloroformu a vyfoukána dusíkem. Byla získána tuhá hnědá medovitá látka (166 mg, 82 %), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.24 (td,  $J = 7.5$  Hz, 1.8 Hz, 1 H), 7.15 (dd,  $J = 7.5$  Hz, 1.8 Hz, 1 H), 7.04 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H), 6.95 (td,  $J = 7.5$  Hz, 1.0 Hz, 1 H), 3.76 (s, 3 H), 2.02 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 156.3, 151.4, 138.3, 130.9, 127.4, 122.2, 120.4, 111.3, 101.5, 55.1, 10.9; HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ON<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 204.1131; nalezeno 204.1132.

### 3-methyl-4-(4-metoxystyryl)-1H-pyrazol-5-amin (95d)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a 4-metoxystyryl boronové kyseliny, čištěno chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0-2 % metanolu v dichlormethanu). Surový produkt byl rozpuštěn ve vodě s přídavkem 1 mL konc. HCl a vyčištěn aktivním uhlím. Po neutralizaci roztokem NaOH byl produkt extrahován do EtOAc. Zakoncentrováním byl získán béžový krystal (192 mg, 84 %), b.t. 163-175 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>COOD δ ppm 7.44 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H), 6.90 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H), 6.75 (d,  $J = 16.6$  Hz, 1 H), 6.74 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COOD) δ ppm 159.3, 149.0, 142.1, 130.4, 128.4, 127.2, 114.0, 113.8, 102.6, 54.6, 10.1; HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 230.1288; nalezeno 230.1289.

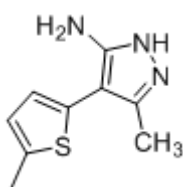
### 3-methyl-4-(4-trifluormethylfenyl)-1H-pyrazol-5-amin (95e)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a 4-(trifluormethyl)fenyl boronové kyseliny, po chromatografii (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0 - 3.5 % metanolu v dichlormethanu) byl získán bílo-

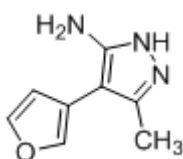
zelený krystal (72 mg, 30 %), b.t. 114 – 119 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  ppm 7.77 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.58 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 2.35 (s, 3H); HRMS (ESI): vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{F}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  242.0900; nalezeno 242.0900

### 3-methyl-4-(5-methylthiofen)-1H-pyrazol-5-amin (95f)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a pinakol esteru 5-methylthiofen-2-boronové kyseliny, čištěno chromatograficky ( $\text{SiO}_2$ , mobilní fáze 0-5 % metanolu v dichlormethanu). Purifikace aktivním uhlím byla vynechána. Odparek rozpuštěn v dichlormethanu a srážen petroletherem, byl získán bílý krystal (110 mg, 57 %), b.t. 116 – 122 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 11.45 (br.s, 1 H, NH), 6.77 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H), 6.73 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H) 4.56 (br.s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 2.42 (s, 3 H), 2.20 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 151.4, 137.2, 135.6, 133.5, 125.5, 122.6, 98.8, 14.8, 11.5; HRMS (ESI): vypočteno pro  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  194.0746; nalezeno 194.0748

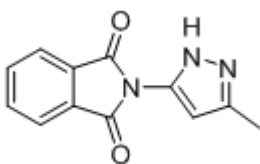
### 3-methyl-4-furan-1H-pyrazol-5-amin (95g)



Připraveno podle obecného postupu z pyrazolu **88** a furan-3-boronové kyseliny, čištěno chromatograficky ( $\text{SiO}_2$ , mobilní fáze 0-3 % metanolu v dichlormethanu). Purifikace aktivním uhlím byla vynechána. Odparek rozpuštěn v dichlormethanu a srážen petroletherem, byl získán bílý krystal (122 mg, 74 %), b.t. 93 – 96 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 11.45 (br.s, 1 H, NH), 7.72 (dd,  $J = 1.6$  Hz, 0.8 Hz, 1 H), 6.67 (dd,  $J = 1.8$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.68 (dd,  $J = 1.8$  Hz, 0.8 Hz, 1 H), 4.56 (br.s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 2.42 (s, 3H), 2.18 (s, 3 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 151.1, 142.8, 137.5, 137.2 (překryv se signálem 137.5), 117.7, 109.7, 95.6, 11.5; HRMS (ESI): vypočteno pro  $\text{C}_8\text{H}_9\text{ON}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  164.0818; nalezeno 164.0820.

## 4.3. Protekce primární amino skupiny pyrazolu **86**

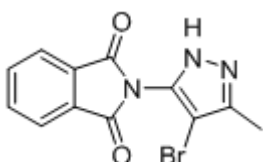
### 2-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (98)



Do roztoku pyrazolu **86** (1.02 g, 10.45 mmol) v dioxanu (20 mL) byl přidán ftalanhydrid (1.70 g, 11.50 mmol). Směs se zahřívala pod zpětným chladičem 24 hodin. Byla získána suspenze, jejíž filtrací byl

izolován pyrazol **98** ve formě jemného bílého krystalu (1.784 g, 75 %), b.t. 265 – 266 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 12.77 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.91 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 2.29 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 166.7, 139.9, 139.7, 134.9, 131.3, 123.5, 101.6, 10.7.

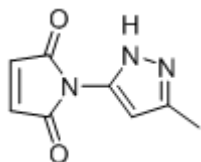
### 2-(4-bromo-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)isoindolin-1,3-dion (**99**)



Pyrazol **98** (893 mg, 3.93 mmol) byl rozpuštěn dimethylformamidu (15 mL) a do roztoku byl přidán *N*-bromsukcinimid (840 mg, 4.73 mmol) a směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě.

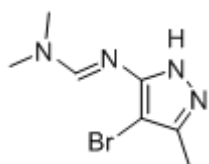
Reakční směs byla převedena do toluenu a zahuštěna. K odparku byla přidána voda, ve které byl nerozpustný, a odparek byl vymíchán ve vodě. Filtrací byl získán bílý krystal (933 mg, 77 %), b.t. 235 – 244 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 13.44 (s, 1H), 8.03 (m, 2H), 7.97 (m, 2H), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 166.2, 139.3, 138.5, 135.4, 131.0, 124.1, 91.1, 10.0; HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>BrO<sub>2</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 305.9873, 307.9852; nalezeno 305.9872, 307.9850.

### 1-(3-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-1H-pyrrol-2,5-dion (**101**)



Do roztoku pyrazolu **86** (1.02 g, 10.45 mmol) v dioxanu (20 mL) byl přidán maleinanhydrid (1.13 g, 11.50 mmol). Směs se míchala na elektromagnetické míchačce pod zpětným chladičem 24 hodin. Byla získána suspenze, jejíž filtrací byl izolován pyrazol **101** ve formě žluto - bílého krystalu (1.797 g, 97 %), b.t. 189 – 193 °C. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 11.03 (s, 1H), 6.48 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 6.33 (s, 3H), 2.211 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 166.7, 162.1, 146.4, 138.8, 132.4, 130.1, 96.0, 10.7.

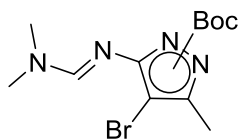
### (*E*)-*N'*-(4-bromo-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-*N,N*-dimethylformimidamid (**104**)



Do roztoku pyrazolu **88** (806 mg, 4.6 mmol) v dioxanu (6 mL) byl přidán diethylacetal dimethylformamidu (787 μl, 4.6 mmol). Směs se zahřívala pod zpětným chladičem 24 hodin. Po přidání petroletheru byl pyrazol **104** izolován filtrací ve formě bílého krystalu (1.334 g, 62 %), b.t. 81 – 82 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COOD) δ ppm 8.43 (s, 1 H), 3.48 (s, 3 H), 3.38 (s, 3 H), 2.30 (s, 3 H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COOD) δ ppm 154.4, 143.6, 141.4, 85.0, 44.0, 37.1, 9.4.

HRMS (ESI): vypočteno pro C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>Br [M + H]<sup>+</sup> 231.0245, 233.0225; nalezeno 231.0244, 233.0218.

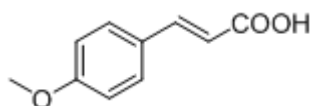
***Tert*-butyl-(*E*)-4-bromo-5-(((dimethylamino)methylen)amino)-3-methyl-1*H*-pyrazol-1-karboxylát (**105**)**



Do roztoku pyrazolu **104** (231 mg, 1 mmol) v tetrahydrofuranu (5 mL) byl přidán Boc<sub>2</sub>O (283 mg, 1.3 mmol) a dimethylaminopyridin (12 mg, 0.1 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin, poté byla extrahována do ethyl acetátu a čištěna chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0 – 0.5 % metanolu v dichlormethanu). Byl získán pyrazol **105** ve formě dvou polohových izomerů (poměr 5:1), bezbarvý olej (244 mg, 74 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>) δ ppm; majoritní izomer: 8.05 (s, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.55 (s, 9H); minoritní izomer: 7.79 (s, 1H), 3.03 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.48 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm směs dvou polohových izomerů: 157.4, 156.4, 155.2, 150.5, 148.9, 147.7, 140.9, 119.5, 95.8, 84.1, 83.5, 33.9, 33.6, 27.5, 13.7, 12.9

#### 4.4. Syntéza boronových sloučenin

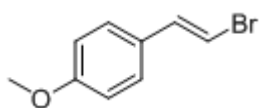
**(*E*)-3-(4-methoxyfenyl)akrylová kyselina (**107**)**



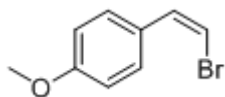
Do roztoku kyseliny malonové (806 mg, 4.6 mmol) v pyridinu (5 mL) byl přidán *p*-anisaldehyd (3.65 ml, 30 mmol). Směs se zahřívala 3 minuty a přidalo se 10 kapek piperidinu. Směs se zahřívala k varu 45 minut, po ochlazení se přidala 2M HCl (50 mL) a vzniklá sraženina se odsála na fritě a promyla 2M HCl (20 mL) a petroletherem (20 mL). Byla získána (*E*)-3-(4-methoxyfenyl)akrylová kyselina **107** ve formě bílého krystalu (3.77 g, 71 %). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.22 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 167.9, 161.0, 143.8, 129.9, 126.9, 116.5, 114.4, 55.3.



**(E/Z)-1-(2-bromovinyl)-4-methoxybenzen (108/109)**



Do roztoku kyseliny **107** (3.477 g, 19.5 mmol) v dichlormethanu (50 mL) byl přidán triethylamin (195  $\mu$ l, 1.40  $\mu$ mol), směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a poté byl do roztoku přisypán *N*-bromosukcinimid (4.165 g, 23.4 mmol) a směs se míchala po dobu dalších 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs extrahována 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 x 50 mL), aby se zbavila přebytečné kyseliny, nasýtila se na silikagel a čistila se chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 5 % Et<sub>2</sub>O v petroletheru). Byly zahuštěny dvě frakce, majoritní *E* izomer (**108**) ve formě průhledné kapaliny (104 mg, 3 %); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 159.3, 136.2, 128.3, 127.6, 114.1, 105.1, 55.1; a minoritní nečistota, která byla identifikována jako *Z* izomer (**109**) ve formě bílého krystalu (1.414 mg, 42 %), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.30 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.27 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 159.4, 129.2, 128.7, 113.5, 85.9, 57.1, 55.1, 50.5.



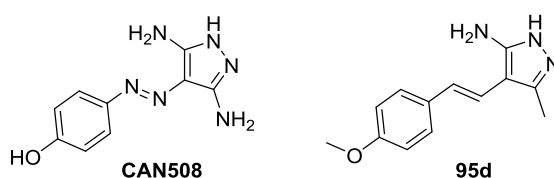
**(E)-2-(4-methoxystyryl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan (111)**

Pod dusíkovou atmosférou byla navážena látka **108** (424 mg, 2 mmol), bispinacol diboron (1.524 g, 6 mmol), XPhos (9.5 mg, 0.02 mmol, 1 mol %), XPhos Pd G2 (7.9 mg, 0.01 mmol, 0.5 mol %) a octan draselný (588 mg, 6 mmol). Byl přidán EtOH (20 mL) a směs se zahřívala pod zpětným chladičem po dobu dvou hodin. Po vychladnutí byla reakční směs extrahována do Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) a následně byla promyta 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 x 40 mL), aby se zbavila přítomného bispinacol diboronu, a dále byla promyta solankou. Po zahuštění byla směs čistěna chromatograficky (SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze 0 – 10 % Et<sub>2</sub>O v petroletheru). Byl získán pinacol ester boronové kyseliny **111** ve formě žluté olejovité látky (109 mg, 21 %). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.05 (d, *J* = 18.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 1.32 (s, 12H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 160.3, 149.1, 130.4, 128.5, 114.0, 83.2, 55.3, 24.8.

## 5. Závěr

Prvním úkolem při řešení bakalářské práce byla optimalizace Suzukiho couplingu aminopyrazolů nesoucí volnou NH skupinu. Na modelové reakci aminopyrazolu a *p*-tolylboronové kyseliny se zjišťovala vhodná substituce výchozího pyrazolu **86** halogenem, příhodná báze, katalytický systém, rozpouštědlo, teplota a reakční doba. Při optimalizačních reakcích byla zároveň pozorována vedlejší reakce - hydrodehalogenace. Logickým krokem byla studie této dehalogenace a snaha ji eliminovat. Když byly zjištěny reakční podmínky a dehalogenace byla téměř potlačena, byly provedeny couplingové reakce s aryl-, heteroaryl- a styrylboronovými kyselinami. Tyto couplingy vedly k syntéze nových aminopyrazolů, které byly získány ve vysoké čistotě a jsou popsány pomocí NMR spekter, bodu tání a HRMS.

Na základě strukturní podobnosti připravených aminopyrazolů s inhibitorem CDK **CAN508**, byly tyto nové aminopyrazoly testovány na jejich potenciální biologickou aktivitu v Laboratoři růstových regulátorů UP. Mezi připravenými pyrazoly se nevyskytovaly vhodné inhibitory CDK2-cyklin E ani enzymu Abl, protože inhibice 50 % aktivity purifikovaného enzymu převyšovala koncentraci 100  $\mu\text{M}$  a tudíž nebyla významná. Jeden z připravených aminopyrazolů (**95d**) však způsoboval 50 % inhibici růstu rakovinných buněk jak K562 (leukémie), tak MCF7 (rakovina prsu) při koncentraci 9.6  $\mu\text{M}$ . Na základě takto slibné cytotoxické aktivity, byl tento aminopyrazol testován na další nádorové linie, a to rakoviny tlustého střeva (HT, MINOD+ a HCT116), jejichž 50 % inhibice byla pozorována při koncentracích 6.6, 10.6 a 7.2  $\mu\text{M}$ . Závěrem se dá říci, že ačkoli je pyrazol **95d** strukturně velmi podobný **CAN508** (viz obrázek 16), je mechanismus inhibice růstu nádorových buněk odlišný od mechanismu **CAN508**, který je na rozdíl od **95d** zároveň inhibitorem CDK. Dále je třeba říci, že pyrazol **95d** svou antiproliferační aktivitou předčil **CAN508**, a proto je jistě zajímavou látkou pro další studie.

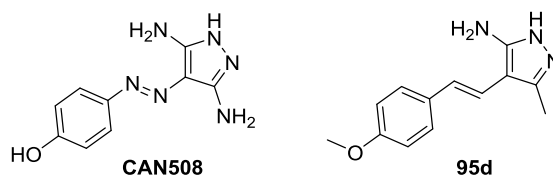


**Obrázek 16.** Inhibitor CDK **CAN508** a připravený analog **95d**, který vykazuje slibnou cytotoxickou aktivitu

## 6. Summary

The efficient method for the Suzuki – Miyaura cross – coupling of unprotected aminopyrazoles bearing free NH group has been developed. This was managed by thorough optimization of the reaction conditions. These studies were accompanied by the side reaction, which caused hydrodehalogenation of the parent aminopyrazole. This side reaction was studied in detail and it was found that it is primarily caused by a base, while palladium has a little or boronic acid has a little effect. Having identified a successful method for Suzuki coupling, a range of aryl-, heteroaryl- and styrylboronic acids were coupled with aminopyrazole bromide. The coupling reactions provided new aminopyrazoles, which were characterized via  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, HRMS spectra and melting points.

Based on the structural relation to CDK inhibitor **CAN508**, the coupled aminopyrazoles were tested for their potential biological activity in the Laboratory of growth regulators UP. None of new aminopyrazoles showed inhibitory effect to CDK2-cyclin E or AbI. On the other hand, the cytotoxic activity of aminopyrazole **95d** caused 50 % growth inhibition of cancer cells for both K562 (leukemia) and MCF7 (breast cancer) at the concentration of 9.6  $\mu\text{M}$ . Based on the excellent antiproliferative activity of **95d**, other cancer cell lines were evaluated and showed as low concentration for 50 % growth inhibition as 6.6, 10.6 and 7.2  $\mu\text{M}$ , respectively, for colon cancer (HT, MINOD+ and HCT116). In conclusion, the mechanism of growth inhibition of cell lines is different for **CAN508** and **95d**, although they are structurally similar (see figure 16). While **CAN508** exhibits both cytotoxic activity and selective inhibition of CDK, **95d** shows only the antiproliferative activity, which on the other hand is stronger than for the parent pyrazole **CAN508**.



**Figure 16.** CDK inhibitor **CAN508** and its structurally related **95d**, which slows promising antiproliferative activity

## 7. Literatura

1. Miyaura, N., Suzuki, A. *Chem. Rev.* **95**, 2457–2483 (1995).
2. Botella, L., Nájera, C. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 179–181 (2002).
3. Navarro, O., Kelly, R. A., Nolan, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16194–16195 (2003).
4. Miyaura, N., Suzuki, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **19**, 866 (1979).
5. Miyaura, N., Yamada, K., Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **20**, 3437–3440 (1979).
6. Casalnuovo, A. L., Calabrese, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4324–4330 (1990).
7. Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine. Boronic Acids* (2006).
8. Miyaura, N., Yamada, K., Suginome, H., Suzuki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 972–980 (1985).
9. Gillie, A. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4933–4941 (1980).
10. Stille, J. K., Lau, K. S. *Acc. Chem. Res.* **10**, 434–442 (1977).
11. Stille, J. K. *Angew. Chemie* **25**, 508–524 (1986).
12. So, C. M., Lau, C. P., Kwong, F. Y. *Org. Lett.* **9**, 2795–2798 (2007).
13. Harkal, S. *et al. Adv. Synth. Catal.* **346**, 1742–1748 (2004).
14. Littke, A. F., Dai, C., Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4020–4028 (2000).
15. Kantchev, E. A. B., O'Brien, C. J., Organ, M. G. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, (2007).
16. Guram, A. S. *et al. Org. Lett.* **8**, 1787–1789 (2006).
17. Guram, A. S. *et al. J. Org. Chem.* **72**, 5104–5112 (2007).
18. Charles, M. D. *et al.* **7**, 3965–3968 (2005).
19. Hooper, M. W., Utsunomiya, M., Hartwig, J. F. *J. Org. Chem.* **68**, 2861–2873 (2003).
20. Martin, R., Buchwald, S. L. *Ind. Res. Dev.* **41**, 1461–1473 (2009).
21. Old, D. W., Wolfe, J. P., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9722–9723 (1998).
22. Nguyen, H. N., Huang, X., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11818–11819 (2003).
23. Walker, S. D., Barder, T. E., Martinelli, J. R., Buchwald, S. L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 1871–1876 (2004).
24. Wolfe, J. P., Singer, R. A., Yang, B. H., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9550–9561 (1999).
25. Kinzel, T., Zhang, Y., Buchwald, S. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14073–14075 (2010).

26. Kuivila, H. G., Reuwer, J. F., Mangravite, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2666–2670 (1964).
27. Fors, B. P., Watson, D. A., Biscoe, M. R., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **3**, 3–5 (2008).
28. Duefert, A., Billingsley, K. L., Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12877–12885 (2013).
29. Bellina, F., Carpita, A., Rossi, R. *Synthesis (Stuttg.)* 2419–2440 (2004). doi:10.1055/s-2004-831223
30. Grasa, G. A. *et al. Organometallics* **21**, 2866–2873 (2002).
31. Zhang, C., Huang, J., Trudell, M. L., Nolan, S. P. *J. Org. Chem.* **64**, 3804–3805 (1999).
32. Ding, S., Gray, N. S., Ding, Q., Schultz, P. G. *Tetrahedron Lett.* **42**, 8751–8755 (2001).
33. Schaper, L. A., Hock, S. J., Herrmann, W. A., Kühn, F. E. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 270–289 (2013).
34. Garrido, R. *et al. Organometallics* **34**, 1855–1863 (2015).
35. Liu, C., Ni, Q., Hu, P., Qiu, J. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1054–1060 (2011).
36. Louie, J., Hartwig, J. F. *Angew. Chemie Int. Ed.* **35**, 2359–2360 (1996).
37. Beletskaya, I. P. *et al. J. Organomet. Chem.* **622**, 89–96 (2001).
38. Peh, G. R., Kantchev, E. A. B., Er, J. C., Ying, J. Y. *Chem. - A Eur. J.* **16**, 4010–4017 (2010).
39. Manolikakes, G., Muñoz Hernandez, C., Schade, M. A., Metzger, A., Knochel, P. *J. Org. Chem.* **73**, 8422–8436 (2008).
40. Yang, Y., Oldenhuis, N. J., Buchwald, S. L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 615–619 (2013).
41. Seregin, I. V., Gevorgyan, V. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 1173–1193 (2007).
42. Catalan, J., Elguero, J. *Adv. Heterocycl. Chem.* **41**, 187–274 (1987).
43. Schonbrunn, E. *et al. J. Med. Chem.* **56**, 3768–3782 (2013).
44. Sherr, C. J. *Sci.* **274**, 1672–1677 (1996).
45. van den Heuvel, S., Harlow, E. *Science* **262**, 2050–2054 (1993).
46. Weinberg, R. A. *Cell* **81**, 323–330 (1999).
47. Fu, W. *et al. Mol. Cancer Ther.* **10**, 1018–1027 (2011).
48. Kryštof, V. *et al. J. Med. Chem.* **49**, 6500–6509 (2006).
49. Shan, B. *et al. J. Biol. Chem.* **280**, 1103–11 (2005).

50. Havlicek, L. *et al. Bioorganic Med. Chem.* **13**, 5399–5407 (2005).
51. Havlíček, L. *et al. J. Med. Chem.* **40**, 408–412 (1997).
52. Moravcová, D. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 2989–2992 (2003).
53. Veselý, J. *et al. Eur. J. Biochem.* **224**, 771–786 (1994).
54. Kryštof, V. *et al. Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1763–1771 (2005).
55. Guha, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 892–4 (2012).
56. Cicenas, J., Valius, M. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 1409–1418 (2011).
57. Massard, C. *et al. Cell Cycle* **10**, 963–970 (2011).
58. Parry, D. *et al. Mol. Cancer Ther.* **9**, 2344–2353 (2010).
59. Paruch, K. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 204–208 (2010).
60. Toogood, P. L. *et al. J. Med. Chem.* **48**, 2388–2406 (2005).
61. Coudret, C., Mazenc, V. *Tetrahedron Lett.* **38**, 5293–5296 (1997).
62. Gronowitz, S., Bobosik, V., Lawitz, K. *Chem. Scr.* **23**, 120–122 (1984).
63. Thakur, A., Zhang, K., Louie, J. *Chem. Commun. (Camb)*. **48**, 203–5 (2012).
64. Englund, E. a, Gopi, H. N., Appella, D. *H.Org. Lett.* **6**, 213–215 (2004).
65. Osby, J. O., Martin, M. G., Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **25**, 2093–2096 (1984).
66. Kidjemet, D. *Synlett* **10**, 1741–1742 (2002).
67. Clapham, K. M., Batsanov, A. S., Bryce. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2155–2161 (2009).

## 8. Seznam zkratek

APhos	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)fenyl)di- <i>tert</i> -butyl fosfin
ATP	Adenosin trifosfát
Ar	Aryl
BINAP	2,2'-Bis(difenylfosfino)-1,1'-binaftyl
Bn	Benzyl
Boc	Di- <i>tert</i> -butyl dikarbonát
cataCXium A	Di(1-adamantyl)- <i>n</i> -butylphosphine
CDK	Cyklin-dependentní kinázy
Cy	Cyklohexyl
DavePhos	2-Dicyklohexylfosfino-2'-( <i>N,N</i> -dimethylamino)bifenyl
dba	Dibenzylidenaceton
DCM	Dichlormethan
DEA-DMF	diethylacetaldimethylformamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Ferrocendiyl-bis(difenylfosfin)
IMes	1,3-bis(2,4,6-trimethylfenyl)imidazol-2-yliden
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NCS	<i>N</i> -chlorsukcinimid
NIS	<i>N</i> -jodsukcinimid
NHC	<i>N</i> -heterocyklické karbeny
PEPPSI	[1,3-Bis(2,6-Diisopropylfenyl)imidazol-2-yliden](3-chloropyridyl) palladium(II) dichlorid
Ph	Fenyl
PPh <sub>3</sub>	Trifenylfosfin
pRb	Retinoblastomový protein
SPhos	2-Dicyklohexylfosfino-2',6'-dimethoxybifenyl
TBDMSCl	<i>Terc</i> -butyldimethylsilyl chlorid
TFA	Kyselina trifluoroctová

THF	Tetrahydrofuran
XPhos	2-Dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenyl
XPhos Pd G2	Chlor(2-dicyclohexylfosfino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-bifenyl)[2-(2'-amino-1,1'-bifenyl)]palladium(II)



## 9. Přílohy – kopie NMR spekter

