

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Příprava některých derivátů 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-
benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on substituovaných v poloze 5 a 6**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Michal Kriegelstein
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Organická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 11.5.2016

.....

Podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D., za odborné vedení a rady při vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ludmile Slaninové, Ph.D. a Mgr. Lukáši Jedinákovi, Ph.D., za měření NMR spekter, Ing. Kamilu Motykovi, Ph.D., za testování antimikrobiální aktivity, doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D., za testování inhibice CDK. Dále bych rád poděkoval kolegům z KOCH za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě také Patricii Trapani za rady a připomínky při psaní této práce. Poděkování také patří finanční podpoře pocházející z grantu IGA-PrF-2016-020.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Michal Kriegelstein
Název práce: Příprava některých derivátů 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-onu substituovaných v polohách 5 a 6
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Katedra organické chemie
Školitel: doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt:

Kondenzací *N*-acetyl isatinu s 5 nebo 5,6-substituovanými benzen-1,2-diaminy byla připravena série aminofenylchinoxalinů, které byly po deacetylaci převedeny na další látky. Diazotací a reakcí diazoniové soli s nadbytkem siřičitanu sodného byly připraveny 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ony. Byla zkoumána reaktivita těchto bisheterocyklických sloučenin, a to zejména vůči alkylačním reakcím. Reakcí 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-onu s nadbytkem *N*-bromsukcinimidu byl připraven monobrom derivát. Reakcí diazoniové soli připravené z ochráněného aminofenylchinoxalinu s C-kyselinami byla připravena série hydrazono derivátů. Redukcí výše zmíněné diazoniové soli se podařilo připravit hydrazino derivát, který byl následně cyklizován za vzniku 5,7-dihydrochinoxalino[2,3-*c*]cinnolinu. U připravených látek byla testována biologická aktivita. Jednalo se o testy inhibice cyklin-dependentní kinasy 2 (CDK2), cytostatického účinku na některých rakovinných liniích (K562 a MCF7) a antimikrobiální aktivity proti *B.Subtilis* a *M.Luteus*.

Klíčová slova: Heterocykly, diazosulfonát, indazol

Počet stran: 89

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Michal Kriegelstein
Title: Synthesis of some derivatives of 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-one substituted in positions 5 and 6
Type of thesis: Diploma
Department: Department of Organic chemistry
Advisor: doc. RNDr. Petr Cankař, Ph.D
The year of presentation: 2016

Abstract:

A series of acylated aminophenylquinoxalines was prepared by reaction of *N*-acetyl isatine with 5 or 5,6-substituted benzene-1,2-diamines. These compounds were deacylated and further transformed into other heterocycles. 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-ones were prepared by reaction of diazonium salt with sodium sulfite. Reactivity of this bisheterocycle was explored, especially towards alkylation and bromination agents. The monobrominated derivative was prepared by reaction of 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-one with the excess of *N*-bromosuccinimide. A series of hydrazones was prepared from deprotected aminophenylquinoxaline by diazotization and subsequent coupling reaction with *C*-acids. The hydrazino derivative was prepared by reduction of previously mentioned diazonium salt by SnCl₂. This hydrazinoderivative was later cyclized to yield 5,7-dihydroquinoxalino[2,3-*c*]cinnolin. Biological activity of prepared compounds was tested. The activity against cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), activity against cell lines (K562 and MCF7), and antimicrobial activity against *B.Subtilis* and *M.Luteus* was tested.

Keywords: Heterocycles, dizonosulfonate, indazol

Number of pages: 89

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

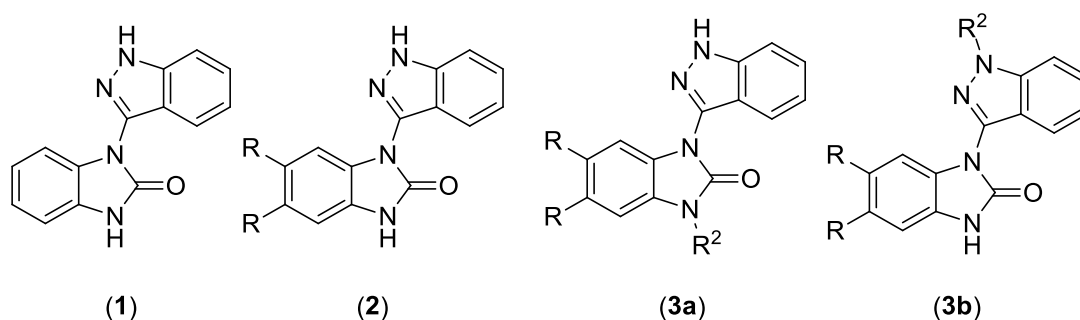
1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1. Syntéza 1-(1 <i>H</i> -indazol-3-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-onu	10
2.2. Mechanismus přesmyku vedoucího k cílovému heterocyklu (1).....	12
2.3. Syntéza a biologická aktivita derivátů chinoxalinu	14
2.3.1. Syntéza derivátů chinoxalinu.....	15
2.3.2. Biologická aktivita derivátu chinoxalinu	17
2.4. Syntéza a biologická aktivita derivátů indazolu.....	19
2.4.1. Syntéza derivátů indazolu	19
2.4.2. Biologická aktivita derivátů indazolu	23
2.5. Syntéza a biologická aktivita derivátů benzimidazol-2-onu	25
2.5.1. Syntéza derivátů benzimidazol-2-onu	25
2.5.2. Biologická aktivita derivátů benzimidazolonu	31
3. Diskuse	33
3.1. Kondenzace diaminů s <i>N</i> -acetylisatinem	34
3.2. Deacetylace derivátů chinoxalinu	38
3.3. Cyklizace odchráněných amino derivátů	40
3.4. Syntéza diazosulfonátu z volného amino derivátu.....	41
3.5. Periferní modifikace heterocyklu (1)	44
3.5.1. Alkylace pomocí alkylhalogenidů	44
3.5.2. Alkylace za Mitsunobu podmínek	46
3.5.3. Alternativní syntéza monobenzylovaného derivátu.....	48
3.5.4. Protekce indazolového dusíku pomocí 3,4-dihydro-1 <i>H</i> -pyranu.....	49
3.5.5. Bromace	49
3.6. Redukce diazoniové soli na hydrazino derivát a jeho cyklizace.....	52
3.6.1. Redukce pomocí SnCl ₂ ·2H ₂ O	52

3.6.2.	Hydrolyza produktů kondenzace diazoniové soli s C-kyselinami.....	53
3.6.3.	Cyklizace hydrazino derivátu	55
3.6.	Aplikace přesmyku na jiných systémech	55
3.7.1.	Syntéza výchozích látek.....	56
3.7.2.	Diazotace a cyklizace.....	58
3.7.	Biologická aktivita připravených látek	59
3.8.	Studium mechanismu přesmyku diazosulfonátu.....	63
4.	Experimentální část	65
4.1.	Úvod.....	65
4.2.	Syntéza	65
4.2.1.	<i>N</i> -(2-(3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid	65
4.2.2.	<i>N</i> -(2-(6,7-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid	66
4.2.3.	<i>N</i> -(2-(6,7-dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid	66
4.2.4.	<i>N</i> -(2-(6-nitro-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid.....	67
4.2.5.	3-(2-Aminofenyl)chinoxalin-2(1 <i>H</i>)-on.....	67
4.2.6.	3-(2-Aminofenyl)-6,7-dimethylchinoxalin-2(1 <i>H</i>)-on.....	68
4.2.7.	3-(2-Aminofenyl)-6,7-dichlorchinoxalin-2(1 <i>H</i>)-on.....	68
4.2.8.	2-(2-(3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát.....	69
4.2.9.	2-(2-(6,7-Dimethyl-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát	69
4.2.10.	2-(2-(6,7-Dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát	70
4.2.11.	1-(1 <i>H</i> -Indazol-3-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-on.....	71
4.2.12.	1-(1 <i>H</i> -Indazol-3-yl)-5,6-dimethyl-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-on	72
4.2.13.	5,6-Dichlor-1-(1 <i>H</i> -indazol-3-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-on	72
4.2.14.	<i>N</i> -(2-nitrobenzyliden)anilin.....	73
4.2.15.	<i>N</i> -(2-aminobenzyliden)anilin	73

4.2.16.	Kyselina 2-nitroskořicová	74
4.2.17.	Methylester kyseliny 2-nitroskořicové.....	74
4.2.18.	Kyselina 2-aminoskořicová.....	75
4.2.19.	Methylester kyseliny 2-aminoskořicové	75
4.2.20.	2,2-Dimethyl-5-(2-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)hydrazono)-1,3-dioxan-4,6-dion	76
4.2.21.	Diethyl 2-(2-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)hydrazono)malonát	76
4.2.22.	(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)carbonohydrazonoyl dikyanid	77
4.2.22.	4-Brom-2-nitroanilin	78
4.2.23.	4-Brombenzen-1,2-diamin	78
4.2.24.	<i>N</i> -benzyl-2-nitroanilin	79
4.2.25.	3-(2-Hydrazinylfenyl)chinoxalin-2(1 <i>H</i>)-on	79
4.2.26.	5,7-Dihydrochinoxalino[2,3- <i>c</i>]cinnolin	80
4.2.27.	Kyselina 2-(1 <i>H</i> -indazol-3-yl)octová	80
4.2.28.	1-(1-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-1 <i>H</i> -indazol-3-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-on	81
4.2.29.	6-brom-1-(1 <i>H</i> -indazol-3-yl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2(3 <i>H</i>)-on	81
5.	Závěr	83
6.	Seznam zkratk	85
7.	Seznam literatury.....	86

1. Úvod

Cílem této diplomové práce je syntéza derivátů 1-(1*H*-indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-onu (**1**). Konkrétně se jedná o deriváty substituované v polohách 5 a 6 (**2**), případně i o *N*-substituované deriváty (**3a**) případně (**3b**). U těchto látek se předpokládá biologická aktivita zejména jako inhibitorů cyklin-dependentních kináz.



Obr. 1: Cílové struktury

Druhým cílem této diplomové práce je objasnění mechanismu přesmyku diazosulfonátu (**4**) vedoucí k cílové sloučenině (**1**) (**Schéma 1**) a využití tohoto přesmyku při syntéze heterocyklických sloučenin jak je naznačeno ve **Schématu 2**.

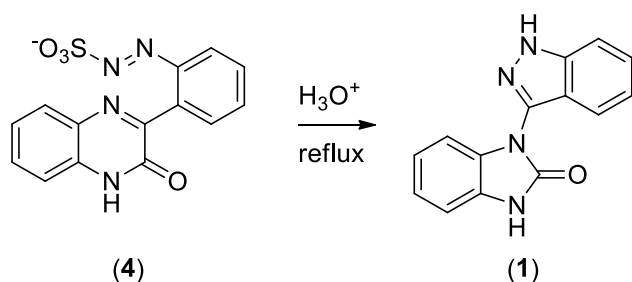


Schéma 1: Cyklizace diazosulfonátu za vzniku cílové látky (**1**)

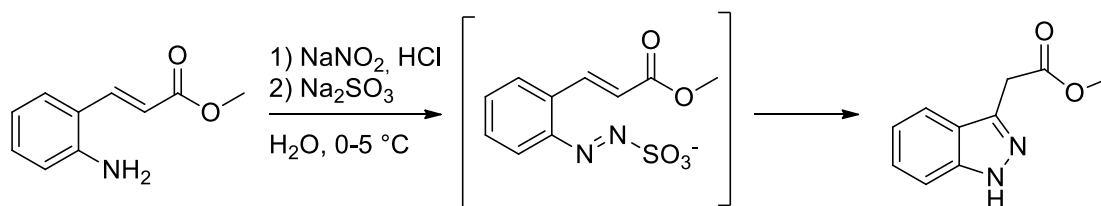
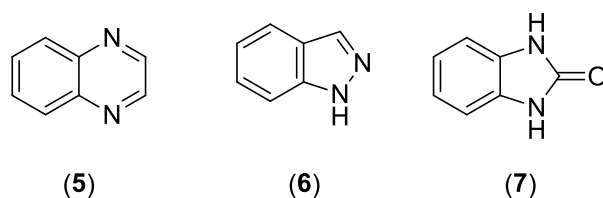


Schéma 2: Cyklizace diazosulfonátu za vzniku derivátu indazolu

2. Teoretická část

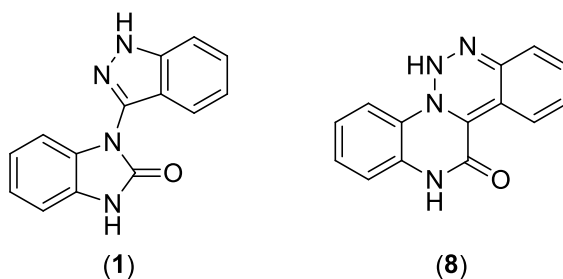
V teoretické části jsou shrnuty popsané syntetické postupy vedoucí k cílové sloučenině (1). Dále je shrnuta syntéza a biologická aktivita některých heterocyklických systémů, které jsou součástí cílové sloučeniny (1). Konkrétně se jedná o deriváty chinoxalinu (5), indazolu (6) a benzimidazolonu (7) (**Obrázek 2**). Chinoxalin byl zvolen z toho důvodu, že jeho derivát (4) je klíčovým intermediátem syntézy cílové látky (1), který by sám o sobě mohl mít zajímavou biologickou aktivitu. Stručné seznámení se syntézou a biologickou aktivitou indazolu a benzimidazolu se nabízí samo, jelikož cílový produkt (1) je ve své podstatě spojení indazolu a benzimidazolu do jedné bisheterocyklické molekuly.



Obr. 2: Struktury chinoxalinu (5), indazolu (6) a benzimidazol-2-onu (7)

2.1. Syntéza 1-(1H-indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-onu

První syntéza 1-(1H-indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-onu (1) byla popsána v roce 2003,¹ nicméně v té době nebyla ještě přesně známá struktura, která byla prvotně mylně určena jako (8). Struktury těchto sloučenin jsou ukázány na **Obrázku 3**.



Obr. 3: Skutečná (1) a původně mylně určená struktura (8)

Správná struktura byla přiřazena až v roce 2006 na základě dusíkových NMR spekter, jejichž analýza byla umožněna využitím reaktantů obohacených o izotop ^{15}N .² Konečné potvrzení struktury finálního produktu bylo provedeno pomocí rentgenové strukturní analýzy.³ Reakční sekvence vedoucí k cílovému produktu je zobrazena ve **Schématu 3**.⁴

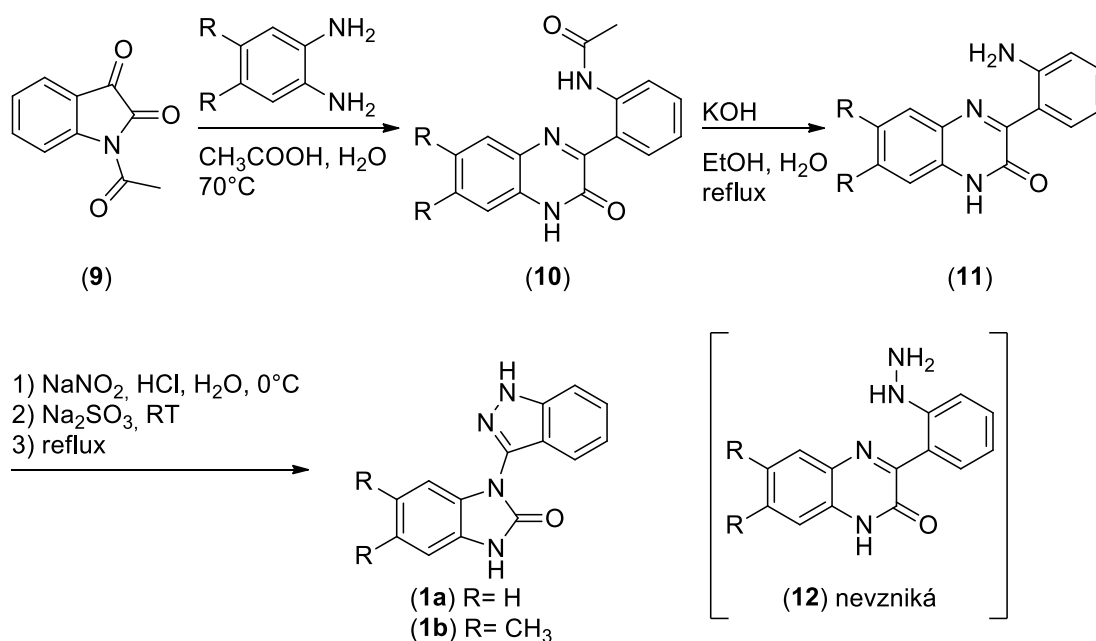


Schéma 3: Reakční sekvence vedoucí k bisheterocyklu (**1**)

Syntéza vychází z *N*-acetylovaného isatinu (**9**), který byl podroben kondenzaci se substituovaným ($\text{R} = \text{CH}_3$) nebo nesubstituovaným ($\text{R} = \text{H}$) *o*-fenyldiaminem ve směsi kyseliny octové s vodou. Vzniklý derivát 2-oxo-chinoxalinu (**10**) byl podroben deprotekcí pomocí roztoku KOH ve směsi EtOH s vodou za refluxu. Následně byl ochráněný amino derivát (**11**) diazotován a u vzniklé diazoniové soli byl proveden pokus o její redukci na hydrazino derivát (**12**) pomocí nadbytku Na_2SO_3 . Tato reakce ovšem nebyla úspěšná a vedla ke vzniku látky (**1**).

Kromě této cesty je v literatuře popsán alternativní postup, který byl využit k potvrzení struktury heterocyklu (**1**).² Tato syntéza vychází z 3-aminoindazolu (**13**) a je zobrazena ve **Schématu 4**.

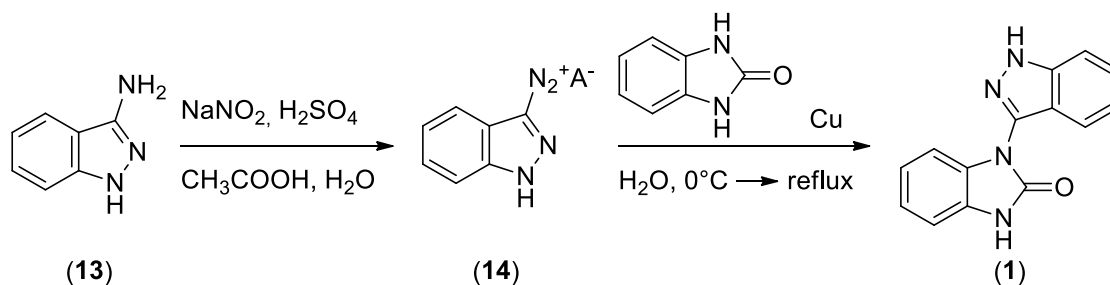


Schéma 4: Alternativní syntéza látky **(1)**

Výchozí 3-aminoindazol **(13)** je diazotován ve směsi kyseliny octové, kyseliny sírové a vody za vzniku diazoniové soli **(14)**. Tato diazoniová sůl je následně podrobena couplingové reakci katalyzované mědí za vzniku cílového heterocyklu **(1)**. Nevýhodou tohoto postupu je zejména nízký výtěžek posledního kroku (15%) a nutná chromatografická purifikace.

2.2. Mechanismus přesmyku vedoucího k cílovému heterocyklu **(1)**

Reakční mechanismus přesmyku diazosulfonátu **(4)** vedoucí ke vzniku heterocyklu **(1)** zatím nebyl uspokojivě prozkoumán. V literatuře je popsán možný mechanismus, který je zobrazen ve **Schématu 5**,³ nicméně tento návrh zatím nebyl potvrzen experimentem. Podobná reakce diazosulfonátu vedoucí k derivátům indazolu již byla popsána dříve.^{5,6}

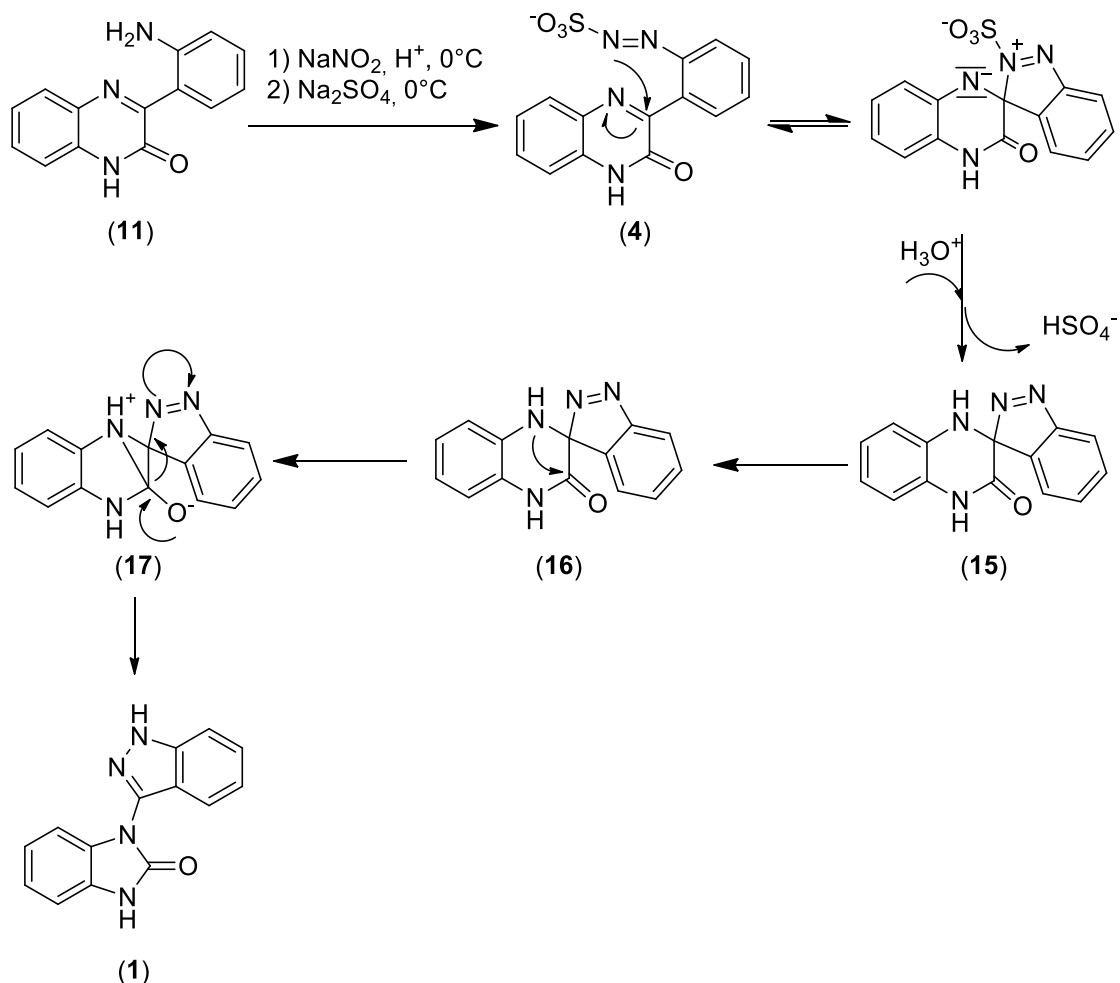


Schéma 5: Navržený mechanismus cyklizace diazosulfonátu

Přesmyk je zahájen nukleofilním atakem diazosulfonátového dusíku na chinoxalinový uhlík v poloze 3 (**4**) a následně odstoupením hydrogensíranového aniontu vzniká spirosloučenina (**15**). Následným atakem elektronového páru dusíku na amidický karbonyl (**16**) vzniká tříčlenný cyklus, který se rozpadá vlivem posunu elektronů od karbonylového kyslíku a po přeskupení elektronů vzniká cílový produkt (**1**). V literatuře byl popsán podobný přesmyk chinoxalin-2-onů vedoucí k 1-(pyrrolyl)benzimidazonům, nicméně ani ten doposud nebyl experimentálně potvrzen.⁷

Vznik diazosulfonátu je popsán v literatuře⁸ a je dále obhájen pomocí elementární analýzy a experimentů, a to jak syntetických, kdy byl diazosulfonát podroben azokopulační reakci s benzen-1,3-diaminem (**Schéma 6**), tak i izolací vznikajícího hydrogensíranového aniontu pomocí BaCl_2 , kdy množství získaného BaSO_4 přesně odpovídalo očekávanému množství uvolněného během rozkladu diazosulfonátu (**4**).³

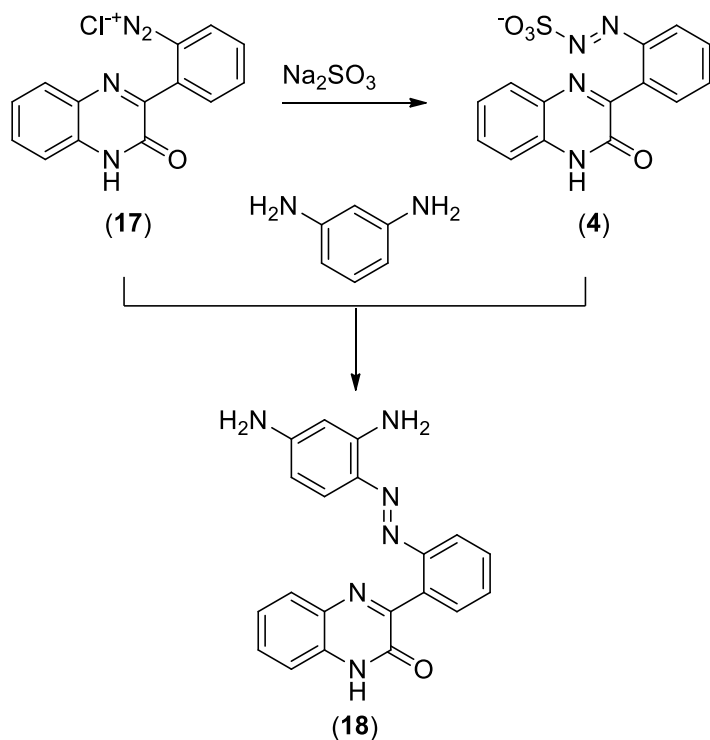
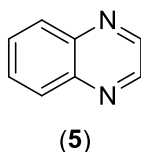


Schéma 6: Kopulační reakce diazosulfonátu s m-fenylendiaminen

2.3. Syntéza a biologická aktivita derivátů chinoxalinu

Chinoxalin (5) je kondenzovaný heterocyklus obsahující kondenzované benzenové a pyrazinové jádro.



Obr. 4: Struktura chinoxalinu (5)

Sám o sobě je nesubstituovaný chinoxalin poměrně nezajímavým heterocyklickým systémem, ale jeho deriváty našly různé využití například v humánní nebo veterinární medicíně.

2.3.1. Syntéza derivátů chinoxalinu

Nejjednodušší metodou pro syntézu chinoxalinu je kondenzace *o*-fenylendiaminu či jeho derivátu s dikarbonylovou sloučeninou, jak je zobrazeno ve Schématu 7.⁹

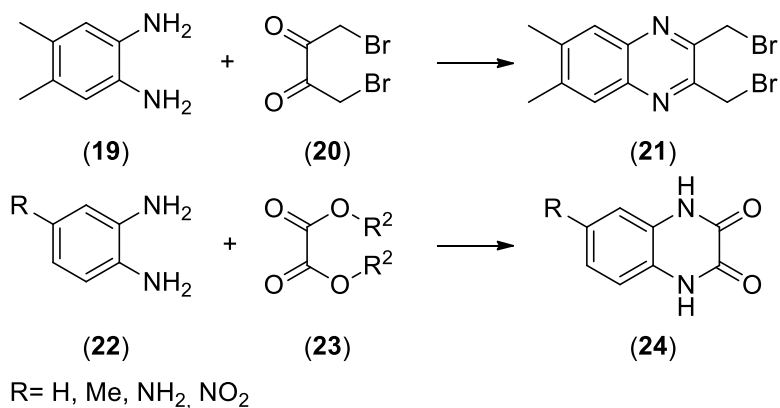


Schéma 7: Kondenzace *o*-fenylendiaminu s dikarbonylovou sloučeninou

Kromě diketonu či diesteru lze použít i jiné dikarbonylové sloučeniny jako jsou např. α -ketokyseliny (26), ať již volné (Schéma 8)¹⁰, případně generované in situ např. z isatinu (28) (Schéma 9) v bazickém prostředí, kdy se cílový chinoxalin (11) vyloučí okyselením reakční směsi¹¹ nebo z acylovaného isatinu (9) v kyselém prostředí (Schéma 10).¹

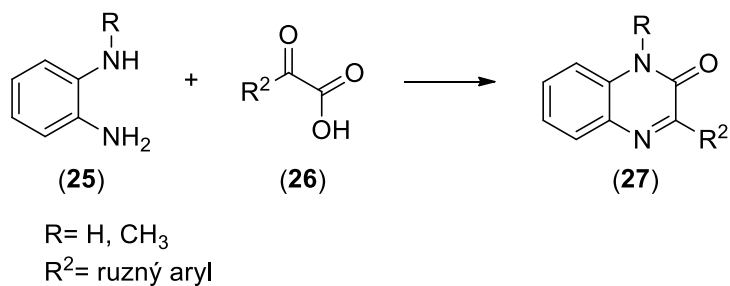


Schéma 8: Kondenzace diaminu s volnou ketokyselinou

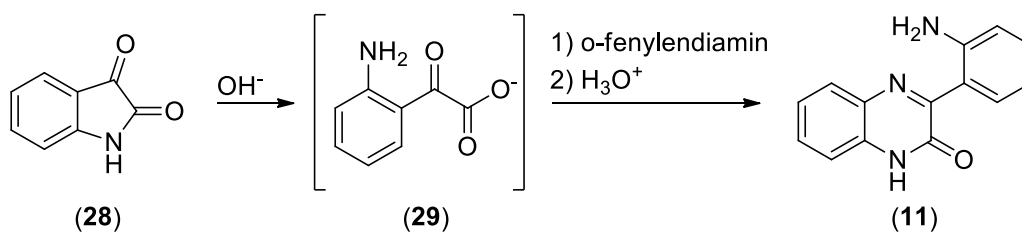


Schéma 9: Generování ketokyseliny *in situ*

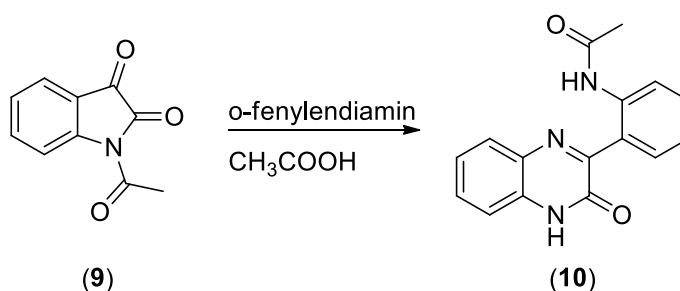


Schéma 10: Kondenzace diaminu s N-acetylisatinem

Další popsaná metoda je založena na kondenzaci 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenu (30) s esterem aminokyseliny. Derivát (31) byl podroben substituci zbývajícího fluorového atomu a následně redukcí, při které vzniklý amino derivát (32) cyklizoval za vzniku dihydrochinoxalinu (33) a po následné oxidaci vzniká derivát chinoxalinu (34), který byl dále využit pro syntézu asymetrického salenového ligandu, jehož koordinační sloučeniny byly dále zkoumány jako katalyzátory pro asymetrickou syntézu.¹²

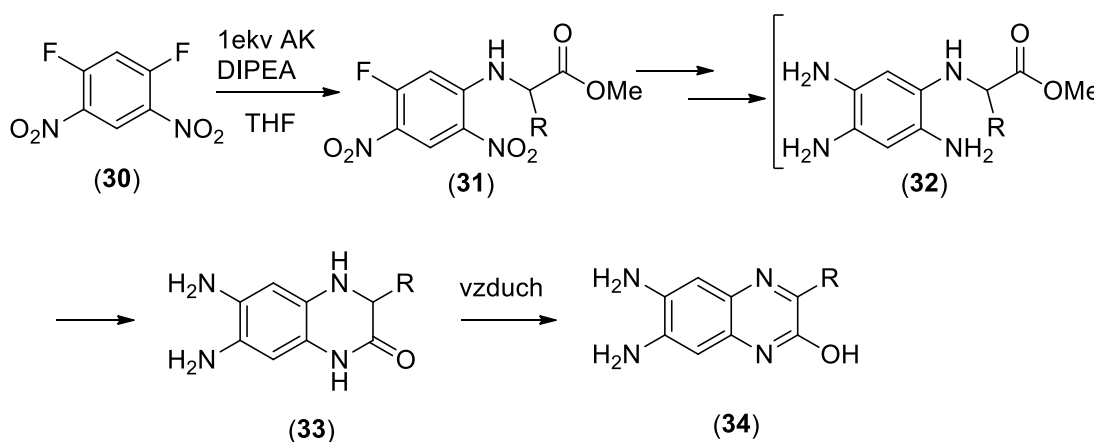


Schéma 11: Syntéza chinoxalinu

Další možností pro syntézu chinoxalinu je Beirutova reakce (Beirut reaction). Jedná se o reakci benzofuroxanu (**35**) s aktivovaným alkenem, např. enamín¹³ nebo vinyl ester (**36**) v přítomnosti diethylaminu vedoucí ke vzniku chinoxalin-1,4-dioxidu (**37**), jak je zobrazeno ve **Schématu 12**.¹⁴ Reakce probíhá s velkým množstvím enamínů nebo iminů, které lze často generovat *in situ* z aldehydu či ketonu reakcí s amoniakem nebo sekundárním aminem.¹⁵

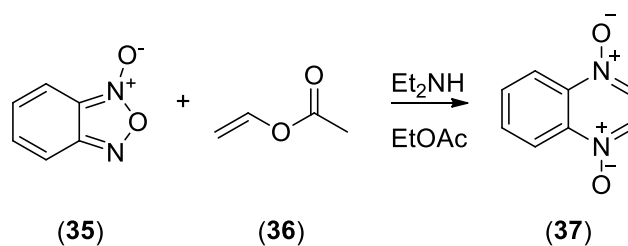
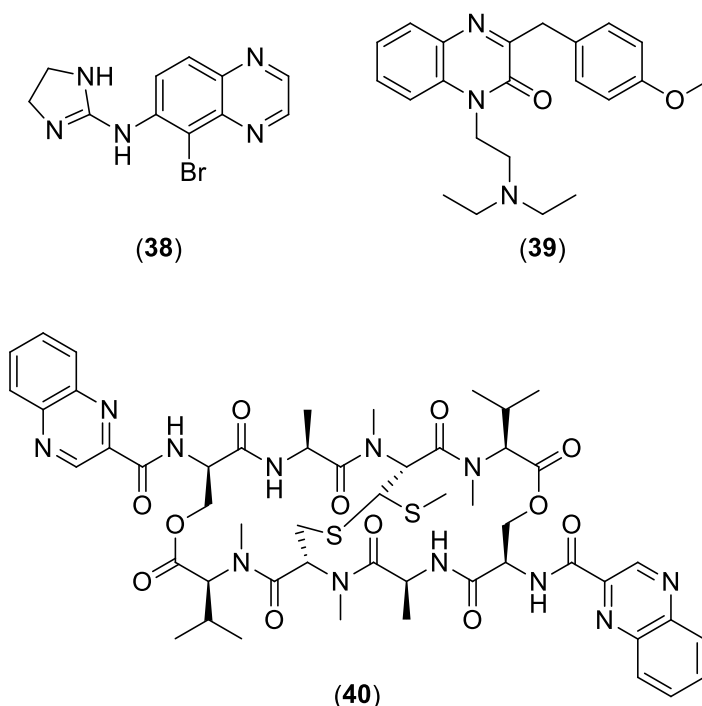


Schéma 12: Beirutova reakce vedoucí k chinoxalin-1,4-dioxidu

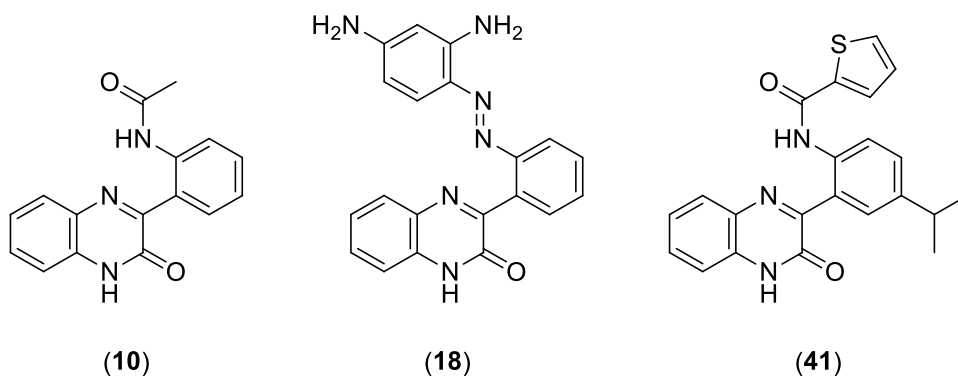
2.3.2. Biologická aktivita derivátů chinoxalinu

Deriváty chinoxalinu jsou poměrně zajímavé díky poměrně širokému spektru biologických aktivit. Chinoxalin je součástí některých používaných léčiv, jako je např. brimonidin (**38**) používaný ke snížení nitroočního tlaku a léčbě glaukomu¹⁶ nebo caroverin (**39**) používaný při léčbě ušních chorob.¹⁷ Je také součástí cyklického peptidu echinomycinu (**40**), který má protinádorové účinky.¹⁸



Obr. 5: Struktura brimonidinu (38), caroverinu (39) a echinomycinu (40)

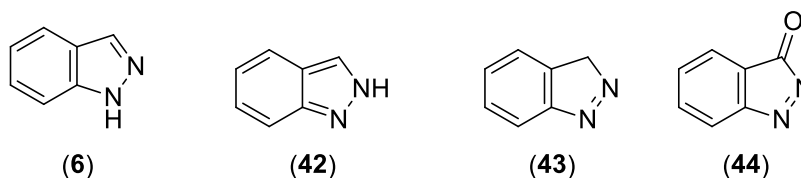
Kromě těchto komerčně používaných léčiv byla například syntetizována i knihovna derivátů chinoxalin-2-onu jako inhibitorů serin-threonin kinasy 33 (STK33), jejíž inhibice je toxická pro některé rakovinné buňky.¹⁹ Nejzajímavější na této knihovně je ovšem strukturní podobnost syntetizovaných látek s derivátem (10), který je jedním z intermediátů připravených v rámci této diplomové práce, a také již poněkud vzdálenější podobnost s derivátem (18), který byl již dříve připraven pro potvrzení struktury diazosulfonátu (4).³ Struktura těchto látek a struktura nejúčinnějšího chinoxalinového inhibitoru STK33 ($IC_{50} = 0,014\mu M$) (41) jsou uvedeny níže na **Obrázku 6**.



Obr. 6: Srovnání struktur inhibitoru STK33 (41) chinoxaliny (10) a (18)

2.4. Syntéza a biologická aktivita derivátů indazolu

Indazol (6) je kondenzovaným heterocyklem obsahující benzenové a pyrazolové jádro. Může se vyskytovat ve třech tautomerních formách, a to 1H (6), 2H (42) a 3H (43). 1H izomer je stabilnější než 2H a 3H izomery indazolu.²⁰ Dále je známo pouze několik případů 3H-indazolu nesoucí v poloze 3 alkyl nebo aryl, nicméně deriváty indazol-3-onu (44), na které se dá pohlížet jako na deriváty 3H-indazolu, jsou poměrně dobře popsány.



Obr. 7: Struktura indazolu (6) a jeho tautomerních forem (42) a (43)

2.4.1. Syntéza derivátů indazolu

Existuje několik obecných metod pro přípravu derivátů 1H-indazolu. První z nich je kondenzace aromatického o-acylfenylhydrazinu (45) za vzniku indazolu (46), jak je uvedeno ve **Schématu 13**.⁹ Je také možné generovat hydrazon *in situ* reakcí acylderivátu s vhodnou odstupující skupinou v ortho poloze (47) s derivátem hydrazinu v přítomnosti báze za vzniku derivátu indazolu (48) (**Schéma 13**).⁹

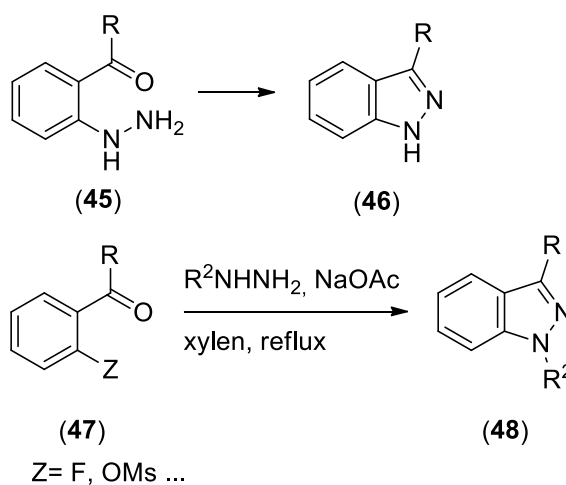


Schéma 13: Kondenzace hydrazino derivátu vedoucí k indazolu

Druhou skupinou metod přípravy 1H-indazolů jsou cyklizace vhodných diazoniových solí. První možností je kondenzace diazoniové soli s methylenovou skupinou v ortho poloze (**49**) za vzniku indazolu (**50**).⁹ Ačkoliv diazoniová sůl je sama o sobě dostatečná k aktivaci methylenových vodíků, reakce poskytuje vyšší výtěžky v případě, kdy jsou methylenové vodíky dále aktivovány jako například u diazoniové soli (**51**), jak je ukázáno ve **Schématu 14**.⁹

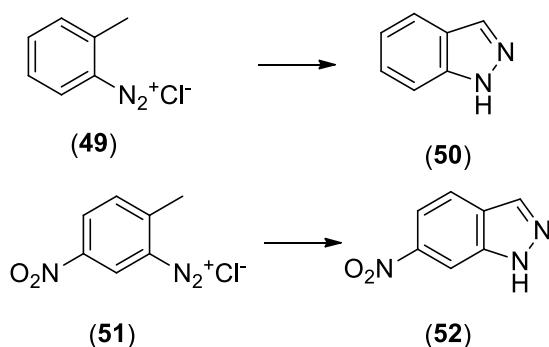


Schéma 14: Obecné schéma cyklizace diazoniové soli vedoucí k indazolu

Konkrétní případ této reakce a rozdíl ve výtěžku je ukázán ve **Schématu 15**. V případě cyklizace diazoniové soli vznikající z aminu s neaktivovanými methylenovými vodíky (**53**) vzniká indazol (**54**) v 58% výtěžku.²¹ Pokud jsou methylenové vodíky aktivované jako v případě aminu (**55**), výtěžek vznikajícího indazolu (**56**) je 82%.²²

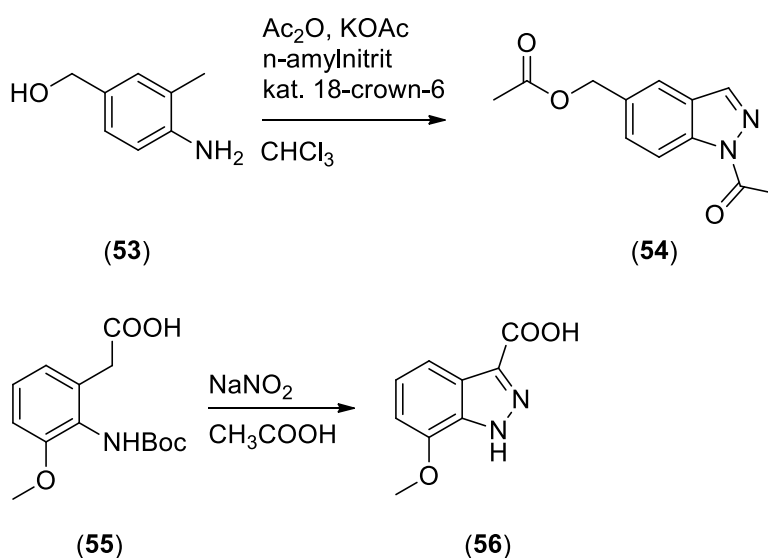


Schéma 15: Cyklizace diazoniové soli vedoucí k derivátům indazolu

Diazoniové soli se nemusí cyklizovat pouze s methylenovou skupinou. Je popsána i cyklizace o-alkynyl diazoniové soli (**57**) za vzniku benzoyl derivátu (**58**).²³ V závislosti na reakčních podmínkách a struktuře derivátu je možné získat cinnolin (**60**), který vzniká cyklizací diazoniové soli (**59**), jak je znázorněno ve **Schématu 16**.²⁴

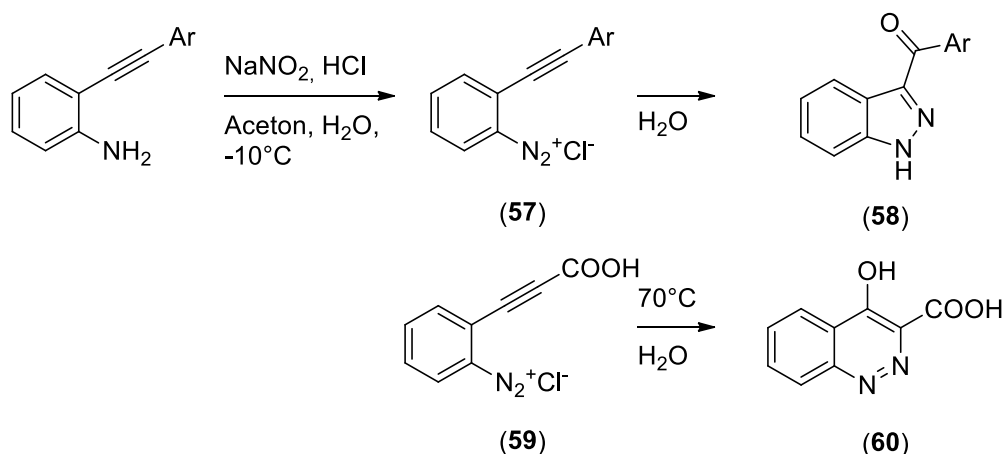


Schéma 16: Cyklizace diazoniové soli s alkynty

Další možností je přesmyk derivátů *N*-aminoisatinu (**61**) v kyselém prostředí vedoucí k derivátům indazol-3-karboxylové kyseliny (**62**). Výhodou je zejména relativně snadná dostupnost derivátů isatinu, které se dají připravit například acylací derivátů anilinu s oxalylochlorem a následnou intramolekulární Friedel-Craftsovou acylací.⁹ Tato metoda byla použita například při syntéze indazolových alkaloidů nigellicinu (**63**) a nigeplaninu (**64**).²⁵ Syntéza těchto alkaloidů je zobrazena ve **Schématu 17**.

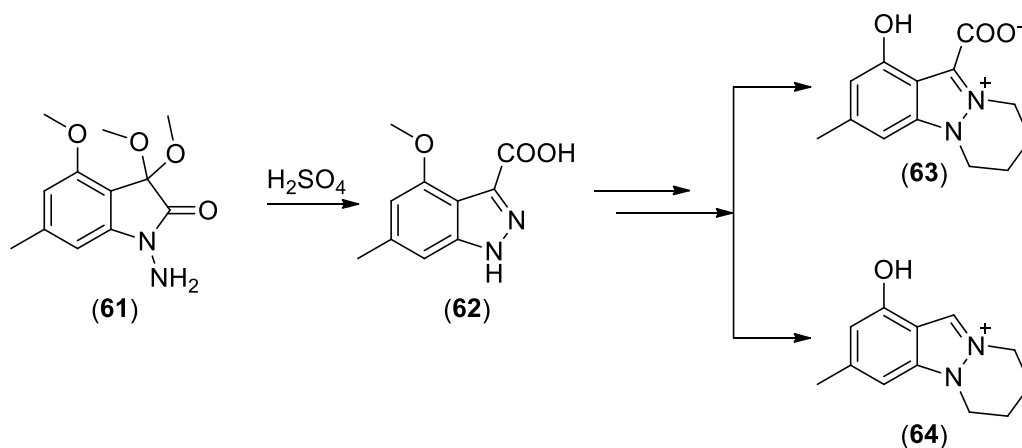


Schéma 17: Syntéza indazolových alkaloidů

Kromě těchto cyklizačních metod lze indazoly syntetizovat pomocí [3+2] cykloadiční reakce fluorbenzenu (**65**) s trimethylsilyldiazomethanem za přítomnosti lithium tetramethylpiperazinu (LTMP). Reakce pravděpodobně zahrnuje tvorbu benzynu, jelikož byla pozorována směs regioisomerů (**66**) a (**67**). Reakce je ukázána ve **Schématu 18**, v závorkách je uveden poměr regioisomerů (**66**) a (**67**).²⁶

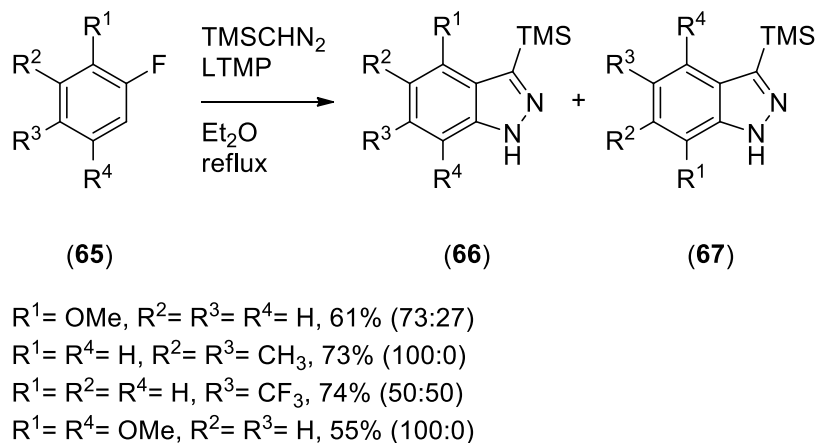


Schéma 18: Syntéza derivátů indazolu pomocí [3+2] cykloadice

Poměrně zajímavou cestou k indazolu je reakce derivátů 2-(1*H*-pyrazol-5-yl) acetonitrilu (**68**) s α -oxoketen dithioacetalem (**69**). Nejprve dochází ke kondenzaci derivátu pyrazolu (**68**) s dithioacetalem (**69**) za vzniku derivátu (**70**), který je následně aromatizován refluxem v prostředí *p*-toluensulfonové kyseliny v benzenu za vzniku indazolu (**71**), jak je ukázáno ve **Schématu 19**. V případě potřeby je možné odstranit kyanoskupinu refluxem v kyselém prostředí, kdy dochází nejprve k hydrolyze nitrilu na karboxylovou kyselinu a následně k dekarboxylaci. Thioether je možné odstranit redukcí pomocí Raneyovo niklu.²⁷

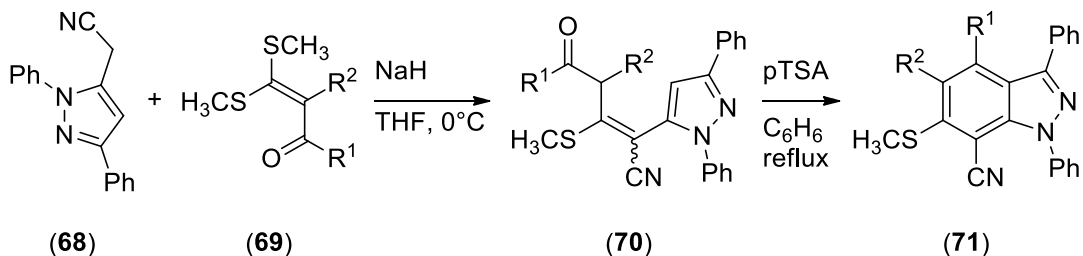
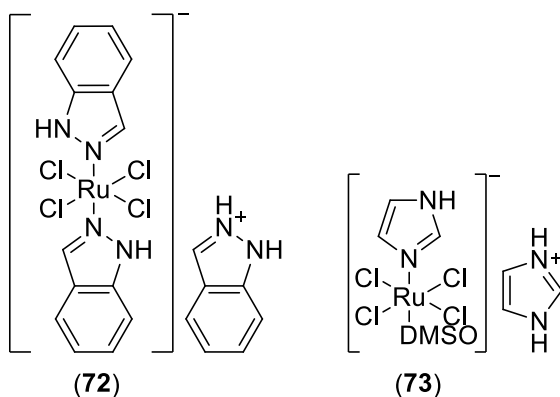


Schéma 19: Syntéza derivátů indazolu vycházející z derivátu pyrazolu

2.4.2. Biologická aktivita derivátů indazolu

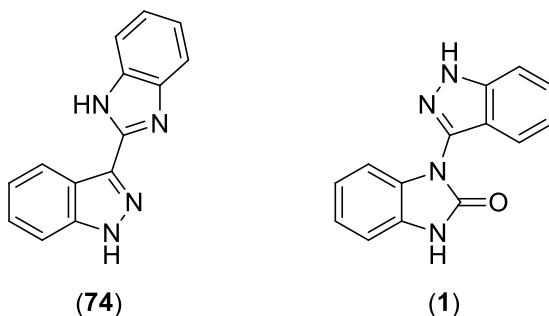
Pravděpodobně nejzajímavější sloučeninou nesubstituovaného indazolu je jeho tetrachlorido komplex s rutheniem KP1019 (**72**). Sloučeniny ruthenia jsou v poslední době aktivně studovány jako možná alternativa ke sloučeninám platiny jakožto protirakovinným léčivům.



Obr. 8: Struktura KP1019 (**72**) a NAMI A (**73**)

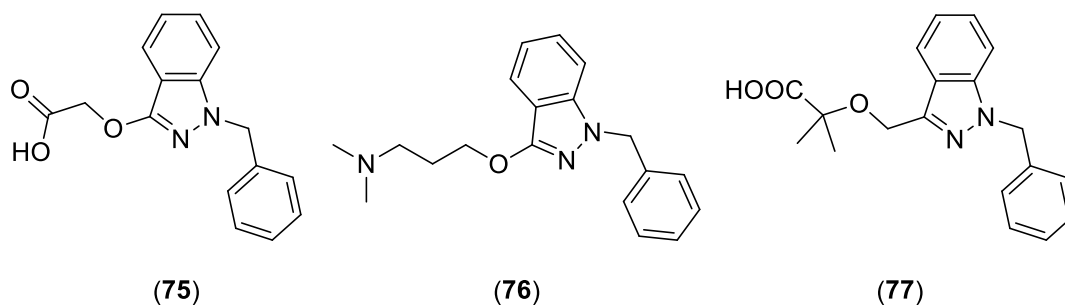
KP1019 společně s NAMI-A (**73**) jsou první léčiva na bázi ruthenia, která se dostala do klinického testování. KP1019 se ukázal jako aktivní vůči kolorektálnímu karcinomu.²⁸

Strukturně jsou velice zajímavé deriváty 3-benzimidazol-2-yl-1*H*-indazolu (**74**), které byly testovány jako inhibitory tyrosinokinasového receptoru. Tento receptor je klíčový pro tvorbu cévního systému, který vyživuje rakovinné buňky a umožňuje jejich růst.²⁹



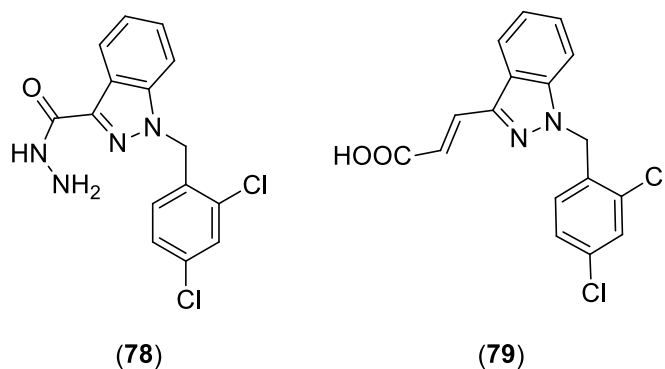
Obr. 9: Srovnání struktury inhibitoru tyrosinokinasového receptoru a cílové látky

Disubstituované indazoly tvoří největší skupinu biologicky aktivních derivátů. Jedná se například o Bendazac (**75**), Benzydamin (**76**), také známý jako Tantum Verde, případně Bindarit (**77**). Bendazac se používá jako topické protizánětlivé léčivo. Benzydamin má též lokální protizánětlivé účinky a navíc vykazuje lokální anestetické a analgetické účinky.²⁰



Obr. 10: Struktury některých použitých indazolových léčiv

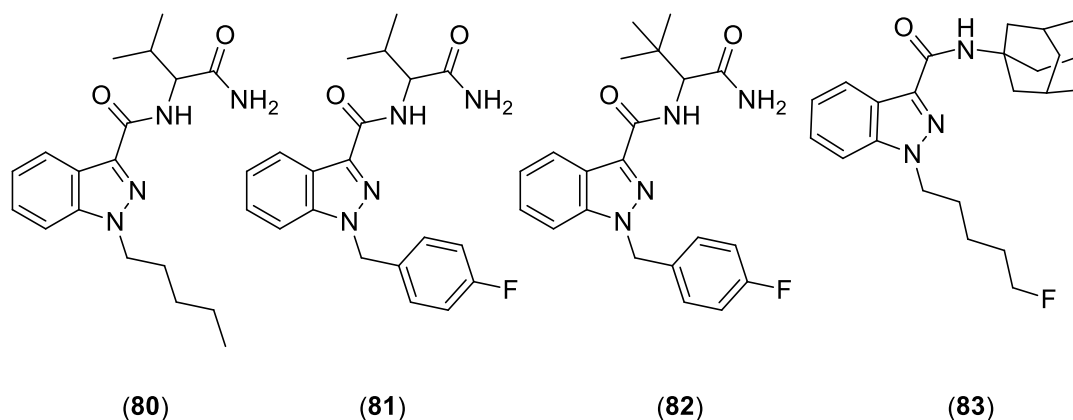
Dalšími zajímavými deriváty indazolu jsou AF2364 (**78**) a AF2785 (**79**). Obě tyto sloučeniny vykazují anti-spermatogenní vlastnosti a mohly by proto být použity jako mužská antikoncepce. Výhodná je zejména jejich nízká toxicita a relativně jednoduchá syntéza oproti jiným potenciálním mužským kontraceptikům.³⁰



Obr. 11: Struktury indazolů s anti-spermatogenními vlastnostmi

Kromě těchto derivátů existuje ještě skupina disubstituovaných indazolů, které byly identifikovány ve směsi syntetických kanabinoidů, které patří do skupin tzv. „designer drugs“. Designer drugs jsou látky, které se svojí biologickou aktivitou blíží kontrolovaným substancím, nicméně jejich struktura je modifikována tak, aby se na ně nevztahovala klasifikace jako kontrolované substance, případně je nemožné je identifikovat standardními testy na drogy (případně obojí).³¹ Těmito deriváty jsou

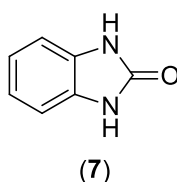
například AB-FUBINACA (**80**), AB-PINACA (**81**), ADB-FUBINACA (**82**) nebo APINACA (**83**).³²



Obr. 12: Struktury indazolových syntetických kanabinoidů

2.5. Syntéza a biologická aktivita derivátů benzimidazol-2-onu

Benzimidazol-2-on (**7**) je heterocyklická sloučenina, která je složená z benzenového jádra, ke kterému je přikondenzován imidazolidin-2-on. Syntéza derivátů benzimidazol-2-onu a jejich biologická aktivita je shrnuta v následujících kapitolách.



Obr. 13: Struktura benzimidazol-2-onu

2.5.1. Syntéza derivátů benzimidazol-2-onu

Syntéza benzimidazol-2-onu a jeho derivátů se dá rozdělit na dva základní postupy. Jedná se o karboxylaci derivátů 1,2-diamino benzenu (*o*-fenylendiamin) (**84**) pomocí činidel jako je fosgen³³, případně CDI, nebo jiná činidla. Druhým způsobem je

cyklizace derivátů fenylmočoviny (**85**).³⁴ Oba tyto způsoby jsou obecně zobrazeny ve **Schématu 20**.

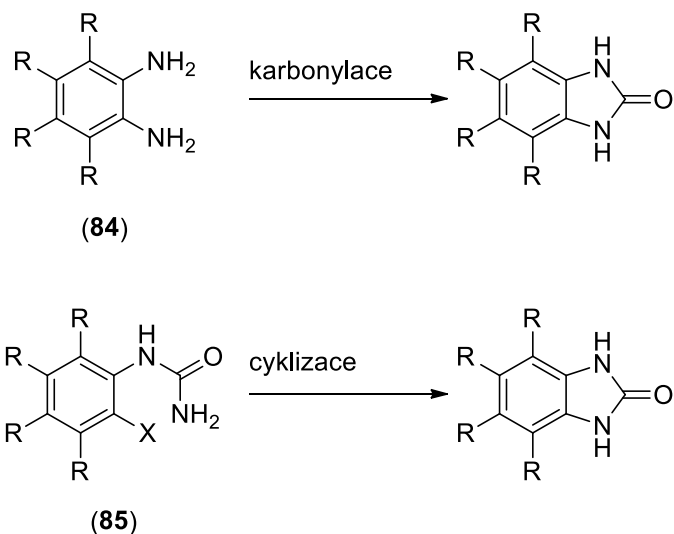


Schéma 20: Obecné postupy syntézy benzimidazol-2-onu

Velice častou výchozí látkou pro syntézu benzimidazol-2-onů jsou deriváty nitrobenzenu, nejčastěji 2-aminonitrobenzenu, případně 2-halogennitrobenzenu. Výhodou těchto výchozích látek oproti derivátům *o*-fenylendiaminu je zejména snadnější syntéza nesymetricky *N*-substituovaných derivátů bez nutnosti použití chránících skupin. 2-Fluoronitrobenzen byl použit jako výchozí látka při syntéze ORL1 (opioid-receptor like 1) antagonistů. Tato reakční sekvence je zobrazena ve **Schématu 21** (pro větší přehlednost je zobrazena pouze klíčová část syntézy benzimidazolového jádra).³⁵

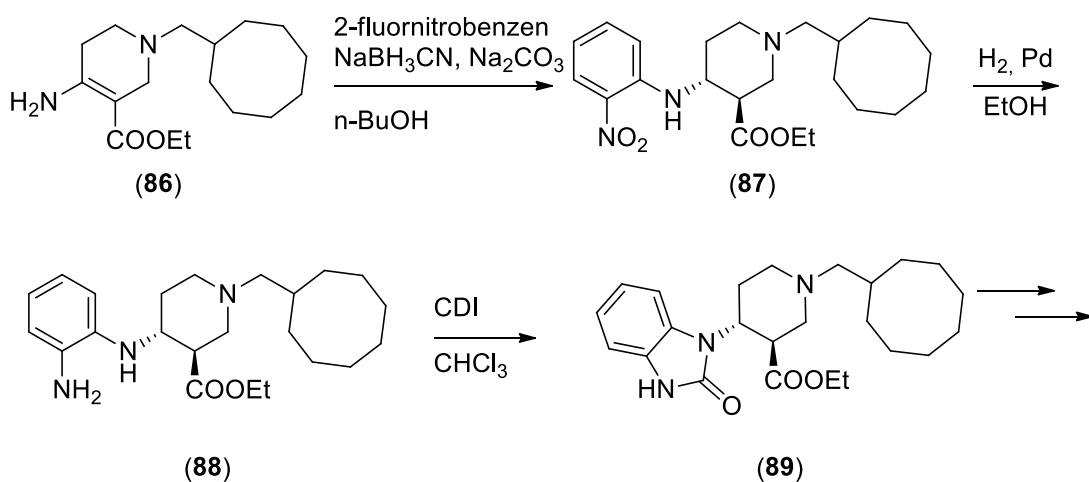


Schéma 21: Syntéza ORL1 antagonistů

Reakce vychází z amino derivátu **(86)**, který reaguje s 2-fluornitrobenzenem za vzniku molekuly **(87)**. Nitroskupina je dále redukována **(88)** a karboxylační reakcí s (CDI) je připraven cílový benzimidazol **(89)**. Poměrně problematická je v tomto případě reakce amino derivátu **(86)** s fluornitrobenzenem a následná redukce, která probíhá ve dvou krocích s výtěžkem pouze 37%.³⁵ V jiných případech probíhá tato reakce s výtěžky až 90%, jako například při syntéze inhibitorů p38 mitogen-aktivované protein kinasy (p38 MAP) jak je zobrazeno ve **Schématu 22**.³⁶

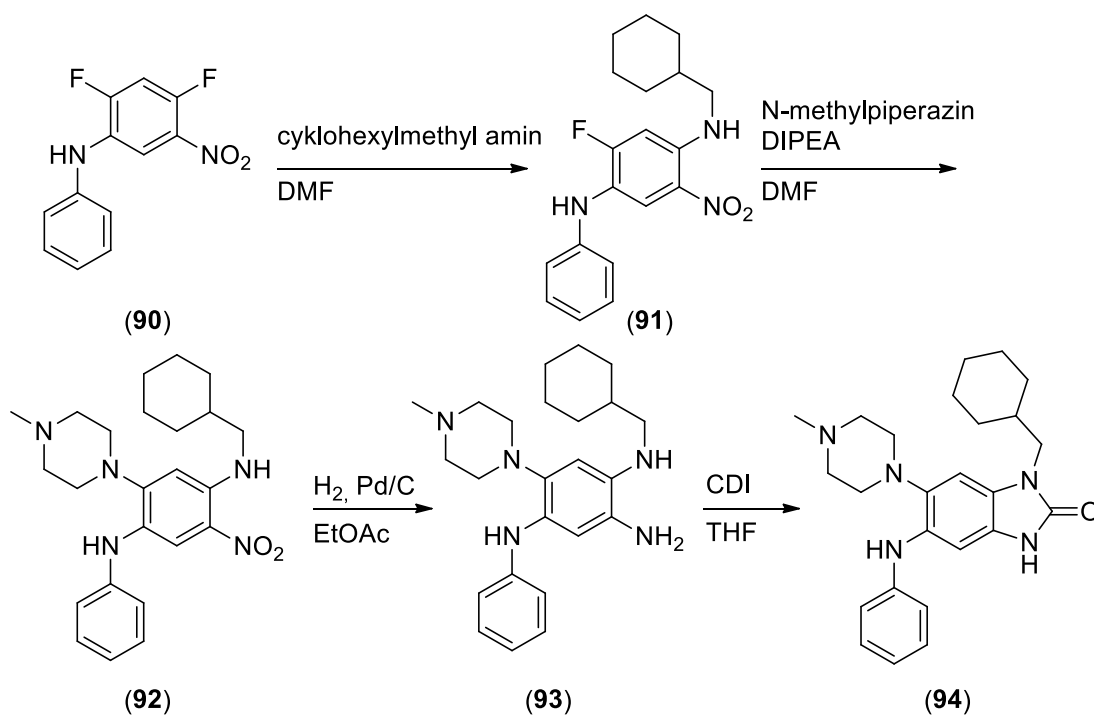


Schéma 22: Syntéza inhibitorů p38 MAP

Syntéza stejně jako v předchozím případě vychází z derivátu 2-fluornitrobenzenu (**90**), který reaguje s cyklohexylmethyl aminem za vzniku látky (**91**) a následně *N*-methylpiperazinem za vzniku derivátu (**92**). Následuje redukce nitroskupiny na aminoskupinu (**93**) a následná karbonylace pomocí CDI za vzniku benzimidazolonu (**94**). Ve srovnání s výše uvedenou syntézou probíhají v tomto případě nukleofilní substituce s výrazně lepším výtěžkem: 90% pro (**91**) a 64% pro (**92**).³⁶

Další možností syntézy je cyklizace derivátu fenylmočoviny (viz **Schéma 23**). Tyto deriváty močoviny (**96**) je možné připravit poměrně snadno z isothiokyanátu (**95**) reakcí s aminem. Následná cyklizace katalyzovaná palladiem poskytuje benzimidazol-2-on (**97**). Výtěžky se v tomto případě pohybují od 30 do 70%. V případě, že je derivát močoviny připraven reakcí sekundárního aminu, reakce neposkytuje žádný produkt ani za drastických podmínek.³⁷

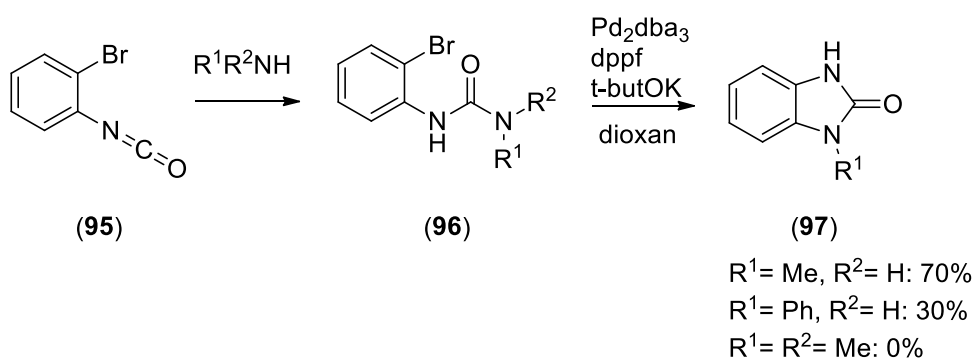


Schéma 23: Syntéza benzimidazol-2-onu cyklizací derivátu fenylmočoviny

Volba ligandu a substituce na močovinně hraje velice výraznou roli. V případě 1-(2-chlorfenyl)-1-alkylmočoviny, případně jejich pyridinový analog (**98**), bylo dosaženo výtěžků přes 90% pomocí X-Phos nebo pddb, což je výrazné zlepšení oproti předchozímu případu.³⁸

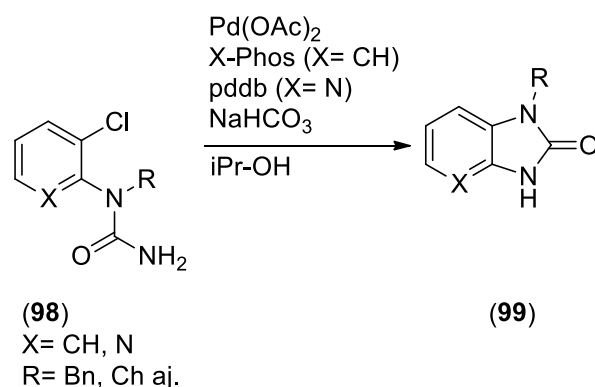


Schéma 24: Syntéza benzimidazol-2-onu cyklizací derivátu fenyl/pyridylmočoviny

Velice podobnou reakcí je cyklizace 1-(2-jodofenyl)močoviny případně derivátů v DMSO v přítomnosti KOH při 40°C. Výtěžky se pohybují od 35 do 95%, nicméně v práci nejsou popsány deriváty nesoucí silně elektronakceptorní funkční skupiny jako jsou nitroskupina nebo karbonylová či karboxylová funkce.³⁹

Z novějších metod je zajímavá zejména přímá reakce monosubstituovaných močovín s deriváty 1-brom-2-chlorbenzenu (**100**). Použitím vhodného ligandu se docílilo kaskádové cyklizace vzniklého derivátu fenylmočoviny (**101**) za vzniku cílového benzimidazolonu (**102**), jak je ukázáno ve **Schématu 25**. Reakce probíhá s vysokou regioselektivitou a druhý regioisomer (**103**) nebyl pozorován.³⁴

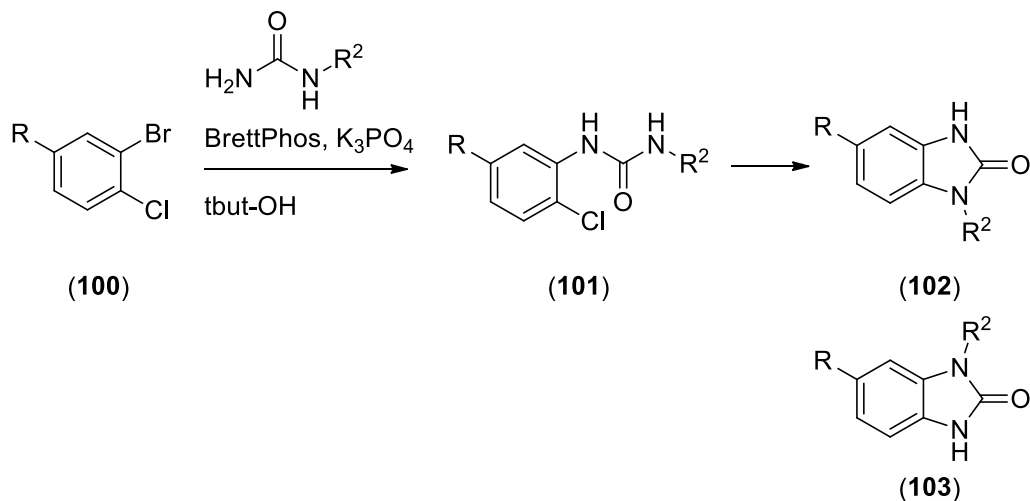


Schéma 25: Kaskádová cyklizace močoviny s derivátem 1-brom-2-chlorbenzenu

Dalším možným způsobem syntézy benzimidazolonů je využití Hoffmanova odbourání amidu kyseliny anthranilové pomocí jodosyl benzenu. *In situ* vznikající isokyanát okamžitě cyklizuje s aminoskupinou za vzniku indazolu. Reakce probíhá i

v případě, že je amino skupina substituována (**104**), což je výhodné zejména v případě, kdy jsou cílem nesymetricky *N*-substituované benzimidazolony (**105**). Reakce probíhá i s amidem kyseliny salicylové (**106**) za vzniku benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-onu (**107**). Výtěžky jsou poměrně vysoké: 70-90% v závislosti na konkrétní výchozí látce.⁴⁰

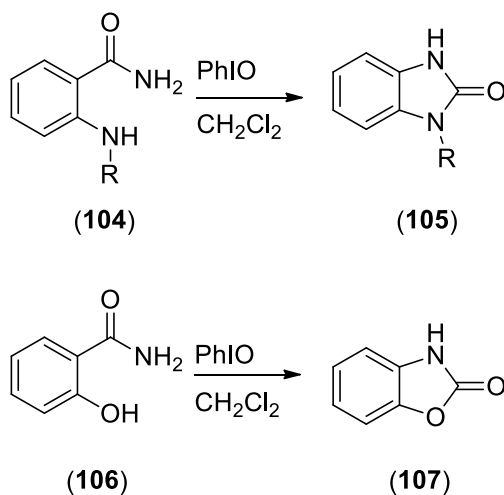


Schéma 26: Syntéza heterocyklů pomocí Hoffmanova odbourání

Kromě těchto syntetických metod lze připravit benzimidazolony pomocí přesmyku vhodných výchozích sloučenin. Přesmyk 3-(2-aminophenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu (**4**) přes diazosulfonát (**11**) byl již popsán výše (**Schéma 3 a 5**). Kromě tohoto přesmyku byl popsán i přesmyk 3-benzoylchinoxalin-2(1*H*)-onu (**108**) v přítomnosti acetofenu či jeho derivátů a octanu amonného za vzniku benzimidazolového derivátu (**109**).⁷

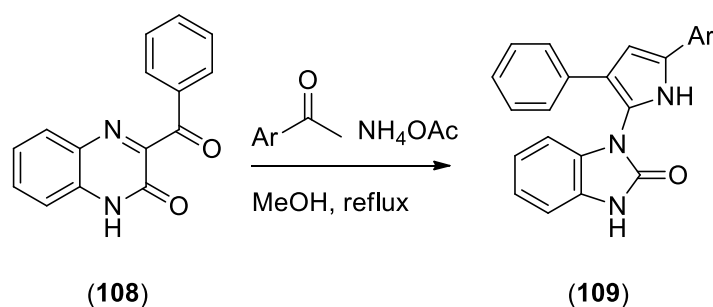
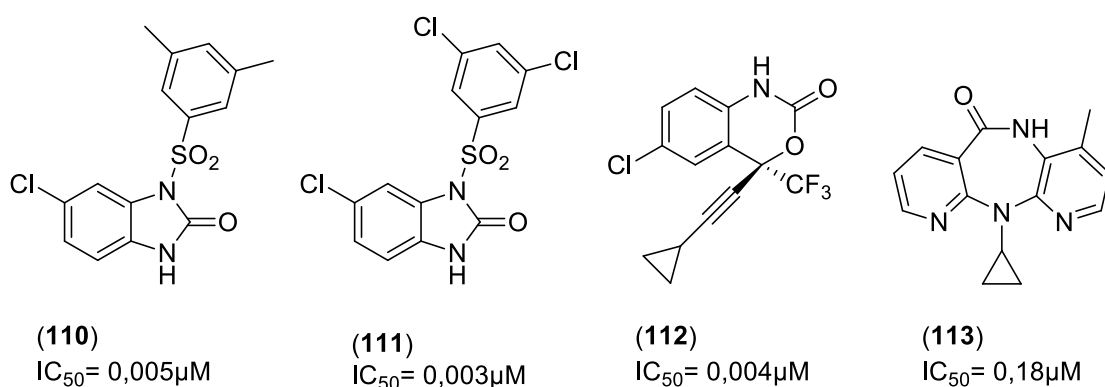


Schéma 27: Přesmyk derivátu chinoxalinu vedoucí k derivátu benzimidazol-2-onu

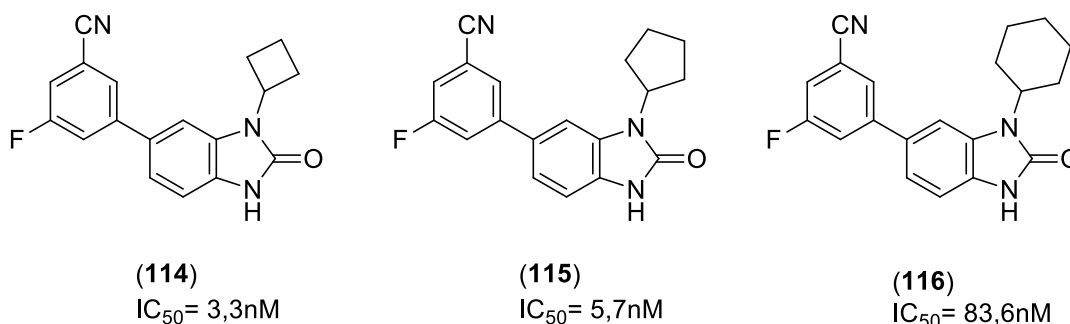
2.5.2. Biologická aktivita derivátů benzimidazolonu

Deriváty benzimidazolonu vykazují zajímavé spektrum biologických aktivit. *N*-2-substituované deriváty 5-chlor-benzimidazol-2-onu (**110**) a (**111**) fungují jako inhibitory RNA-dependentní RNA polymerasy. Některé tyto sloučeniny mají srovnatelnou aktivitu s klinicky používanými NNRTI Efavirenz (**112**) a Nevirapin (**113**). Struktury těchto látek jsou zobrazeny na **Obrázku 13**.³³



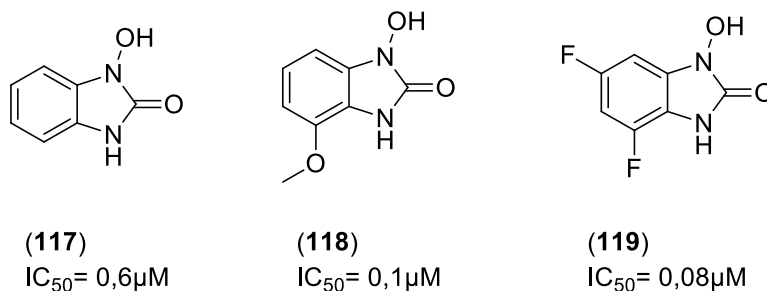
Obr. 13: Benzimidazolonové inhibitory RNA polymerasy

Deriváty 6-aryl-benzimidazol-2-onu byly zkoumány jako selektivní antagonisté progesteronového receptoru. Jeho antagonisté by mohli najít využití jako látky s protirakovinným účinkem, případně jako látky s účinkem proti některým gynekologickým nemocem, jako je například endometrióza. Některé z připravených derivátů (**114-116**) jsou ukázány na **Obrázku 14**. Hodnota IC_{50} je koncentrace látky, která způsobila 50% inhibici aktivity alkalické fosfatasy, která byla indukována 1nM roztokem progesteronu.⁴¹



Obr. 14: Benzimidazolonoví antagonisté progesteronového receptoru

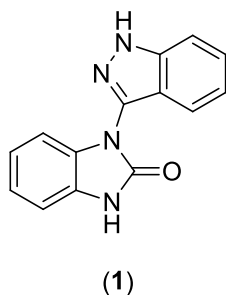
Strukturně zajímavé *N*-hydroxy-benzimidazoly byly zkoumány jako inhibitory oxidasy D-aminokyselin (D-amino acid oxidase). Tento enzym oxiduje D-aminokyseliny, zejména D-serin. D-serin je zkoumán jako možné terapeutikum při léčbě schizofrenie, nicméně tento výzkum je omezen zejména potřebou vysokých dávek a jeho nefrotoxicitou. Původem této nefrotoxicity je pravděpodobně aktivita oxidasy D-aminokyselin, která při oxidaci produkuje toxický peroxid vodíku. Inhibice tohoto enzymu by tedy mohla zlepšit terapeutické využití D-serinu. Nejúčinnější inhibitory (117-119) jsou ukázány na **Obrázku 15**.⁴²



Obr. 15: Struktury benzimidazolových inhibitorů oxidasy D-aminokyselin

3. Diskuse

Cílem této práce je syntéza 1-(1*H*-indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-onu (**1**), jeho derivátů a studium mechanismu reakce vedoucí k cílovému produktu. U derivátů indazolu a benzimidazol-2-onu byla popsána biologická aktivita (viz. Teoretická část, kapitoly 3.2.2 a 3.3.2)



Obr. 1: Cílová struktura (**1**)

Pro syntézu cílové látky (**1**) byl použit postup již dříve vyvinutý J. Sloukou a I. Fryšovou. Reakční schéma popisující tento postup je zobrazeno níže (**Schéma 1**).^{3,4} Struktura produktu byla potvrzena pomocí NMR² a také pomocí X-ray strukturní analýzy.³

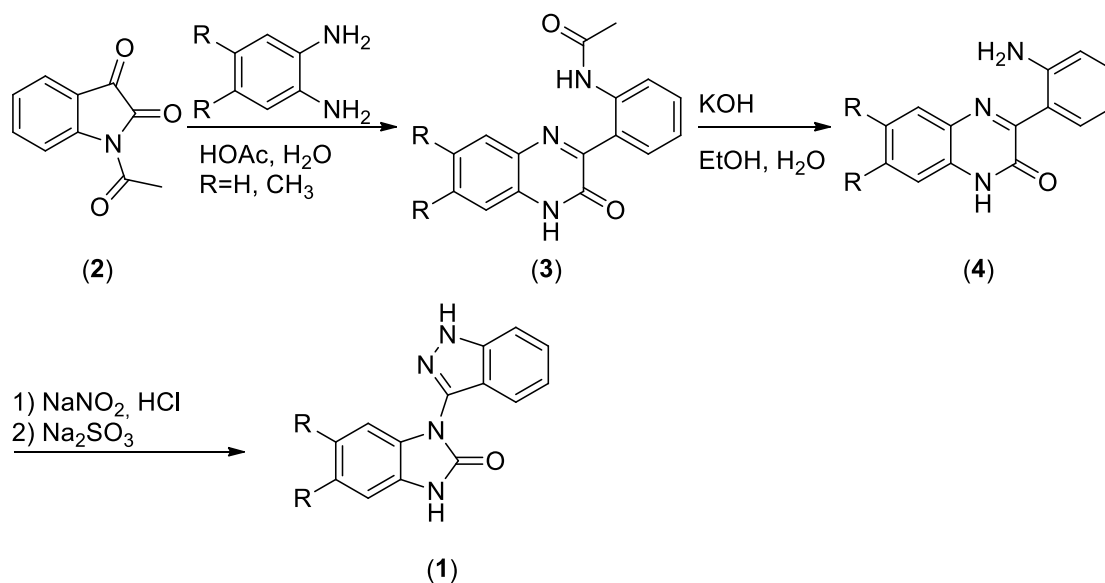
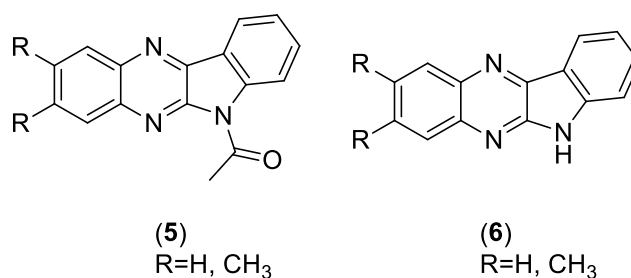


Schéma 1: Schéma syntézy heterocyklu (**1**)

3.1. Kondenzace diaminů s *N*-acetylisatinem

Prvním krokem této sekvence byla kondenzace *o*-fenylendiaminu nebo 4,5-dimethylbenzen-1,2-diaminu ve směsi kyseliny octové s vodou (**Schéma 1**). Roztoky výchozích látek byly zahřáty na 70 °C, slity dohromady a dále zahřívány dalších 15 minut. Chinoxalin (**3**) byl po samovolném vysrážení odsát, promyt a vysušen.⁴ Při pokusu o reprodukci tohoto postupu docházelo ke vzniku vedlejšího produktu, a to až z 50%. Návrh struktur těchto vedlejších produktů je zobrazen na **Obrázku 2**. Vlivem zvýšené teploty a kyselého prostředí pravděpodobně došlo k intramolekulární kondenzaci za vzniku derivátu (**5**). V hmotnostním spektru byly přítomny signály, které odpovídají jak látce (**5**), tak látce (**6**), která pravděpodobně vzniká až při ionizaci v iontovém zdroji. Návrh těchto struktur se zakládá pouze na hmotnostních spektrech, pro jejich potvrzení by bylo nutné tyto nečistoty izolovat a charakterizovat pomocí NMR.



Obr. 2: Navržené struktury nečistot.

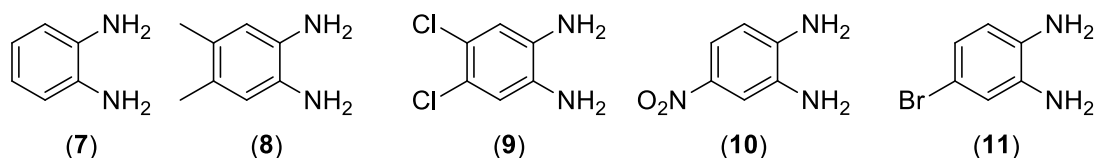
Z tohoto důvodu byla provedena optimalizace reakčních podmínek za účelem omezení vzniku těchto nečistot. Tato optimalizace byla provedena pouze s *o*-fenylendiaminem, protože bylo předpokládáno, že reakce s dimethylderivátem se bude chovat obdobně. K roztoku 0,5 mmol *N*-acetylisatinu v 1,3 ml kyseliny octové byl přilít roztok 0,5 mmol *o*-fenylendiaminu v 0,5 ml kyseliny octové. Oba roztoky byly zahřáty na danou teplotu před slitím. Reakční směs byla v časových intervalech analyzována pomocí HPLC-MS. Výsledky této optimalizace jsou zobrazeny v **Tabulce 1**.

Tab. 1: Optimalizace podmínek kondenzace

Reakční teplota	Čas analýzy	% nečistot ^a
70 °C	Po slítí	10,5
	5 min	14,3
	15 min	16,3
	60min	28
50 °C	Po slítí	5,2
	5 min	11,2
	15 min	17,1
	60min	20,1
25°C	Po slítí	0
	5 min	0

^a získáno porovnáním integrovaných ploch signálů v UV-VIS záznamu z HPLC

Kondenzace diaminů s *N*-acetylisatinem byla tedy dále prováděna slítím roztoků výchozích látek v.koncentrované kyselině octové za laboratorní teploty. Tento postup fungoval velice dobře pro různé diaminy. Použité diaminy jsou zobrazeny na **Obrázku 3**. Diaminy **7-10** jsou komerčně dostupné. Diamin (**11**) byl připraven z 2-nitroanilinu bromací pomocí NBS⁴³ a následnou redukcí nitroskupiny pomocí SnCl₂ podle postupu převzatého z literatury.⁴⁴ Produkt (**11**) byl oproti původnímu postupu přečištěn rekrystalizací ze směsi DCM:petrolether.⁴⁵

**Obř. 3:** Struktura diaminů použitých pro kondenzaci

Chinoxaliny (**12**) (**13**) a (**14**) (**Obrázek 4**) vznikaly jako jediné produkty této kondenzace. V případě reakce nesymetrického diaminu (**10**) byl pozorován pouze jeden produkt (**15a**) (**Schéma 2**). Struktura látky (**15a**) byla potvrzena pomocí 2D NMR experimentů COSY a NOESY. Poloha nitroskupiny je poměrně neočekávaná, jelikož byl předpokládán produkt s nitroskupinou v poloze 7 (**15b**). Byla očekávána deaktivace aminoskupiny v para poloze vůči nitro skupině vlivem záporného indukčního efektu nitro skupiny. Nedeaktivovaná amino skupina v poloze 2 tedy může reagovat s reaktivnější karbonylovou skupinou *N*-acetylisatinu (**2**) za vzniku intermediátu (**17b**) a

následná reakce druhé aminoskupiny by vedla k cílovému produktu (**15b**), jak je ukázáno ve **Schématu 2**.

Tento rozdíl v reaktivitě je pravděpodobně způsoben použitím koncentrované kyseliny octové jako rozpouštědla. V tomto případě byla bazičtější amino skupina protonizována, což mělo za následek vznik intermediátu (**17a**) a produkt (**15a**) jak je zobrazeno ve **Schématu 2**.

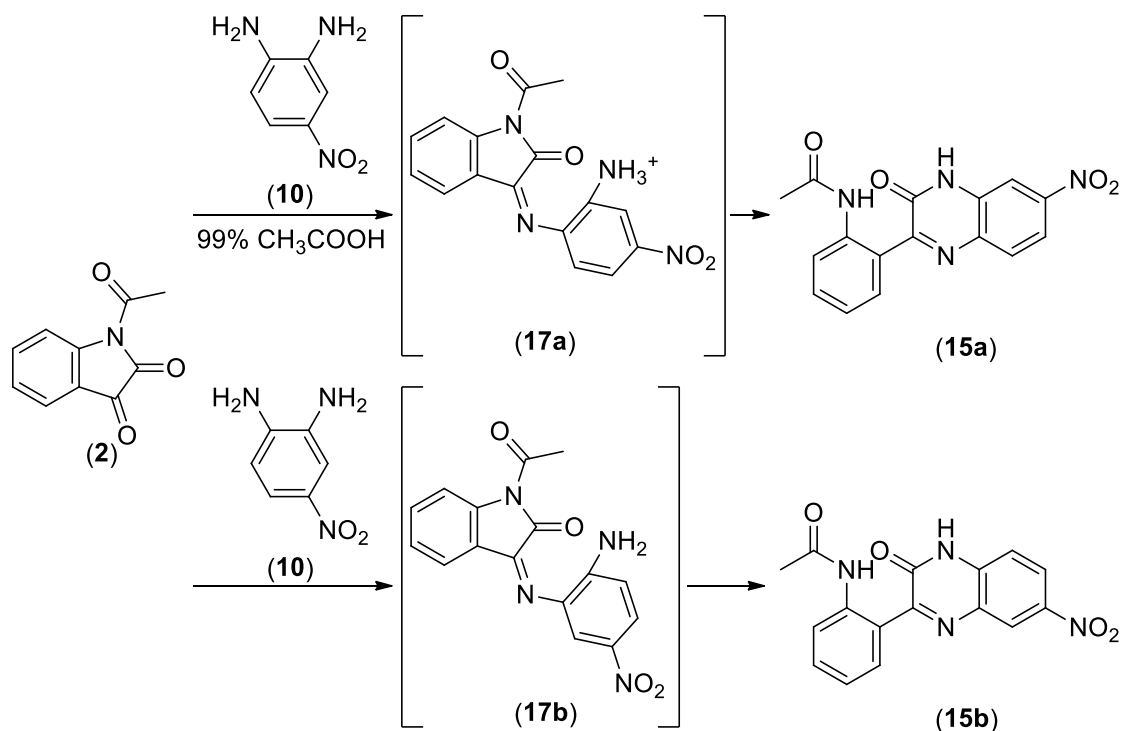
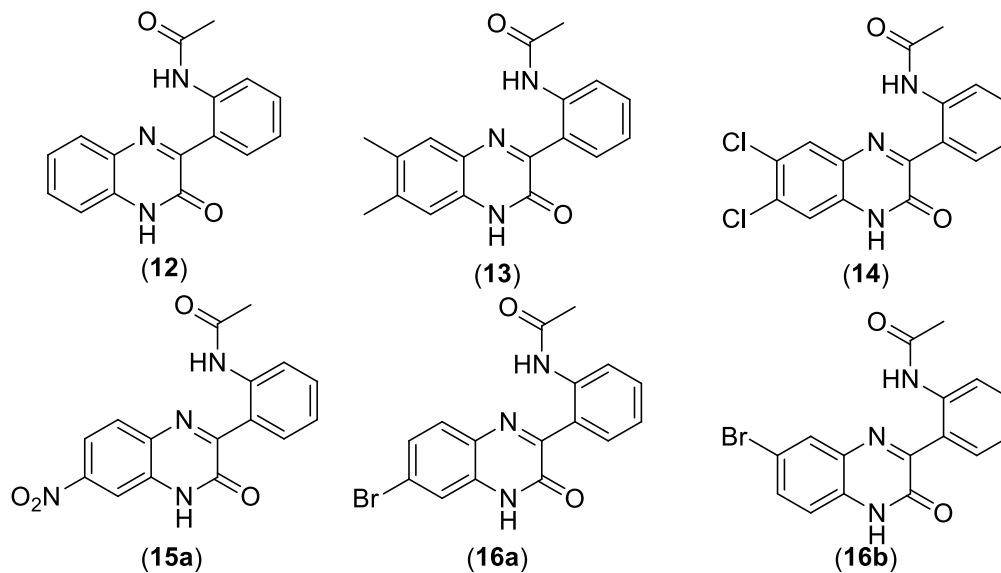


Schéma 2: Průběh kondenzace diaminu (**10**) s *N*-acetylisatinem (**2**)

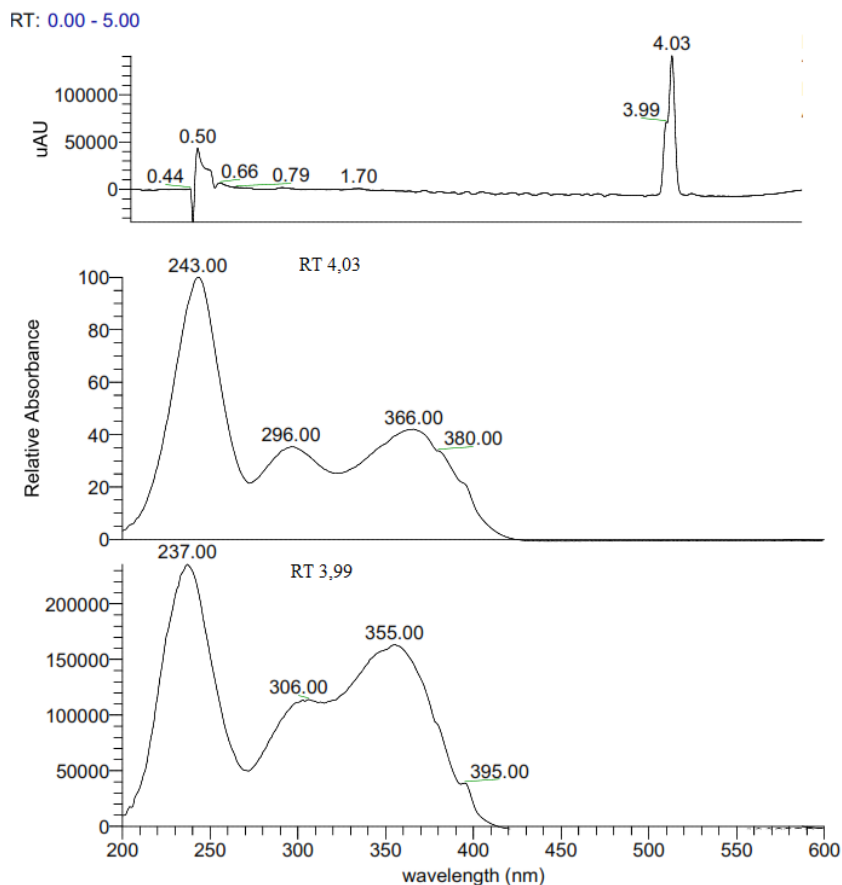
V případě kondenzace bromovaného diaminu (**11**), vznikla směs dvou regioisomerů (**16a**, **16b**) (**Obrázek 4**). Isomery se prakticky nedělily ani při použití analytického HPLC, ale byl pozorován rozdíl v UV spektru v jednotlivých částech chromatografického záznamu, jak je ukázáno na **Obrázku 5**. Přítomnost obou isomerů byla dále potvrzena pomocí ¹H a ¹³C NMR, kdy bylo pozorováno zdvojení některých signálů.

V případě chinoxalinů (**12**), (**14**) a (**16**) došlo k vyloučení produktu samovolně, v případech (**13**) a (**15**) se větší množství produktu vyloučilo až po přidání vody. Po odsátí a promytí produktu se z filtrátu přes noc vyloučil další podíl produktu. V případě chinoxalinu (**14**) se z filtrátu vyloučilo již pouze zanedbatelné množství produktu. Toto

bylo způsobeno pravděpodobně velmi špatnou rozpustností vzniklého chinoxalinu ve vodném prostředí, která měla za následek vyloučení celého množství produktu již při slítí roztoků. Struktury připravených chinoxalinů jsou zobrazeny na **Obrázku 4**.



Obr. 4: Struktury připravených chinoxalinů



Obr. 5: UV-VIS záznam z HPLC analýzy směsi látek (**16a**) a (**16b**)

3.2. Deacetylace derivátů chinoxalinu

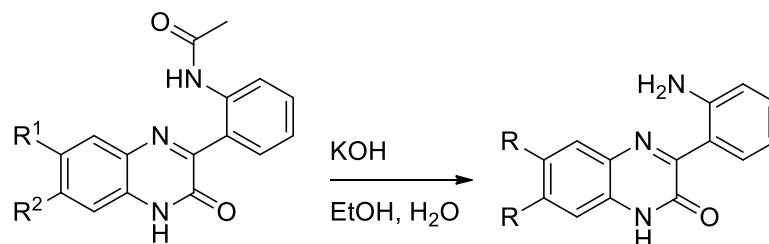
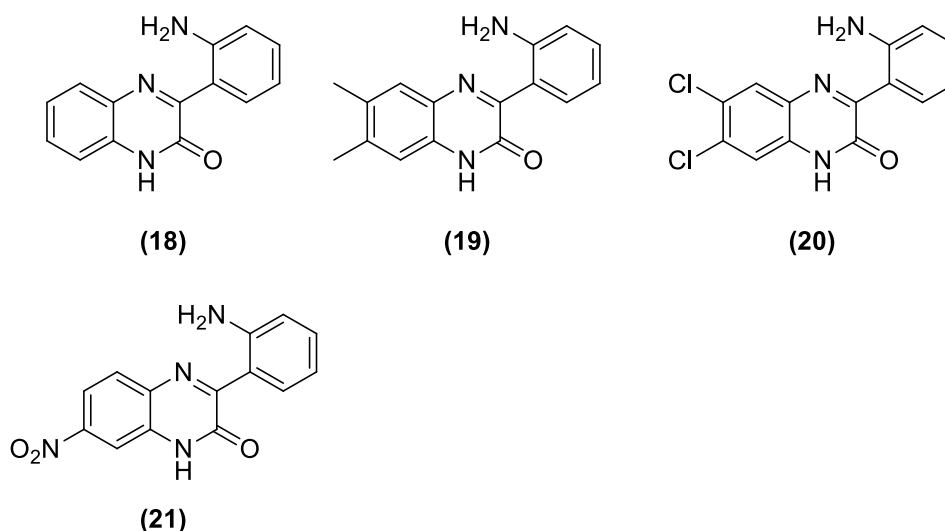


Schéma 3: Deprotekce acetylovaných chinoxalinů

Dalším krokem byla bazická hydrolyza acetylové skupiny (**Schéma 3**). Původní postup⁴ využíval 9 molárních ekvivalentů KOH ve směsi EtOH:voda 1:1 (v/v) za refluxu po dobu 4 hodin. Okyselením reakční směsi kyselinou octovou se vyloučil produkt, který byl izolován filtrací. Jelikož v některých případech při použití tohoto postupu obsahoval izolovaný produkt i zbytky výchozí látky, bylo mírně navýšeno množství KOH na 10 ekvivalentů a reakce se nechala proběhnout přes noc (obvykle okolo 20 hodin). Při použití těchto podmínek již nebyla pozorována žádná výchozí

látku. V případě deacetylace nitroderivátu (15) se po okyselení vyloučila tmavá sraženina, která se velice špatně filtrovala. Analýza této směsi ukázala rozklad výchozí látky nebo produktu. Bylo provedeno několik pokusů o optimalizaci této reakce (zejména změna reakční teploty), ale tento problém se nepodařilo uspokojivě vyřešit a derivát (21) se nepodařilo připravit. Struktury připravených aminů (včetně nepřipraveného derivátu (21)) jsou zobrazeny na **Obrázku 6**.



Obr. 6: Struktury ochráněných chinoxalinů

Při měření teploty tání derivátu (20) došlo k zajímavému jevu, kdy látka nejprve roztála v rozmezí 275-285 °C a následně opět ztuhla za vzniku jehliček, které již netály ani při 350°C. Původně uvažovaná termická cyklizace aminoskupiny s karbonylovou skupinou se HPLC-MS analýzou nepotvrdila. U strukturně podobných látek (18), (19) a (21) se tento jev nevyskytoval což dále naznačuje, že nedošlo k termické cyklizaci. Pravděpodobně došlo pouze ke změně krystalové struktury této látky.

3.3. Cyklizace odchráněných amino derivátů

Posledním krokem byla cyklizace připravených amino derivátů na cílové deriváty látky (1), jak je ukázáno na následujícím reakčním schématu (**Schéma 4**).

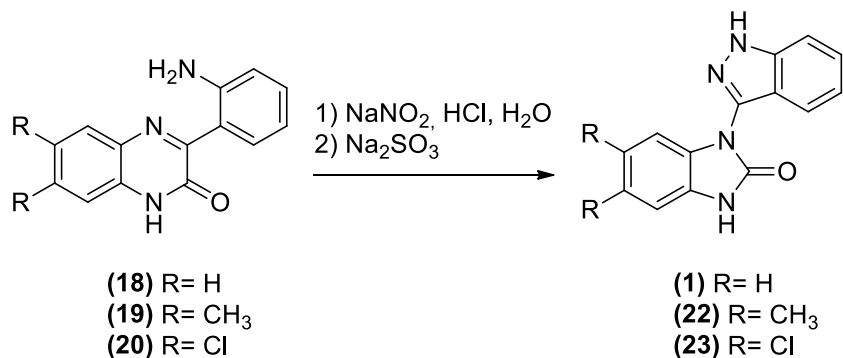
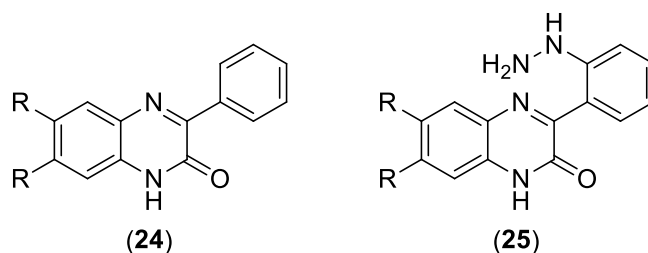


Schéma 4: Cyklizace vedoucí k cílovým bisheterocyklům

Prvním krokem této cyklizace^{1,3} byla diazotace volné aminoskupiny. Tato reakce byla provedena klasicky pomocí přidavku vodného roztoku NaNO₂ k suspenzi aminu vychlazené v ledové lázni. Volné aminy byly velice špatně rozpustné v kyselém prostředí, nicméně po přidání roztoku dusitanu došlo obvykle během hodiny až dvou ke kompletnímu rozpuštění diazoniové soli. Rozpustnost dichlorderivátu (20) ve vodě byla tak špatná, že se touto cestou nepodařilo získat cílový derivát v použitelném množství. Z tohoto důvodu byla vyzkoušena reakce ve směsi THF:H₂O 2:1, která již probíhala uspokojivě (THF a CHCl₃ jsou jediná rozpouštědla, která rozpouští větší množství látky (20)).

Přilítí diazoniové soli (připravené z aminů (18), (19) nebo (20)) do roztoku siřičitanu sodného a následné zahřátí vedlo k vysrážení cílové látky. V případě dichlorderivátu bylo vysrážení umocněno odpařením THF pomocí vakuové odparky. Cílové látky se nepodařilo připravit úplně čisté a ve všech případech byly pozorovány nečistoty v množství od 10 do 40% (podle HPLC spektra). Struktury nečistot (24, 25) byly přiřazeny na základě hmotnostních spekter a jsou zobrazeny na **Obrázku 7**.



Obr. 7: Navržené struktury nečistot vznikajících při cyklizaci

Nesubstituovaný derivát (**1**) byl přečištěn rekrystalizací ze směsi kyselina octová voda, dimethylderivát (**22**) byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie a následně i pomocí semipreparativního HPLC, jelikož produkt i po použití kolonové chromatografie obsahoval asi 5% nečistot. Dichlorderivát (**23**) byl přečištěn pouze pomocí kolonové chromatografie a již neobsahoval žádné další nečistoty.

3.4. Syntéza diazosulfonátu z volného amino derivátu

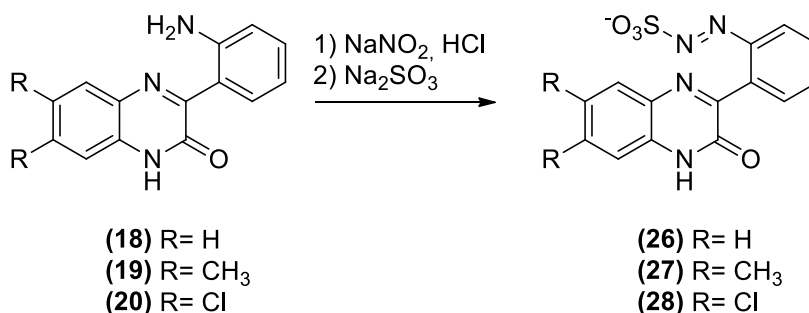


Schéma 5: Syntéza diazosulfonátu

Syntéza diazosulfonátů byla velice podobná předchozí cyklizaci. Roztok diazoniové soli byl přilít k velkému nadbytku siřičitanu, a pokud byl roztok dále chlazen, došlo k vyloučení žlutého diazosulfonátu (**Schéma 5**).⁴⁶ V případě dichlorderivátu (**28**) byla izolace provedena až po odpaření THF z reakční směsi. Tyto diazosulfonáty bylo dále možné převést na cílové heterocykly (**1**, **22** a **23**) zahřátím v roztoku kyseliny. Bylo provedeno několik experimentů za účelem ověření stability těchto látek a bylo zjištěno, že jsou stabilní na vzduchu i za vyšších teplot (100 °C, 2h), dále jsou stabilní ve vodném roztoku hydroxidu, a to i po několik dní. Stabilitu v neutrálním roztoku a v roztoku kyselin shrnuje **Tabulka 2**. Ve všech případech bylo

naváženo 20 mg diazosulfonátu (**26**), který byl vložen do vody, následně byla přidána

Tabulka 2: Studie stability diazosulfonátu (**26**) v kyselém a neutrálním prostředí

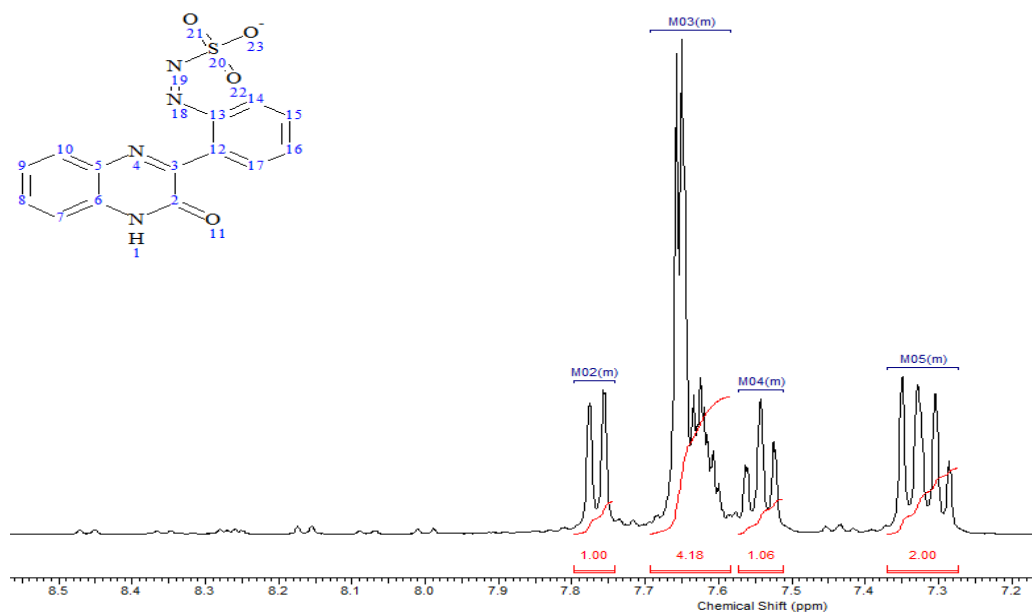
Rozpouštědlo	Kyselina	Teplota	Výsledek
H ₂ O, 4,5 ml	-	40 °C	Bez reakce
H ₂ O, 4,5 ml	-	75 °C	Směs produktů po 24 h
H ₂ O, 4,5 ml	HCl 0,5 ml	40 °C	Směs produktů po 20 min
H ₂ O, 4,5 ml	CH ₃ COOH, 0,5 ml	40 °C	Bez reakce
H ₂ O, 4,5 ml	CH ₃ COOH, 0,5 ml	75 °C	Směs produktů po 24 h

kyselina a směs byla zahřívána a následně analyzována pomocí HPLC-MS.

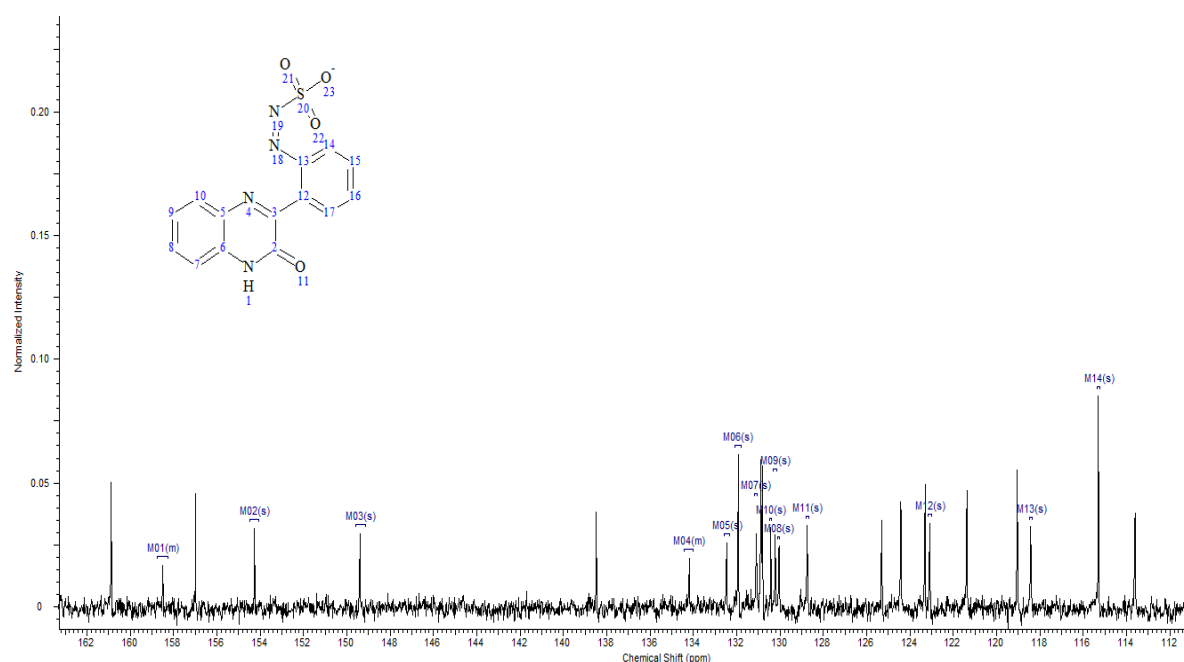
V HPLC záznamu byly pozorovány jak produkt cyklizace (**1**), tak i struktura (**24**) (**Obrázek 7**). Látka (**24**) byla v případě použití kyseliny octové majoritním produktem. Rozklad diazosulfonátu (**26**) v prostředí kyseliny chlorovodíkové byl použit k syntéze cílového heterocyklu (**1**). Deriváty (**22**) a (**23**) (**Schéma 4**) byly připraveny bez izolace příslušných diazosulfonátů (**27**) a (**28**) (**Schéma 5**)

Charakterizace diazosulfonátů byla poněkud obtížná. Při měření NMR spekter, látky stáním v DMSO samovolně přesmykovaly na heterocykly (**1**, **22**, **23**) (**Schéma 4**). Tato cyklizace se částečně dala vyřešit rychlým změřením spekter okamžitě po rozpuštění v DMSO-*d*₆. V ¹H NMR spektru diazosulfonátu (**26**) nebyla patrná přítomnost nečistot a chemické posuny signálů se shodovaly s literaturou⁴⁶ (výřez aromatické oblasti je zobrazen na **Obrázku 8**).

Naproti tomu ¹³C NMR spektrum stejné látky obsahovalo velké množství neznámých signálů v aromatické oblasti. Podařilo se najít signály produktu, ale jedině z toho důvodu, že tato látka již byla popsána dříve.⁴⁶ Výřez z ¹³C NMR spektra je zobrazen na **Obrázku 9** (označeny jsou signály látky odpovídající literatuře⁴⁶). Podobná situace nastala v případě diazosulfonátu (**28**), ¹H spektrum odpovídalo dané látce, zatímco v ¹³C spektru bylo pozorováno velké množství signálů, jejichž identifikace byla dále komplikována jejich nízkou intenzitou.



Obř. 8: Výřez aromatické oblasti ^1H NMR spektra látky (26)



Obř. 9: Výřez z ^{13}C NMR spektra látky (26)

Identifikace látek pomocí MS také nebyla příliš jednoznačná, jelikož byly obvykle pozorovány pouze fragmenty dané molekuly. Teploty tání připravených diazosulfonátů (26) a (27) se shodovaly s literaturou.³ Dále byl pozorován jasný rozdíl

v retenčních časech při HPLC analýzách (ve srovnání s výchozími látkami **(18)**, **(19)** a **(20)**).

^1H NMR spektra látek **(26)** a **(27)** odpovídalo publikovaným spektrům.⁴⁶ ^{13}C NMR spektrum diazosulfonátu **(27)** se podařilo změřit, nicméně byla pozorována absence jednoho ze signálů. Jelikož následným rozkladem diazosulfonátů vznikaly cílové heterocykly **(1)** **(22)** a **(23)** (**Schéma 4**), lze diazosulfonáty považovat za produkty reakce (zejména co se týče diazosulfonátu **(28)**, který nebyl dříve připraven).

3.5. Periferní modifikace heterocyklu (1)

Pro zvýšení strukturní variability připravovaných látek bylo provedeno několik pokusů o periferní modifikaci molekuly **(1)**. Byla vyzkoušena alkylace benzylbromidem a benzylalkoholem za Mitsunobu podmínek (**Schéma 6**). Dále byla provedena bromace pomocí NBS a ochránění indazolového dusíku pomocí 3,4-dihydro-2*H*-pyranu.

3.5.1. Alkylace pomocí alkylhalogenidů

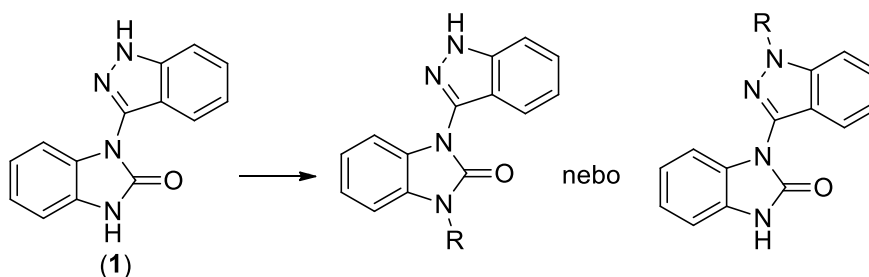


Schéma 6: Schéma cílového produktu alkylační reakce

Pro alkylace s alkylhalogenidy byl zvolen benzylbromid z důvodu jeho vysoké reaktivity a methyljodid jako jednoduchý zástupce alifatických halogenderivátů. Reakce byla nejprve prováděna v EtOH s jedním ekvivalentem báze a jedním ekvivalentem BnBr. Po prvotním screeningu vhodných bází se jako jediný vhodný kandidát ukázal octan sodný. Ostatní použité báze (NaOH, Na_2CO_3 , EDIPA, DBU) obvykle vedly ke vzniku směsi produktů. Vznik těchto směsí může být vysvětlen tím, že silnější báze deprotonují i druhý dusík v molekule, na kterém vzniká nové reakční centrum.

Naproti tomu použití octanu sodného jakožto slabší báze i ve velkém nadbytku vedlo pouze ke vzniku jednoho produktu.

Použití octanu sodného také nevedlo ke snadné přípravě monosubstituovaných derivátů. Velikým problémem se ukázala rychlost této reakce. Zatímco v přítomnosti silné báze nebyla po 24 h při pokojové teplotě ve směsi pozorována žádná výchozí látka, při použití octanu bylo po 24 h ve směsi pozorováno pouze asi 25% produktu. Poměrně překvapivě se množství produktu nezvyšovalo ani s prodloužením reakčního času. Konverzi se podařilo zvýšit použitím většího nadbytku benzylobromidu, použití 40 ekvivalentů vedlo k 60% konverzi na jediný produkt. Použití 80 ekvivalentů již vedlo ke vzniku směsi produktů za stálé přítomnosti 20% nezreagované výchozí látky. Bohužel, benzylaci pomocí 40 ekvivalentů se nepodařilo reprodukovat z většího množství výchozí látky. Zvýšení reakční teploty také vedlo ke vzniku směsi produktů. Experimenty shrnuje **Tabulka 3**.

Zkušební reakce byly prováděny s 0,2 mmol výchozí látky a všechny byly ponechány reagovat déle než 24 hodin, nicméně po 24 h nebylo pozorováno žádné zvýšení konverze na žádaný produkt, případně došlo k nárůstu množství nečistot v reakční směsi směsi.

Tab. 3: Zkoumané podmínky alkylace pomocí BnBr

Rozpouštědlo	Báze	BnBr	t (°C)	Čas	Výsledek
EtOH	10% Aq.NaOH (1 ekv)	1 ekv	25	24h	Směs ^a
EtOH	10% Aq.AcONa (1 ekv)	1 ekv	25	24h	20% monoalk. prod. ^b
EtOH	10% Aq.Na ₂ CO ₃ (1 ekv)	1 ekv	25	24h	Směs ^a
EtOH	-	1 ekv	25	24h	30% monoalk. prod. ^b
DMF	K ₂ CO ₃	1 ekv	25	24h	Směs ^a
DMF	AcONa (1 ekv)	1 ekv	25	24h	Bez reakce
EGME	AcONa (1 ekv)	1 ekv	25	24h	20% monoalk. prod. ^b
MeOH	AcONa (1,1 ekv)	1,1 ekv	25	24h	20% monoalk. prod. ^b
MeOH	K ₂ CO ₃ (1,1 ekv)	1,1 ekv	25	24h	30% monoalk. prod. ^b
MeOH	KHCO ₃ (1,1 ekv)	1,1 ekv	25	24h	Směs ^a
MeOH	AcONa (1,1 ekv.)	1,1 ekv	40	24h	Směs ^a
MeOH	EDIPA (1 ekv.)	1,1 ekv	25	24h	20 % monoalk. prod. ^b
MeOH	DBU (1 ekv.)	1,1 ekv	25	24h	30 % monoalk. prod. ^b
DMSO	EDIPA (1 ekv.)	1,1 ekv	25	24h	Bez reakce
DMSO	DBU (1 ekv.)	1,1 ekv	25	24h	Směs ^a
DMSO	AcONa (1,1 ekv.)	1,1 ekv	25	24h	Bez reakce
MeOH	AcONa (1,1 ekv.)	40 ekv	25	24h	60% monoalk. prod. ^b
MeOH	AcONa (5 ekv.) + 1 ekv. KI	5 ekv	25	24h	Směs ^a

^a Uvažováno jako směs 3 a více látek

^b Uvažováno jako směs výchozího heterocyklu a jediného produktu, získáno porovnáním integrovaných ploch v HPLC záznamu

3.5.2. Alkylace za Mitsunobu podmínek

Z důvodu neúspěšnosti alkylace alkyhalogenidy byla vyzkoušena alkylace za Mitsunobu podmínek. Jedná se o alkylační reakci, kde alkohol, který je v přítomnosti fosfinu (nejčastěji trifenylfosfin) a azodikarboxylátu (nejčastěji diisopropylazodikarboxylát (DIAD) nebo diethylazodikarboxylát (DEAD)), vystupuje jako alkylační činidlo. Reakce se provádí za bezvodých podmínek, nejčastěji v rozpouštědlech jako je THF, dioxan, toluen nebo DCM.^{47,48} **Tabulka 4** ukazuje přehled provedených pokusů, všechny reakce byly prováděny v bezvodých rozpouštědlech (THF 5 ml nebo dioxan 10 ml) s 0,2 mmol výchozího heterocyklu (**1**). Jako alkohol byl použit benzylalkohol.

Tab. 4: Zkoumané podmínky alkylace za Mitsunobu podmínek

Ekv. BnOH	Ekv. PPh ₃	Ekv. DIAD	Rozpouštědlo	Výsledek po 24h ^a
1	1,5	1,5	THF	7% konverze
1	1,5	1,5	Dioxan	20% konverze ^d
2	1,5	1,5	THF	bez reakce ^d
2	1,5	1,5	Dioxan	11% konverze ^d
1	1,5	1,5	Dioxan ^b	13% konverze ^d
1	3	3	THF	45% monobenz. produktu 55% dibenz. produktu ^a
1 ^c	2	2	THF	bez reakce ^d
1	2	2	THF	25% monobenz. produktu 25% dibeenz. produktu ^a

^a získáno porovnáním integrovaných ploch v HPLC záznamu

^b v 5 ml dioxanu

^c použit 2-hydroxybenzylalkohol

^d po 24h přidáno 1,5 ekv. PPh₃ a DIAD

Reakce nebyly příliš úspěšné. Pravděpodobným důvodem byla přítomnost krystalické vody ve výchozí látce. Přidáním další dávky PPh₃ a DIAD se obvykle zvýšila konverze výchozí látky za současného zvýšení zastoupení dibenzylovaného produktu. Za nejúspěšnější lze považovat pokus se 3 ekvivalenty DIAD a PPh₃, nicméně ani tak nebylo zastoupení monobenzylovaného produktu pouze 45%.

3.5.3. Alternativní syntéza monobenzylovaného derivátu

Jelikož benzylační reakce nevedly uspokojivě k monobenzylovanému produktu, byla navržena alternativní cesta, která je zobrazena ve **Schématu 7**.

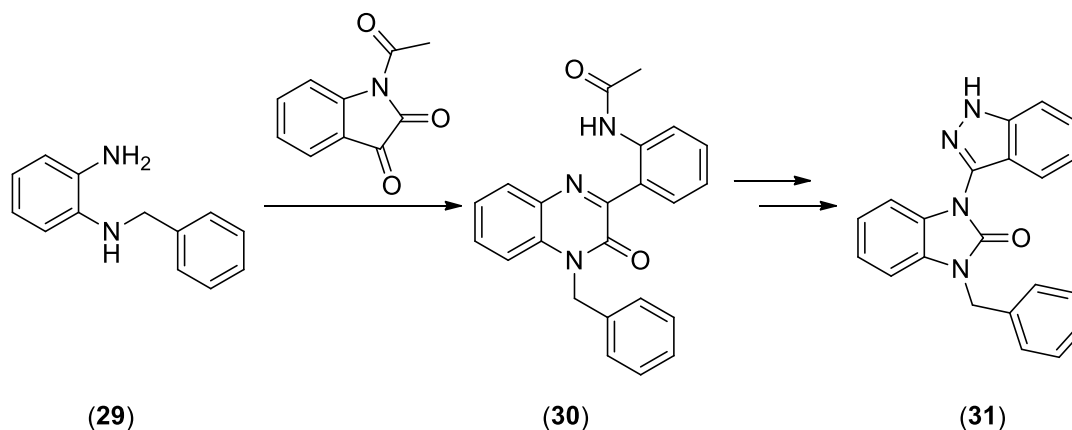


Schéma 7: Alternativní syntéza benzylovaného heterocyklu (31)

Prvním krokem této sekvence byla syntéza monobenzylovaného *o*-fenyldiaminu (29), který by kondenzací s N-acetylisatinem vedl k chinoxalinu (30) a po následné deprotekcí a cyklizaci by vznikl monobenzylovaný produkt (31).

Reakce nadbytku *o*-fenyldiaminu s benzylbromidem v DMA v přítomnosti K_2CO_3 ⁴⁹ nevedla ke vzniku očekávaného monobenzylovaného produktu (29), ale vznikl 2-fenylbenzimidazol. Proto byl vyzkoušen alternativní postup, kdy byl nejprve nabenzylován 2-nitroanilin, jehož nitroskupina by byla následně redukována. 2-Nitroanilin byl benzylován podle postupu z literatury,⁵⁰ nicméně následnou redukcí vedoucí k produktu (29) (**Schéma 7**) se nepodařilo uspokojivě provést.

Redukce pomocí dithioničitanu sodného v přítomnosti KOH⁵¹ vedla ke směsi produktů, ve které bylo 30% výchozí látky, 30% požadovaného produktu a zbylých 40% byla neznámá nečistota (podle HPLC). Redukce pomocí $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ za varu v EtOAc vedla ke vzniku velkého množství neznámých produktů. Z časových důvodů se již nepodařilo vyzkoušet další metody redukce (např. vodíkem, Bechampova redukce aj.) a derivát (29) nebyl připraven.

3.5.4. Protekce indazolového dusíku pomocí 3,4-dihydro-1*H*-pyranu

Jelikož se alkylace vyznačovaly nízkou konverzí, případně směsí produktů, byla vyzkoušena selektivní protekce indazolového dusíku pomocí 3,4-dihydro-1*H*-pyranu (DHP).⁵² Tato reakce je zobrazena ve **Schématu 8**.

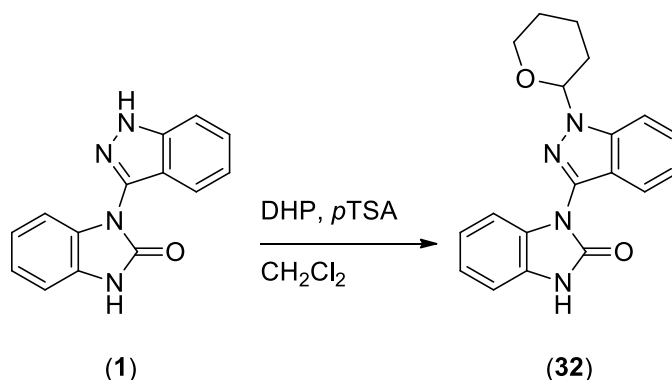


Schéma 8: Protekce indazolového dusíku pomocí DHP

Následně byla na ochráněném heterocyklu (32) vyzkoušena benzylace za Mitsunobu podmínek, nicméně i tato reakce vykazovala nízkou konverzí (40 %).

3.5.5. Bromace

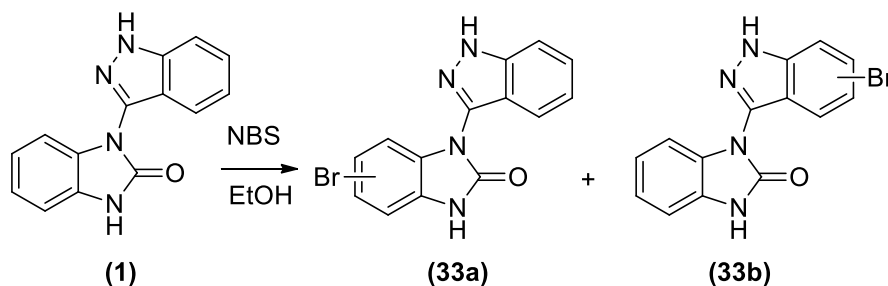


Schéma 9: Bromace heterocyklu (1)

Z dříve provedených experimentů⁵³ bylo známo, že reakcí heterocyklu (1) s nadbytkem bromové vody vzniká směs dibromovaných a tribromovaných derivátů neznámé struktury. Z tohoto důvodu byla vyzkoušena bromace pomocí mírnějšího činidla, jako je NBS (*N*-bromosukcinimid). Struktury cílových produktů (33a) a (33b) zobrazuje **Schéma 9**. Snaha byla zejména o syntézu monobromovaného derivátu a identifikaci pozice na které substituce probíhá. Reakce byly prováděny s 0,2 mmol

výchozí látky v EtOH. Procentuální zastoupení výchozích látek a produktů bylo získáno integrací HPLC záznamu. Zkoušené podmínky ukazuje následující **Tabulka 4**.

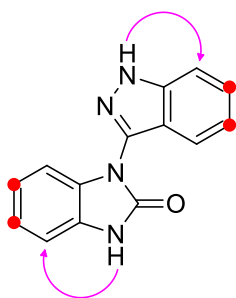
Tab. 4: Zkoumané podmínky bromace

Ekv. NBS	% výchozí látky ^a	% monobrom. produktu ^a	% dibrom. produktu ^a	% tribrom. produktu ^a	ostatní
1	49	22	20		- +1 ekv. NaHCO ₃ v 2 ml H ₂ O
1	32	61	7		- NBS přidáno najednou
1	24	69	7		- NBS přidáváno během 5 min.
2	0	65	35		- NBS přidáváno během 5 min.
1,5	3	82	10		- NBS přidáno najednou
5	0	0	53	20+23	NBS přidáváno během 5 min.
1,25	14	75	11		- NBS přidáváno během 5 min.
1,25	14	75	11		- NBS přikapáno jako roztok v EtOH
1,7	0	75	25		- NBS přidáváno během 5 min.
3	0	35	65		- NBS přidáváno během 5 min.

^a získáno porovnáním integrovaných ploch v HPLC záznamu

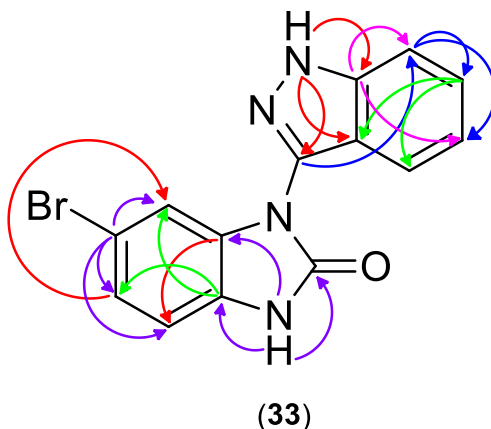
Pro syntézu se jako nejlepší ukázalo použití 1,7 ekvivalentu NBS, který byl pomalu přidáván k roztoku výchozího heterocyklu. Použití 1,5 ekvivalentu NBS vedlo k vyššímu množství žádaného produktu, nicméně se nepodařilo zcela oddělit zbylou výchozí látku pomocí kolonové chromatografie. Jelikož zpracování probíhalo pouhým odpařením rozpouštědla a nanesením zbytku přímo na kolonu, látka po vyčistění obsahovala poměrně velké množství sukcinimidu, který se eluoval spolu s produktem. Tento sukcinimid byl následně odstraněn promytím produktu malým množstvím vody.

Pozice bromového atomu byla určena pomocí 2D-NMR experimentů. Z ¹H a COSY spekter, bylo patrné, že k substituci došlo na jednom ze čtyř vyznačených míst. Tyto místa jsou vyznačena červenou tečkou na **Obrázku 10**.



Obr. 10: Možná místa substituce (červeně) a hledané NOESY interakce (fialově)

Jelikož byly chemické posuny NH skupin u výchozí látky známy² a i v případě derivátů substituovaných v polohách 5 a 6 (viz. experimentální část látky 6.2.12 a 6.2.13) byly prakticky neměnné, mohlo by být možné v NOESY spektru pozorovat interakce těchto NH vodíků s vodíky na aromatickém jádře a pomocí těchto interakcí by určení místa substituce bylo snadné (viz. **Obrázek 10** fialově). Jelikož tyto interakce nebyly v NOESY spektru pozorovány, byla struktura určena pomocí kombinace ¹H, ¹³C, APT, HMQC a HMBC NMR spekter. C-H korelace z HMBC spekter jsou zobrazeny na **Obrázku 11**.



Obr. 11: HMBC C-H korelace zobrazené na struktuře produktu bromace

3.6. Redukce diazoniové soli na hydrazino derivát a jeho cyklizace

3.6.1. Redukce pomocí $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

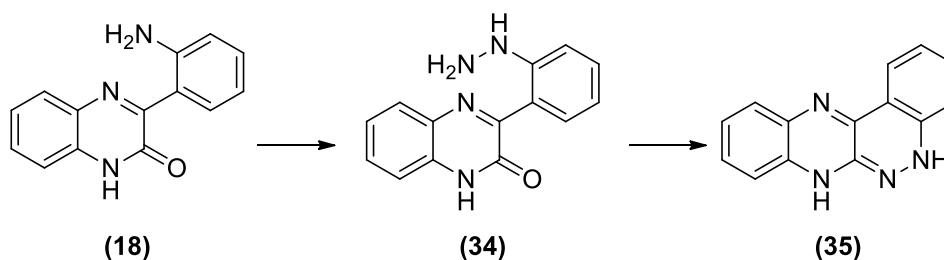


Schéma 10: Syntéza hydrazino derivátu (34) a jeho cyklizace

Původním záměrem při syntéze (1) byla redukce diazoniové soli na hydrazino derivát (35) a jeho cyklizace za vzniku cinnolinového cyklu (35).¹ Jelikož redukce pomocí sířičitanu sodného vedla k diazosulfonátům a následně k látce (1), byla hledána alternativní metoda redukce. Jako metoda redukce byla zvolena redukce SnCl_2 vzhledem k jeho nízké ceně a možnosti pracovat bez izolace vzniklé diazoniové soli.

Prvotní pokusy redukce diazoniové soli připravené ve vodném roztoku HCl byly úspěšné pouze částečně. Analýza pomocí HPLC-MS potvrdila vznik žádaného produktu (34), nicméně se z reakce vysrážel ve směsi s dalšími látkami. Extrakcí filtrátu se podařilo získat čistý produkt, nicméně pouze v malém výtěžku. To bylo způsobeno pravděpodobně vysrážením většiny produktu ve formě pevné látky. Provedením reakce v koncentrované HCl bylo dosaženo vyšší čistoty reakce, kdy cílový hydrazin (33) vznikal jako jediný produkt. Pro čistotu získaného produktu bylo klíčové použití „nového“ (asi půl roku starého) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Použitím „staršího“ (několik let, přesné stáří se nedalo ze zásobní lahve poznat) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ docházelo ke vzniku vedlejších produktů. Produkt se vysrážel ve formě pevné látky, která obsahovala zbytky sloučenin cínu. Takto získaný produkt se nepodařilo vyčistit.

Obecně se dá říci, že izolace produktu (34) byla problematická. Tyto problémy byly způsobeny zejména přítomností kyselého amidického vodíku v poloze 1. Při následné alkalizaci reakční směsi docházelo k deprotonaci a obtížné extrakci do organického rozpouštědla (ethylacetát). Tento problém byl nakonec překonán pomocí kolonové chromatografie. Reakční směs byla zneutralizována na pH 7 pomocí roztoku KOH a roztoku Na_2CO_3 . Takto zneutralizovaný roztok byl odpařen dosucha a pevná látka byla umístěna na silikagelovou kolonu a produkt byl eluován směsí

ethylacetát:hexan 1:1 (v/v). Touto současnou extrakcí a kolonovou chromatografií byl získán čistý produkt, který již dále neobsahoval stopy sloučenin cínu.

3.6.2. Hydrolýza produktů kondenzace diazoniové soli s C-kyselinami

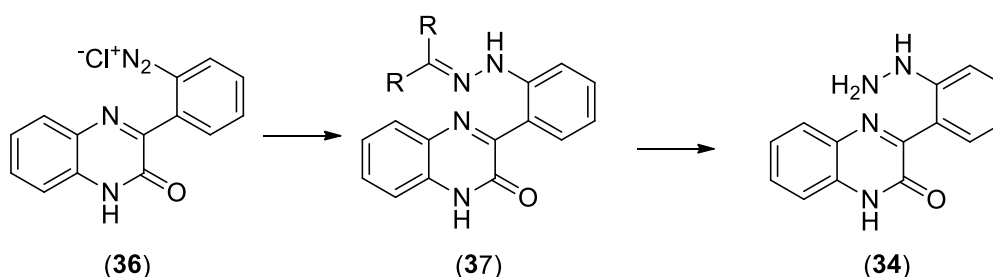
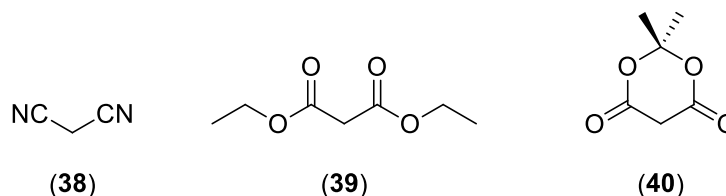


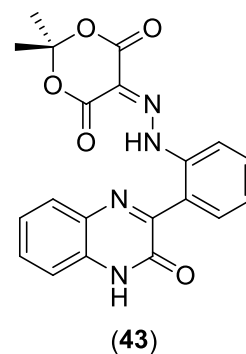
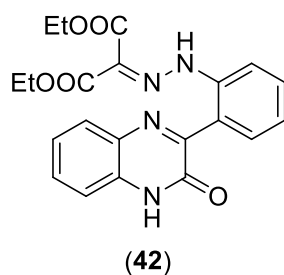
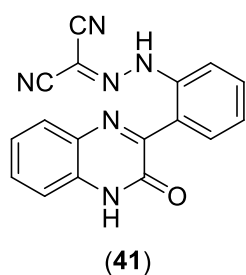
Schéma 11: Alternativní syntéza hydrazino derivátu (34)

Jelikož prvotní pokusy redukce diazoniové soli nebyly příliš úspěšné, byla zkoumána i alternativní cesta syntézy hydrazino derivátu (34). Tato cesta spočívala v kondenzaci diazoniové soli (36) s deriváty kyseliny malonové za vzniku hydrazonu (37). Konkrétně se jednalo o malondinitril (38), diethylmalonát (39) a Meldrumovu kyselinu (40), struktury těchto látek jsou zobrazeny na **Obrázku 12**. Hydrolýzou těchto derivátů v kyselém prostředí by mohlo být možné připravit hydrazino derivát (34).⁵⁴



Obr. 12: Struktury použitých derivátů kyseliny malonové

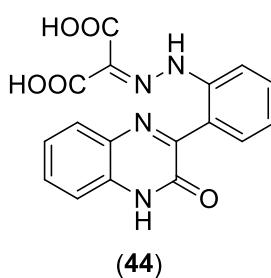
Kondenzací výše uvedených derivátů kyseliny malonové s diazoniovou solí (36) v prostřední octanového pufru podle postupu z literatury⁵⁵ byla připravena série hydrazonů (41-43). Po přidání roztoku C-kyseliny ve vodě a octanu sodném k roztoku diazoniové soli došlo k vyloučení žádaného produktu. Struktury připravených hydrazonů jsou zobrazeny na **Obrázku 13**.



Obr. 13: Struktury připravených hydrazonů

Rozpustnost hydrazonu (41) v kyselém prostředí byla velice špatná i za vyšších teplot. Reakce proto probíhala v suspenzi a nepodařilo se hydrazon zhydrolizovat.

Rozpustnost derivátů (42) a (43) byla mnohem lepší, tyto látky byly podrobeny hydrolýze v prostředí koncentrovaných kyselin. Konkrétně byly použity HCl, CH₃COOH a H₃PO₄. Za zvýšené teploty docházelo ke vzniku produktů, které se nepodařilo identifikovat. Při pokojové teplotě došlo v případě HCl a H₃PO₄ po 48 hodinách ke kompletní konverzi výchozí látky na jediný produkt. Struktura tohoto produktu byla určena pomocí HPLC-MS a NMR jako látka (44). Struktura této látky je zobrazena na **Obrázku 14**. V případě koncentrované CH₃COOH nedošlo k žádné reakci, pravděpodobně kvůli malému množství vody v reakční směsi oproti reakci s koncentrovanou HCl nebo H₃PO₄. Touto metodou se nepodařilo připravit žádaný hydrazin (34).



Obr. 14: Struktura produktu hydrolýzy hydrazonu

3.6.3. Cyklizace hydrazino derivátu

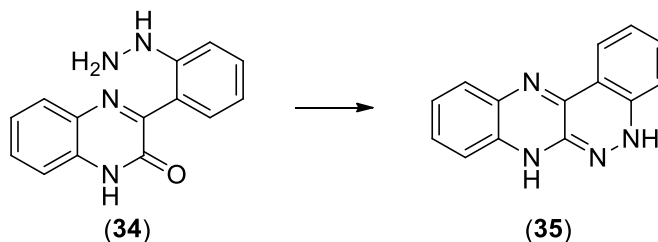


Schéma 11: Cyklizace hydrazinu (34)

Hydrazino derivát (34) byl dále cyklizován na cinnolinochinoxalin (35). V refluxujícím ethanolu reakce neprobíhala ani po 24 hodinách. Použitím katalytického množství kyseliny (CH_3COOH a *p*TSA) došlo v refluxujícím ethanolu po 24 hodinách k částečné konverzi na cílový produkt. Reakcí v refluxující CH_3COOH došlo po 18 hodinách k úplné konverzi na žádaný produkt. Reakce byla refluxována přes noc, nicméně je možné, že by pro plnou konverzi stačila i kratší reakční doba. Po odpaření rozpouštědla byl odparek suspendován v malém množství vody a produkt odfiltrován. Vzhledem ke kompletní konverzi hydrazino derivátu (34) byl výtěžek reakce malý (30%). Z časových důvodů ale neproběhla detailnější optimalizace reakčního času ani izolace produktu (kde pravděpodobně došlo k největším ztrátám).

3.6. Aplikace přesmyku na jiných systémech

Jelikož rozklad diazosulfonátu vedl ke vzniku derivátů indazolu, bylo provedeno několik experimentů, zdali je tento přesmyk aplikovatelný i na jiné systémy, které by také vedly k derivátům indazolu. Struktura zkoumaných derivátů a předpokládaných produktů přesmyku je zobrazena ve **Schématu 12**. Konkrétně se jednalo 2-aminoskořicovou kyselinu (45) vedoucí k 2-(1*H*-indazol-3-yl)octové kyselině (46), nitril 2-aminoskořicové kyseliny (47) vedoucí k 2-(1*H*-indazol-3-yl)acetonitrilu (48) a *N*-(2-aminobenziliden)anilin (49) vedoucí k *N*-fenyl-1*H*-indazol-3-aminu (50).

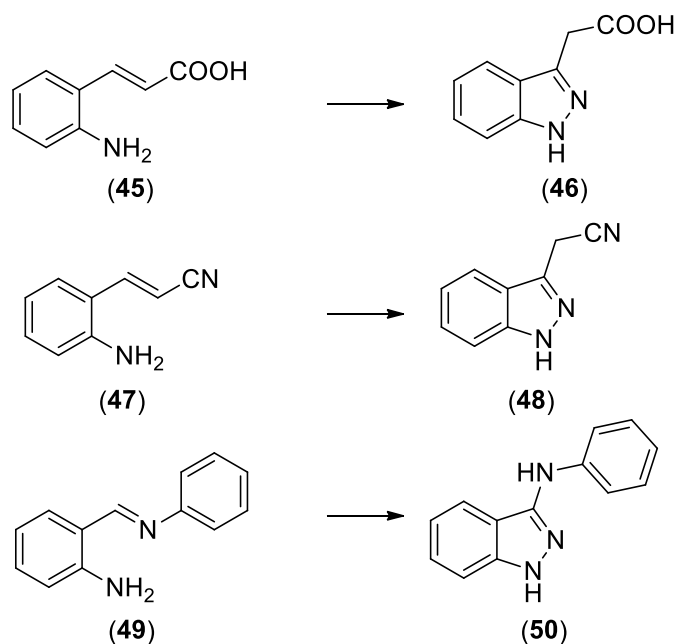


Schéma. 12: Aplikace přesmyku diazosulfonátu na jiných sloučeninách

3.7.1. Syntéza výchozích látek

Prvním krokem těchto pokusů byla syntéza výchozích látek. 2-aminoskořicová kyselina byla připravena podle postupu z literatury z 2-nitrobenzaldehydu (51)⁵⁶ s následnou redukcí kyseliny nitroskořicové (52). Schéma této syntézy je zobrazeno ve Schématu 13.

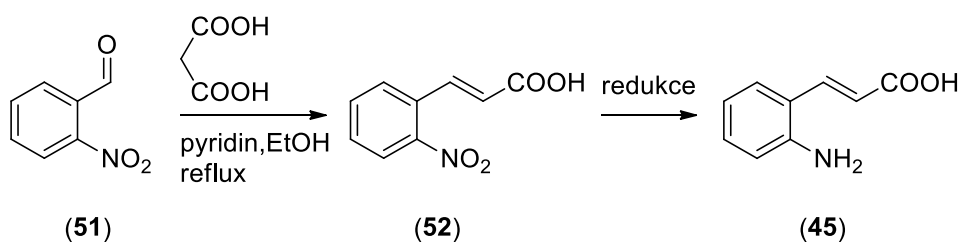


Schéma 13: Syntéza 2-aminoskořicové kyseliny

Kondenzace kyseliny malonové s 2-nitrobenzaldehydem byla až na nižší výtěžek (~50%) oproti publikovanému (70%) bezproblémová. K redukcí nitroskupiny bylo vyzkoušeno několik postupů. Byla zkoušena redukce jak volné kyseliny, tak jejího methylesteru.⁵⁷ Zkoušené podmínky jsou uvedeny v **Tabulce 5**.

Tab. 5: Redukce nitroskořicové kyseliny		
Výchozí látka	Podmínky redukce	Výsledek
Methylester	Na ₂ S ₂ O ₄ , MeOH, reflux ⁵¹	Produkt nevznikl
	Zn, HOAc, RT	Produkt nevznikl
	Fe, HOAc, RT	Produkt nevznikl
	Na ₂ S, MeOH, reflux ⁵⁵	Produkt nevznikl
	SnCl ₂ .2H ₂ O, MeOH, reflux	70% konverze ^a
	SnCl ₂ .2H ₂ O, EtOAc, reflux ⁵⁴	65% ^b
Volná kyselina	Na ₂ S, MeOH, reflux ⁵⁵	Produkt nevznikl
	Fe/C, N ₂ H ₄ , reflux	Produkt nevznikl
	FeSO ₄ , NH ₃ , H ₂ O ⁵	80% ^b

^a Plocha v HPLC
^b Izolovaný výtěžek

Reakcí 2-nitrobenzaldehydu (**52**) s diethyl (kyanomethyl)fosfonátem (**53**) ve směsi EtOH a vody v přítomnosti LiOH vznikl nitril kyseliny 2-nitroskořicové (**54**) ve směsi *cis* a *trans* izomerů (**Schéma 14**). Tyto izomery se nepodařilo uspokojivě oddělit. Pokus o separaci byl proveden pomocí kolonové chromatografie. Podařilo se izolovat oba jednotlivé izomery v dostatečném množství pro potvrzení jejich struktury pomocí NMR, ale většina produktu stále zůstala ve směsi. Jelikož v případě *cis* izomeru by po redukci mohlo docházet k nukleofilnímu ataku aminoskupiny na nitrilovou skupinu a protože separace jednotlivých izomerů nebyla příliš úspěšná, dále se s derivátem (**54**) nepracovalo.

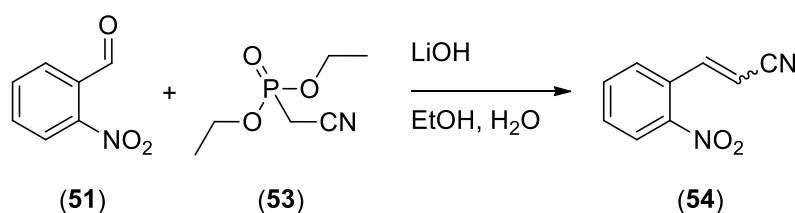


Schéma 14: Syntéza 2-(1*H*-indazol-3-yl)acetonitrilu

N-(2-aminobenzyliden)anilin (**49**) byl připraven podle postupu z literatury zahříváním 2-nitrobenzaldehydu v anilinu.⁵⁸ Následná redukce (**55**) pomocí Na₂S v EtOH⁵⁹ poskytla cílový produkt po přidání reakční směsi do studené vody. Reakční postup je zobrazen ve **Schématu 15**.

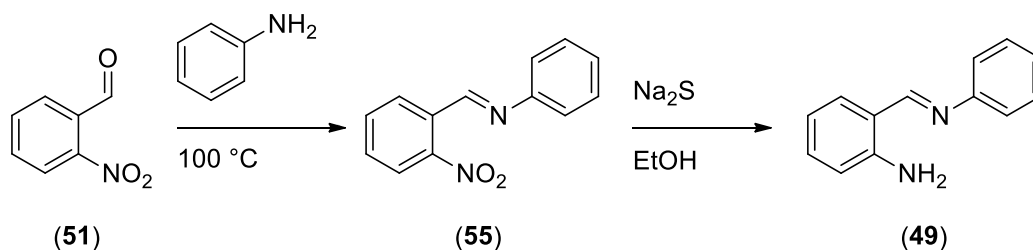
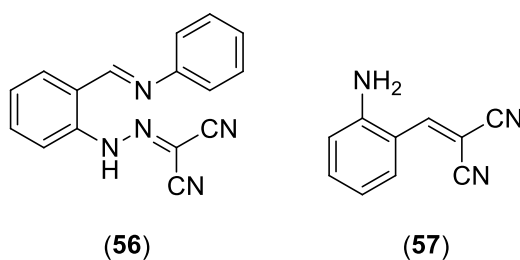


Schéma 15: Syntéza *N*-(2-aminobenziliden)anilinu

3.7.2. Diazotace a cyklizace

Diazotací kyseliny 2-aminoskořicové (**45**) a následným přidáním Na_2SO_3 se podařilo připravit 2-(1*H*-indazol-3-yl)octovou kyselinu (**46**), ale s poměrně nízkým výtěžkem (35%). Podrobnější průzkum literatury později ukázal, že tato látka již byla touto metodou připravena,^{6,60} stejně jako její 5-hydroxy derivát.⁵

Obdobná reakce byla provedena i v případě *N*-(2-aminobenziliden)anilinu (**49**). Po několika pokusech se ukázalo, že se látka rozkládala během diazotace. Tato hypotéza byla potvrzena diazotací a následným přidáním nitrilu kyseliny malonové a octanu sodného. Očekávaný hydrazon (**56**) nevznikal a místo něj se podařilo izolovat látku, jejíž struktura byla pomocí NMR určena jako (**57**). Struktury těchto látek jsou zobrazeny na **Obrázku 15**.



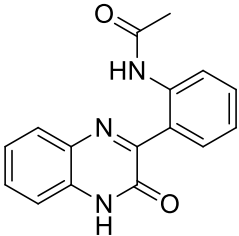
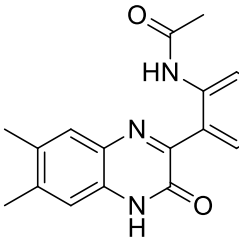
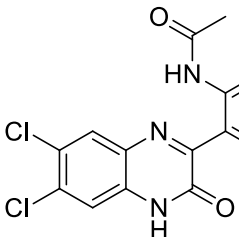
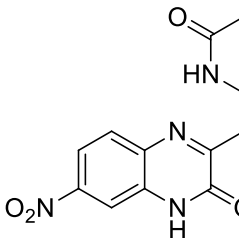
Obr. 15: Struktura očekávané (**56**) a izolované (**57**) látky po diazotaci látky (**49**)

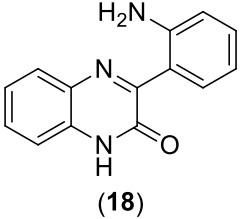
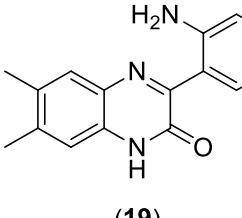
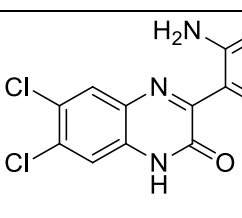
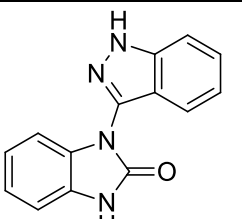
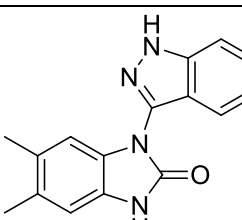
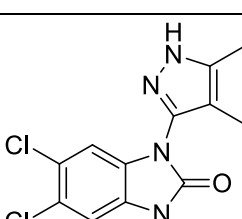
3.7. Biologická aktivita připravených látek

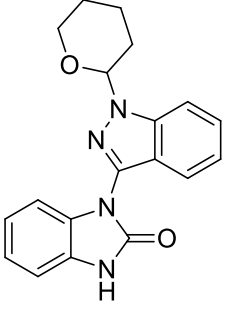
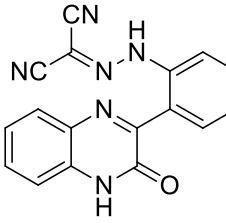
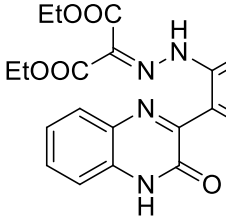
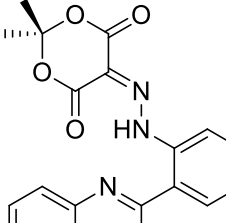
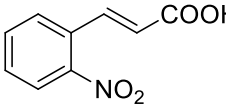
U připravených látek bylo provedeno testování biologické aktivity. Jednalo se o testy inhibice CDK2 (cyklin-dependentní kinasa 2), testy na rakovinných liniích K562 (myeloidní leukémie) a MCF7 (rakovina prsu) a dále testování antibakteriální aktivity proti *B.Subtilis* a *M.Luteus*. Výsledky testů inhibice CDK jsou uváděny jako IC_{50} tj. koncentrace látky, která měla za následek 50% inhibici funkce enzymu. Výsledky testů na rakovinných liniích jsou uváděny jako GI_{50} , tj. jako koncentrace látky vedoucí k úmrtí 50% buněk. Výsledky antimikrobiálních testů jsou uváděny jako velikost inhibiční zóny (průměr plochy v mm, na které bylo zabráněno množení bakterií). Ne všechny látky byly testovány na oba druhy aktivit, a to zejména z důvodu jejich nedostupnosti v době testování. Výsledky shrnuje **Tabulka 6**.

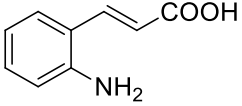
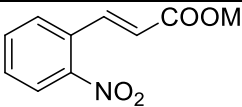
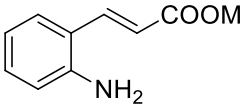
Látkou s nejvyšší inhibiční aktivitou CDK2 byl derivát (**23**). Velkým problémem testovaných látek byla špatná rozpustnost, často se nepodařilo připravit koncentrovanější roztok, z tohoto důvodu jsou některé hodnoty IC_{50} nebo ID_{50} uváděny jako hodnota „větší než“. Aktivita všech látek proti buněčným liniím byla nižší než proti samotnému enzymu.

Většina látek vykazovala určitou formu antimikrobiální aktivity, nicméně ani zde se nejednalo o vysokou aktivitu. Nejvyšší aktivita proti *M.Luteus* byla pozorována v případě derivátu (**12**). Nejvyšší aktivita proti *B.Subtilis* byla pozorována v případě látky (**23**), která také vykazovala aktivitu proti *M.Luteus*. Je ovšem nutné zdůraznit, že v případě difúzního testu je velikost zóny ovlivněna nejen antibakteriální aktivitou dané látky, ale také např. její difúzí v živném médiu.

Tabulka 6: Výsledky testů biologické aktivity připravených látek						
Struktura	IC ₅₀		ID ₅₀		<i>B.Subtilis</i> [mm]	<i>M.Luteus</i> [mm]
	CDK2 [μM]	ABI [μM]	K-562 [μM]	MCF7 [μM]		
 <p>(12)</p>	>50	>50	>12,5	>12,5	0	17
 <p>(13)</p>	>12,5	>12,5	>25	>25	0	15
 <p>(14)</p>	>12,5	>12,5	>12,5	>12,5	0	15
 <p>(15a)</p>	-	-	-	-	0	14

 <p>(18)</p>	>50	>50	>25	>25	-	-
 <p>(19)</p>	>50	>50	>25	>25	0	13
 <p>(20)</p>	>25	>25	>12,5	>12,5	0	13
 <p>(1)</p>	>25	>25	>25	>25	0	12
 <p>(22)</p>	>25	>25	>25	>25	0	0
 <p>(23)</p>	19,7	>25	>25	>25	12	15

 <p>(32)</p>	>25	>25	>50	>50	0	15
 <p>(41)</p>	-	-	-	-	0	15
 <p>(42)</p>	-	-	-	-	0	14
 <p>(43)</p>	-	-	-	-	0	13
 <p>(52)</p>	>25	>25	>50	>50	0	10

 (45)	>100	>100	>100	>100	0	12
	>100	>100	>100	>100	0	12
	>100	>100	>100	>100	0	12

3.8. Studium mechanismu přesmyku diazosulfonátu

Reakční mechanismus přesmyku diazosulfonátu vedoucí ke kontrakci chinoxalinového cyklu ještě nebyl uspokojivě prozkoumán. Návrh mechanismu³ je zobrazen ve **Schématu 16**. Jednotlivé kroky tohoto mechanismu jsou detailněji rozebrány v kapitole 2.2.

Byl proveden pokus o zachycení a charakterizaci jednotlivých intermediátů pomocí HPLC-MS. 50 mg diazosulfonátu byly rozpuštěno v 50 ml směsi MeOH:voda 1:1 a zahřáto na zkoumanou teplotu (60, 70 a 80 °C). V časových intervalech (3x 10 minut, 2x 15 minut, 2x 30 minut a 2x 60 minut) byly odebírány vzorky (1 ml reakční směsi), které byly analyzovány pomocí HPLC-MS.

Podařilo se zachytit pouze jeden intermediát při teplotě 80 °C, nicméně se nepodařilo určit jeho strukturu. Problematický se ukázal fakt, že všechny intermediáty vznikající po odstoupení SO₃⁻ skupiny mají stejnou molekulovou hmotnost jako cílový heterocyklus (**1**) a tudíž nebylo možné určit jejich strukturu pouze na základě MS. Přesný mechanismus přesmyku se tedy nepodařilo objasnit.

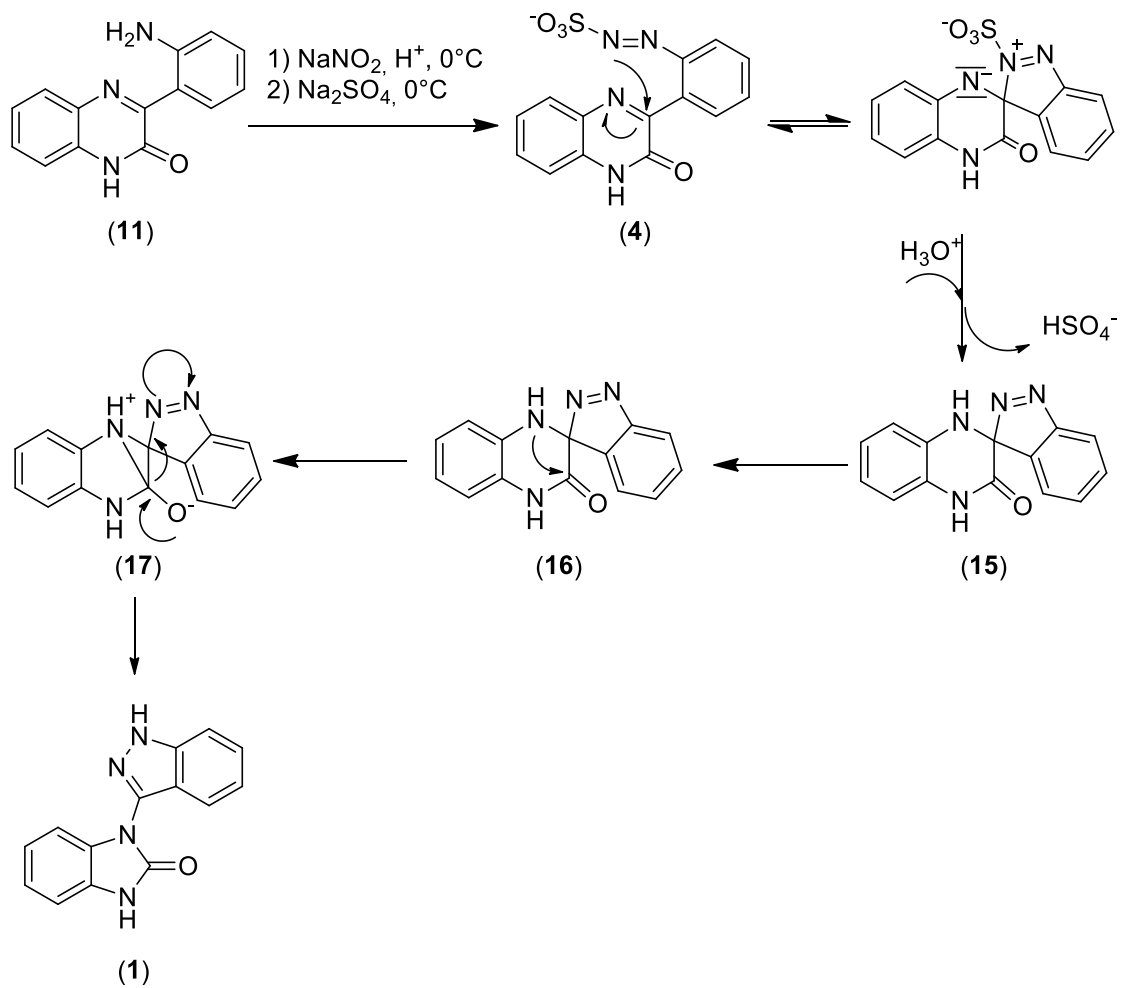


Schéma 16: Návrh mechanismu přesmyku diazosulfonátu

4. Experimentální část

4.1. Úvod

Pro syntézu byly použity komerčně dostupné chemikálie. *N*-acetyl isatin byl připraven v minulosti prof. Janem Sloukou na Katedře organické chemie Přírodovědecké fakulty UP. Tyto chemikálie byly použity bez dalších úprav, pokud není řečeno jinak.

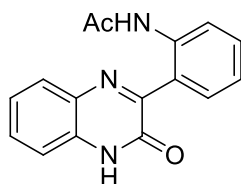
Produkty byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie, ^1H , ^{13}C případně 2D NMR spektroskopie a pomocí bodu tání.

LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému, skládající se z UHPLC chromatografu Accela s fotodiodovou řadou a trojitým kvadrupolovým hmotnostním spektrometrem TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, CA, USA).

NMR spektra byla měřena při 25°C na spektrometru JEOL ECA 400II. Spektrum bylo zreferencováno na residuální signál rozpouštědla.

4.2. Syntéza

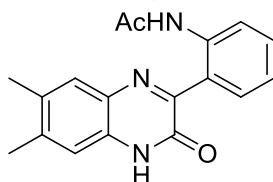
4.2.1. *N*-(2-(3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid



945 mg *N*-acetyl isatinu (5 mmol) bylo rozpuštěno v 30 ml kyseliny octové při laboratorní teplotě. K tomuto roztoku byl za míchání přilít roztok 550 mg *o*-fenylendiaminu (5 mmol) v 15 ml kyseliny octové. Přibližně po minutě se začala objevovat světlá sraženina, která byla po dalších 10 minutách odsáta, promyta (do filtrátu) koncentrovanou kyselinou octovou, zředěnou kyselinou octovou (1:1), vodou a vysušena. Z filtrátu se stáním přes noc vyloučil další podíl, který byl odsát a promyt stejným způsobem. Celkem bylo izolováno 1050 mg produktu (75 %) ve formě bíložlutého prášku. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.50 (br. s., 1 H), 9.77 (s, 1 H), 7.83 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.79 (dd, J = 0.9, 7.9 Hz, 1 H), 7.63 (dd, J = 1.6, 7.8 Hz, 1 H), 7.55 (ddd, J = 1.4, 7.1, 8.3 Hz, 1 H), 7.46 - 7.41 (m, 1 H), 7.36 - 7.34 (m, 1 H), 7.34 - 7.30 (m, 1 H), 7.19 (t, J = 7.3 Hz, 1 H), 1.91 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz,

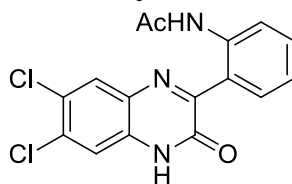
DMSO-d₆) δ = 167.9, 156.9, 154.5, 136.8, 132.4, 132.0, 130.8, 130.3, 129.8, 129.6, 128.6, 127.8, 123.2, 123.0, 115.2, 23.7 ppm. MS: 280,03[M+H]⁺; 278,03[M-H]⁻, teplota tání: 290-294 °C.

4.2.2. *N*-(2-(6,7-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid



945 mg *N*-acetyl isatinu (5 mmol) bylo rozpuštěno v 30 ml kyseliny octové při laboratorní teplotě. K tomuto roztoku byl za míchání přilít roztok 680 mg 4,5-dimethylbenzen-1,2-diaminu (5 mmol) v 15 ml kyseliny octové. Po přibližně minutě míchání bylo přidáno 10 ml vody, čímž došlo k vysrážení produktu. Sraženina byla po dalších 10 minutách odsáta, promyta (do filtrátu) koncentrovanou kyselinou octovou, zředěnou kyselinou octovou (1:1), vodou a vysušena. Z filtrátu se stáním přes noc vyloučil další podíl, který byl odsát a promyt stejným způsobem. Celkem bylo izolováno 1270 mg produktu (71 %) ve formě zelenožlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.42 (s, 1 H), 9.83 (s, 1 H), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.65 (dd, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 7.42 (dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1 H), 7.18 (dd, *J* = 7.3, 15.0 Hz, 1 H), 7.10 (s, 1 H), 2.33 (s, 3 H), 2.30 (s, 3 H), 1.92 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 167.8, 155.3, 154.6, 139.9, 136.8, 131.9, 130.8, 130.5, 130.3, 129.4, 128.3, 127.8, 123.1, 122.9, 115.1, 23.8, 19.8, 19.0 ppm. MS: 308,05 [M+H]⁺; 306,07 [M-H]⁻, teplota tání: 330-332 °C.

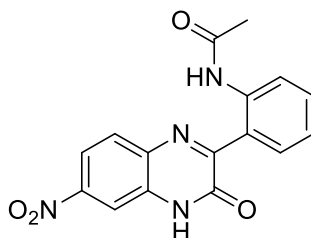
4.2.3. *N*-(2-(6,7-dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid



945 mg *N*-acetyl isatinu (5 mmol) bylo rozpuštěno v 30 ml kyseliny octové při laboratorní teplotě. K tomuto roztoku byl za míchání přilít roztok 880 mg 4,5-dichlorbenzen-1,2-diaminu (5 mmol) v 15 ml kyseliny octové. Okamžitě po slití roztoků se vyloučila hustá kašovitá látka. Tato sraženina byla po dalších 10 minutách odsáta, promyta (do filtrátu) koncentrovanou kyselinou octovou, zředěnou kyselinou octovou (1:1), vodou a vysušena. Bylo izolováno 1420 mg hnědošedého prášku (83%). ¹H NMR

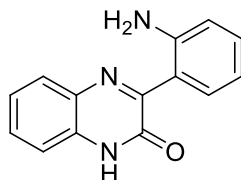
(400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.60 (br. s, 1 H), 9.72 (br. s, 1 H), 8.07 (s, 1 H), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 7.59 (dd, J = 1.6, 7.8 Hz, 1 H), 7.49 (s, 1 H), 7.45 (dd, J = 1.6, 7.8 Hz, 1 H), 7.23 - 7.17 (m, 1 H), 1.90 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 168.0, 158.9, 154.1, 136.6, 132.3, 132.1, 131.6, 130.7, 130.0, 129.6, 127.2, 124.9, 123.3, 122.9, 116.1, 23.7 ppm. MS: 347,89 [M+H]⁺; 345,93 [M-H]⁻, teplota tání: >350 °C.

4.2.4. *N*-(2-(6-nitro-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamid



945 mg *N*-acetyl isatinu (5 mmol) bylo rozpuštěno ve 30 ml kyseliny octové při laboratorní teplotě. K tomuto roztoku byla přilita jemná suspenze 4-nitrobenzen-1,2-diaminu v 60 ml kyseliny octové. Po chvíli se začala vylučovat tmavá suspenze. Srážení bylo urychleno přidáním 20 ml vody. Sraženina byla odsáta a promyta vodou. Z filtrátu se přes noc vysrážel druhý podíl. Dohromady bylo získáno 1100 mg produktu (67%) ve formě šedozelené pevné látky. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.75 (br. s., 1 H), 9.80 (br. s., 1 H), 8.12 (d, J = 2.3 Hz, 1 H), 8.07 (dd, J = 2.6, 8.9 Hz, 1 H), 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.74 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.64 (dd, J = 0.9, 7.8 Hz, 1 H), 7.51 - 7.44 (m, 1 H), 7.22 (t, J = 7.6 Hz, 1 H), 1.90 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 167.9, 160.9, 154.1, 147.0, 136.7, 135.5, 132.6, 130.7, 130.2, 129.7, 127.1, 123.2, 122.9, 117.4, 110.4, 23.5 ppm. MS: 324,93 [M+H]⁺; 322,96 [M-H]⁻, teplota tání: 312-314 °C.

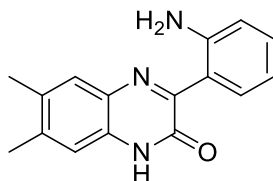
4.2.5. 3-(2-Aminofenyl)chinoxalin-2(1H)-on



4,97 g (17,8 mmol) *N*-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamidu bylo rozpuštěno v roztoku 10 g KOH (178 mmol) v 70 ml směsi EtOH:H₂O v objemovém poměru 1:1. Reakční směs byla refluxována po dobu 9,5 hodiny. Po ukončení refluxu byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a přidáním zředěné kyseliny octové byl vyloučen produkt jako žlutá sraženina. Tato sraženina byla odsáta, promyta

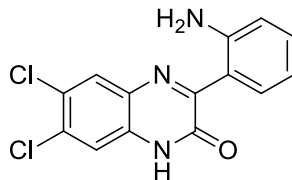
kyselinou octovou a vodou a vysušena. Bylo izolováno 3,94 g (93%) produktu ve formě žlutého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 12.48 (d, J = 0.5 Hz, 1 H), 8.09 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 1 H), 7.81 - 7.78 (m, 1 H), 7.52 - 7.47 (m, 1 H), 7.33 - 7.27 (m, 1 H), 7.17 - 7.12 (m, 1 H), 6.83 - 6.79 (m, 1 H), 6.61 - 6.55 (m, 1 H), 6.45 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 155.9, 154.7, 148.7, 131.5, 131.5, 131.3, 130.7, 129.7, 128.0, 123.2, 117.5, 116.2, 114.9, 114.6 ppm. MS: 238,02 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 236,08 $[\text{M}-\text{H}]^-$ teplota tání: 263-265 °C.

4.2.6. 3-(2-Aminofenyl)-6,7-dimethylchinoxalin-2(1H)-on



1,2 g (3,9 mmol) *N*-(2-(6,7-dimethyl-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamidu bylo rozpuštěno v roztoku 2,2 g KOH (39 mmol) v 15 ml směsi EtOH:H₂O v objemovém poměru 1:1. Reakční směs byla refluxována přes noc (přibližně 17 h). Po ukončení refluxu byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a přidáním zředěné kyseliny octové byl vyloučen produkt jako žlutá sraženina. Tato sraženina byla odsáta, promyta kyselinou octovou a vodou a vysušena. Bylo izolováno 970 mg (94%) produktu ve formě žlutého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.08 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 1 H), 7.55 (s, 1 H), 7.12 (ddd, J = 1.7, 7.0, 8.3 Hz, 1 H), 7.08 (s, 1 H), 6.79 (dd, J = 1.1, 8.2 Hz, 1 H), 6.57 (ddd, J = 1.2, 7.0, 8.1 Hz, 1 H), 6.40 (br. s., 2 H), 2.31 (s, 3 H), 2.29 (s, 3 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 155.0, 154.6, 148.6, 139.1, 131.7, 131.4, 130.3, 129.9, 129.8, 127.8, 118.0, 116.2, 115.2, 114.6, 19.8, 18.9 ppm. MS: 266,03 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 264,09 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

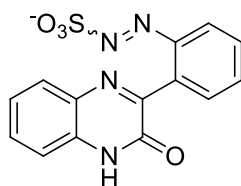
4.2.7. 3-(2-Aminofenyl)-6,7-dichlorchinoxalin-2(1H)-on



1,34 g (3,85 mmol) *N*-(2-(6,7-dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)acetamidu bylo rozpuštěno v roztoku 3,36 g KOH (38 mmol) v 14 ml směsi EtOH:H₂O v objemovém poměru 1:1. Reakční směs byla refluxována přes noc (přibližně 18 h). Po ukončení refluxu byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a

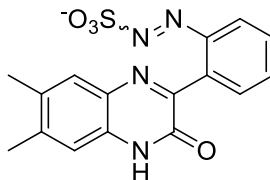
přidáním zředěné kyseliny octové byl vyloučen produkt jako oranžová sraženina. Tato sraženina byla odsáta, promyta kyselinou octovou a vodou a vysušena. Bylo izolováno 1,1 g (94%) produktu ve formě oranžového prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- D_6) δ = 8.17 - 8.13 (m, 1 H), 8.12 - 8.09 (m, 1 H), 7.47 - 7.42 (m, 1 H), 7.17 - 7.11 (m, 1 H), 6.80 (dd, J = 1.1, 8.3 Hz, 1 H), 6.55 (ddd, J = 1.2, 7.0, 8.1 Hz, 1 H), 6.59 (br. s, 2 H) ppm, ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 156.8, 155.2, 149.2, 132.5, 131.6, 131.1, 128.8, 124.4, 117.0, 116.4, 116.3, 114 ppm. MS: 305,95 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 303,97 $[\text{M}-\text{H}]^-$, teplota tání: 275-285°C, >350 °C viz diskuse.

4.2.8. 2-(2-(3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát



2 g (8,4 mmol) 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu bylo rozsuspendováno ve směsi 250 ml H_2O s 25 ml HCl . Po vychlazení na 0 °C v ledové lázni byl k suspenzi přikapán roztok NaNO_2 (620 mg, 8,9 mmol) v 25 ml vody. Po přidání dusitanu byl roztok ponechán míchat do rozpuštění veškeré pevné látky. Do tohoto roztoku byl přilít roztok 52 g Na_2SO_3 (415 mmol) v 250 ml H_2O vychlazený na 10 °C. Roztok byl dále míchán v ledové lázni. Po půl hodině byla odsáta vyloučená pevná látka, která byla promyta matečným louhem a ledovou vodou. Izolováno 2,8 g (98%) produktu ve formě žlutého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 12.42 (br. s., 1 H), 7.80 - 7.74 (m, 1 H), 7.69 - 7.58 (m, 4 H), 7.57 - 7.51 (m, 1 H), 7.37 - 7.27 (m, 2 H) ppm. ^{13}C NMR viz diskuse. MS: 223,06 $[\text{M}-(\text{N}=\text{N}-\text{SO}_3^-)+\text{H}]^+$; 328,94 $[\text{M}]^-$, teplota tání: 229-232 °C.

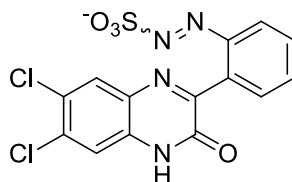
4.2.9. 2-(2-(6,7-Dimethyl-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát



265 mg 3-(2-aminofenyl)-6,7-dimethylchinoxalin-2(1*H*)-onu (1 mmol) byl rozsuspendován pomocí sonifikace v 80 ml H_2O s 610 μL HCl (5 mmol). Tato suspenze byla vychlazená v ledové lázni na 0 °C. Po vychlazení bylo přikapáno 76 mg NaNO_2 (1,1 mmol) v 7,6 ml studené H_2O . Po 2,5h míchání v ledové lázni byl roztok rychle

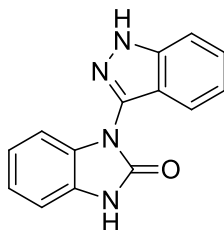
zfiltrován a k filtrátu byl přilít roztok 5 g Na₂SO₃ (40 mmol) v 50 ml H₂O. Roztok byl ponechán stát dva dny v lednici (4-8 °C). Po dvou dnech byla vysrážená látka odsáta, promyta matečným louhem a studenou vodou. Bylo izolováno 221 mg (61%) produktu ve formě žlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.27 (s, 1 H), 7.65 - 7.55 (m, 4 H), 7.53 (s, 1 H), 7.09 (s, 1 H), 2.33 (s, 3 H), 2.29 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 157.1, 154.4, 149.4, 139.7, 134.7, 131.6, 131.0, 130.5, 130.4, 129.8, 128.6, 118.0, 115.3, 19.8, 18.9 ppm. MS: 278,21 [M-(SO₃⁻)+H]⁺; 249,09 [M-(N=N-SO₃⁻)], teplota tání: 197-201 °C.

4.2.10. 2-(2-(6,7-Dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonát



445 mg 3-(2-aminofenyl)-6,7-dichlorchinoxalin-2(1H)-onu (1,5 mmol) bylo rozpuštěno ve 45 ml THF ke kterému bylo přidáno 22 ml H₂O. K tomuto roztoku bylo přidáno 637 μL HCl (7,5 mmol). Tato směs byla vychlazená v ledové lázni na teplotu 0 °C. K tomuto roztoku byl přikapán roztok 115 mg NaNO₂ (1,65 mmol) v 11 ml vychlazené H₂O. Směs byla následně ponechána míchat 2 h v ledové lázni a poté byl přidán roztok 7,5g Na₂SO₃ (60 mmol) v 75 ml H₂O. Po přibližně 30 minutách se začala vylučovat žlutá sraženina. Reakční směs byla přes noc ponechána v lednici (4-8 °C). Tato sraženina byla druhý den odsáta a promyta studenou vodou. Z filtrátu bylo odpařeno THF a vyloučená sraženina odsáta. Celkem bylo získáno 500 mg (85%) produktu ve formě žlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-D₆) δ = 12.65 - 12.45 (m, 1 H), 8.03 (s, 1 H), 7.72 - 7.61 (m, 4 H), 7.48 (s, 1 H) ppm. MS: 318,91 [M-SO₃⁻+2H]⁺; 288,97 [M-(N=NSO₃⁻)], teplota tání: 296-306°C

4.2.11. 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on



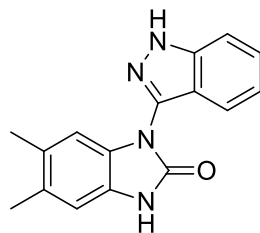
4.2.11.1. Rozkladem diazosulfonátu

2,6 g 2-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazosulfonátu (7,9 mmol) bylo přidáno do roztoku 250 ml H₂O a 25 ml HCl vyhřáté na 100 °C a zahříváno po dobu 15 minut. Po 15 minutách došlo ke změně barvy roztoku ze žluté na oranžovou a po ochlazení na pokojovou teplotu byla vyloučená sraženina odsáta a promyta vodou. Bylo získáno 1,7 g směsi, která byla dále rekrystalizována ze směsi kyseliny octové a voda. Bylo izolováno 1,42 g (71%) produktu ve formě bílošedého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 13.31 (s, 1 H), 11.26 (s, 1 H), 7.70 (dd, *J* = 0.8, 8.2 Hz, 1 H), 7.63 - 7.60 (m, 1 H), 7.44 (ddd, *J* = 1.0, 7.0, 8.3 Hz, 1 H), 7.18 - 7.06 (m, 4 H), 7.04 - 6.99 (m, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 153.1, 141.1, 136.6, 130.1, 128.8, 126.9, 122.1, 121.0, 120.8, 120.7, 116.9, 110.7, 109.4, 109.3 ppm. MS: 250,95 [M+H]⁺; 248,76 [M-H]⁻, teplota tání: 318-320 °C.

4.2.11.2. Přímou z amino derivátu

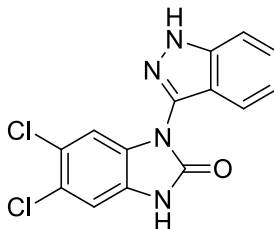
1,87 g 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu (5,7 mmol) bylo rozsuspendováno v roztoku 250 ml H₂O s 3,9 ml H₂SO₄. Tato suspenze byla vychlazená v ledové lázni na 0 °C. Po vychlazení byl přidán roztok 597 mg NaNO₂ (8,65 mmol) v 50 ml vychlazené vody. Po rozpuštění pevné látky, byl tento roztok přilít k roztoku 15,5 g Na₂SO₃ (123 mmol) ve 100 ml vody. Tato směs byla ponechána míchat 30 minut při pokojové teplotě a následně refluxována 2 hodiny. Po ukončení refluxu byla reakce ponechána chladnout při pokojové teplotě do druhého dne. Vyloučená sraženina byla odsáta, promyta vodou a rekrystalizována ze směsi kyseliny octové a voda. Bylo získáno 670 mg produktu (34%) ve formě bílošedého prášku, který se shodoval s produktem připraveným rozkladem diazosulfonátu ve všech aspektech (NMR, MS).

4.2.12. 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-5,6-dimethyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on



265 mg 3-(2-aminofenyl)-6,7-dimethylchinoxalin-2(1*H*)-onu (1 mmol) bylo rozsuspendováno v 56 ml H₂O a 9 ml HCl. Tato suspenze byla vychlazená v ledové lázni na 0 °C. K této suspenzi byl přikapán roztok 76 mg NaNO₂ (1,1 mmol) v 7,6 ml vychlazené vody. Po 45 minutách byla suspenze přilita do roztoku 1,9 g Na₂SO₃ (15 mmol) v 40 ml H₂O. Tento roztok byl ponechán 30 minut při laboratorní teplotě a následně vložen do olejové lázně a refluxován 1 hodinu. Po ukončení refluxu byla směs ochlazená na pokojovou teplotu a dále ponechána do druhého dne v lednici (4-8 °C). Druhý den bylo odsáto 170 mg oranžové pevné látky, která byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtOAc:hexan 1:1 v/v). Bylo získáno 40 mg nažloutlé látky, která byla dále přečištěna pomocí semipreparativního HPLC. Bylo získáno 23 mg produktu (9%) ve formě bílošedého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 13.35 (br. s, 1 H), 11.18 - 10.99 (m, 1 H), 7.69 - 7.65 (m, 1 H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.45 - 7.40 (m, 1 H), 7.14 (s, 1 H), 6.90 (s, 1 H), 6.90 (s, 1 H), 2.23 (s, 3 H), 2.17 (s, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 153.2, 141.1, 136.8, 129.7, 128.6, 128.2, 126.8, 126.8, 120.7, 120.6, 116.8, 110.7, 110.3, 110.2 ppm. MS: 279,03 [M+H]⁺; 277,08 [M-H]⁻, teplota tání: 277-279 °C.

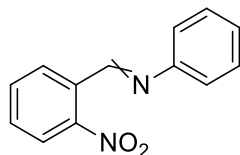
4.2.13. 5,6-Dichlor-1-(1*H*-indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on



500 mg 2-(2-(6,7-dichlor-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)diazoesulfonátu (1,26 mmol) bylo vloženo do roztoku 115 ml H₂O s 15 ml HCl a zahříváno na olejové lázni na 100 °C po dobu 25 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo získáno 360 mg směsi, která byla přečištěna pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze DCM:MeOH 40:1 v/v). Bylo získáno 220 mg produktu

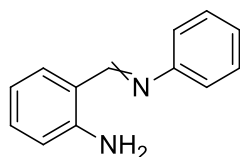
(45%) ve formě oranžového prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 13.36 (s, 1 H), 11.62 (s, 1 H), 7.76 (dd, J = 0.8, 8.2 Hz, 1 H), 7.62 (td, J = 0.8, 8.5 Hz, 1 H), 7.45 (s, 1 H), 7.37 (s, 1 H), 7.32 (s, 1 H), 7.17 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 152.8, 141.1, 136.0, 129.7, 129.0, 127.0, 124.1, 123.0, 120.9, 120.8, 116.4, 110.9, 110.7, 110.6 ppm. MS: 318,96 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 316,98 $[\text{M}-\text{H}]^-$, teplota tání: 341-344 °C.

4.2.14. *N*-(2-nitrobenzyliden)anilin



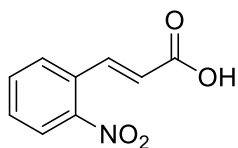
3,5 g 2-nitrobenzaldehydu (23,1 mmol) bylo přidáno k 5,2 g anilinu (55,9 mmol) a hodinu zahříváno na 100 °C. Po ukončení zahřívání a ochlazení na pokojovou teplotu byla získána olejovitá látka, která byla rozpuštěna v 25 ml diethyletheru, vysušena MgSO₄ a ether byl odpařen. Získaný olej byl rozpuštěn v EtOH a po přidání malého množství vody (<0,5 ml) se vyloučila žlutá krystalická látka, která byla odstáta, promyta ethanolem a vysušena. Celkem bylo získáno 3,46 g produktu (66%) ve formě žlutých krystalků. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.87 (s, 1 H), 8.18 (dd, J = 1.4, 7.8 Hz, 1 H), 8.12 (dd, J = 1.2, 8.1 Hz, 1 H), 7.87 (tt, J = 0.6, 7.6 Hz, 1 H), 7.80 - 7.75 (m, 1 H), 7.49 - 7.43 (m, 2 H), 7.33 - 7.27 (m, 3 H) ppm. MS: 226,95 $[\text{M}+\text{H}]^+$, teplota tání: 60-62 °C (lit. 64-66 °C).

4.2.15. *N*-(2-aminobenzyliden)anilin



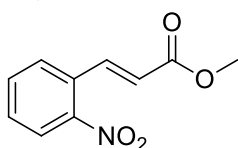
1,3 g *N*-(2-nitrobenzyliden)anilinu (5,7 mmol) bylo rozsuspensováno v 25 ml EtOH. Do této suspenze bylo přidáno 1,9 g Na₂S.3H₂O (14,25 mmol) a tato směs byla zahřívána na 65 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu, byla tato směs nakapána do 30 ml ledové vody. Vyloučená sraženina byla odsáta a promyta vodou. Bylo získáno 665 mg produktu (60%) ve formě tmavého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.68 - 8.60 (m, 1 H), 7.49 - 7.35 (m, 4 H), 7.27 - 7.21 (m, 2 H), 7.20 - 7.15 (m, 1 H), 6.83 - 6.73 (m, 1 H), 6.64 - 6.56 (m, 1 H), 3.36 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 163.4, 151.5, 149.6, 134.5, 131.8, 129.2, 125.4, 120.9, 116.4, 115.3, 114.7 ppm. MS: 197,13 $[\text{M}+\text{H}]^+$, teplota tání: 80-82 °C.

4.2.16. Kyselina 2-nitroskořicová



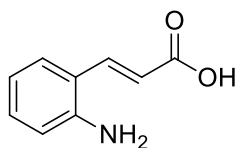
K 8,6 g 2-nitrobenzaldehydu (57 mmol) v 14,3 ml EtOH bylo přidáno 6,52 g kyseliny malonové (62,7 mmol) a 1,4 ml pyridinu. Tato směs byla refluxována přes noc (~16 hodin). Po ochlazení na pokojovou teplotu, byla vyloučená látka odsáta a promyta studeným EtOH. Bylo izolováno 5,7 g produktu (52%) ve formě světlého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 12.73 (br. s., 1 H), 8.09 - 8.04 (m, 1 H), 7.95 - 7.91 (m, 1 H), 7.86 (d, J = 16.0 Hz, 1 H), 7.80 - 7.74 (m, 1 H), 7.69 - 7.63 (m, 1 H), 6.53 (d, J = 15.8 Hz, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 166.88, 148.29, 138.85, 133.87, 130.82, 129.35, 129.25, 124.66, 123.84 ppm. MS: 192,16[M-H] $^-$, teplota tání: 241-243 °C.

4.2.17. Methylester kyseliny 2-nitroskořicové



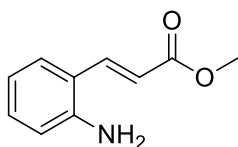
1,12 g kys. 2-nitroskořicové (5,8 mmol) bylo vloženo do 35 ml MeOH a následně bylo přidáno 0,8 ml H₂SO₄. Směs byla refluxována přes noc (~16 hodin). Po ochlazení na pokojovou teplotu byla směs zneutralizována roztokem NaHCO₃, během této neutralizace se vyloučilo malé množství světlé sraženiny. Tato suspenze byla extrahována 3x 35 ml DCM. Organické fáze byly spojeny, vysušeny MgSO₄ a odpařeny. Bylo izolováno 1,12 g produktu (93%) ve formě žlutohnědého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.10 - 8.07 (m, 1 H), 7.96 - 7.94 (m, 6 H), 7.94 - 7.90 (m, 7 H), 7.79 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.71 - 7.66 (m, 1 H), 6.64 (d, J = 16.1 Hz, 1 H), 3.75 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 166.0, 148.3, 139.7, 134.0, 131.1, 129.4, 129.2, 122.3, 51.9, 24.6 ppm. MS: 206,82 [M-H] $^-$, teplota tání: 70-72 °C.

4.2.18. Kyselina 2-aminoskořicová



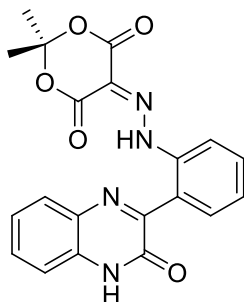
7,05 g heptahydrátu síranu železnatého (25,3 mmol) bylo rozpuštěno ve vodě a zahřáto (60-70 °C). Do tohoto roztoku byl přilít roztok 580 mg kys. 2-nitroskořicové (3 mmol) v 1,9 ml 5M NH₃ a 4,7 konc. NH₃. Tato směs byla zahřívána na 60-70 °C po dobu 30 minut. Po ukončení zahřívání byla reakční směs za horka zfiltrována přes celit. Filtrační koláč byl povařen v 1M roztoku NaOH a zfiltrován. Po spojení filtrátů došlo k vyloučení namodralé pevné látky (pravděpodobně vyloučené železo), která byla odsáta. Filtrát byl okyselen na pH 4 pomocí kyseliny octové a následně extrahován do EtOAc (3x 60 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (2x 50 ml), vysušeny MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Bylo získáno 233 mg produktu (53%) ve formě žlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.17 (br. s, 1 H), 7.81 (d, *J* = 15.7 Hz, 1 H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 6.26 (d, *J* = 15.7 Hz, 1 H), 5.54 (br. s., 2 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 168.1, 148.1, 140.3, 131.1, 127.2, 117.8, 116.4 ppm. MS: 187,03 [M+Na]⁺; 162,04 [M-H]⁻, teplota tání: 154-155 °C.

4.2.19. Methylester kyseliny 2-aminoskořicové



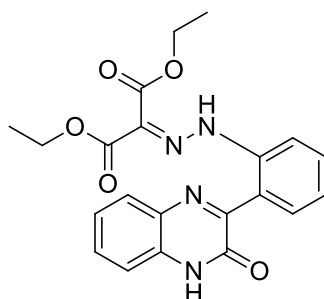
620 mg methylesteru kyseliny 2-nitroskořicové (3 mmol) bylo rozpuštěno v 20 ml EtOAc. K tomuto roztoku bylo přidáno 3,4 g SnCl₂·2H₂O (15 mmol) a směs byla refluxována 1 hodinu. Po ukončení refluxu a ochlazení na pokojovou teplotu byl EtOAc roztokem NaHCO₃. Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena. Bylo získáno 400 mg produktu (67%) ve formě hnědožluté pevné látky. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.88 (d, *J* = 15.8 Hz, 1 H), 7.44 (dd, *J* = 1.5, 7.9 Hz, 1 H), 7.07 (s, 1 H), 6.69 (dd, *J* = 1.0, 8.2 Hz, 1 H), 6.56 - 6.50 (m, 1 H), 6.36 (d, *J* = 15.8 Hz, 1 H), 5.60 (s, 2 H), 3.70 (s, 3 H), ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 167.1, 148.3, 140.8, 131.4, 127.3, 117.5, 116.5, 116.4, 114.9, 51.2 ppm. MS, teplota tání: 57-59 °C.

4.2.20. 2,2-Dimethyl-5-(2-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)hydrazono)-1,3-dioxan-4,6-dion



237 mg 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu (1 mmol) bylo suspendováno v 30 ml H₂O a 3 ml koncentrované HCl (34 mmol). Tato suspenze byla vychlazená v ledové lázni na 0-5 °C a poté byl přikápan roztok 76 mg NaNO₂ (1,1 mmol) v 7,6 ml H₂O vychlazený na 5 °C. Tato suspenze byla ponechána v ledové lázni, dokud nepřešla v roztok (30-45 minut). Nerozpuštěné zbytky byly odstraněny filtrací a k vzniklému roztoku byl přilít roztok 5,64 g octanu sodného (69 mmol) a 145 mg mel drumovy kyseliny (1 mmol) v 25 ml vody. Z roztoku se po chvíli začala vylučovat sraženina. Tato suspenze byla ponechána přes noc v lednici (4-6 °C). Druhý den byla sraženina odsáta, promyta vodou a vysušena. Bylo izolováno 324 mg produktu ve formě žlutooranžové pevné látky (82 %). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 14.79 (br. s., 1 H), 12.74 (br. s., 1 H), 8.32 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.64 (dt, *J* = 1.4, 7.9 Hz, 1 H), 7.59 (dt, *J* = 1.4, 7.7 Hz, 1 H), 7.42 - 7.33 (m, 3 H), 1.72 (s, 6 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 158.8, 154.2, 153.6, 139.9, 132.2, 131.7, 131.4, 131.1, 130.9, 129.1, 125.2, 123.4, 117.2, 115.1, 114.0, 105.2, 27.0 ppm, MS: 392,95 [M+H]⁺; 390,98 [M-H]⁻, teplota tání: 238-241 °C.

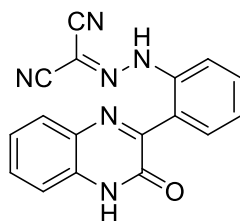
4.2.21. Diethyl 2-(2-(2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)hydrazono)malonát



237 mg 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu (1 mmol) bylo suspendováno v 30 ml destilované vody. Byly přidány 3 ml koncentrované HCl a směs byla vychlazená

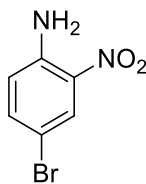
v ledové lázni na 0-5 °C. Po vychlazení byl přikapán roztok 76 mg NaNO₂ (1,1 mmol) v 7,6 ml vody vychlazené na 4-6 °C. Po dvou hodinách byl přilít roztok 176 mg (1,1 mmol) diethyl malonátu a 5,64 g CH₃COONa v 25 ml vody. Z roztoku se začala vylučovat pevná látka. Tato směs byla ponechána přes noc v lednici (4-6 °C). Druhý den byla vyloučená sraženina odsáta a promyta matečným louhem a malým množstvím vody. Bylo izolováno 300 mg produktu (73%) ve formě žlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 13.74 (s, 1 H), 12.79 - 12.55 (m, 1 H), 8.21 (dd, *J* = 1.2, 7.9 Hz, 1 H), 8.06 - 8.02 (m, 1 H), 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.60 - 7.52 (m, 2 H), 7.39 - 7.33 (m, 2 H), 7.21 (dt, *J* = 1.1, 7.6 Hz, 1 H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H), 1.26 - 1.19 (m, 6 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 162.6, 161.4, 154.4, 154.3, 141.0, 132.1, 131.7, 131.2, 130.6, 128.8, 123.3, 122.7, 121.9, 115.9, 115.1, 61.0, 60.7, 14.0, 13.8 ppm. MS: 408,94 [M+H]⁺; 406,97 [M-H]⁻, teplota tání: 198-204 °C.

4.2.22. (2-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-yl)fenyl)carbonohydrzonoyl dikyanid



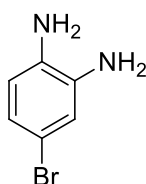
490 mg 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu (2,06 mmol) bylo suspendováno v 60 ml vody a 1,1 ml koncentrované HCl. Tato suspenze byla vychlazená v ledové lázni na 0-5 °C. Po vychlazení byl pomalu přidán roztok 156 mg NaNO₂ (2,25 mmol) v 10 ml vychlazené vody (4-6 °C). Po 2 hodinách byla nerozpuštěná pevná látka odsáta a k filtrátu byl přilít roztok roztok 150 mg malononitrilu (2,25 mmol) a 17 g (20,6 mmol) octanu sodného v 25 ml vody. Vyloučená sraženina byla odsáta a promyta vodou. Bylo izolováno 460 mg produktu (75 %) ve formě tmavého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 13.50 - 13.16 (m, 1 H), 12.77 (br. s., 1 H), 8.14 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.69 - 7.64 (m, 1 H), 7.62 - 7.55 (m, 2 H), 7.39 - 7.32 (m, 3 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 155.2, 154.6, 132.1, 131.9, 131.3, 131.2, 130.8, 128.5, 125.2, 124.0, 123.5, 117.7, 115.2, 109.7 ppm. MS: 221,02 [M-(NH-N=C(CN)₂)]⁺, 318,08 [M-H]⁻, teplota tání: 262-268 °C.

4.2.22. 4-Brom-2-nitroanilin



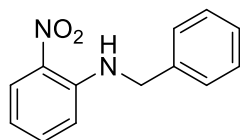
5 g *o*-nitroanilinu (35,4 mmol) bylo rozpuštěno ve 100 ml kyseliny octové a zahřáto na 60 °C. K tomuto roztoku bylo během 45 minut po malých dávkách přidáno 6,3 g NBS (35,4 mmol). Po ukončení přidavku NBS byla reakční směs ponechána ještě 2 hodiny při 55 °C. Po 2 hodinách byla reakční směs vlita do směsi 250 g ledu a 250 vody za míchání a následně ponechána přes noc v lednici (4-6 °C). Vysrážená žlutooranžová látka byla odsáta, promyta vodou a vysušena. Bylo izolováno 7,1 g produktu ve formě oranžovožluté pevné látky (93 %). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.51 (br. s., 2 H), 7.47 (dd, *J* = 2.1, 9.3 Hz, 1 H), 6.95 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H), ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 145.3, 138.0, 130.6, 126.9, 121.4, 105.0 ppm. MS: 228,89 [M+H]⁺, teplota tání: 99-102 °C.

4.2.23. 4-Brombenzen-1,2-diamin



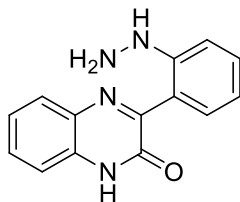
2,16 g 4-brom-2-nitroanilinu (10 mmol) bylo rozsuspendováno v 25 ml EtOH. K této suspenzi bylo přidáno 11,3 g SnCl₂·2H₂O (50 mmol) a směs byla refluxována přes noc (~20 h). Po ukončení refluxu byla reakce ochlazena na pokojovou teplotu a vzniklá HCl byla zneutralizována 50 ml 2M NaOH (100 mmol NaOH). Vysrážená kašovitá látka byla odsáta a filtrační koláč byl promyt diethyletherem. Filtrát byl extrahován diethyletherem a organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena. Olejovitý zbytek byl rozpuštěn v 4 ml DCM a za míchání byl přikapáván petrolether (asi 30 ml) a vyloučená pevná látka byla odsáta, promyta petroletherem a vysušena. Bylo izolováno 1,26 g produktu ve formě šedobílého prášku (68 %). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 6.64 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 6.47 (dd, *J* = 2.2, 8.2 Hz, 1 H), 6.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 4.63 (br. s., 4 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 136.98, 134.23, 118.96, 115.98, 115.49, 107.84 ppm, teplota tání: 58-62 °C.

4.2.24. *N*-benzyl-2-nitroanilin



Směs 2,76 g *o*-nitroanilinu (20 mmol) a 4,05 g benzylbromidu (24 mmol) ve 40 ml H₂O bylo refluxováno 3 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo k reakci přidáno 1,7 g pevného NaHCO₃ (19,2 mmol). Roztok byl extrahován 3x 50 ml EtOAc. Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena za vzniku červenooranžové látky obsahující směs produktu a výchozí látky. Tato směs byla přečištěna pomocí kolonové chromatografie, mobilní fáze EtOAc:Hexan 1:9. Bylo izolováno 2,64 g produktu ve formě červené pevné látky (58%). ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 1 H), 8.12 - 8.04 (m, 1 H), 7.44 (tddd, *J* = 0.7, 1.5, 7.0, 8.6 Hz, 1 H), 7.39 - 7.31 (m, 4 H), 7.28 - 7.23 (m, 1 H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 6.70 - 6.64 (m, 1 H), 4.63 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H) ppm. ¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ = 144.9, 138.4, 136.3, 131.3, 128.5, 127.0, 126.9, 126.2, 115.4, 114.9, 45.7 ppm. MS: 195,04 [M+H]⁺; 193,07 [M-H]⁻, teplota tání: 68-72 °C.

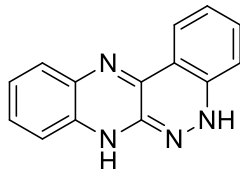
4.2.25. 3-(2-Hydrazinylfenyl)chinoxalin-2(1*H*)-on



120 mg (0,5 mmol) 3-(2-aminofenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu bylo rozpuštěno v 15 ml koncentrované HCl a vychlazeno v ledové lázni na 0-5 °C. K tomuto roztoku byl pomalu přidán roztok 38 mg NaNO₂ (1,1 mmol.) v 3,8 ml vody vychlazené na 4-6°C. Po 30 minutách míchání bylo k roztoku diazoniové soli přidáno 225 mg (1 mmol) SnCl₂·2H₂O, přičemž došlo k vyloučení tmavé pevné látky. Tato směs byla míchána další dvě hodiny v ledové lázni. Po dvou hodinách byla reakční směs zneutralizována pomocí 9,61 g KOH v 25 ml H₂O a 8 ml 20% roztoku Na₂CO₃. Takto zneutralizovaný roztok byl odpařen dosucha na vakuové odparce. Suchý zbytek byl vložen na krátkou silikagelovou vrstvu (3x5 cm) a produkt byl eluován pomocí směsi hexan:EtOAc 1:1 a dále čistým EtOAc. Izolováno bylo 78 mg (62%) produktu ve formě žlutého prášku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.61 (s, 1 H), 8.18 (td, *J* = 1.0, 8.1 Hz, 1 H), 7.67 (td, *J* = 0.9, 8.4 Hz, 1 H), 7.46 - 7.38 (m, 2 H), 7.25 (ddd, *J* = 0.9, 7.0, 8.1 Hz, 1 H), 6.99 -

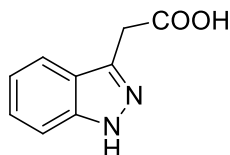
6.90 (m, 1 H), 6.82 (dd, $J = 1.4, 8.0$ Hz, 1 H), 6.70 - 6.58 (m, 1 H), 4.92 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 160.9, 142.1, 141.6, 138.0, 126.3, 125.7, 125.2, 124.0, 122.1, 121.7, 121.4, 116.8, 116.6, 111.1$ ppm. MS: 253,06 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 121,11 $[\text{M}-\text{H}]^-$, teplota tání: 174-180 °C.

4.2.26. 5,7-Dihydrochinoxalino[2,3-*c*]cinnolin



45 mg 3-(2-hydrazinylfenyl)chinoxalin-2(1*H*)-onu bylo rozpuštěno v 10 ml koncentrované kyseliny octové a refluxováno přes noc (18 h). Po ukončení refluxu a ochlazení na laboratorní teplotu byla kyselina octová odpařena. Olejovitý odparek byl suspendován v malém množství vody a zfiltrován. Bylo získáno 13 mg (31%) produktu ve formě světlého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- D_6) $\delta = 13.62$ (s, 1 H), 12.97 (s, 1 H), 8.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 7.76 - 7.71 (m, 1 H), 7.67 - 7.63 (m, 1 H), 7.55 - 7.50 (m, 1 H), 7.50 - 7.45 (m, 1 H), 7.34 - 7.29 (m, 1 H), 7.26 - 7.18 (m, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 147.2, 144.0, 141.2, 135.9, 134.2, 126.8, 122.6, 122.0, 121.7, 121.4, 120.9, 118.8, 111.3, 110.6$ ppm. MS: 234,15 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 233,18 $[\text{M}-\text{H}]^-$, teplota tání: 274-282 °C.

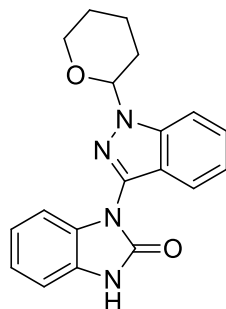
4.2.27. Kyselina 2-(1*H*-indazol-3-yl)octová



147 mg 2-aminoskořicové kyseliny (1 mmol) bylo rozpuštěno v 10 ml zředěné HCl (HCl:voda 1:9 v/v). Tento roztok byl vychlazen v ledové lázni na teplotu 0-5 °C a následně byl pomalu přikapán studený (4-6 °C) roztok 76 mg NaNO_2 (1,1 mmol) v 7,6 ml H_2O . Směs byla ponechána 1,5h v ledové lázni a následně bylo přidáno 252 mg pevného Na_2SO_3 (2 mmol). Reakce byla ponechána míchat v ledové lázni po další 2h a následně byla ponechána do druhého dne v lednici při teplotě 4-6°C. Druhý den byla z reakční směsi odfiltrována světlá sraženina a filtrát byl extrahován do ethylacetátu. Po odpaření rozpouštědla byl odparek rozpuštěn v 5 ml MeOH, zfiltrován a opět odpařen. Bylo izolováno 60 mg produkt (35%). ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta = 13.16 - 11.85$ (m, 1 H), 7.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 1

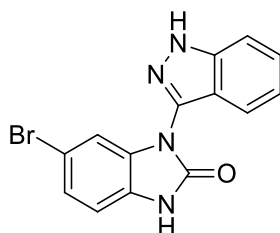
H), 7.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 3.93 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 171.8, 140.9, 139.2, 126.0, 122.0, 120.3, 119.8, 110.1, 33.2$ ppm. MS: 177,04 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 175,06 $[\text{M}-\text{H}]^-$

4.2.28. 1-(1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-on



250 mg 1-(1H-indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-onu (1 mmol) bylo rozsuspendováno v 15 ml DCM. K této suspenzi bylo přidáno 22 mg *p*TSA (0,1 mmol) a dále 252 mg (174 μl) 3,4-dihydro-2H-pyranu (3 mmol). Tato směs byla ponechána míchat 24 hodin při pokojové teplotě. Po 24h byl vzniklý roztok naředěn 15 ml DCM a 3x extrahován nasyceným roztokem NaHCO_3 . Organická fáze byla vysušena MgSO_4 a odpařena a produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie, mobilní fáze DCM:MeOH 50:1. Bylo izolováno 155 mg produktu (47%) ve formě bíložlutého prášku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) $\delta = 11.30$ (s, 1 H), 7.82 (dd, $J = 0.6, 8.6$ Hz, 1 H), 7.79 - 7.75 (m, 1 H), 7.53 - 7.48 (m, 1 H), 7.25 - 7.21 (m, 1 H), 7.21 - 7.19 (m, 1 H), 7.13 - 7.10 (m, 2 H), 7.07 - 7.02 (m, 1 H), 5.96 (dd, $J = 1.9, 9.5$ Hz, 1 H), 3.96 - 3.90 (m, 1 H), 3.83 - 3.76 (m, 1 H), 2.46 - 2.36 (m, 1 H), 2.06 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 1.85 - 1.38 (m, 4 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) $\delta = 152.9, 140.5, 136.5, 129.7, 128.9, 127.3, 122.3, 121.4, 121.4, 121.1, 117.9, 110.7, 109.5, 109.3, 83.9, 66.5, 28.8, 24.7, 22.1$ ppm. MS: 335,07 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 333,06 $[\text{M}-\text{H}]^-$, teplota tání: 79-81 $^\circ\text{C}$.

4.2.29. 6-brom-1-(1H-indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-on



50 mg 1-(1H-Indazol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-onu (0,2 mmol) bylo rozpuštěno v 8 ml EtOH. K tomuto roztoku bylo během 5 minut přidáno 61 mg (0,34

mmol) NBS. Po dvou hodinách byl EtOH odpařen a zbytek byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze acetonitril:toluen 3,5:1 v/v). Po odpaření rozpouštědla byl zbytek suspendován v horké vodě a odsát. Bylo izolováno 45 mg produktu ve formě bílého prášku (69 %). ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 13.34 (s, 1 H), 11.47 (s, 1 H), 7.74 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.44 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.31 (s, 1 H), 7.26 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.17 (t, J = 7.4 Hz, 1 H), 7.07 (d, J = 8.2 Hz, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ = 152.8, 141.1, 136.2, 131.2, 128.2, 127.0, 124.6, 120.9, 120.8, 116.5, 112.6, 112.1, 111.0, 110.7. MS:329,00; 331,01 ppm. $[\text{M}+\text{H}]^+$; 327,06; 329,05 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

5. Závěr

V teoretické části byl popsán postup syntézy a identifikace 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-onu (**1**). Následně byla stručně rozebrána syntéza a biologická aktivita některých heterocyklů a jejich derivátů. Konkrétně se jednalo o deriváty chinoxalinu, indazolu a benzimidazol-2-onu.

Byly optimalizovány podmínky kondenzace N-acetylisatinu s deriváty o-fenylendiaminu a pomocí těchto podmínek bylo připraveno 5 derivátů chinoxalinu (3 dříve nepřipravené). V případě 4-brombenzen-1,2-diaminu vznikala směs polohových izomerů, kterou se nepodařilo rozdělit. Následnou deacetylací, diazotací a cyklizací pomocí nadbytku siřičitanu sodného byly připraveny 3 deriváty (**1**) substituované v polohách 5 a 6. Nitroderivát (**15**) se při deacetylaci rozkládal.

1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on (**1**) byl dále podroben periferním modifikacím. Podmínky benzylace pomocí benzylbromidu nebo benzylalkoholu za Mitsunobu podmínek se nepodařilo uspokojivě optimalizovat a monobenzylovaný derivát se nepodařilo připravit. Bromací (**1**) pomocí nadbytku NBS se podařilo připravit monobromovaný derivát (**33**). Struktura tohoto produktu byla potvrzena pomocí 2D NMR.

Redukcí diazoniové soli připravené z aminofenylchinoxalinu (**18**) se podařilo připravit hydrazino derivát (**34**), který byl následně úspěšně cyklizován na chinoxalino-cinnolin (**35**).

Diazotací kyseliny 2-aminoskořicové a následnou reakcí vzniklé diazoniové soli se siřičitanem sodným se podařilo připravit kyselinu 2-(1*H*-indazol-3-yl)octovou.

Mechanismus přesmyku diazosulfonátu na cílový 1-(1*H*-Indazol-3-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)-on byl zkoumán pomocí HPLC-MS, nicméně se nepodařilo zachytit a strukturně identifikovat jednotlivé intermediáty této reakce.

U připravených látek byla testována jejich biologická aktivita. Jednalo se o testy inhibice CKD2, cytostatické aktivity proti liniím K562 a MCF7 a také antimikrobiální aktivitu vůči *B.Subtilis* a *M.Luteus*. V případě inhibice CDK2 se jako nejúčinnější inhibitor ukázala látka (**23**) (IC₅₀= 19,7 μM). Aktivitu proti buněčným liniím se

nepodařilo přesně určit, jelikož všechny látky byly špatně rozpustné. Většina připravených látek vykazovala slabou antimikrobiální aktivitu. Proti *B.Subtilis* se ukázala jako nejúčinnější látka (**23**). Proti *M.Luteus* byla nejúčinnější látka (**12**).

6. Seznam zkratek

Ac ₂ O	acetanhydrid
AK	aminokyselina
Bn	benzyl
BretPhoss	2-(dicyclohexylphosphino)3,6-dimethoxy-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-bifenylyl
CDI	karbonyldiimidazol
EDIPA	diisopropylethylamin
DBU	1,8-diazabicykloundec-7-en
DHP	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran
DMA	dimethylacetamid
DMF	dimethylformamid
Dppf	1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocen
EGME	ethylenglykolmethyl ether
Et ₂ NH	diethylamin
EtOAc	ethylacetát
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
Ch	cyklohexyl
iPr	isopropyl
KOAc	octan draselný
LTMP	lithium tetramethylpyperazin
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NNRTI	nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptasy
Pd ₂ dba ₃	tris(dibenzylidenaceton)palladium
<i>p</i> TSA	<i>para</i> -toluensulfonová kyselina
tbut	terc-butyl
THF	tetrahydrofuran
X-phos	2-dicyclohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenylyl
DCM	dichlormethan

7. Seznam literatury

- (1) Wiedermannová, I.; Slouka, J.; Humpa, O.; Lemr, K. *J. Heterocyclic Chem.* **2003**, *40*, 357.
- (2) Lyčka, A.; Frysova, I.; Slouka, J. *Magn Reson Chem* **2007**, *45* (1), 46–50.
- (3) Fryšová, I.; Trávníček, Z.; Slouka, J.; Cankař, P. *Arkivoc* **2010** 2011 (ii), 127–136.
- (4) Wiedermanová, I.; Slouka, J.; Hlaváč, J. *Acta. Univ. Palacki. Olomouc., Fac. Rerum. Nat., Chem.* **2000**, *83* (1999), 69–74.
- (5) Ainsworth, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *303* (1885), 5245–5247.
- (6) Fischer, E.; Tafel, J. *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1885**, *227* (3), 303–340.
- (7) Mamedov, V. a.; Zhukova, N. a.; Beschastnova, T. N.; Syakaev, V. V.; Krivolapov, D. B.; Mironova, E. V.; Zamaletdinova, A. I.; Rizvanov, I. K.; Latypov, S. K. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (3), 1375–1386.
- (8) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed.; Longmans Scientific & Technical, **1989**.
- (9) Katritzky, A. R.; Ramsden, C. A.; Joule, J. A.; Zhdankin, V. V. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, 3rd ed.; Elsevier, **2010**.
- (10) Lawrence, D. S.; Copper, J. E.; Smith, C. D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (4), 594–601.
- (11) Bergman, J.; Engqvist, R.; Sta, C. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1033–1048.
- (12) Wu, X.; Gordon, a. E. V; Tonks, S. a.; Vilseck, J. Z. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (23), 8691–8699.
- (13) Li, J.-J.; Corey, E. J. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., **2005**.
- (14) Monge, A.; Martínez-Crespo, F. J.; López de Ceráin, A.; Palop, J. A.; Narro, S.; Senador, V.; Marín, A.; Sainz, Y.; González, M.; Hamilton, E. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (22), 4488–4494.
- (15) Haddadin, M. J.; Issidorides, C. H. *Heterocycles* **1993**, *35* (2), 1503–1525.
- (16) Gluchowski, C.; Mission, V. Method for using (2-imidazolin-2-ylamino) quinoxalines to reduce or maintain intraocular pressure. EP19900311755, 1990.
- (17) Udilova, N.; Kozlov, A. V; Bieberschulte, W.; Frei, K.; Ehrenberger, K.; Nohl, H. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65* (1), 59–65.

- (18) Watanabe, K.; Hotta, K.; Praseuth, A. P.; Koketsu, K.; Migita, A.; Boddy, C. N.; Wang, C. C. C.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 423–428.
- (19) Weïwer, M.; Spoonamore, J.; Wei, J.; Guichard, B.; Ross, N. T.; Masson, K.; Silkworth, W.; Dandapani, S.; Palmer, M.; Scherer, C. a.; Stern, A. M.; Schreiber, S. L.; Munoz, B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (12), 1034–1038.
- (20) Schmidt, A.; Beutler, A.; Snovydovych, B. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 24, 4073–4095.
- (21) Sun, J.-H.; Teleha, C. a.; Yan, J.-S.; Rodgers, J. D.; Nugiel, D. a. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (16), 5627–5629.
- (22) Wrobleski, S. T.; Chen, P.; Hynes, J.; Lin, S.; Norris, D. J.; Pandit, C. R.; Spergel, S.; Wu, H.; Tokarski, J. S.; Chen, X.; Gillooly, K. M.; Kiener, P. a.; McIntyre, K. W.; Patil-Koota, V.; Shuster, D. J.; Turk, L. a.; Yang, G.; Leftheris, K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (11), 2110–2116.
- (23) Fedenok, L. G.; Zolnikova, N. A. **2003**, *44*, 5453–5455.
- (24) Vinogradova, O. V.; Balova, I. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2008**, *44* (5), 501–522.
- (25) Elliott, E. L.; Bushell, S. M.; Caverro, M.; Tolan, B.; Kelly, T. R. *Org. Lett.* **2005**, *7* (12), 2449–2451.
- (26) Shoji, Y.; Hari, Y.; Aoyama, T. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (8), 1769–1771.
- (27) Peruncheralathan, S.; Khan, T. a.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron* **2004**, *60* (15), 3457–3464.
- (28) Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. a.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (5-6), 891–904.
- (29) Frazier, K.; Jazan, E.; McBride, C. M.; Pecchi, S.; Renhowe, P. a.; Shafer, C. M.; Taylor, C.; Bussiere, D.; He, M. M.; Jansen, J. M.; Lapointe, G.; Ma, S.; Vora, J.; Wiesmann, M. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (8), 2247–2251.
- (30) Bonanomi, M.; Lucente, G.; Silvestrini, B. *Contraception* **2002**, *65* (4), 317–320.
- (31) Wohlfarth, A.; Weinmann, W. *Bioanalysis* **2010**, *2* (5), 965–979.
- (32) Uchiyama, N.; Matsuda, S.; Kawamura, M.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y. *Forensic Toxicol.* **2013**, *31* (2), 223–240.
- (33) Monforte, A.-M.; Logoteta, P.; Ferro, S.; De Luca, L.; Iraci, N.; Maga, G.; Clercq, E. De; Pannecouque, C.; Chimirri, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (16), 5962–5967.

- (34) Ernst, J. B.; Tay, N. E. S.; Jui, N. T.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3844–3846.
- (35) Kawamoto, H.; Ozaki, S.; Yoshiki, I.; Mitsuru, M.; Sachie, A.; Hiroshi, N.; Tetsuya, K.; Hisashi, O.; Yoshikazu, I. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (25), 3–5.
- (36) Hammach, A.; Barbosa, A.; Gaenzler, F. C.; Fadra, T.; Goldberg, D.; Hao, M. H.; Kroe, R. R.; Liu, P.; Qian, K. C.; Ralph, M.; Sarko, C.; Soleymanzadeh, F.; Moss, N. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (24), 6316–6320.
- (37) Benedí, C.; Bravo, F.; Uriz, P.; Fernández, E.; Claver, C.; Castellón, S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (32), 6073–6077.
- (38) McLaughlin, M.; Palucki, M.; Davies, I. W. *Org. Lett.* **2006**, *8* (15), 3311–3314.
- (39) Beyer, A.; Reucher, C. M. M.; Bolm, C. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 2876–2879.
- (40) Liu, P.; Wang, Z.; Hu, X. *European J. Org. Chem.* **2012**, *2* (10), 1994–2000.
- (41) Terefenko, E. a; Kern, J.; Fensome, A.; Wrobel, J.; Zhu, Y.; Cohen, J.; Winneker, R.; Zhang, Z.; Zhang, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (15), 3600–3603.
- (42) Berry, J. F.; Ferraris, D. V.; Duvall, B.; Hin, N.; Rais, R.; Alt, J.; Thomas, A. G.; Rojas, C.; Hashimoto, K.; Slusher, B. S.; Tsukamoto, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (10), 839–843.
- (43) Reuter, R.; Hostettler, N.; Neuburger, M.; Wegner, H. A. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 32, 5647–5652.
- (44) Rangarajan, M.; Kim, J. S.; Sim, S. P.; Liu, A.; Liu, L. F.; LaVoie, E. J. *Bioorganic Med. Chem.* **2000**, *8* (11), 2591–2600.
- (45) Aaron K.Holley; Sanjit Kumar Dhar; Yong Xu; K.St.Clair, D. *Amino Acids* **2012**, *42*, 139–159.
- (46) Fryšová, I.; Trávníček, Z.; Slouka, J.; Cankař, P. *Arkivoc* **2010**, *2011* (ii), 127–136.
- (47) Dembinski, R. *European J. Org. Chem.* **2004**, No. 13, 2763–2772.
- (48) Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2551–2651.
- (49) Qiu, D.; Wei, H.; Zhou, L.; Zeng, Q. *Appl. Organometallic Chem.* **2013**, *28* (August), 109–112.
- (50) Damodara, K. N.; Dinesh, K.; Rohit, B.; Chebolu, R.; Chakraborti, K. A. *Green Chem.* **2012**, *14*, 3329–3335.
- (51) Ashton, B. .; Suchitzky, H. *J. Chem. Soc.* **1957**, 4559–4562.

- (52) Slade, D. J.; Pelz, N. F.; Bodnar, W.; Lampe, J. W.; Watson, P. S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (16), 6331–6334.
- (53) Slouka, J. osobní sdělení
- (54) Slouka, J. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun* **1978**, *44*, 2438–2442.
- (55) Kryštof, V.; Cankař, P.; Fryšová, I.; Slouka, J.; Kontopidis, G.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Srovnal, J.; de Azevedo Jr., W. F.; Orság, M.; Paprskářová, M.; Rolčík, J.; Látr, A.; Fischer, P. M.; Strnad, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6500–6509.
- (56) Wiley, R. H.; Smith, N. R. *Org. Synth.* **1953**, *33*, 62.
- (57) Oberboersch, S.; Melanie, R.; Schunk, S.; Hees, S.; Jostock, R.; Engels, M.; Kless, A.; Christoph, T.; Schiene, K.; Germann, T.; Bijsterveld, E. Substitued sulfonamide compounds. 0249128A1, 2008.
- (58) Cadogan, J. I. G.; Mackie, R. K. *Org. Synth.* **1968**, *48*, 113.
- (59) Vicente, J.; Chicote, M. T.; Martínez-Martínez, A. J.; Bautista, D.; Jones, P. G. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (7), 2279–2285.
- (60) Hantzsch, A.; Schmiedel, M. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1897**, *30* (1), 71–88.