

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

LUKÁŠ MAREK

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ústav organické chemie a technologie

Syntéza derivátů 3-[amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2H-indol-2-onů s využitím *Eschenmoserovy* reakce.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Lukáš Marek

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. Ing. Jiří Hanusek Ph.D.

2017

University of Pardubice

Faculty of chemical technology

Institute of organic chemistry and technology

Synthesis of 3-[amino(aryl)methylidene]-1,3-dihydro-2*H*-indole-2-one derivatives using the *Eschenmoser* coupling reaction.

BACHELOR WORK

AUTHOR: Lukáš Marek

SUPERVISOR: doc. Ing. Jiří Hanusek Ph.D.

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lukáš Marek**  
Osobní číslo: **C14436**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Syntéza derivátů**  
**3-[amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2H-indol-2-onů**  
**s využitím Eschenmoserovy reakce**  
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Proveďte literární rešerši týkající se přípravy a použití sloučenin obsahujících 3-[amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2H-indol-2-onový skelet.
- 2) Připravte a charakterizujte nejméně tři 3-[amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2H-indol-2-ony s využitím Eschenmoserovy reakce.
- 3) Získané výsledky porovnejte s literaturou a zpracujte formou závěrečné zprávy.

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.**

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejm. se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. Ing. Jiřímu Hanuskovi, Ph.D. za odborné vedení, předané zkušenosti, trpělivost a cenné rady a připomínky, jež provázely vznik této práce.

Dále bych rád poděkoval Ing. Richardovi Kammelovi, Ph.D. a Ing. Honzovi Bartáčkovi za pomoc a cenné rady při práci na Ústavu organické chemie a technologie. Rád bych také poděkoval své rodině, jenž mi byla oporou nejen při studiu. Velké díky patří i mým přátelům a známým za podporu mého zájmu o chemii, zejména V. Vávrovi, Ing. D. Krulišovi, Ing. F. Vlčkovi a dalším.

## ANOTACE:

V bakalářské práci je popsána biologická aktivita strukturních analogů 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-onů a jejich dosud popsané syntézy. V experimentální části je popsána syntéza čtyř derivátů 3-(aminomethyliden)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-onů, tří arylsubstituovaných a jednoho alkylsubstituovaného, včetně jejich charakterizace pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie, MALDI a elementární analýzy. Součástí experimentální sekce je také popis dvou metodik pro získání čistých 3-(aminomethyliden)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-onů z jejich surových solí (hydrobromidů).

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Eschenmoserova* reakce, *Eschenmoserova* sulfidová kontrakce, syntéza, 3-[amino(aryl)methyliden]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on, 3-brom-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on, thioamid

#### ANNOTATION:

This bachelor work contains description of structural analogues of the 3-[1-amino(aryl)methylidene]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one compounds and up to date known synthetic routes for them. Experimental part of this work describes synthesis of four derivatives of 3-(aminomethylidene)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one (three of them are aryl-substitued, last one is alkyl-substitued), including complete characterization by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MALDI and by elemental analysis. Experimental section also contains description of two routes giving pure substituted 3-(aminomethylidene)-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-ones from their crude hydrobromide salts.

#### KEYWORDS:

*Eschenmoser* coupling reaction, *Eschenmoser* sulfide contraction, synthesis, 3-[amino(aryl)methylidene]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one, 3-bromo-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-one, thioamide

## Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
ALS	amyotrofická laterální skleroza
ATP	z angl. adenosine triphosphate = adenosin trifosfát
Bn	benzyl
DCM	dichlormetan
DIPEA	diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
ekv	ekvivalent
TEA	triethylamin, Et <sub>3</sub> N,
GABA	z angl. gamma-aminobutyric acid = gamma-aminomáselná kyselina
HRMS	z angl. high-resolution mass spectrometry = hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IC <sub>50</sub>	z angl. half maximal inhibitory concentration = poloviční maximální inhibiční koncentrace
MALDI	z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization = hmotnostní spektrometrie s použitím matrice
MeI	methyljodid
MF	mobilní fáze
MS	z angl. mass spectrometry = hmotnostní spektrometrie
MS4Å	molekulové síto o velikosti pórů 4 angströmy
MW	z angl. microwaves - mikrovlny
NMR	z angl. nuclear magnetic resonance (specstroscopy) = spektroskopie nukleární magnetické resonance
rt	z angl. room temperature = pokojová/laboratorní teplota
RTK	receptorové tyrosin-kinázy
THF	tetrahydrofuran
TLC	z angl. thin-layer chromatography = chromatografie na tenké vrstvě
Ts	tosyl, 4-toluensulfonyl

## OBSAH

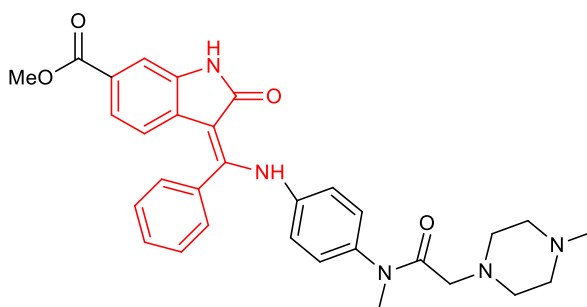
<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>3</b>
2.1	<i>Eschenmoserova</i> reakce.....	3
2.1.1	Mechanismus <i>Eschenmoserovy</i> reakce.....	4
2.1.2	Atypické provedení <i>Eschenmoserovy</i> reakce.....	7
2.2	Biologická aktivita substituovaných 3-methylidenindol-2-onů.....	9
2.2.1	3-Methylidenindol-2-ony jako inhibitory tyrosin-kináz a kancerostatika.....	9
2.2.2	3-(1-Aminomethyliden)indol-2-ony při potenciaci léčiv.....	12
2.3	Publikované syntézy 3-[1-amino(aryl)methyliden]indolon-2-onů.....	13
2.3.1	Syntéza vycházející ze substituovaného chinazolin-3-oxidu a esteru acetylendikarboxylové kyseliny.....	13
2.3.2	Syntéza vycházející z substituovaného benzonitrilu.....	14
2.3.3	Cyklizace 2-(fenylethynyl)fenylisokyanátu s použitím FeCl <sub>3</sub> .....	15
2.3.4	Cyklizace 2-(fenylethynyl)fenylisokyanátu s použitím palladiového katalyzátoru.....	15
2.3.5	Syntéza s využitím <i>Eschenmoserovy</i> reakce.....	16
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>17</b>
3.1	Substráty a činidla:.....	17
3.2	Syntéza výchozích látek.....	18
3.2.1	Arylthioamidy.....	18
3.2.2	3-Brom-1-methylindol-2-on.....	18
3.3	<i>Eschenmoserova</i> reakce.....	21
3.3.1	Příprava hydrobromidů sloučenin 5a-d.....	21
3.3.2	Příprava sloučenin 5a-d.....	21
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b> .....	<b>25</b>
4.1.1	Příprava prekurzorů.....	25
4.1.2	<i>Eschenmoserova</i> reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu s thioamidy.....	29
4.1.3	Závěr.....	37
<b>5</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>38</b>

# 1 Úvod

Chemie heterocyklů, indolové deriváty nevyjímaje, je nezbytnou součástí moderní organické chemie. V dnešním světě mají výsledky bádání a práce organických chemiků zabývajících se chemií heterocyklů nezastupitelný význam – příkladem jsou syntézy herbicidů, pesticidů, moderních polymerů, barviv, pigmentů, látek využívaných v potravinářství jako například aroma, konzervanty, sladidla a především léčiva. Indolový skelet se taktéž často vyskytuje ve strukturách mnoha přírodních látek.

O syntézách, vlastnostech a využití substituovaných indol-2-onů bylo publikováno velké množství informací. Substituovaný indolový skelet se často vyskytuje ve strukturách moderních léčiv. Jako příklad lze uvést léčiva indomethacin, ziprasidon, lisurid, ergometrin, sumatriptan, zolmitriptan, naratriptan a další.<sup>1</sup>

Poněkud novější a ne zcela probádanou skupinou látek jsou substituované 3-methylidenindol-2-ony, jež jsou účinnými inhibitory tyrosin-kináz a nově nalézají uplatnění jako velice efektivní léčiva na choroby jako je například idiopatická plicní fibróza a zejména na různé typy rakovin, například specifických forem leukemie. Příkladem může být léčivo Nintedanib (**Obr.1**), zavedené do klinické praxe v roce 2014.<sup>2</sup>

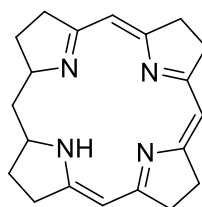


**Obr.1** – Strukturní vzorec Nintedanibu.

Problém, který poněkud brzdí rozvoj a masovější využití těchto látek, spočívá v tom, že dosud známé a používané syntézy jsou velice nákladné, neboť je při nich využíváno poměrně drahých prekurzorů, složitých katalyzátorů nebo dosahováno nízkých výtěžků. Dosud publikované syntézy těchto sloučenin jsou popsány a diskutovány níže. Ve výzkumné skupině doc. Hanuska bylo při studiu reaktivity substituovaných thiazolů zjištěno, že sloučeniny s 3-(1-amino(aryl)methyliden)indol-2-onovým skeletem mohou být připraveny tzv.

*Eschenmoserovou* reakcí, a to ve vysokém výtěžku, z dostupných prekurzorů a za velice mírných reakčních podmínek.<sup>3</sup> Toto zjištění se tak stalo výchozím bodem pro prozkoumání obecnosti této reakce v závislosti na substituci.

Historicky poprvé byla *Eschenmoserova* reakce popsána prof. *Albertem Eschenmoserem* - po němž tedy nese jméno - při syntéze korrinoidních chromoforových systémů (**Obr.2**). Příprava těchto sloučenin ve vysokém výtěžku byla nezbytnou součástí totální syntézy vitamínu B<sub>12</sub>, přičemž standardně používané reakce - například oxidativní C-C coupling za použití benzoylperoxidu - selhávaly nebo poskytovaly pouze neuspokojivý výtěžek, jenž by znamenal selhání celé syntézy.<sup>4</sup>



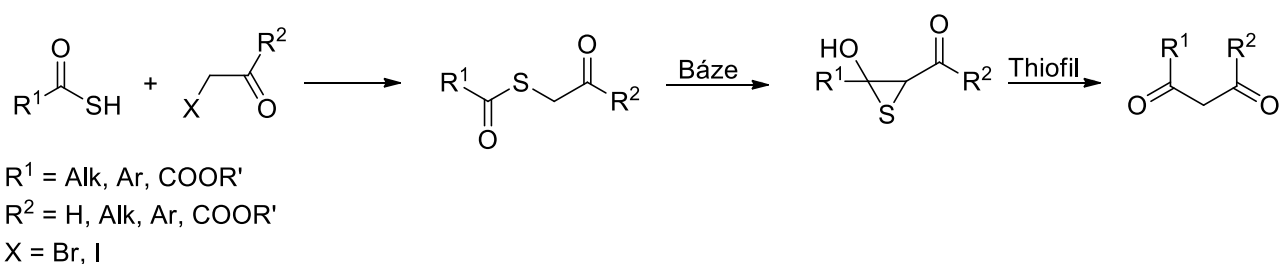
**Obr. 2** – Strukturní vzorec korrinu, jenž tvoří základ struktury vitamínu B<sub>12</sub>.

*Eschenmoserův* coupling tudíž sehrál významnou roli při totální syntéze kyanokobalaminu (vitamin B<sub>12</sub>), která byla dokončena a publikována v roce 1972.

## 2 Teoretická část

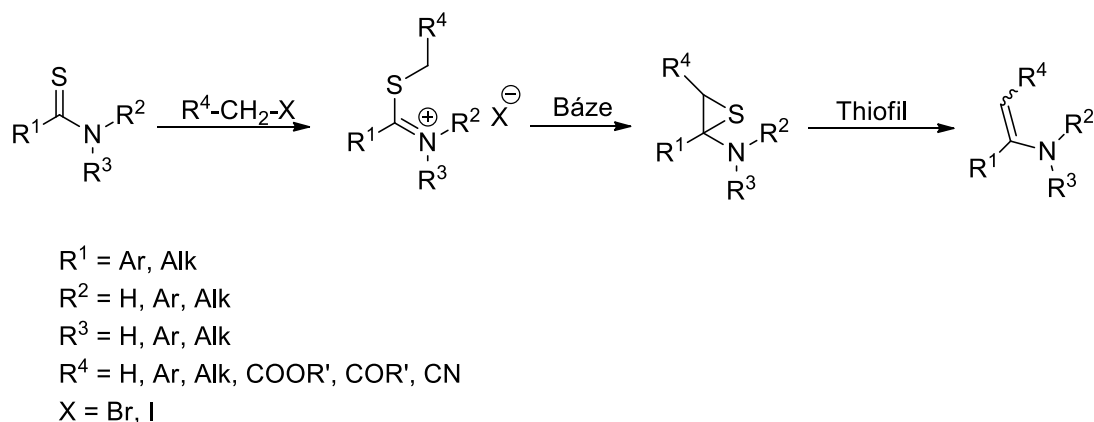
### 2.1 Eschenmoserova reakce

*Eschenmoserův coupling* neboli *Eschenmoserova reakce*, v anglicky psané literatuře často označovaná také jako „*Eschenmoser sulfide contraction*“ je obecně alkylativní C-C coupling. Tato reakce má dvě modifikace<sup>5</sup> – při první reaguje thiokyselina s  $\alpha$ -halogenketonem za vzniku 1,3-diketonu (**Schéma 1**).



**Schéma 1** – Eschenmoserova reakce s thiokyselinou.

Druhou variantou je reakce thioamidu s halogenderivátem, přičemž thioamid může být primární, sekundární nebo terciární a halogenderivát primární nebo sekundární. V této bakalářské práci se budu dále zabývat pouze *Eschenmoserovou* reakcí s využitím thioamidů. Mechanismem, který bude diskutován níže, vzniká ve třech reakčních krocích substituovaný vinylamin (**Schéma 2**). Poprvé byla tato reakce popsána a publikována v roce 1967.<sup>4</sup> Obecné schéma této reakce lze formulovat následovně:

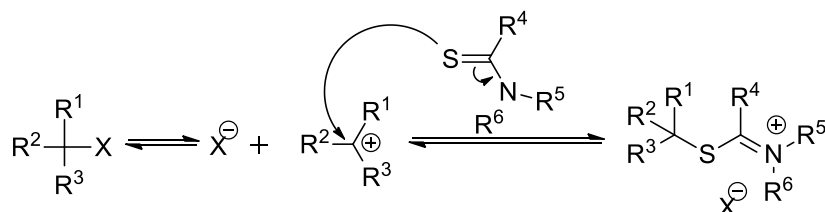


**Schéma 2** – Eschenmoserova reakce s thioamidem.

### 2.1.1 Mechanismus *Eschenmoserovy* reakce

Průběh *Eschenmoserovy* reakce můžeme rozdělit do tří základních kroků.<sup>4</sup> V prvním kroku dochází k S-alkylaci primárního nebo sekundárního thioamidu elektrofilem za vzniku α-thioiminiové soli. Poté dochází k cyklizaci thioiminiové soli na thiiran (episulfid). Eliminací síry z thiiranového cyklu dochází ke vzniku vinylaminu. Mechanismus je podrobně diskutován níže.

#### 2.1.1.1 S-Alkylace

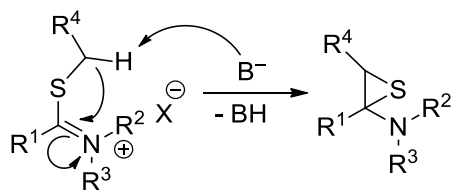


**Schéma 3** – Příklad vzniku thioiminiové soli atakem thioamidu na terciární halogenderivát mechanismem  $S_N1$ .

V prvním kroku dochází k selektivní nukleofilní substituci na halogenderivátu atakem nukleofilního činidla – thioamidu. Reakce může probíhat mechanismem  $S_N1$  i  $S_N2$ , záleží na struktuře halogenderivátu. Zatímco u primárního halogenderivátu (viz. **Schéma 2**) bude tento krok probíhat velice pravděpodobně mechanismem  $S_N2$ , u sekundárních halogenderivátů může reakce probíhat mechanismem  $S_N1$ . Produktem této reakce je α-thioiminiová sůl, která je ve většině případů nestálá a podléhá následnému kroku, kterým je tvorba thiiranového (episulfidového) kruhu.

V praxi se při přípravě thioiminiových solí používají nejčastěji bromderiváty<sup>6,7</sup>, jelikož bromidový ion je dobře odstupující skupinou, reakce probíhá dostatečně rychle. Jodderiváty, ač je jodidový ion lépe odstupující skupinou než bromidový, se v praxi používají velice omezeně, jelikož řada halogenovaných sloučenin obsahující jod je velice reaktivní a za běžných podmínek nestabilní<sup>8</sup>. Ve speciálních případech lze výchozí jodderiváty připravovat *in situ* například ze stabilních chloridů<sup>9</sup> *Finkelsteinovou* reakcí.

### 2.1.1.2 Vznik thiiranového (episulfidového) intermediátu

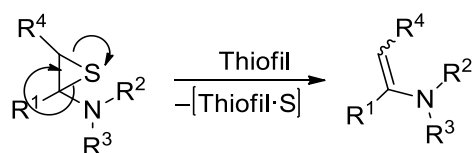


**Schéma 4** – Mechanismus cyklizace α-thioiminiové soli na thiiranový intermediát.

Ve druhém kroku reakce vstupuje do reakce báze, která způsobí odtržení vodíku z uhlíku vedle síry za vzniku aniontu, který cyklizuje na nepříliš stabilní thiiranový intermediát (**Schéma 4**). Ochota thioiminiové soli odstěpovat proton je proto klíčová pro zdárný průběh *Eschenmoserova* couplingu.

Bylo provedeno mnoho experimentů, při kterých byly s úspěchem použity báze jak anorganické – uhličitany, hydrogenuhličitany, hydroxidy a hydridy alkalických kovů, tak i báze organického charakteru – nejběžněji například TEA (triethylamin), DIPEA (diisopropylethylamin), některé alkoxidy, a mnoho dalších.<sup>5,6</sup>

### 2.1.1.3 Extruze síry

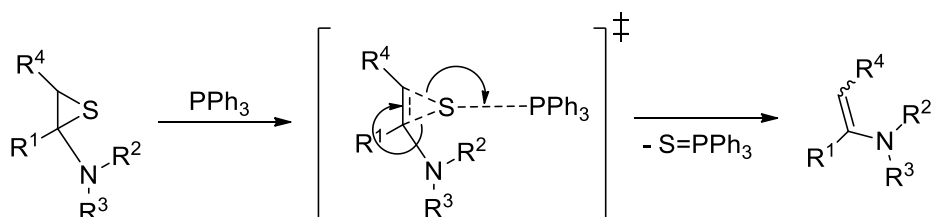


**Schéma 5** – Extruze síry z thiiranového intermediátu.

V posledním kroku se vzniklý 2,2,3-trisubstituovaný thiiranový (episulfidový) intermediát rozpadá za eliminace síry a dochází ke vzniku konečného produktu reakce, nejčastěji 2-vinylsubstituovaného aminu (**Schéma 5**).

Eliminaci síry lze provést či usnadnit tzv. thiofilem (**Schéma 6**). Thiofil je látka, která různými mechanismy ochotně váže síru a tudíž je moderátorem rozpadu thiiranového (episulfidového) cyklu. Jako thiofil se používají zejména sloučeniny fosforu, ve kterých má fosfor oxidační číslo P<sup>III</sup>. Jedná se v podstatě o redoxní reakci, fosfor se touto cestou oxiduje z oxidačního stavu P<sup>III</sup> na P<sup>V</sup>.

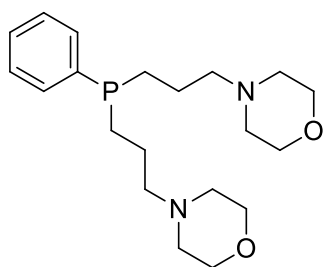
Stabilita thiiranového kruhu je určena přítomnými substituenty. V řadě případů je thiiranový cyklus tak nestabilní, že se rozpadá samovolně a bez nutnosti přítomnosti thiofilu, příkladem jsou i mnohá prováděná reakce s 3-brom-1-methylindol-2-onem a substituovanými arylthioamidy. Opakem jsou reakce, kdy bez přítomnosti thiofilu k rozpadu kruhu vůbec nedochází, nebo se uplatňuje jiná než předpokládaná reakční cesta a výtěžek vinylaminů je malý nebo zcela nulový.<sup>10</sup> U několika reakcí bylo zjištěno, že ač probíhají i bez přítomnosti thiofilu, jeho přítomnost pozitivně ovlivňuje jak výtěžnost reakce, tak reakční podmínky – reakční čas a teplotu.



**Schéma 6** - Jeden z možných způsobů extruze síry z thiiranového cyklu na příkladu nejběžnějšího thiofilu – trifenylofosfinu.

V pracích zabývajících se *Eschenmoserovou* reakcí bylo v průběhu času s úspěchem použito mnoho thiofilů. Mezi nejběžnější thiofilů patří zejména sloučeniny fosforu – trifenylofosfin ( $\text{Ph}_3\text{P}$ ), komplex trifluorboranu s trifenylofosfinem ( $\text{Ph}_3\text{P}\cdot\text{BF}_3$ ), triethylfosfin, triethyl-fosfit a trimethyl-fosfit.<sup>11,12</sup>

Speciálním případem jsou sloučeniny, které fungují jako thiofil i jako báze zároveň. Tyto sloučeniny navrhnul a jejich první zástupce do praxe uvedl sám prof. *Eschenmoser*. Například bis[4-(morfolinypropyl)]fenylfosfin (**Obr. 3**) je sloučenina mající jednak povahu báze kvůli přítomnosti *N*-substituovaného morfolinu v molekule, tak i thiofilu ( $\text{P}^{\text{III}}$ ). V praxi se tato látka osvědčila především díky usnadnění čištění výsledných produktů – při použití nepolárního rozpouštědla lze po ukončení reakce tuto látku jakožto vedlejší produkt odstranit promytím reakční směsi vodou.<sup>6</sup>



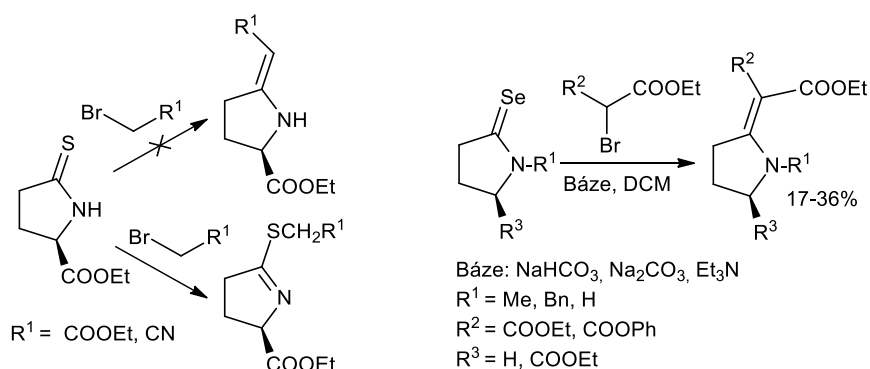
**Obr. 3** – Strukturní vzorec bis[4-(morfoliny)propyl]]fenylfosfinu.

## 2.1.2 Atypické provedení Eschenmoserovy reakce

### 2.1.2.1 Eschenmoserova reakce na selenoamidových substrátech

Byla publikována i práce zabývající se studiem *Eschenmoserovy* reakce při reakci substituovaných  $\alpha$ -halogenketonů se selenoamidy, přičemž bylo zjištěno, že probíhá analogickým mechanismem jako reakce thioamidů (při vzniku vinylaminů se eliminuje selen). Autoři *S. Hussaini a G. Hammond* taktéž vybrali několik reakcí, u nich coupling „klasickou“ cestou, tedy s použitím thioamidů, selhával, poskytoval minimální výtěžky nebo směs mnoha produktů a thioamidy v nich nahradili selenoamidovými substráty. Zjistili, že coupling se selenoamidy v části těchto případů funguje, i když s nepříliš vysokými výtěžky.<sup>13</sup>

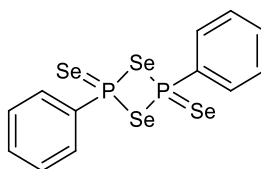
Jedním ze substrátů, na kterých *Eschenmoserova* reakce zcela selhává, jsou sekundární thiolaktamy a použití selenoamidu se u nich proto jeví jako vhodná alternativa (**Schéma 7**).



**Schéma 7** – Srovnání *Eschenmoserovy* reakce se sírou a selenem na příkladu substituovaného pyrrolidinu.<sup>13</sup>

Při výzkumu a využití *Eschenmoserovy* reakce se však tento postup syntézy příliš neujal – oproti sirným analogům jsou selenové sloučeniny drahé, velice snadno hydrolyzují za vzniku toxického selenovodíku (proto se v praxi většinou připravují *in situ*) a i samotné jsou mnohem toxichtější, než sloučeniny obsahující síru.<sup>14</sup>

Využití selenoamidů v organické syntéze, tedy i při studiu *Eschenmoserových* reakcí, bylo též znesnadněno jejich velice obtížnou syntézou. Jistý průlom v této oblasti znamenal objev senačních činidel, která jsou použitelná pro laboratorní podmínky, například *Woolinsovo* činidlo – 2,4-difenyl-1,3,2,4-diselenadifosfetan-2,4-diselenid (jedná se o strukturní selenový analog dříve popsaného *Lawessonova* činidla, viz. **Obr 4**)<sup>15</sup>. S využitím tohoto činidla byly popsány syntézy *N,N*-disubstituovaných selenoamidů vhodných pro studium *Eschenmoserova* couplingu. Brzy po tomto objevu se stalo *Woolinsovo* činidlo komerčně dostupným.



**Obr. 4** – Strukturní vzorec *Woolinsova* činidla.

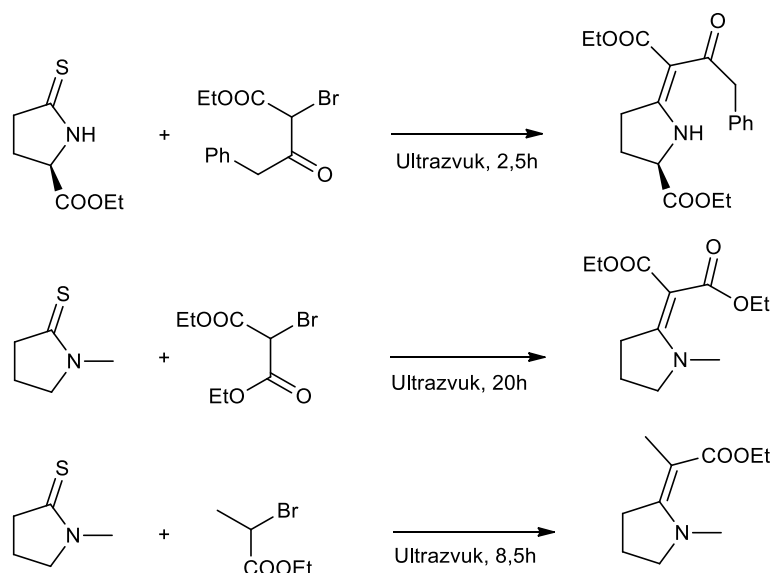
### 2.1.2.2 *Eschenmoserova* reakce s využitím ultrazvuku

Urychlení reakcí ultrazvukem si lze vysvětlit tak, že při vystavení roztoku reakční směsi ultrazvuku v ní dojde ke vzniku bublinek vakua. Při zániku těchto bublinek – kavitaci – vzniká v roztoku rázová vlna a lokálně se mění mikroprostředí - při použití zdroje ultrazvuku s vysokou energií si tak lze představit fázové rozhraní roztok/vakuum jako mikroreaktor s velmi vysokým tlakem (i stovky atmosfér) a vysokými teplotami.<sup>16</sup>

Byly popsány *Eschenmoserovy* reakce, kdy byl s výhodou použit ultrazvuk. Touto problematikou se zabývali např. *N. D. Koduri, B. Hileman a kol.* Tito autoři studovali *Eschenmoserovy* reakce na substrátech, jejichž coupling trval v roztoku velice dlouho. Vystavením reakční směsi zdroji ultrazvuku o vysoké energii došlo k podstatnému zkrácení reakčních dob (z řádově dnů až týdnů na hodiny), taktéž byly publikovány pozitivní výsledky u

reakcí, u kterých *Eschenmoserova* reakce za běžných podmínek zcela selhávala. Příkladem může být reakce thiolaktamů (**Schéma 7** a **Schéma 8**).<sup>13,17</sup>

V případě reakce v heterogenním systému může reakci urychlovat též zmenšování velikosti částic (tedy zvětšování celkového povrchu) suspendované látky v roztoku vlivem kavitace.



**Schéma 8** – *Eschenmoserova* reakce katalyzovaná ultrazvukem na příkladu substituovaných pyrrolidinů.

## 2.2 Biologická aktivita substituovaných 3-methylidenindol-2-onů

### 2.2.1 3-Methylidenindol-2-ony jako inhibitory tyrosin-kináz a kancerostatika

Naprostá většina publikovaných prací řadí 3-(amino(aryl/alkyl)methylidenindol-2-ony mezi inhibitory tyrosin-kináz.

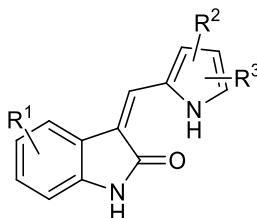
Kinázy představují velkou třídu enzymů, jenž je zodpovědná za katalýzu při přenosu fosforylové skupiny z donoru – například ATP – na akceptorovou molekulu. Fosforylovaná molekula (akceptor, nejčastěji protein) pak mění svoje chování a vlastnosti, což ovlivňuje kaskádu navazujících dějů, jichž se akceptor fosforylové skupiny účastní. Zjednodušeně si lze

představit, že aktivace/inhibice kináz, stejně jako ostatních enzymových receptorů, může vést k ovlivnění mnoha dějů, které probíhají v buňce. <sup>18</sup>

Tyrosin kinázy představují podskupinu kináz, přičemž specifikum spočívá v tom, že katalyzují selektivně fosforylaci tyrosinových koncových skupin, které jsou peptidickou vazbou vázány v mnoha enzymech. Fosforylace těchto tyrosinových zbytků proto hraje důležitou roli při přenosu signálu a regulaci aktivity enzymů, v nichž jsou přítomny, což má v konečném důsledku klíčový vliv na diferenciaci a růst buňky. Poprvé byla fosforylace tyrosinových residuí pozorována a popsána u virů ze skupiny *Polyomaviridae* v roce 1979. <sup>19</sup>

Mnoho receptorových tyrosin kináz (RTK) hraje nezastupitelnou roli při buněčném dělení, regulaci buněčného cyklu a při apoptóze. Při vzniku a progresi karcinomu byly zjištěny a popsány mechanismy změn těchto receptorů – ty vedly k zrychlené proliferaci nádorových buněk, u nichž ke změnám došlo. Specifická inhibice těchto abnormálních receptorů představuje jeden z možných způsobů, jakým lze zabránit šíření karcinomu.

*Sun et. al.* zkoumali *in vitro* schopnost substituovaných 3-methylidenindol-2-onů (**Obr. 5**) vázat se na specifické receptorové tyrosin-kinázy ovlivňující růstový faktor fibroblastů (FGF-RTK), které představují základní buňku vazivové tkáně. Podtřídu FGF-RTK reprezentují specifické enzymy PDGF, FLK-1, EGF, HER-2 a IGF-2, na nich byla měřena IC<sub>50</sub>. Autoři otestovali celkem 52 3-substituovaných derivátů indol-2-onu, u některých byla stanovena IC<sub>50</sub> menší než 1 μM, což lze považovat za extrémně účinné inhibitory (**Tabulka 1**). Většina studovaných derivátů vykazovala dobrou účinnost při inhibici FLK-1. <sup>20</sup>



**Obr. 5** – Strukturní vzorec substituovaných 3-methylidenindol-2-onů, na nichž byla zkoumána inhibiční aktivita.

Substituce			Inhibiční aktivita (IC <sub>50</sub> , [μM])	
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	PGDF	FLK-1
H	H	H	12	0,39
5-Cl	H	H	85,4	3
6-F	H	H	2,8	<0,78
H	3-Me	4-Me	>100	2,7
H	3-Me	4-COOEt	>100	0,18
H	5-Me	4-COOEt	65,5	0,14

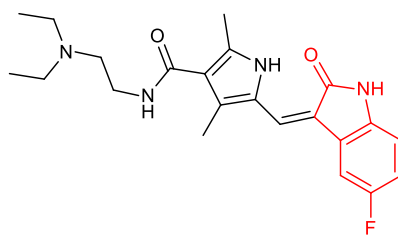
**Tabulka 1** – Tyrosin-kinázové inhibiční aktivity nejúčinnějších derivátů.

Od roku 1979, kdy byly poprvé objeveny tyrosin-kinázové receptory<sup>19</sup>, byl v této oblasti učiněn obrovský pokrok. Bylo patentováno velké množství sloučenin s popsanou aktivitou na RTK (například v patentu US2003199478A1 je popsáno přes 300 derivátů indol-2-onu<sup>21</sup>. Mnohé z těchto sloučenin byly s úspěchem podrobeny klinickým testům a dnes jsou běžně využívány v praxi.<sup>2</sup>

Příkladem jsou léčiva Sunitinib a Nintedanib. (**Obr. 1**, **Obr. 6**) Tyto látky, spolu s desítkami dalších sloučenin s aktivitou na tyrosin-kinázových receptorech, úspěšně prošly klinickými testy a jsou dnes v klinické praxi běžně využívány na léčbu mnoha závažných chorob. Nejčastěji nachází tyto látky využití jako účinná a selektivní antineoplastika. Oproti alkylačním činidlům (např. cyklofosamid<sup>1</sup>), které jako první našly uplatnění jako léčiva na tento typ chorob, mají nesrovnatelně menší množství nežádoucích účinků. Oproti inhibitorům mitózy (Paclitaxel, Docetaxel) také vykazují mnohem menší až nulovou neurotoxicitu.

Léčivo Sunitinib je využíváno na léčbu resistantních forem nádorů gastrointestinálního traktu. Kromě onkologických onemocnění se inhibitory tyrosin-kináz využívají i k léčbě těžkých forem fibróz, například zmiňovaný Nintedanib. Poměrně novým trendem je využití těchto látek při léčbě neurodegenerativních poruch – některé tyrosin-kinázové inhibitory se jeví jako nadějná léčiva na specifické formy amyotrofické laterální sklerozy (ALS), ve fázi klinických testů jsou i léčiva s potenciálem zastavit progresi *Parkinsonovy* choroby.<sup>2</sup>

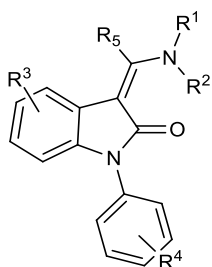
Zajímavým faktem je, že jako základní funkční skelet se u těchto léčiv vyskytují substituované indolové, indolonové, indazolové případně isoindolové cykly.



**Obr. 6** – Strukturní vzorec Sunitinibu.

### 2.2.2 3-(1-Aminomethyliden)indol-2-ony při potenciaci léčiv

Byla popsána taktéž schopnost substituovaných 3-(1-aminomethyliden)indol-2-onů potencovat účinky GABA-ergních léčiv. Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) je inhibiční neurotransmitter zastávající funkci ligandu otevírajícího chloridové kanály v neuronální membráně (zejména v mozku), což způsobuje její hyperpolarizaci. Jako GABA-ergní můžeme označit jakoukoli látku, která stimuluje nebo inhibuje neurotransmisi pomocí  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny. Mezi léčiva ovlivňující přenos nervového vzruchu pomocí GABA patří sedativa, hypnotika a anestetika. Jednu ze tříd sedativ/hypnotik představují benzodiazepiny.<sup>1</sup> Jedním ze zástupců třídy sedativ/hypnotik je Flunitrazepam (dříve prodáváný pod obchodním názvem *Rohypnol*). *In vivo* studii zabývající se zvýšením schopnosti Flunitrazepamu vázat se na GABA receptory v synergii s rozličnými deriváty 3-methylidenindol-2-onů (viz. **Obr. 7**) provedl Seges a kol. Experiment byl proveden na dvou skupinách myší s <sup>3</sup>H značeným Flunitrazepamem. První skupina dostala vybrané 3-methylidenindol-2-ony a následně <sup>3</sup>H Flunitrazepam, druhá, kontrolní, dostala pouze <sup>3</sup>H Flunitrazepam. Následná měření prokázala, že při podání 3-methylidenindol-2-onů došlo ke zvýšení schopnosti Flunitrazepamu vázat se na GABA receptory, v některých případech o více než 200%.<sup>22</sup>



**Obr. 7** – Strukturní vzorec substituovaných 3-(1-aminomethyliden)indol-2-onů, na nichž byly prováděny pokusy s potenciací Flunitrazepamu.

Substituce					Účinnost Flunitrazepamu na GABA-receptorech [%]*
R1	R2	R3	R4	R5	
Me	Me	H	3-Cl	Ph	213
Me	Me	H	3-F	H	191
Me	Me	H	3,5-Cl	H	244
H	H	6-Cl	H	Me	204
H	H	3-Me	H	H	184

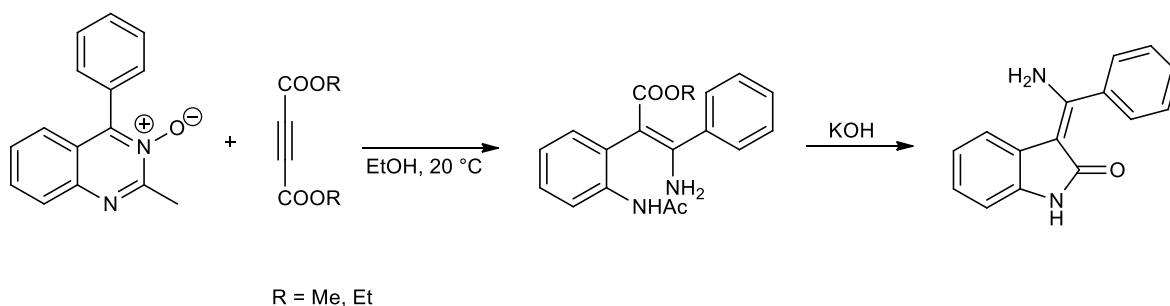
\*oproti kontrolní skupině

**Tabulka 2** – Vliv vybraných derivátů 3-(1-aminomethyliden)indol-2-onu na potenciaci účinků Flunitrazepamu.

## 2.3 Publikované syntézy 3-[1-amino(aryl)methyliden]indolon-2-onů

### 2.3.1 Syntéza vycházející ze substituovaného chinazolin-3-oxidu a esteru acetylendikarboxylové kyseliny

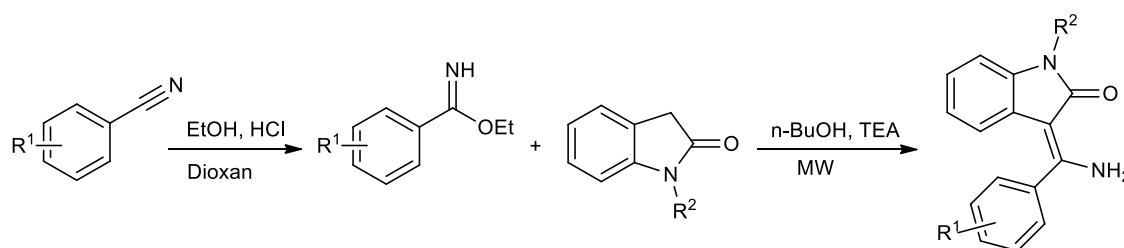
První popsanou syntézou 3-[1-amino(fenyl)methyliden]indol-2-onu je reakce 2-methyl-4-fenylchinazolin-3-oxidu s alkylestery acetylendikarboxylové kyseliny, kterou publikovali *Stauss et. al.* v roce 1973 (**Schéma 9**). První reakční krok probíhá ve smyslu adice následované přesmykem intermediátu na ester substituované fenylprop-2-enové kyseliny. Autoři popisují výtěžek 20% u dimethyl-acetylendikarboxylátu a 28% u diethyl-acetylendikarboxylátu. Bazickou hydrolyzou esteru této kyseliny dochází k cyklizaci a ke vzniku indol-2-onového kruhu. Popsaný výtěžek hydrolyzy je 59% u methylesteru a 83% u ethylesteru.<sup>23</sup>



**Schéma 9** – První popsaná syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onu.

### 2.3.2 Syntéza vycházející z substituovaného benzonitrilu

Nejjednodušší syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů byla v roce 2009 popsána v patentu US20090131506A1 (**Schéma 10**). Vychází ze substituovaného benzonitrilu, který je podroben alkoholýze katalyzované bezvodým chlorovodíkem. Vzniklý imidoester poté kondenzuje s odpovídajícím indol-2-onem v přítomnosti triethylaminu (ten v reakci plní úlohu báze) za vzniku 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onu.<sup>24</sup> Tuto reakci lze urychlit mikrovlnným zářením. Reakční sekvence je vhodná pro přípravu mnoha derivátů 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů, probíhá však s velice nízkými výtěžky (maximálně 20%).

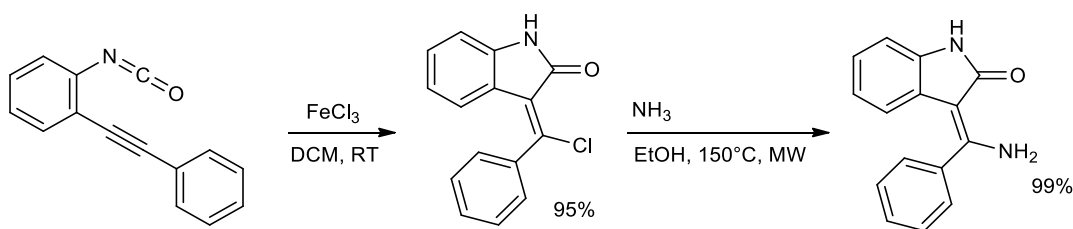


R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Výtěžek [%]
4-HO	H	7
4-I	H	6
3-I	H	16
4-MeO	H	10
4-F	H	12
H	Me	12
4-HO	Me	13
4-MeO	Me	8
3-I	Me	17
4-I	Me	10

**Schéma 10** – Syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů vycházející ze substituovaných benzonitrilů.

### 2.3.3 Cyklizace 2-(fenylethynyl)fenylisokyanátu s použitím FeCl<sub>3</sub>

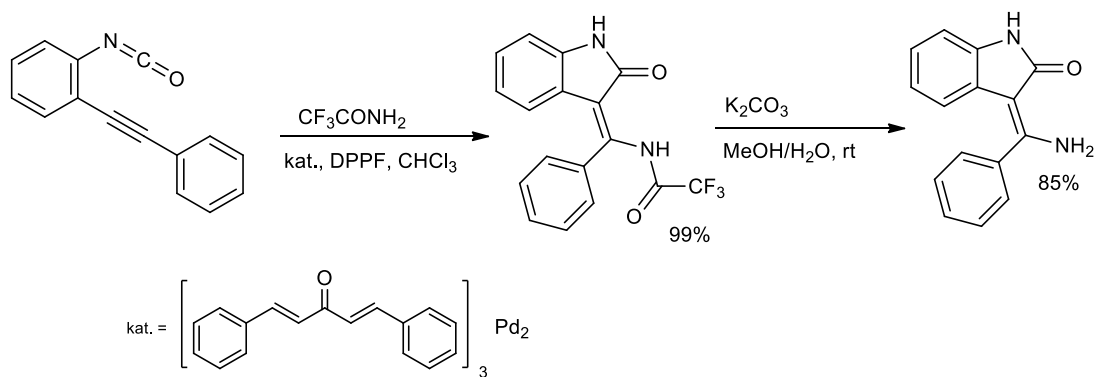
Syntézu 3-[1-amino(fenyl)methyliden]indol-2-onů s vysokým výtěžkem popsali *Cantagrel et. al.* v roce 2009. V prvním kroku se cyklizuje alkynyl(aryl)isokyanát přebytkem bezvodého chloridu železitého. Autoři předpokládají iontový mechanismus reakce, kdy za katalýzy Lewisovou kyselinou (chloridem železitým) z isokyanátu vznikne reaktivní vinylový karbokation, který je následně atakován alkynelem a dochází k uzavření kruhu za vzniku 3-(chloralkyliden)indol-2-onu. Reakce probíhá již za laboratorní teploty. Meziprodukt je poté podroben reakci s amoniakem za zvýšeného tlaku v polárním rozpouštědle, například ethanolu. Vzniká 3-(1-amino(fenyl)methyliden)indol-2-on v excelentním výtěžku (**Schéma 11**). Autoři popisují taktéž reakce chlorderivátu s dalšími primárními a sekundárními aminy s výtěžky 83-99%.<sup>25</sup>



**Schéma 11** – Syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onu z alkynyl(aryl)isokyanátu.

### 2.3.4 Cyklizace 2-(fenylethynyl)fenylisokyanátu s použitím palladiového katalyzátoru

Obdobnou syntézu popsali *Miura et. al.* a byla taktéž publikována v roce 2009. Vychází opět z 2-(fenylethynyl)fenylisokyanátu, který je podroben transmetalaci oxidativní cyklizaci a reakci s trifluoracetamidem. Reakce má poměrně složitý mechanismus a je katalyzována komplexem dibenzylidenacetonu s palladiem, nutná je i přítomnost chloroformu a 1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocenu (DPPF). Vzniká substituovaný trifluoracetamid v téměř kvantitativním výtěžku. Ten je dále hydrolyzován za mírných podmínek. Produktem hydrolyzy je 3-[1-amino(fenyl)methyliden]indol-2-on v dobrém výtěžku (**Schéma 12**).<sup>26</sup> Problémem obou popsaných cyklizací je však dostupnost výchozích isokyanátů.

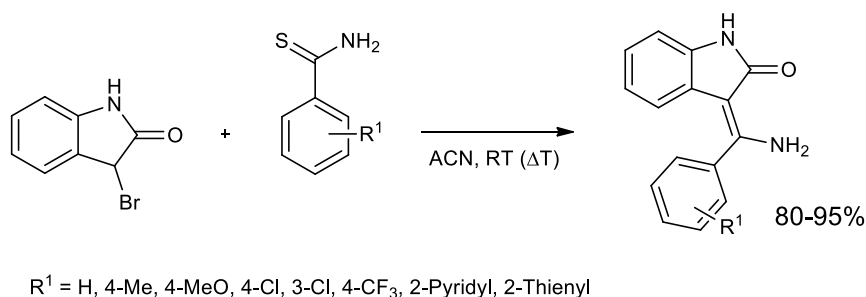


**Schéma 12** - Syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onu z alkynyl(aryl)isokyanátu.

### 2.3.5 Syntéza s využitím Eschenmoserovy reakce

Nejnovější popsaná syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů je dílem výzkumné skupiny doc. Hanuska a byla publikována v roce 2015<sup>3</sup>. Při ní reaguje 3-bromindol-2-on se substituovaným thioamidem ve smyslu diskutované Eschenmoserovy reakce (viz. kap. 3.1.). Reakce probíhá za laboratorní teploty v bezvodém acetonitrilu s vysokými výtěžky 80-95% (**Schéma 13**). Při reakci 3-bromindol-2-onu s 4-methoxythiobenzamidem a 2-pyridinylthiokarboxamidem je produktem reakce nejdříve substituovaný thiazol (vzniklý přesmykem vzniklé thioiminiové soli), který je zahřátím převeden na produkt Eschenmoserovy reakce (příslušný 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-on). Mechanismus těchto reakcí je diskutován v kapitole 5.1.

Při výzkumu, který předcházela publikaci této metody syntéz 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů, vznikala i tato bakalářská práce.



**Schéma 13** - Syntéza 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů s využitím Eschenmoserovy reakce.

## 3 Experimentální část

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR analýza byla provedena na přístroji Bruker Advance III 400 MHz nebo na přístroji Bruker Ascend 500 MHz. Chemické posuny  $\delta$  jsou vztaženy buď na tetramethylsilan (TMS) nebo k signálům residuálního rozpouštědla.  $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2,50 \text{ ppm } (^1\text{H}), 39,6 \text{ ppm } (^{13}\text{C})$ .  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7,26 \text{ ppm } (^1\text{H}), 77,0 \text{ ppm } (^{13}\text{C})$ .

Elementární analýza byla provedena na přístroji EA Flash 2000 CHNS Organic Element Analyser. Pro stanovení obsahu chloru ve sloučenině **5a** byla použita merkurimetrická titrace.

Body tání připravených sloučenin byly měřeny na bodotávku Polytherm A Heiztisch-Mikroskop Wagner & Munz.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách Supelco Analytical – Sigma Aldrich  $\text{SiO}_2/\text{Al}$  dopovaných indikátorem vykazujícím luminiscenci při 254 nm.

Hmotnostní spektroskopie MALDI byla provedena přístroji MALDI LTQ Orbitrap XL s použitím dusíkového laseru (337 nm, 60 Hz, 8-20  $\mu\text{J}$ ) v režimu pro pozitivní ionty. Pro CID experimenty s lineárním quadropolem (LTQ) bylo jako kolizní plyn použito helium a jako matrice kyselina 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) nebo *trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-methylprop-2-en-1-yliden]malonnitril (DCTB).

### 3.1 Substráty a činidla:

Acetonitril byl použit v kvalitě p.a. a před použitím byl vysušen stáním nad molekulovým sítem 4Å.

Thioacetamid byl použit komerčně dostupný a substituované thioamidy byly použity buď komerčně dostupné nebo byly připraveny z odpovídajících nitrilů níže popsanými reakcemi.<sup>27</sup>

Výchozí 3-brom-1-methyl-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-on byl připraven z isatinu níže popsanou sekvencí reakcí. V této práci bude pro tento substrát dále používán zkrácený název 3-brom-1-methylindol-2-on.

## 3.2 Syntéza výchozích látek

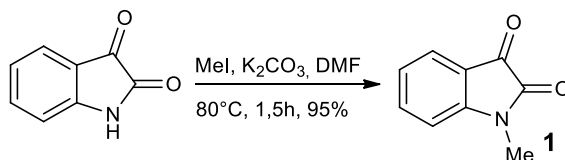
### 3.2.1 Arylthioamidy

Ve 100 ml dimethylformamidu bylo suspendováno 12 g (60 mmol) hexahydrátu chloridu hořečnatého, který byl předem rozetřen na jemný prášek. Do suspenze bylo přidáno 50 mmol odpovídajícího benzonitrilu a 9,2 g (160 mmol) hydrogensulfidu sodného. Směs byla intenzivně míchána na magnetické míchačce po dobu 2 hodin, poté vlita do 200 ml studené vody a okyselena 4 ml koncentrované HCl. Vysrážená látka byla zfiltrována, promyta vodou a surový vlhký produkt byl rekrystalizován ze směsi voda/ethanol (1/1).

Výtěžek 7,25 g (86% teorie) 3-chlorthiobenzamidu ve formě žluté krystalické látky. T.t. 131,5-133 °C (lit. <sup>28</sup> 132-134 °C) a 5,9 g (80% teorie) 4-methylthiobenzamidu ve formě žluté krystalické látky. T.t. 158-159 °C (lit. <sup>29</sup> 158-159 °C).

### 3.2.2 3-Brom-1-methylindol-2-on

#### 1-Methylindol-2,3-dion (1)



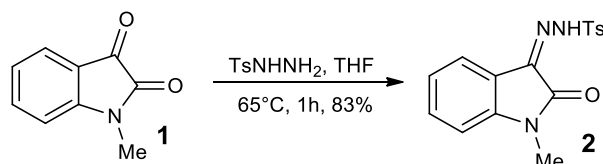
Do roztoku 10,0 g (68 mmol) isatinu v dimethylformamidu (DMF, 340 ml) bylo přidáno 12,2 g (88 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Do suspenze bylo najednou přidáno 4,64 ml (12,7 g, 79 mmol) methyljodidu a reakční směs byla zahřívána na olejové lázni při teplotě 85 °C po dobu 90 minut. Po této době bylo TLC analýzou zjištěno, že směs neobsahuje žádný výchozí isatin. Reakční směs byla ochlazená na laboratorní teplotu a vlita do 300 ml ledové vody. Směs byla extrahována 5 x 100 ml CHCl<sub>3</sub>. Organické fáze byly smíchány a roztok byl promyt solankou (100 ml), vodou (100 ml), vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařen na odparce.

Výtěžek 10,4 g (95% teorie) červené krystalické látky **1**. T.t. 125-128 °C (lit. <sup>30</sup> 125-127 °C)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,62 (dd,  $J = 11,7, 4,3$  Hz, 2H, ArH), 7,14 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, ArH), 6,90 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, ArH), 3,26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

NMR spektrum je ve shodě s literaturou.<sup>31</sup>

### 1-Methylindol-2-on-3-tosylhydrazon (**2**)



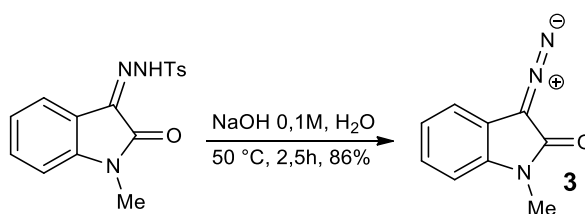
5 g (30 mmol) 1-methylindol-2,3-dionu (**1**) bylo rozpuštěno v tetrahydrofuranu (THF, 170 ml). Do roztoku bylo přidáno 6,4 g (35 mmol) *p*-toluensulfonylhydrazinu. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni při teplotě 65 °C po dobu 1h. Reakční směs byla poté ochlazena na laboratorní teplotu a na odparce zahuštěna na 20% původního objemu a poté ochlazena ve směsi led + chlorid sodný. Vyloučená látka byla zfiltrována na vakuu a promyta ledovým THF (20 ml).

Výtěžek 8,4 g (83% teorie) žluté látky **2**. T. t. 194-197°C (lit.<sup>32</sup> 192-195 °C).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 12,55 (s, 1H, NH), 7,88 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H, ArH), 7,60 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, ArH), 7,41 – 7,28 (m, 3H, ArH), 7,10 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, ArH), 6,84 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, ArH), 3,22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

NMR spektrum v literatuře nebylo dosud popsáno.

### 1-Methyl-3-diazoindol-2-on (**3**)



2 g (6 mmol) 1-methylindol-2-on-3-tosylhydrazonu (**2**) bylo suspendováno ve vodě (130 ml) a do suspenze bylo přidáno 1,1 g (28 mmol) NaOH. Reakční směs byla míchána 15

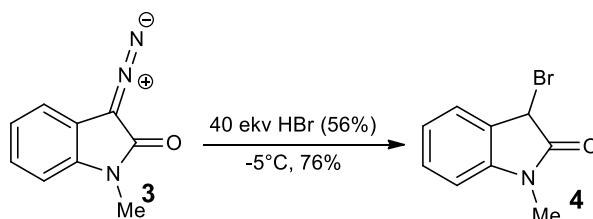
minut při laboratorní teplotě a poté zahřívána na olejové lázni při 40 °C po dobu 2,5 h. Reakční směs byla poté ochlazená na laboratorní teplotu a extrahována 3 x 40 ml dichlormethanu. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na odparce.

Výtěžek 0,91 g (86% teorie) oranžové látky **3**. T.t. 83-85 °C (lit. <sup>33</sup> 84-85 °C).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,24 – 7,16 (m, 2H, ArH), 7,10 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, ArH), 6,93 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, ArH), 3,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

NMR spektrum je ve shodě s literaturou.<sup>34</sup>

### 3-Brom-1-methylindol-2-on (**4**)



0,63 g (3,6 mmol) 3-diazo-1-methylindol-2-onu (**3**) bylo po malých dávkách za intenzivního míchání přidáno do 56 % HBr (30 ml), která byla předem vychlazená v lázni led + NaCl na -5 °C. Směs byla míchána při této teplotě po dobu 1,5h. Směs po uplynutí cca 10 minut začala intenzivně pěnit (uvolňuje se N<sub>2</sub>). Poté byla reakční směs (suspenze) ohřáta na laboratorní teplotu, zfiltrována na vakuu a filtrační koláč byl promýván studenou vodou do neutrální reakce vytékajícího filtrátu. Získaná látka byla usušena ve vakuovém exsikátoru.

Výtěžek 0,58 g (76% teorie) nažloutlé látky **4**. T.t. 122,5-124 °C (lit. <sup>32</sup> 125-129 °C).

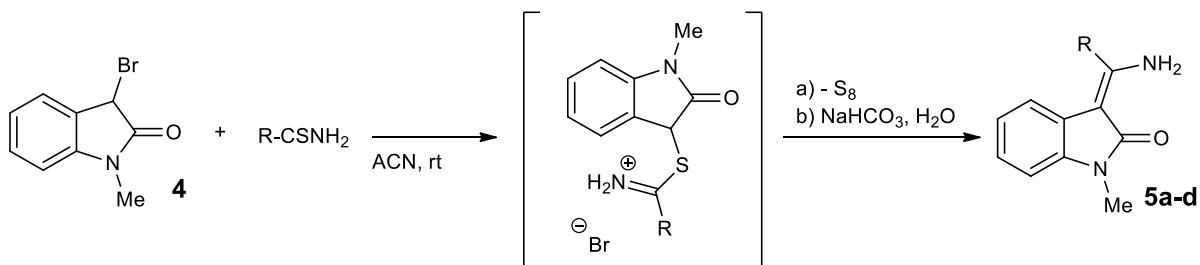
Celkový výtěžek 3-brom-1-methylindol-2-onu (**4**) byl 52% (počítáno na výchozí isatin).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,41 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, ArH), 7,35 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,11 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, ArH), 6,83 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 5,27 (s, 1H, CH), 3,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

NMR spektrum je ve shodě s literaturou.<sup>34</sup>

### 3.3 Eschenmoserova reakce

Reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu (**4**) s primárními arylthioamidy a alkylthioamidy.



**Schéma 14** – Eschenmoserova reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu s thioamidy.

		Reakční podmínky		Výtěžek [%]	
Látka	R	V ACN [ml]	t míchání [h]	Postup 1	Postup 2
<b>5a</b>	3-ClPh	5	3	71	78
<b>5b</b>	4-MePh	10	3	74	81
<b>5c</b>	4- <i>t</i> -BuPh	15	5	70	89
<b>5d</b>	Me	5	18	67	54

**Tabulka 3** – Specifikace provedených reakcí.

#### 3.3.1 Příprava hydrobromidů sloučenin 5a-d

Z 0,57g (2,5 mmol) 3-brom-1-methylindol-2-onu (**4**) byl připraven nasycený roztok v acetonitrilu (ACN, 10 ml). K tomuto roztoku byl za míchání přidán roztok odpovídajícího thioamidu (2,5 mmol) v minimálním množství acetonitrilu ( $V_{ACN}$ , viz. **Tabulka 4**). Baňka s reakční směsí byla uzavřena zátkou (kvůli zamezení přístupu vzduchu a vlhkosti) a míchána po dobu  $t_{míchání}$  (viz. **Tabulka 4**). Vyloučený produkt byl zfiltrován na vakuu, promyt studeným ACN (5 ml) a usušen ve vakuovém exsikátoru.

#### 3.3.2 Příprava sloučenin 5a-d

Byly vypracovány dva postupy pro získání čistých 3-[1-amino(aryl)methylidene]-1-methylindol-2-onů ve formě báze.

## Postup 1

Surový usušený hydrobromid (získaný reakcí 2,5 mmol výchozích látek) byl suspendován v 50 ml H<sub>2</sub>O a k roztoku bylo za míchání přidáno 5 ml 10% vodného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (nebo roztoku jiné báze, viz. 5.1.1.). Reakční směs byla ponechána míchat 30 minut. Během této doby se mění barva reakční směsi ze žluté na hnědou. Výsledná suspenze byla zfiltrována a promyta 5 ml vychlazeného ethyl-acetátu (0 °C) – dojde k vymytí vedlejších produktů reakce, které jsou v ethyl-acetátu dobře rozpustné. Produkt byl usušen na vakuu.

## Postup 2

Surový usušený hydrobromid byl suspendován v 50 ml H<sub>2</sub>O a k tomuto roztoku bylo za intenzivního míchání přidáno 2,5 ml 10% NaHCO<sub>3</sub>. Suspenze byla převedena do dělicí nálevky a extrahována ethyl-acetátem do vymizení pevné fáze nebo dokud se organická fáze barví žlutě (4 x 25 ml). Organické fáze byly smíchány, promyty vodou (25 ml), vysušeny bezv. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a roztok byl odpařen na odparce. Produkt byl poté podroben kolonové chromatografii (stacionární fáze SiO<sub>2</sub>, mobilní fáze ethyl-acetát).

### 3-[1-Amino(3-chlorfenyl)methyliden]-1-methylindol-2-on (5a)

Výtěžek 0,73 g surového hydrobromidu látky **5a**. Výtěžek 0,55 g látky **5a** (78%, počítáno na výchozí látku **4**) ve formě žluté krystalické látky, t.t. 216-218°C.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 6,00 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, ArH); 6,56 (dt, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,3 Hz, ArH); 6,80 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, *J* = 0,8 Hz, ArH); 6,85 (dt, *J* = 7,7 Hz, *J* = 1,1 Hz, 1H, ArH); 7,49 (td, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,4 Hz, ArH); 7,59 (t, 1H, *J* = 1,5 Hz, ArH<sub>2</sub>); 7,62 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArH<sub>5</sub>); 7,68 (ddd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 2,0 Hz, *J* = 1,2 Hz, 1H, ArH); 8,10 (bd, 1H, *J* = 3,7 Hz, NH); 9,38 (bd, 1H, *J* = 3,9 Hz, NH); 10,40 (bs, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 94,1; 108,9; 117,1; 119,7; 122,7; 124,3; 126,8; 127,7; 130,0; 131,1; 133,6; 136,3; 137,6; 158,3; 170,2.

**Elementární analýza:** C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O, vypočteno: C 66,55; H 4,10; Cl 13,10; N 10,35; změřeno: C 66,62; H 4,15; Cl 12,89; N 10,15

**HRMS:** [M+H<sup>+</sup>]: vypočteno: 285,07892, změřeno: 285,07898.

### 3-[1-Amino(4-methylfenyl)methyliden]-1-methylindol-2-on (5b)

Výtěžek 0,60 g surového hydrobromidu látky **5b**. Výtěžek 0,53 g (81%, počítáno na výchozí látku **4**) látky **5b** ve formě světle žluté amorfnní látky, t.t. 222-224°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 2,43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,14 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, ArH); 6,54 (dt, 1H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,6 Hz, ArH); 6,77-6,86 (m, 2H, 2×ArH); 7,35-7,44 (m, 4H, 4×ArH); 7,94 (bd, 1H, *J* = 3,6 Hz, NH); 9,45 (bd, 1H, *J* = 3,6 Hz, NH); 10,34 (bs, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 93,7; 108,7; 117,3; 119,5; 122,3; 124,8; 127,8; 129,5; 132,9; 136,0; 139,9; 160,6; 170,3.

**Elementární analýza:** C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O; vypočteno: C 70,19; H 6,43; N 14,88; změřeno: C 70,39; H 6,39; N 14,79

**HRMS:** [M+H<sup>+</sup>]: vypočteno: 265,13354, změřeno: 265,13343.

### 3-[1-Amino(4-*terc*-butylfenyl)methyliden]-1-methylindol-2-on (5c)

Výtěžek 0,81 g surového hydrobromidu látky **5c**. Výtěžek 0,68 g (89%, počítáno na výchozí látku **4**) látky **5c** ve formě žluté krystalické látky, t.t. 129-131°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 9,43 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, NH), 8,07 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, NH), 7,71 – 7,58 (m, 2H, ArH), 7,55 – 7,43 (m, 2H, ArH), 6,93 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H, ArH), 6,68 – 6,54 (m, 1H, ArH), 6,17 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, ArH), 3,27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,36 (s, 9H, *t*-Bu).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 168,3; 160,5; 153,0; 137,2; 132,7; 127,6; 125,6; 123,7; 122,3; 120,0; 116,9; 107,4; 92,8; 34,6; 31,0; 25,2.

**HRMS:** [M+H<sup>+</sup>]: vypočteno: 307,18049, změřeno: 307,18070.

### 3-(1-Aminoethyliden)-1-methylindol-2-on (5d)

Výtěžek 0,52 g surového hydrobromidu látky **5d**. Výtěžek 0,36 g (54%, počítáno na výchozí látku **4**) látky **5d** ve formě bílé krystalické látky, t.t. 198-200°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 9,31 (s, 1H, NH), 8,03 (s, 1H, NH), 7,28 (dd, *J* = 7,4, 1,2 Hz, 1H, ArH), 7,05 – 6,90 (m, 3H, ArH), 3,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ (ppm) 167,7; 160,6; 136,8; 124,5; 121,7; 120,3; 117,7; 107,2; 92,5; 25,2; 20,5.

**Elementární analýza:** vypočteno: C 77,25; H 6,10; N 10,60; změřeno: C 77,16; H 6,10; N 10,52

**HRMS:** [M+H<sup>+</sup>]: vypočteno: 189,10224, změřeno: 189,10227.

### **3.3.2.1 Příprava vzorků k analýze na hmotnostním spektrometru**

**1** - Po deseti minutách, co se z reakční směsi začal vylučovat surový produkt, bylo odebráno 10 μl roztoku reakční směsi, rozpuštěno ve 25 ml acetonitrilu a 10 μl tohoto roztoku bylo analyzováno.

**2** - Po deseti minutách, co se z reakční směsi začal vylučovat surový produkt, byla reakční směs zfiltrována na vakuu a vysrážený produkt byl promyt studeným acetonitrilem. Asi 1 mg produktu bylo rozpuštěno v 25 ml methanolu a 10 μl tohoto roztoku bylo analyzováno

## 4 Výsledky a diskuse

Experimentální část této bakalářské práce navazuje na předchozí experimenty prováděné R. Kammelem v rámci jeho disertační práce, při kterých byly prováděny reakce mezi 3-bromindol-2-ony a arylthioamidy, resp. thioamidy. Při těchto reakcích byly jako produkty identifikovány substituované thiazoly a thiazolidiny. Bylo zjištěno, že tyto látky jsou produktem přesmyku („ring transformation“) vzniklých thioiminiových solí. Přesmyk vedoucí ke vzniku thiazolů byl identifikován jako vratný děj. Při experimentech během úprav reakčních podmínek byla dále popsána druhá reakční cesta, přeměna thioiminiové soli na produkt Eschenmoserovy reakce (Schéma 15).<sup>35</sup>

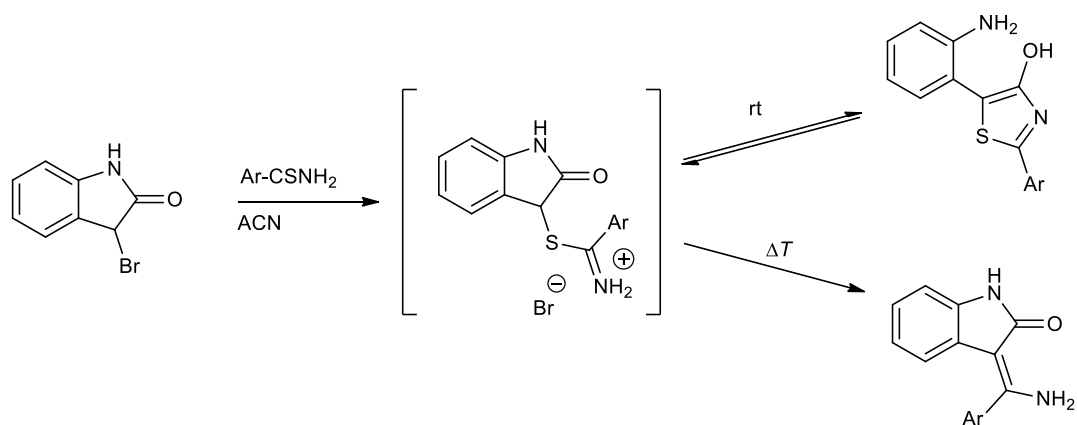


Schéma 15 – Reakce 3-brom-1-methylindol-2-ony s arylthioamidy.

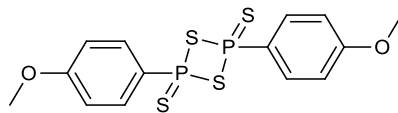
### 4.1.1 Příprava prekurzorů

#### 4.1.1.1 Syntéza thioamidů

Průmyslově se thioamidy syntetizují velice jednoduše – thiolýzou (což je reakce analogická s hydrolýzou) nitrilů odpovídajících karboxylových kyselin za použití vhodného katalyzátoru. Ta se provádí tak, že se roztok nitrilu ve vhodném rozpouštědle sytí plynným sulfanem do úplné konverze nitrilu na thioamid. Tato metoda přípravy je efektivní a levná, neobejde se však bez použití velkých objemů silně toxického sulfanu. Z tohoto důvodu se dnes reakce v této modifikaci v laboratořích k přípravě thioamidů nepoužívá.

Laboratorně mohou být arylthioamidy připraveny nejjednodušeji z odpovídajících amidů reakcí se sulfidem fosforečným nebo Lawesonovým činidlem - 2,4-bis(4-methoxyfenyl)-1,3-dithia-2,4-difosfetan-2,4-disulfidem. Obě tyto činidla mají velkou výhodu v tom, že při

jejich použití odpadá práce s toxickým plynným sulfanem, navíc vykazují dobrou reaktivitu za mírných podmínek, v neutrálním prostředí i v přítomnosti různých funkčních skupin, včetně esterů.<sup>36</sup>

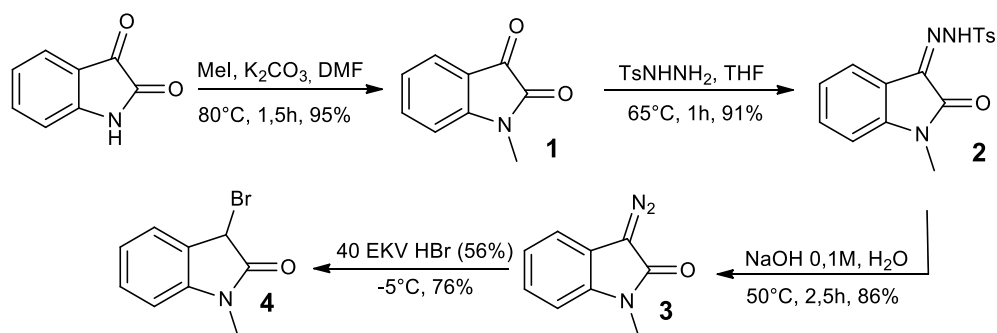


**Obr. 8** – Strukturální vzorec Lawessonova činidla.

Výše popsanou thiolýzu nitrilů karboxylových kyselin lze za laboratorních podmínek provádět metodou, kterou popsal *Manaka et. al.*. Princip je reakce je stejný, avšak jako zdroj  $\text{SH}^-$  iontu je použit hydrogensulfid sodný – NaSH, což je snadno dostupná průmyslová chemikálie. Tato reakce je katalyzována hořečnatými ionty. Tímto je vyřešena hlavní nevýhoda thiolýzy – tedy nutnost pracovat s jedovatým a zapáchajícím plynným sulfanem.<sup>27</sup> Popsaná metodika přípravy thioamidů byla použita při přípravě některých výchozích arylthioamidů, které byly použity při reakcích popsaných v této práci. Postupy jsou popsány v kap. 4.2.1. . Tento postup přípravy thioamidů se velice osvědčil pro svoji jednoduchost. Poskytuje thioamidy ve vynikající čistotě a s vysokými výtěžky (80% a 86%).

#### 4.1.1.2 Syntéza výchozího 3-brom-1-methylindol-2-onu

Výchozí 3-brom-1-methylindol-2-on byl připraven z isatinu (1*H*-indol-2,3-dionu) sekvencí reakcí, jež jsou uvedeny ve schématu níže (**Schéma 16**). Tato reakční sekvence byla zvolena kvůli snadné dostupnosti prekurzorů a také kvůli tomu, že jako produkt poskytuje pouze monobromderivát **4**. Nejjednodušší reakci vedoucí k této látce představuje teoreticky radikálová bromace isatinu, bohužel veškeré literární prameny<sup>37,38</sup> popisují vznik směsi 3-brom-1-methylindol-2-onu (**4**) a 3,3-dibrom-1-methylindol-2-onu, kterou by bylo nutné dále nutně dělit, například chromatograficky. Proto byla pro přípravu výchozího bromderivátu **4** radikálová bromace 1-methylindol-2-onu vyhodnocena jako nevhodná.



**Schéma 16** – Reakční cesta vedoucí k výchozímu 3-brom-1-methylindol-2-onu.

Syntetické cesty z isatinu, tedy methylace, reakce s *p*-toluensulfonylhydrazinem a převedení vzniklého hydrazonu na 3-diazo-1-methylindol-2-on jsou v literatuře popsány. Reakční postupy použité při syntéze diazosloučeniny **3** jsou optimalizované varianty těchto popsaných syntéz, přičemž některým optimalizacím se věnovala již dříve *D. Tarabová* a některým já. 3-Brom-1-methylindol-2-on byl připraven z odpovídající diazosloučeniny **3** substitucí bromovodíkem – tento reakční krok byl taktéž optimalizován.

#### 4.1.1.3 Optimalizace syntéz výchozích látek

Methylaci isatinu (indol-2,3-dionu) methyljodidem v dimethylformamidu za použití uhličitanu draselného jako báze popisují například autoři *Majik et. al.*<sup>39</sup>. Tato syntéza byla mírně pozměněna, bylo použito menší množství rozpouštědla (DMF). Autoři popisují reakční dobu 8 h při použití 2 ml DMF na 0,1 mmol isatinu, přičemž při provádění optimalizace bylo pomocí TLC analýzy (MF ethyl-acetát/*n*-hexan 9/1) zjištěno, že při použití poměru 0,5 ml DMF / 0,1 mmol isatinu (což je objem dostatečný k rozpuštění výchozí látky) již po 1,5h reakční směs neobsahuje žádný výchozí isatin. Proto byla reakce ukončena. Jistý problém představuje odpařování organické fázi po extrakci, dojde totiž k extrahování dimethylformamidu do organické fáze. Pro jeho odstranění je nutné ke konci odpařování organické fáze na vakuové odparce použít adekvátní teplotu lázně (bylo použito 75 °C). Oproti původnímu postupu nebylo residuum podrobena kolonové chromatografii. Surová látka **1** čistotu >95% (ověřeno NMR) a není nutné ji čistit před provedením následujícího kroku.

Oproti původnímu postupu<sup>40</sup> pro syntézu sloučeniny **2** byl použit větší nadbytek *p*-toluensulfonylhydrazinu, 1,1 ekvivalentu oproti původním 1,05 ekvivalentům. Tím došlo ke zkrácení reakční doby, konec reakce byl indikován pomocí TLC (MF methanol/chloroform 1/1). Dále byl postup doplněn o zahuštění reakční směsi na 1/5 jejího původního objemu před jejím

ochlazením a vyloučením produktu. Tím došlo ke zvýšení výtěžku. Pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie bylo zjištěno, že takto získaný surový produkt **2** má opět dostačující čistotu pro provedení dalšího kroku reakční sekvence (>95%).

První syntetický postup 3-diazo-1-methylindol-2-onu (**3**) z *p*-tosylhydrazonu 1-methylindol-2-onu publikoval *Moriconi*.<sup>32</sup> Původní syntetický postup používal rozklad *p*-toluensulfonylhydrazonu **2** v heterogenní fázi kapalina-kapalina. Byla vyvinuta metodika pro rozklad *p*-tosylhydrazonu **2** v heterogenní fázi pevná látka-kapalina. Má výhodu v tom, že výslednou heterogenní reakční směs není nutné separovat v dělicí nálevce a organickou fází odpařovat na vakuu. Vyloučená látka **3** se po úplné konverzi jednoduše odfiltruje. Výtěžnost modifikované (zjednodušené) reakce je stejná, jako reakce původně popsané.

Postup použitý při syntéze bromderivátu **4** je analogem syntézy používané ve výzkumné skupině doc. *Hanuska*<sup>3</sup> při syntéze -NH derivátu (3-bromoindol-2-onu). Reakce byla prováděna při stejných podmínkách, tj. při teplotě  $-10^\circ\text{C}$  -  $-5^\circ\text{C}$  reakcí diazosloučeniny **3** s nadbytkem kyseliny bromovodíkové. Na rozdíl od -NH analogu **3** však musel být použit větší nadbytek kyseliny bromovodíkové. Reakční směs totiž intenzivně pění a při použití původních 9 ekvivalentů se v průběhu reakce stává nemíchatelnou. Do reakční směsi byla tedy přilévána předem vychlazená koncentrovaná HBr tak, aby reakční směs byla po celou dobu reakce míchatelná. Výsledná suspenze bromderivátu **4** byla poté standardně promyta vodou do vymizení kyselé reakce filtrátu a usušena ve vakuovém exsikátoru.

Celkový výtěžek 3-brom-1-methylindol-2-onu byl **52%** (počítáno na výchozí isatin).

Výchozí látku **4** je nutné uchovávat v chladu, jedná se o sloučeninu velice reaktivní a tudíž nestabilní, která při laboratorní teplotě časem degraduje - byla pozorována změna teploty tání a barvy po několikaměsíčním skladování při laboratorní teplotě.

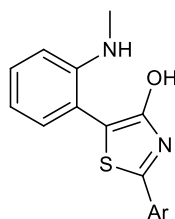
Všechny výchozí látky byly analyzovány pouze pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie za účelem ověření čistoty, jelikož jde o látky již popsané.

#### 4.1.2 *Eschenmoserova* reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu s thioamidy

V návaznosti na výsledky předchozích experimentů (viz. **Schéma 15**) byly provedeny pokusy, při nichž byly reakci s 3-brom-1-methylindol-2-onem (**4**) podrobeny arylthioamidy. Bylo zjištěno, že substituce indol-2-onového vodíku za methylskupinu vede k podstatné změně reaktivity.

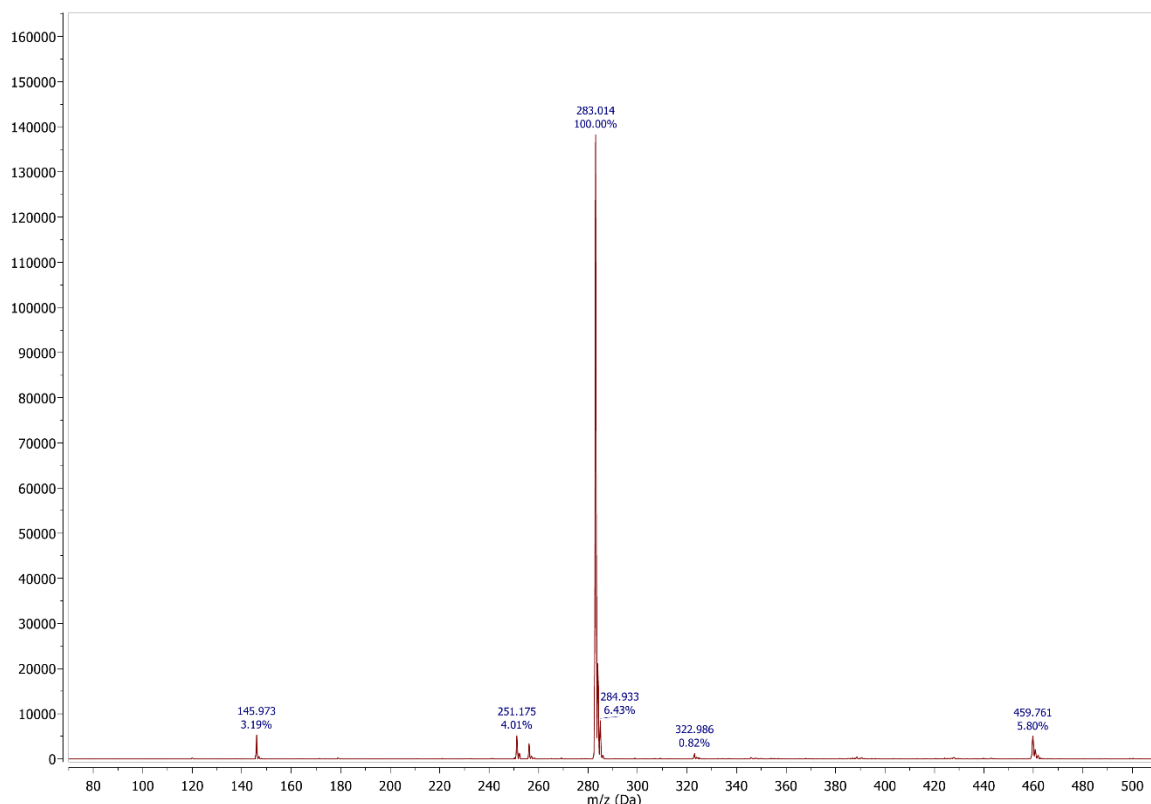
Experimentálně bylo prokázáno, že u *N*-methyl derivátů je reakční cesta vedoucí k substituovaným thiazolům překvapivě zcela potlačena, jako produkty reakce byly jednoznačně identifikovány pouze produkty *Eschenmoserovy* reakce – tj. 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-ony (**5a-d**). Zatímco u experimentů prováděných dříve s 3-bromindol-2-onem byly z reakční směsi izolovány nejprve thiazoly, které byly poté přesmykem za extruze síry převedeny na odpovídající produkty *Eschenmoserovy* reakce<sup>35</sup> (reakce byla uskutečněna změnou podmínek, konkrétně zvýšením reakční teploty), při reakci 3-brom-1-methylindol-2-onu s thioamidy nebylo toto chování pozorováno vůbec.

Byly provedeny experimenty, jejichž cílem byl pokus o izolaci, resp. prokázání existence thiazolů s předpokládanou strukturou, které je uvedena níže (**Obr. 9**). Tyto thiazoly by představovaly strukturální analogy sloučenin, které byly již dříve připraveny reakcí 3-bromindol-2-onu s arylthioamidy (**Schéma 15**).



**Obr. 9** – Struktura thiazolů, jenž byly předpokládaným produktem reakce.

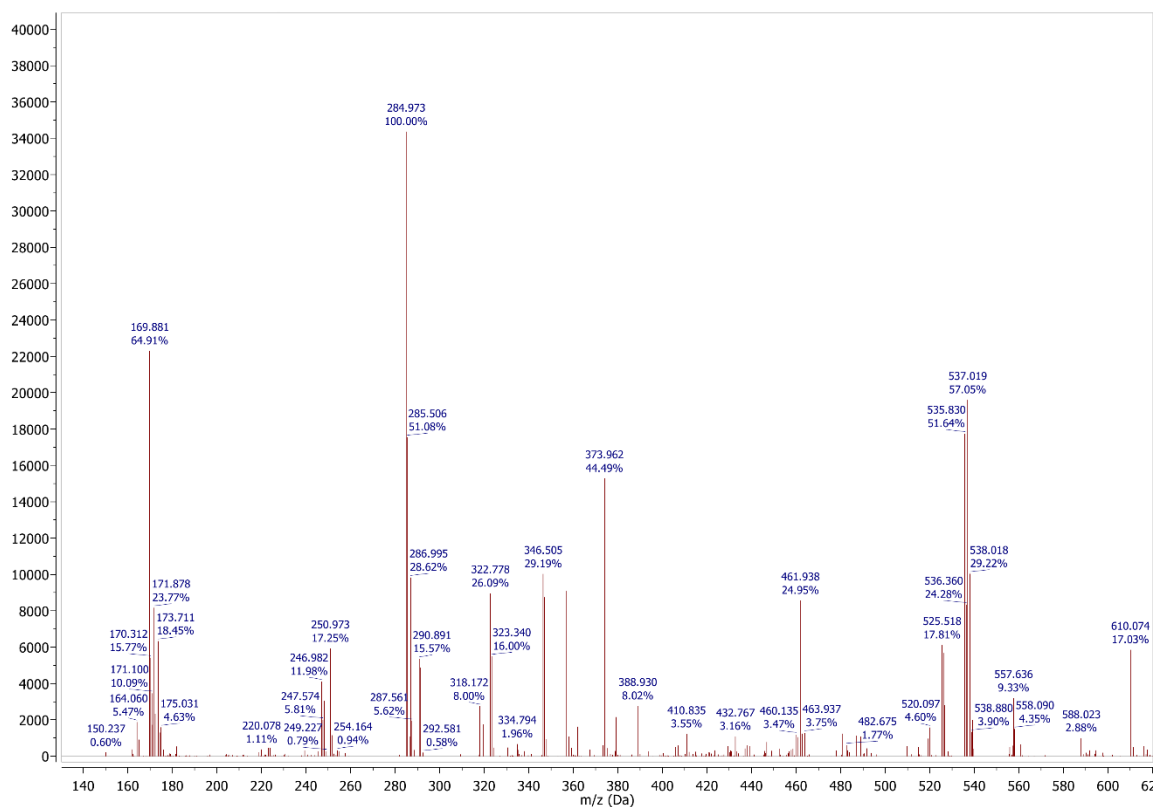
První pokus spočíval v podrobení vzorku roztoku reakční směsi thiobenzamidu s 3-brom-1-methylindol-2-onem analýze na hmotnostním spektrometru (viz. **Obr. 10**), přičemž byla analýza prováděna za velice mírných podmínek (ionizační energie <1  $\mu$ J). Příprava vzorku k analýze je popsána v kapitole 3.3.2.1 (analyzován vzorek **1**).



**Obr.10** – MS spektrum reakční směsi thiobenzamidu + 3-brom-1-methylindol-2-onu.

Ve spektru je patrný signál o  $m/z = 283,014$ , ten může odpovídat thioiminiové soli nebo 5-[2-(methylamino)fenyl]-2-fenylthiozol-4-olu – tyto dvě sloučeniny jsou konstituční izomery. Signál  $m/z = 251,175$  odpovídá produktu *Eschenmoserovy* reakce, signál  $m/z = 145,973$  odpovídá iontu z výchozího 3-brom-1-methylindol-2-onu. Toto měření potvrzuje fakt, že vznikající thioiminiová sůl reaguje ve smyslu *Eschenmoserovy* reakce, nicméně nemůže vyloučit ani potvrdit vznik a přítomnost thiazolu.

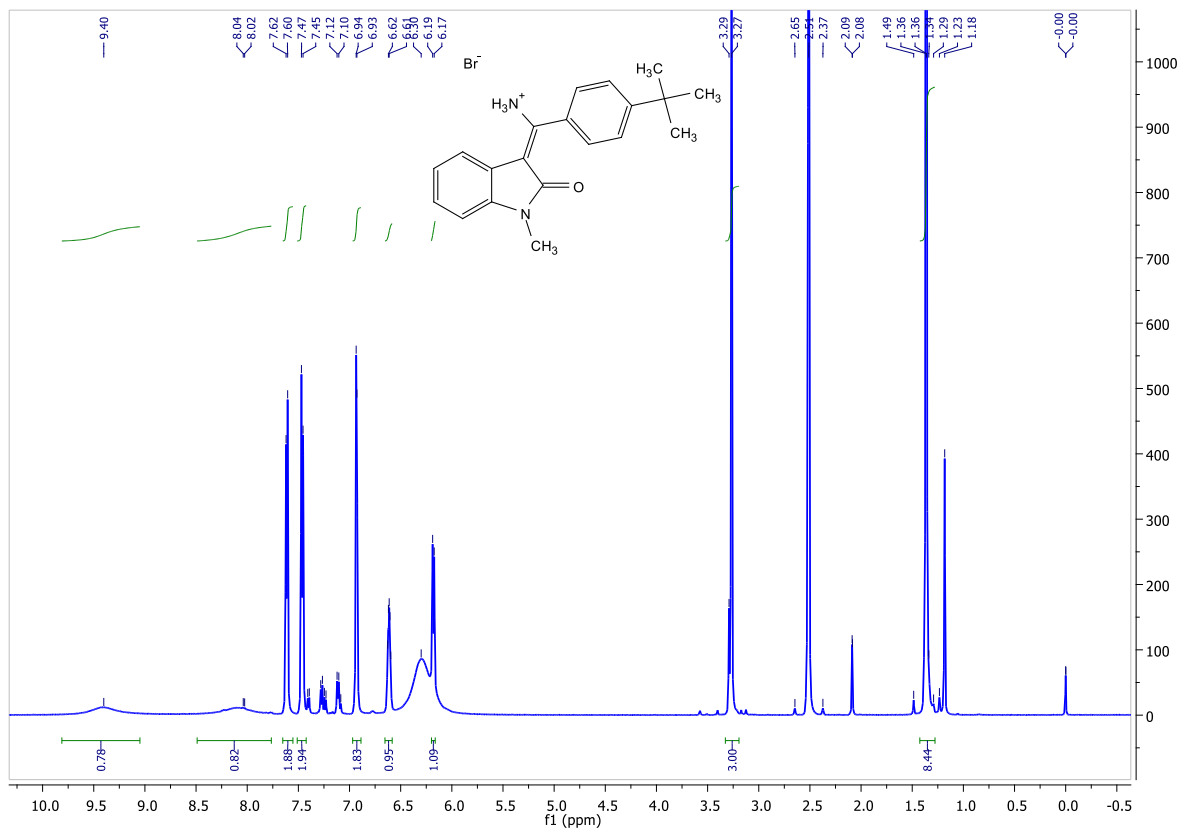
Dalším z experimentů byla analýza hydrobromidu surové látky **5a**. Při měření byla použita metoda postupného zvyšování ionizační energie za účelem fragmentace produktu reakce (konečná ionizační energie cca 5,5  $\mu$ J). Příprava vzorku k analýze je popsána v kapitole 3.3.2.1 (analyzován vzorek **2**). MS spektrum je na **Obr. 11**. Spektrum je reprezentativní a pochází z konce měření, kdy bylo dosaženo nejintenzivnější fragmentace měřeného vzorku.



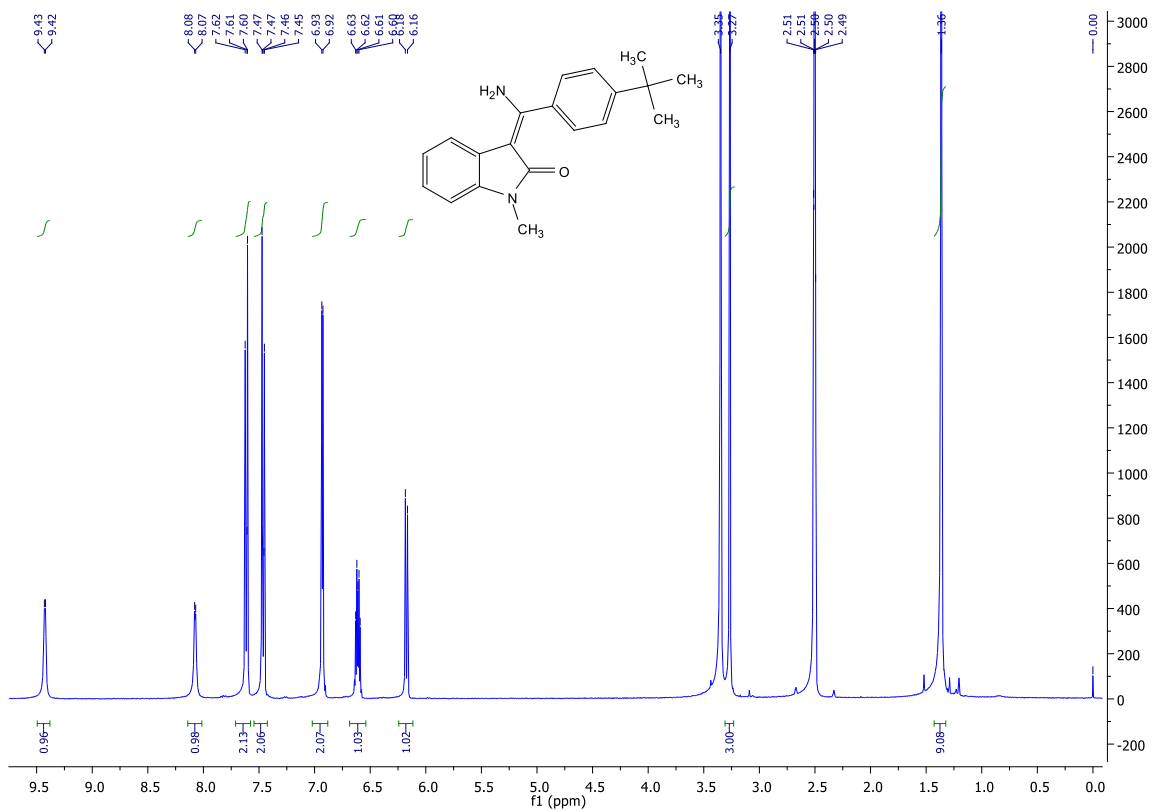
**Obr. 11** – MS spektrum reakční směsi 3-chlorthiobenzamid + 3-brom-1-methylindol-2-on (5,5  $\mu$ J).

Již od začátku měření byl ve spektru patrný signál o  $m/z = 284,973$ , který odpovídá produktu Eschenmoserovy reakce **5a**. Ten byl ve spektru patrný po celou dobu zvyšování ionizační energie. Naopak signál o  $m/z = 317$  který by odpovídal thioiminiové soli nebo 5-[2-(methylamino)fenyl]-2-(3-chlorfenyl)thiazol-4-olu, ve spektru pozorován nebyl. Z tohoto měření lze usuzovat, že surový vyloučený produkt obsahuje pouze produkt Eschenmoserovy reakce a nevyskytuje se v něm thiazol jakožto produkt *ring transformation* reakce ani výchozí thioiminiová sůl.

Surový produkt připravený metodou popsanou výše byl dále analyzován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Vzhledem k předpokládané nestabilitě thiazolů byl vzorek analyzován ihned po jeho přípravě (rozpuštění látky v  $\text{DMSO-}d_6$ ). Ani v tomto případě měření neprokázalo výskyt thiazolu, byť jen ve směsi. Jako produkty reakce byly identifikovány jednoznačně hydrobromidy 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1-methylindol-2-onů. V  $^1\text{H}$  NMR spektru surové látky **5c** si lze všimnout charakteristického rozšíření signálů kyselých vodíků s typickým posunem kolem 8,0 a 9,5 ppm (**Obr. 12**). Tento jev byl pozorován při měření všech surových produktů Eschenmoserovy reakce.



Obr. 12 –  $^1\text{H}$  NMR spektrum hydrobromidu surové látky 5c.

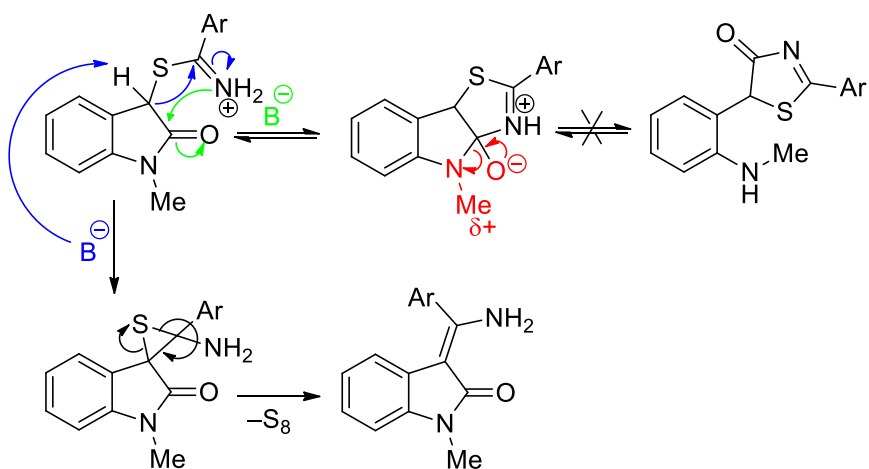


Obr. 13 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 5c po dekvarternizaci.

Naproti tomu při  $^1\text{H}$  NMR analýze 3-[1-amino(aryl)methyliden]indol-2-onů ve formě volných bazí jsou tyto signály mnohem užší a tedy lépe pozorovatelné, viz **Obr. 13**.

Tyto experimenty tedy prokazují, že u reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu s arylthioamidy je reakční cesta vedoucí k produktům *Eschenmoserovy* reakce upřednostněna a reakční cesta „ring transformation“ vedoucí k substituovaným thiazolům je zcela potlačena.

Předpokládaný mechanismus přesmyku thioiminiové soli na thiazol je znázorněn na schématu níže (viz. **Schéma 17**). Vysvětlení, proč vzniká pouze produkt *Eschenmoserovy* reakce může být následující: volný elektronový pár dusíku thioiminiové soli atakuje karbonylový uhlík indol-2-onového skeletu. Dochází ke vzniku tricyklického intermediátu, u něhož poté dochází k přesunu elektronového páru z jeho deprotonované hydroxyskupiny a k odstoupení anilinové skupiny. Právě její substituent může mít rozhodující vliv na průběh reakce. Zatímco u intermediátů vzniklých z thioiminiových solí, kde je na dusíku indol-2-onového skeletu navázán pouze vodík, může proběhnout odstoupení anilinové skupiny. Tento fakt byl již dříve experimentálně ověřen.<sup>3</sup> V případě, že je na dusíku indolonového skeletu navázána methylskupina, která je elektrondonorní skupinou, dojde k situaci, kdy methylskupina svým kladným indukčním efektem zvyšuje elektronovou hustotu na dusíku *N*-methylanilinového zbytku. Ten se tak stává horší odstoupující skupinou a přesmyk (ve schématu níže zvýrazněno červeně, viz. **Schéma 17**), jehož produktem by byl thiazol, se stává energeticky nevýhodný. Jelikož se neodštěpí *N*-methylanilinový zbytek, nedochází ke vzniku thiazolu a je upřednostněna energeticky méně náročná přeměna thioiminiové soli mechanismem *Eschenmoserovy* reakce (viz. **Schéma 2**, **Schéma 17**).

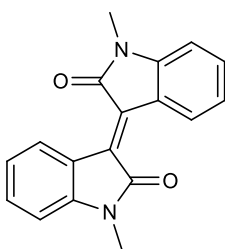


**Schéma 17** – Možné mechanismy transformace thioiminiové soli.

#### 4.1.2.1 Volba báze

Dále byly provedeny pokusy, jejichž cílem bylo získání čistých 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1-methylindol-2-onů ve formě báze (**5a-d**). Vzhledem k tomu, že diskutovaná reakce poskytuje surové produkty *Eschenmoserovy* reakce ve formě kvarterních solí (hydrobromidů), bylo nutné provést dekvaternizaci. Jedním z důvodů je i fakt, že jako metoda čištění byla zvolena kolonová (sloupcová) chromatografie a tu nelze provádět, resp. jen velice obtížně a za specifických podmínek, s látkami ve formě kvartérních amoniových solí.

Ač se na první pohled jeví tato reakce jako velice triviální (jedná se v podstatě o neutralizaci, tj. proton-transfer reakci), bylo zjištěno, že hydrobromidy 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1-methylindol-2-onů mají tendenci za přítomnosti silné báze degradovat, jako reakční produkty této reakce jsou předpokládány<sup>35</sup> isoindiga se strukturou uvedenou níže (**Obr.14**). Přítomnost isoindiga lze indikovat snadno vizuálně – jedná se o látku, která má v roztocích intenzivně červenou barvu.

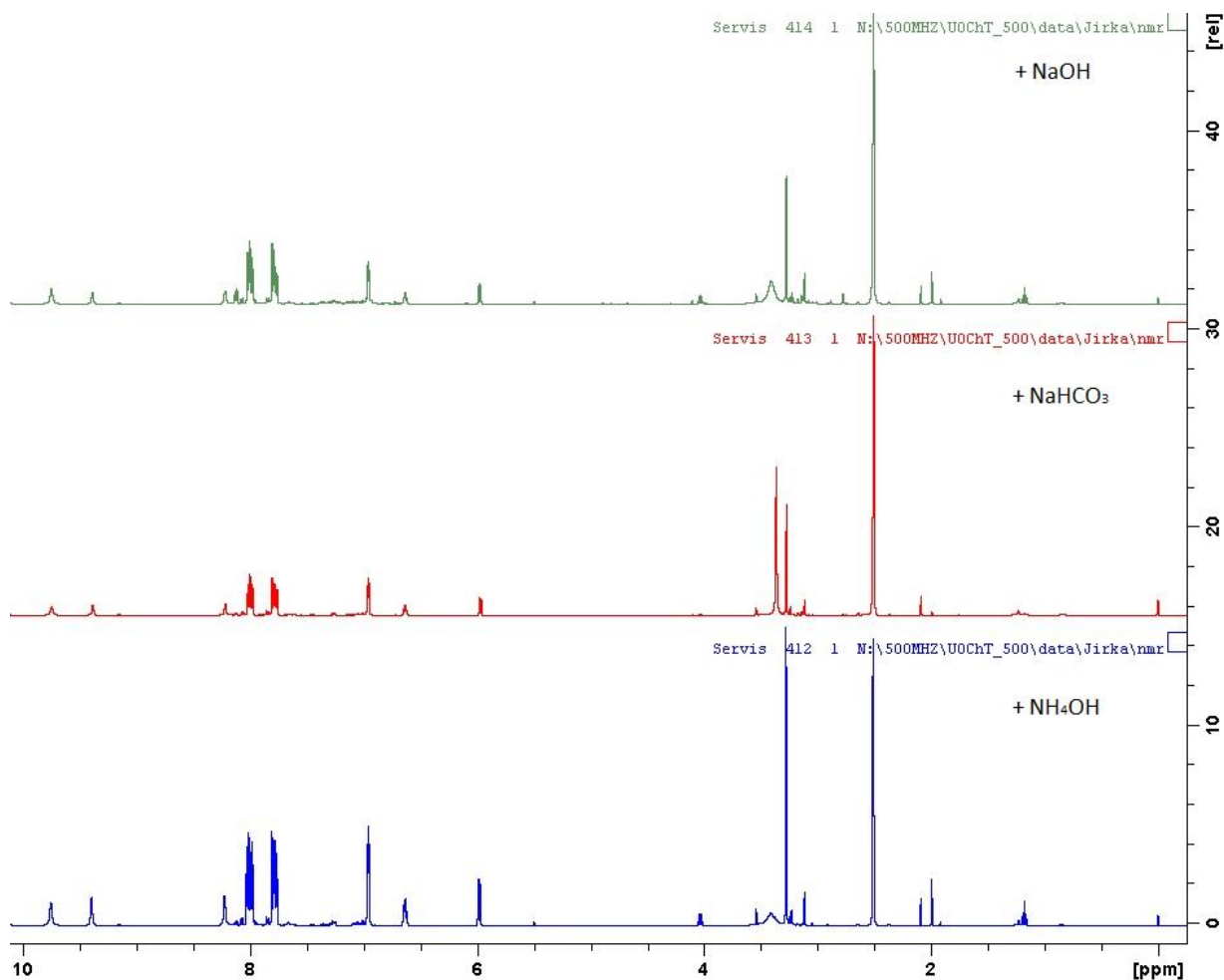


**Obr. 14** - Navržená struktura vznikajícího isoindiga.

Ze stejného důvodu je pro úspěšný průběh *Eschenmoserových* reakcí nutné použití bezvodých rozpouštědel, v nichž se reakce provádí (v tomto případě acetonitrilu, který byl, jak je uvedeno v kap. 4.1., vysušen stáním nad molekulovými sítý 4Å), stejně tak je zcela zásadní dokonalé vysušení všech látek účastnících se *Eschenmoserovy* reakce. Při použití rozpouštědel/reaktantů obsahujících zbytkovou vlhkost dochází k preferenci vedlejších reakčních cest, zejména degradaci výchozího 3-brom-1-methylindol-2-onu **4** na isoindigo<sup>3</sup> (**Obr. 14**). Tato vedlejší reakce byla pozorována při reakcích  $-NH$  analogu<sup>35</sup> a projevuje se charakteristickým zčervenáním roztoku a znatelným snížením výtěžku prováděné reakce.

Proto bylo provedeno několik experimentů s cílem získat 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1-methylindol-2-ony ve formě báze. Kvůli zamýšlenému provedení reakce v heterogenní fázi, kdy fází kapalnou je voda, byla k neutralizaci (dekvaternizaci) hydrobromidu použita báze

anorganické povahy (kvůli dobré rozpustnosti ve vodě). Byly provedeny pokusy se třemi bázemi – hydroxidem sodným (5% roztok), amoniakem (25% roztok) a hydrogenuhličitanem sodným (10% roztok). Pracovní postup je uveden výše (viz. postupy pro získání čistých látek **5a-d** ve formě báze v kapitole 4.3.). Získané látky byly analyzovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Bylo zjištěno, že použití všech tří bází vede k požadované reakci, tedy neutralizaci hydrobromidu – převedení kvarterní soli na bázi (viz. **Obr. 12** a **Obr. 13**).



**Obr. 15** –  $^1\text{H}$  NMR spektra látky **5a** po dekvarternizaci pomocí různých bází.

Spektra jsou téměř identická, navzdory tomu, že vizuálně se vzorky jevily podstatně odlišné (vzorek získaný reakcí hydrobromidu **5a** s hydroxidem sodným byl zbarven intenzivně červeně), příčinou může být i relativně nízká citlivost NMR spektroskopie. Při provádění dekvarternizace bylo pozorováno, že při použití silné báze (konkrétně hydroxidu sodného) dochází rychleji k degradaci hydrobromidu suspendovaného v roztoku. Produkt, jenž byl získán neutralizací kvarterní soli hydroxidem sodným byl silně zbarven do červena isoindigem. Proto bylo rozhodnuto, že jako báze bude použit hydrogenuhličitan sodný – k neutralizaci

kvarterní sole postačuje, reakce je dostatečně rychlá a v jeho přítomnosti degradují produkty nejpomaleji.

Na základě těchto pozorování byla vypracována metoda na izolaci látek **5a-d** ve formě báze. Zvolena byla poměrně neobvyklá metoda extrakce suspenze vzniklého produktu z vodné fáze do organické, jako organická fáze byl zvolen ethyl-acetát, jelikož jsou v něm sloučeniny **5a-d** dobře rozpustné, extrakce byla zkoušena i s diethyletherem, avšak pro dokonalé extrahování bylo potřeba mnohem větší množství rozpouštědla. Tímto postupem dojde k odstranění bromidu sodného, který vzniká při neutralizaci kvarterních solí (hydrobromidů) surových 3-[1-amino(aryl)methyliden]-1-methylindol-2-onů. Po odpaření organické fáze byly produkty analyzovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Byla zjištěna jejich čistota okolo 95%, proto bylo rozhodnuto o dalším čištění. Jako čistící operace byla zvolena kolonová chromatografie, nejlepší dělení probíhalo při použití čistého ethyl-acetátu jako mobilní fáze. S využitím těchto poznatků byl vypracován Postup 1 (viz. kapitola 4.3.).

Během provádění chromatografií byla pozorována skutečnost, že minoritně zastoupený vedlejší produkt reakce (isoindigo, **Obr.14**) se při kolonové chromatografii drží v čele sloupce, na základě tohoto poznatku byl vypracován Postup 2 (viz. kapitola 4.3.) spočívající ve vymytí hlavního podílu nečistot promytím surového produktu studeným (0 °C) ethyl-acetátem. Velkou výhodou této metody je značná úspora času při čištění produktu. Nevýhodou je fakt, že výsledné produkty dosahují menší čistoty, než látky zpracované metodou A. Jako hlavní nečistota se v takto připravených látkách vyskytuje koloidní síra, která vzniká při extruzi z thiiranového cyklu (viz. **Schéma 5**) a isoindigo. Jelikož při reakci nebyl použit žádný thiofil, síra se vyskytuje v reakční směsi volně a má tendenci k inkluzi do vznikajících krystalových mřížek. Tento fakt byl zjištěn při provádění elementárních analýz vzorků zpracovaných touto metodou (vzorky obsahovaly přibližně 0,5% síry), při měření vzorků na NMR spektrometru se látkyjevily čisté (síra není detekovatelná NMR spektroskopii).

V návaznosti na tato zjištění byly syntetizovány a charakterizovány čtyři deriváty 3-[1-amino(aryl/alkyl)methyliden]-1-methylindol-2-onů **5a-d**. Tři deriváty byly syntetizovány reakcí s aromatickými thioamidy (**5a-c**), z nichž dva mají na jádře elektrondonorní skupiny, konkrétně methyl (**5b**) a *terc*-butyl (**5c**). Další z připravených derivátů, **5a**, byl syntetizován z 3-chlorthiobenzamidu – tedy obsahuje chlor jakožto elektronakceptorní substituent. Další

sloučeninou je derivát **5d**, připravený reakcí 3-brom-1-methylindol-2-onu s thioacetamidem, nejjednodušším alifatickým thioamidem.

#### 4.1.3 Závěr

S přihlédnutím ke všem faktům, které byly v této práci uvedeny lze konstatovat, že *Eschenmoserova* reakce se jeví jako velice vhodná pro přípravu 3-[1-amino(aryl/alkyl)methyliden]indol-2-onů. Všechny doposud publikované syntézy těchto sloučenin<sup>23-26</sup> používají jako reaktanty na přípravu poměrně složité prekurzory, drahé katalyzátory (např. s obsahem palladia), nebo dosahují nízkých výtěžků (viz. kapitola 2.3.1 - 2.3.3.). Velkou výhodou použití *Eschenmoserovy* reakce jsou mírné podmínky, při nichž probíhá. Dosud popsané syntézy popisují použití poměrně drastických reakčních podmínek – dlouhého zahřívání, použití ultrazvuku atp., což značně komplikuje syntézu. *Eschenmoserova* reakce probíhá za laboratorní teploty a není při ní třeba použití žádných dalších katalyzátorů ani činidel. Reakce 3-brom-1-methylindol-2-onu **4** s thioamidy je poměrně atypická i tím, že není třeba používat žádný thiofil. I to v konečném důsledku představuje jednu z výhod použití *Eschenmoserovy* reakce. Další výhodou, vyplývající z experimentálních dat, představuje fakt, že reakce může být využita při syntéze mnoha strukturních analogů těchto sloučenin, jelikož probíhá s dobrými výtěžky - s thioamidy alifatickými (**5d**) i aromatickými (**5a-c**), a to jak s elektrondonorně (**5b-d**), tak s elektronakceptorně (**5a**) substituovanými. Při provádění reakce nebylo pozorováno znatelné exotermní nebo endotermní chování. Pro vypracovanou metodiku zpracování surových produktů (Postup 1 v kapitole 4.3.) připadá v úvahu i syntéza větších množství těchto látek, jelikož při čištění nebyla využita kolonová chromatografie ani další ekonomicky a časově náročný proces. Využití *Eschenmoserovy* reakce při syntéze 3-[1-amino(aryl/alkyl)methyliden]indol-2-onů má tedy velký potenciál a nic nebrání jeho využití v praxi, v určité modifikaci například při syntéze látek s inhibiční aktivitou na tyrosin-kinázových receptorech.

## 5 Seznam použité literatury

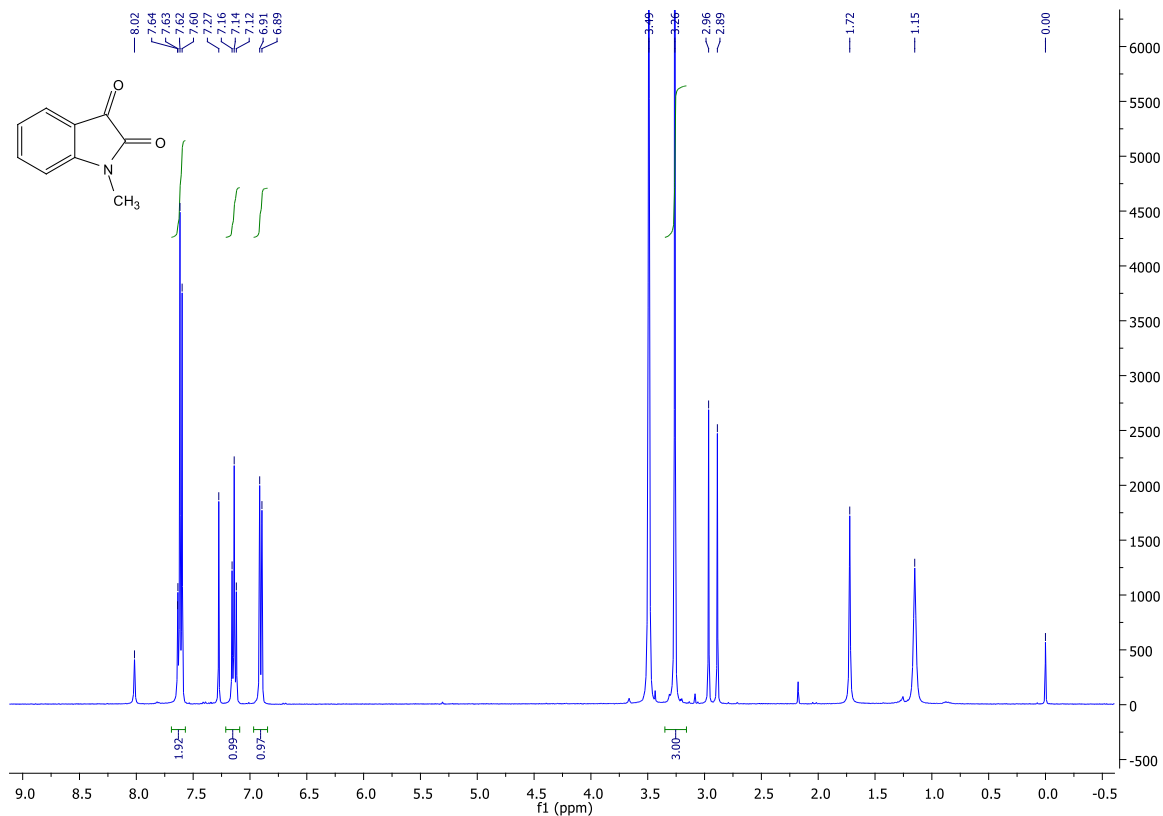
- [1] Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.; Farmakochemie. 3. upravené a rozšířené vydání. Praha: VŠCHT, **2015**.
- [2] Thurston, D.; Kinase drug discovery. Cambridge: RSC, **2012**.
- [3] Kammel, R.; Tarabová, D.; Růžičková, Z.; Hanusek, J.; Reaction of brominated benzolactone/lactam with 4-methoxythiobenzamide and thiourea: an *Eschenmoser* coupling reaction, ring transformation, or dimerization? *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (20), 2548-2550.
- [4] Roth, M.; Dubs, E.; Götschi, E.; Eschenmoser, A.; Sulfidkontraktion via alkylative Kopplung: eine Methode zur Darstellung von  $\beta$ -Dicarboxylderivaten. *Helv. Chim. Acta.* **1971**, 54 (2), 710-734.
- [5] Shiosaki, K.; The Eschenmoser Coupling Reaction. *Comp. Org. Synth.*; Trost, B. M., Ed.; Pergamon Press: Oxford, **1991**; Vol. 2, 865–892.
- [6] Shiosaki, K.; Fels, G.; Rapport, H.; Versatile beta-ketoester and beta-ketonitrile synthesis through sulfur contraction. *J. Org. Chem.* **1981**, 46 (16), 3230-3234.
- [7] Roth, B.; Laube, R.; Tidwell, M.; Ruckmann, B.; Extrusion of Sulfur from [(Acylmethyl)thio]pyrimidinones. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3651-3657.
- [8] Sauv e, G.; Berre, N.; Zacharie, B.; Carboxyl-modified amino acids and peptides: A convenient route for the synthesis of difunctionalized enamines from thioamides via thioiminium salts. *Tetrahedron.* **1988**, 29, 2299-2231.
- [9] Ireland, R.E.; Brown, F.R.; Macrocyclic lactone formation through sulfide contraction. Synthesis of (+)-diplodialide A. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1968-1972.
- [10] Fischli, A.; Eschenmoser, A.; A synthetic route to Metal-Free Corrins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6 (10), 866-868.
- [11] Petterson, B.; Hasimbegovic, V.; Bergman, V.; One-pot Eschenmoser episulfide contractions in DMSO: Applications to the synthesis of fuligocandins A and B and a number of vinyllogous amides. *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (6), 1554-1561.

- [12] Knott, Edward B. Compounds containing sulphur chromophores. Part I. The action of bases on heterocyclic sulphide quarternary salts. *J.Chem. Soc.* **1955**, 916-927.
- [13] Hussaini S. R.; Hammond G. B.; Eschenmoser coupling reaction of selenoamides, Synthesis of enamino esters. *Arch. Org. Chem.* **2008**, 13, 129-136.
- [14] Nogueira, Ch.; Gilson, Z.; Joao, B.T. R.; Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (12), 6255-6286.
- [15] Gray, I.P., et al.; A New Synthesis of (PhPSe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Woollins Reagent) and Its Use in the Synthesis of Novel P–Se Heterocycles. *Chem. – Eur. J.* **2005**, 11 (21), 6221-6227.
- [16] Mason, T.J.; Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26 (6), 443-451.
- [17] Koduri, N.D.; Hileman, J.D.; Scott, H.; Hoang, P.; Robbins, A.; Bowers, L.; Tsebaot, K.; Miao, M.; Castaneda, M.; Coffin, M.; Wei, G.; Acceleration of the Eschenmoser coupling by sonification: Efficient synthesis of enaminoes. *RSC Adv.* **2013**, 3, 181-188.
- [18] Cox, M.; Nelson, D.; Lehninger, A.; *Principles of Biochemistry*, 6<sup>th</sup> edition. W. H. Freeman & Co, **2008**.
- [19] Eckhart, W.; Hutchinson, M.A.; Hunter, T.; An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell.*, **1979**. 18 (4), 925-933.
- [20] Sun, L.; Tran, N.; Tang, F.; App, H.; Hirth, P.; McMahon, G.; Tang, Ch.; Synthesis and Biological Evaluations of 3-Substitued Indolin-2-ones: A novel Class of Tyrosine Kinase Inhibitors That exhibit Selectivity toward Particular Receptor Tyrosine Kinases. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (14), 2588-2603.
- [21] 3-(Arylamino)methylene-1,3-dihydro-2H-indol-2-ones as kinase inhibitors. US 2003199478 A1. 23.10.2003.
- [22] Sarges, R.; Howard, H.R.; Koe, B.K., Weissman, A.; A Novel Class of „GABAergic“ Agents: 1-Aryl-3-(aminoalkylidene)oxindoles. *J. Med. Chem.* **1989**, 32 (2), 437-444.
- [23] Stauss, U.; Härter, H.; Neuenschwander, M.; Schindler, O.; Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Acetylendicarbonsäure-estern and 2-Methyl-4-phenyl-chinazolin-3-oxid. *Helv. Chim. Acta.* **1972**, 55, 771-780.

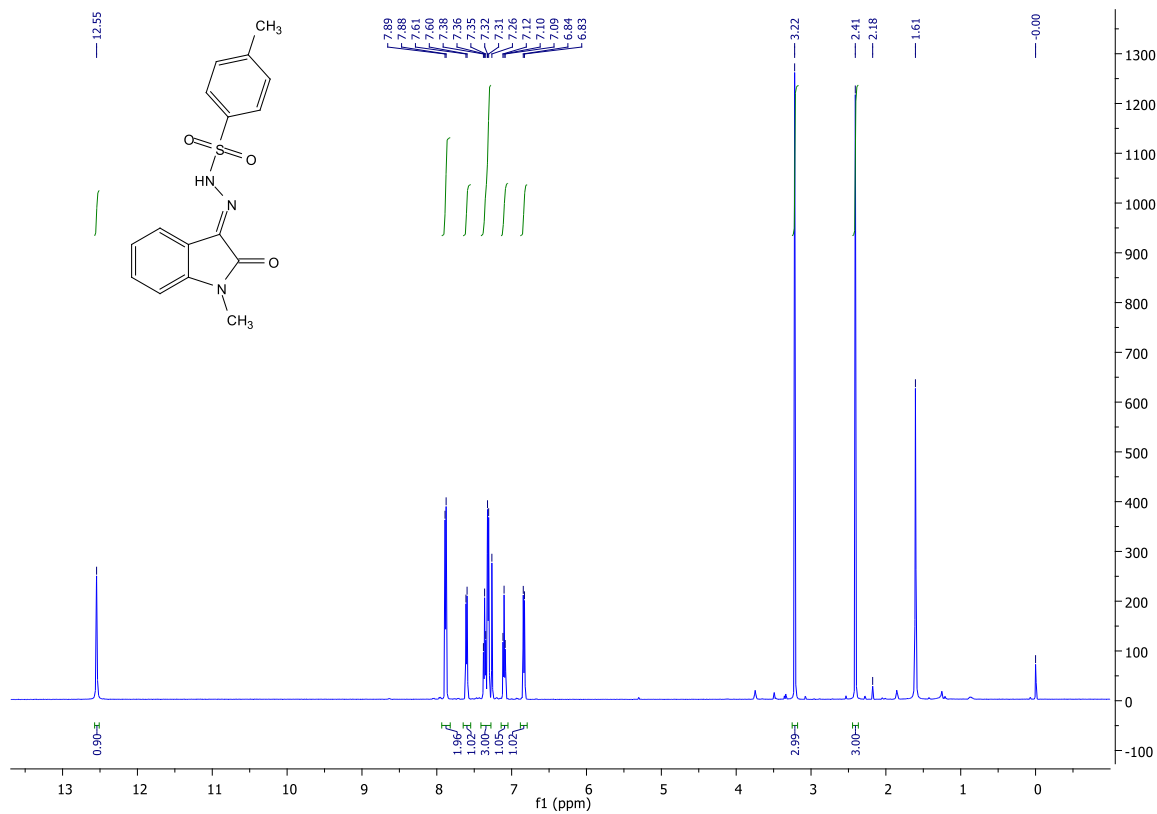
- [24] Oxindoles as Kinase Inhibitors. Inventors: Burgdorf, Bruge, Greiner, Kordowicz, Sirrenberg, Zenke. US 2009131506 A1. 21.5.2009.
- [25] Cantagrel, G.; Carné-Carvalet, de B.; Meyer, Ch., Cossy, J.; Iron Trichloride-Promoted Cyclization of o-Alkynylaryl Isocyanates: Synthesis of 3-(chloromethylene)oxindoles. *Org. Lett.* **2009**, 11 (19), 4262-4265.
- [26] Miura, T.; Toyoshima, T.; Takahashi, Y.; Murakami, M.; Stereoselective Oxindole Synthesis by Palladium Catalyzed Cyclization Reaction of 2-(alkynyl)aryl Isocyanates with Amides. *Org. Lett.* **2009**, 11 (10), 2141-2143.
- [27] Manaka, A. et. Al. Synthesis of aromatic thioamide from nitrile without handling of gaseous hydrogen sulfide. *Synth. Comm.* **2005**, 35 (5), 761-764.
- [28] Poeschl, A.; Mountford, D.M.; A facile manganese dioxide mediated oxidation of primary benzylamines to benzamides. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 16 (2), 624-627
- [29] Sandeep, K.; Saurabh, S.; Pralay, D.; Supported Gold Nanoparticles-Catalyzed Microwave-Assisted Hydration of Nitriles to Amides under Base-Free Conditions. *Adv. Synth. Cat.* **2016**, 358 (18), 2889-2894.
- [30] Rajeev, S.; Lee, G.J.; Yong, R. Synthesis of diverse isatins: Via ring contraction of 3-diazoquinoline-2,4-diones. *RSC Advances.* **2016**, 6 (68), 63782-63787.
- [31] Gui, J.; Chen, G.; Cao, P.; Liao, J.; Rh(I)-catalyzed asymmetric addition of arylboronic acids to NH isatins. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2012**, 23 (8), 554-563
- [32] Moriconi, M.; Murray, J.J.; Pyrolysis and Photolysis of 1-Methyl-3-diazoindole. Base decomposition of Isatin 2-Tosylhydrazone. *J. Org. Chem.* **1964**, 29 (12), 3577-3584.
- [33] Nicolle, S.M.; Moody, C.H.J.; Potassium N-iodo p-toluensulfonamide (TsNIK, iodamine-T): A new reagent for the oxidation of hydrazones to diazo compounds. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20 (15), 4420-4425.
- [34] Zheng, P.; Ouyang, Q., Nie, S.; Shuai, L.; Yuan, Y.; Jiang, K.; Liu, T.; Chen, Y.; Enantioselective [4 + 1] Annulation Reactions of  $\alpha$ -Substituted Ammonium Ylides To Construct Spirocyclic Oxindoles. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (29), 9390-9399.

- [35] Kammel, R.; Tarabová, D.; Brož, B.; Hladíková, V.; Hanusek, J.; Formation of 3-[amino(aryl)-methylidene]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-ones involving formation of 2-aryl-5-(2-aminophenyl)-4-hydroxy-1,3-thiazoles. *Tetrahedron*. **2017**, 73 (14), 1861-1866.
- [36] Cherkasov, R. A.; Kutyrev, G. A.; Pudovik, A. N. Organothiophosphorus reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*. **1985**, 41 (41), 2567.
- [37] Parrick, J.; Arbaeyah, Y.; Yizun, J.; A convenient conversion of indoles to 3,3-dibromooxindoles and then to isatins. *Tetrahedron*. **1984**, 25 (29), 3099-3100.
- [38] Sumpter, C.W.; Miller, M.; Hendrick, L.N.; A study of Certain Brominated Derivatives of Oxindole. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67 (10), 1656-1658.
- [39] Majik, M.S.; Rodriguez, C.; Mascarenhas, S.; D'Souza, L.; Design and synthesis of marine natural product-based 1*H*-indole-2,3-dione scaffold as a new antifouling/antibacterial agent against fouling bacteria. *Bioorg. Chem.* **2014**, 58, 89-95.
- [40] Hepples, Ch.; Murphy, G.K.; Synthesis of 3,3-dichloro-2-oxindoles from isatin-3-tosylhydrazone and (dichloroiodo)benzene. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (35), 4971-4974.

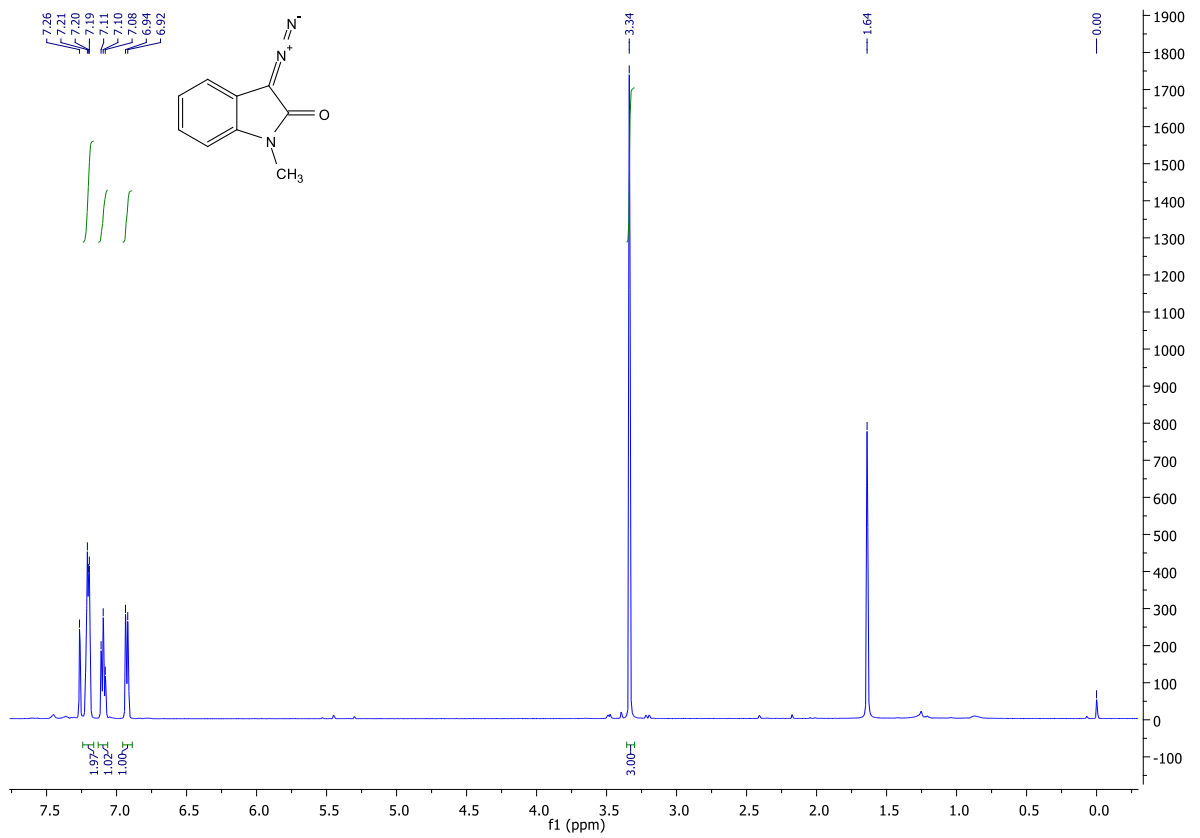
## **Přílohy**



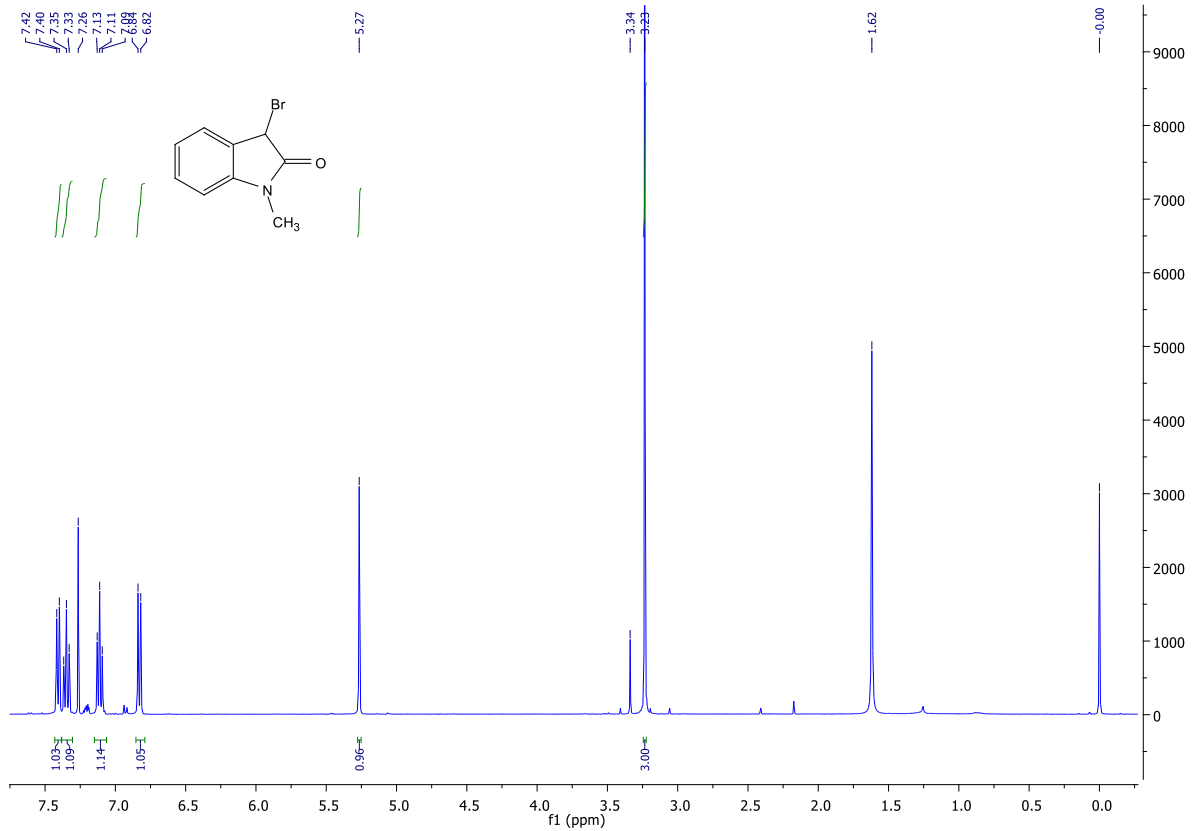
<sup>1</sup>H NMR spektrum 1-methyl-indol-2,3-dionu. (1).



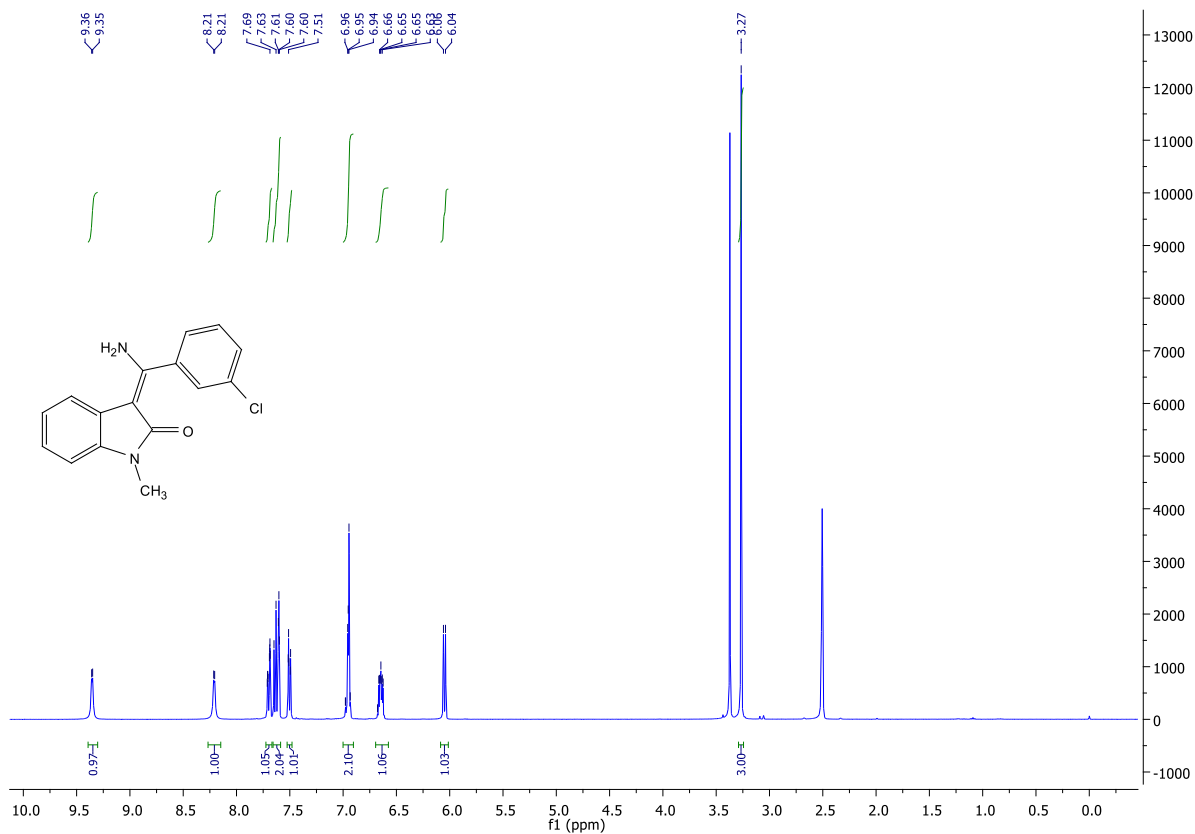
<sup>1</sup>H NMR spektrum 3-tosylhydrazonu 1-methylindol-2-onu (2).



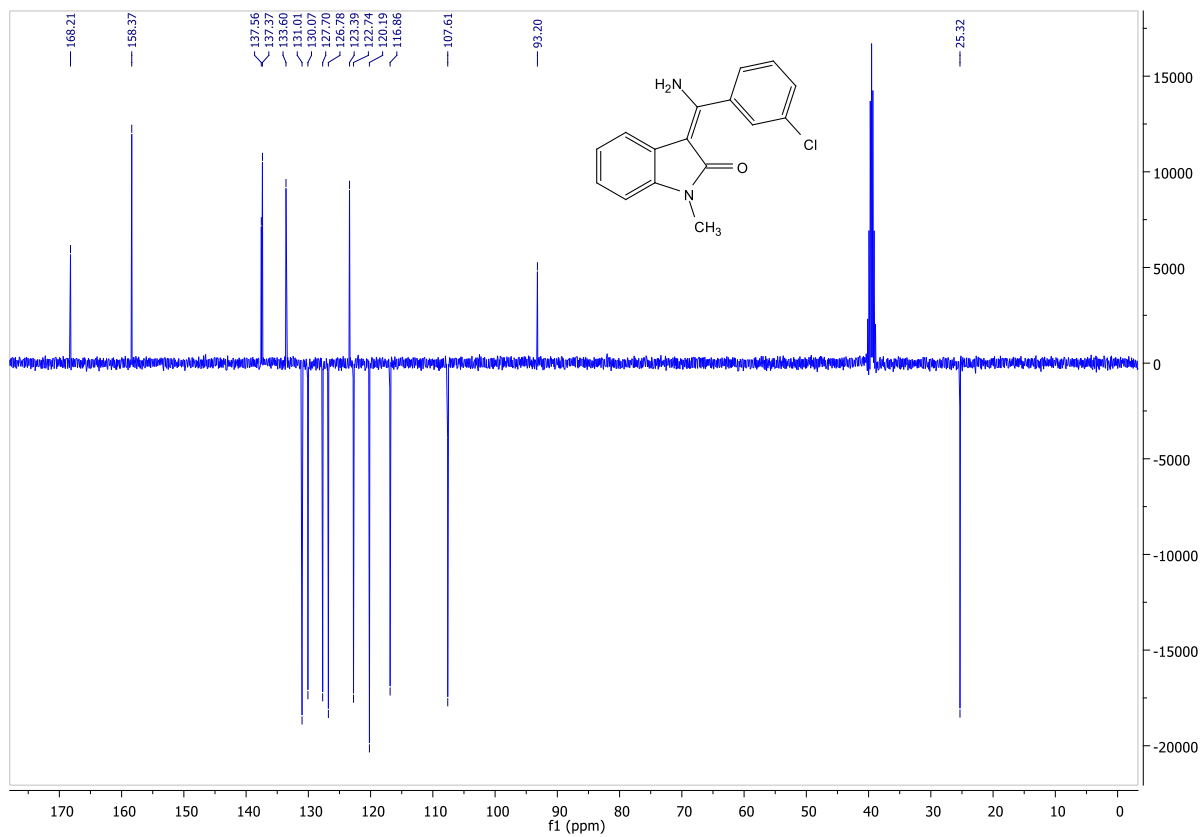
<sup>1</sup>H NMR spektrum 3-diazo-1-methylindol-2-onu (3).



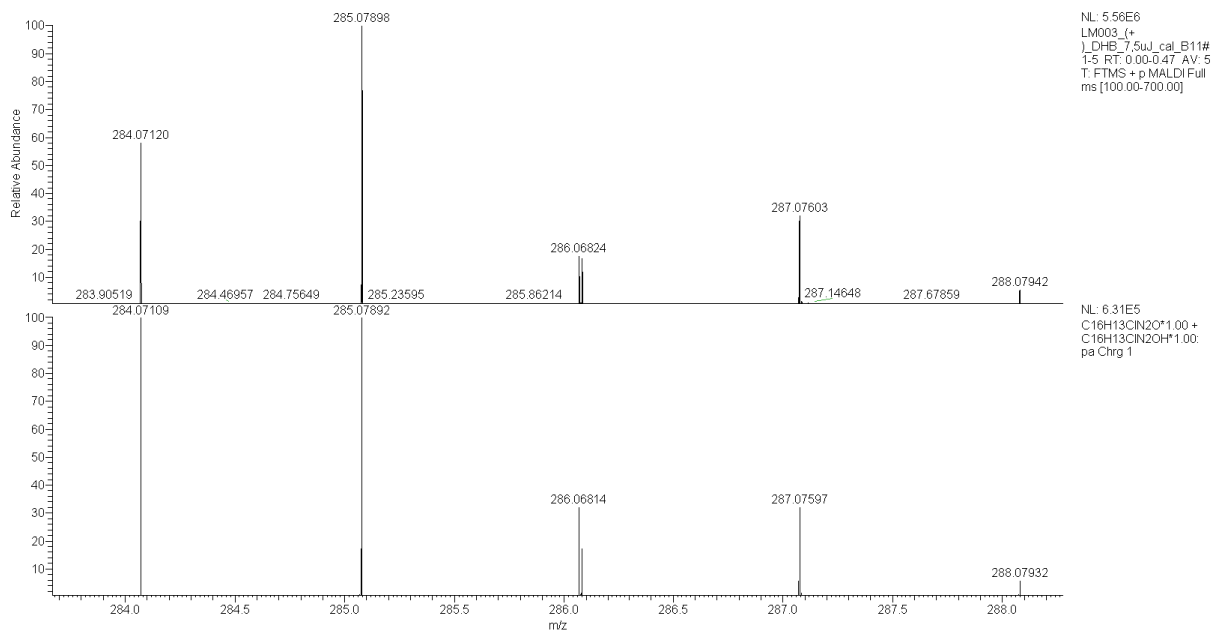
<sup>1</sup>H NMR spektrum 3-brom-1-methylindol-2-onu (4).



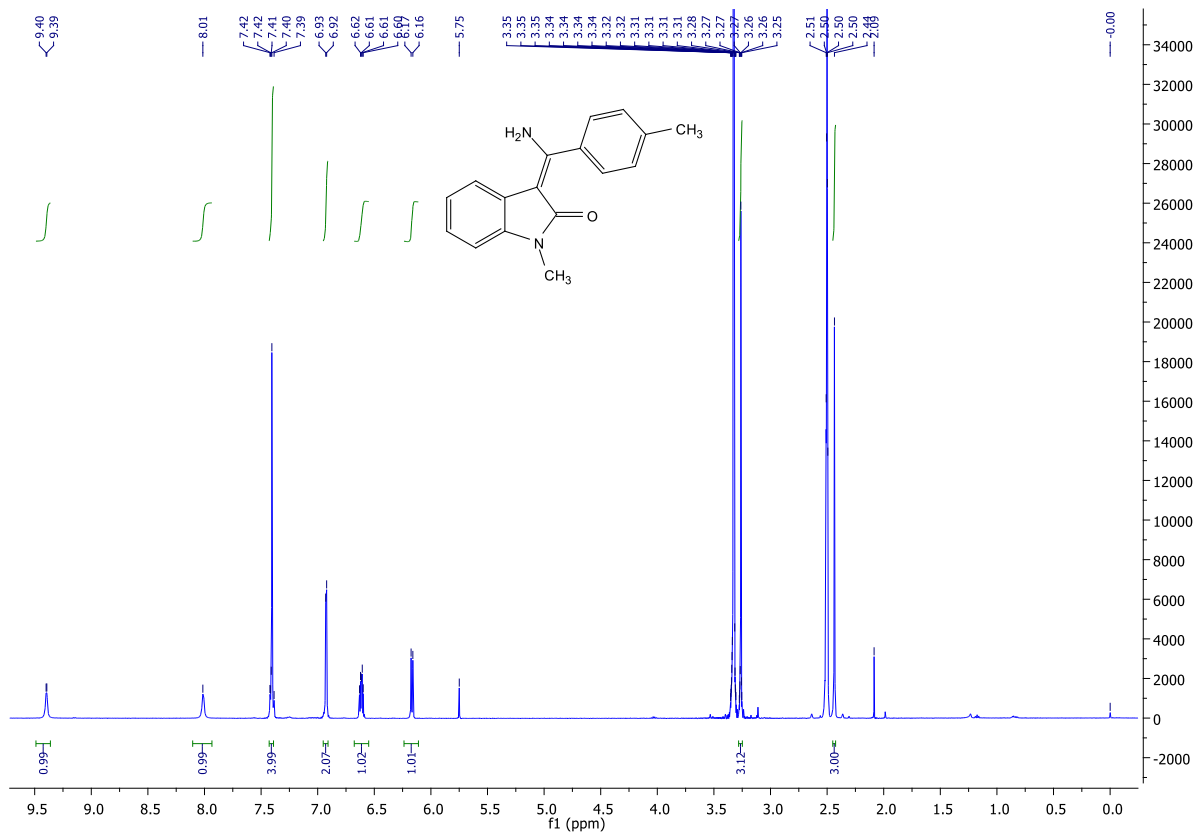
<sup>1</sup>H NMR spektrum látky 5a.



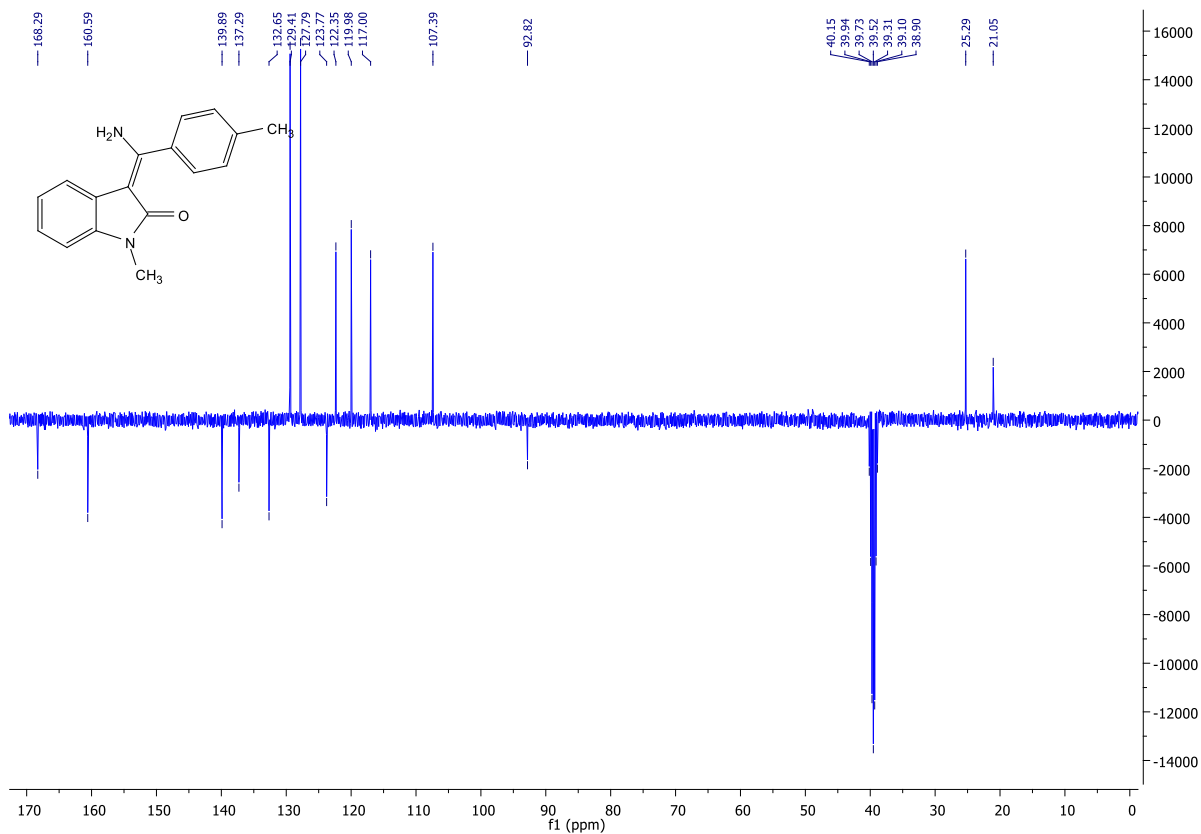
<sup>13</sup>C NMR spektrum látky 5a.



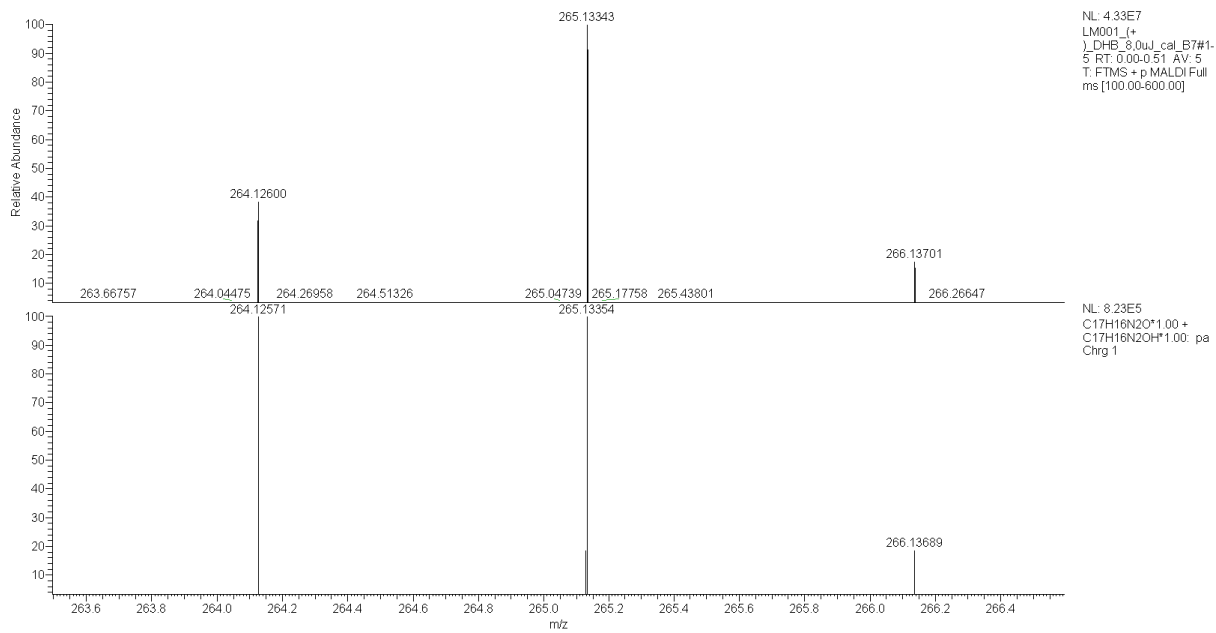
HRMS spektrum\* látky 5a.



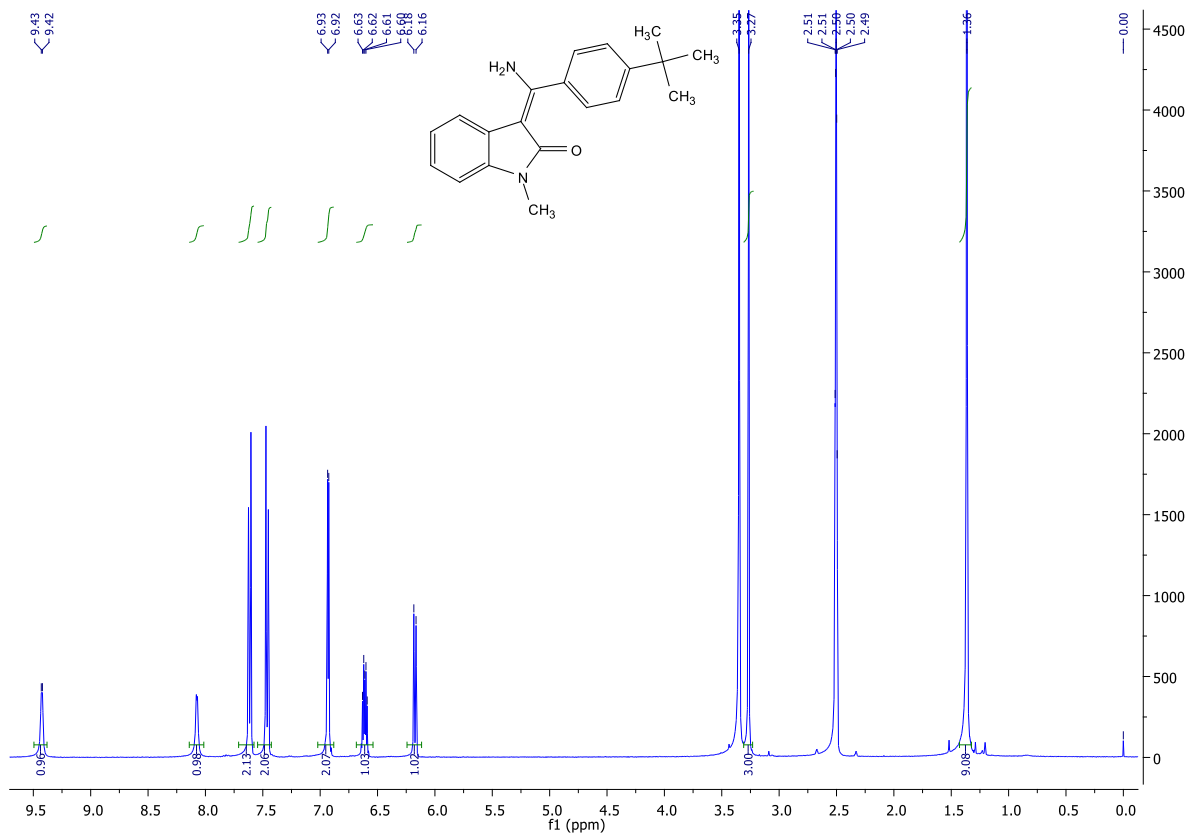
<sup>1</sup>H NMR spektrum látky 5b.



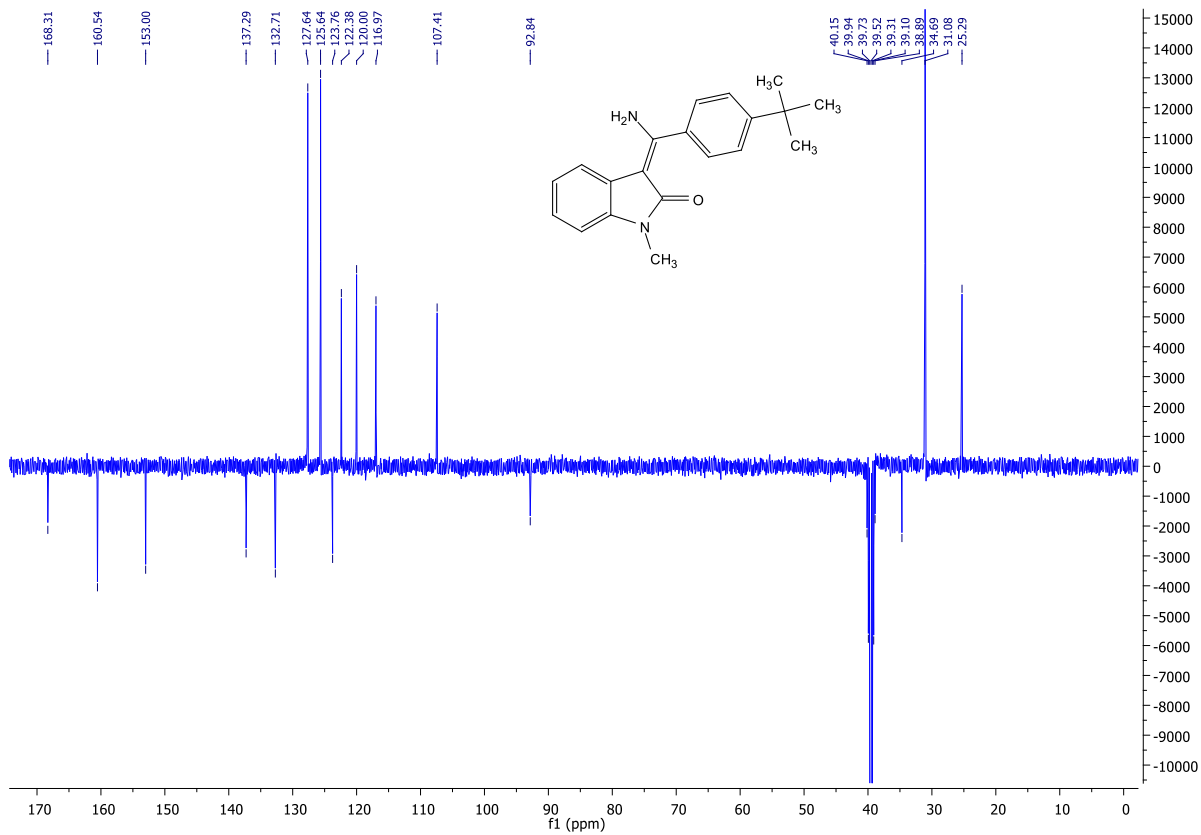
<sup>13</sup>C NMR spektrum látky **5b**.



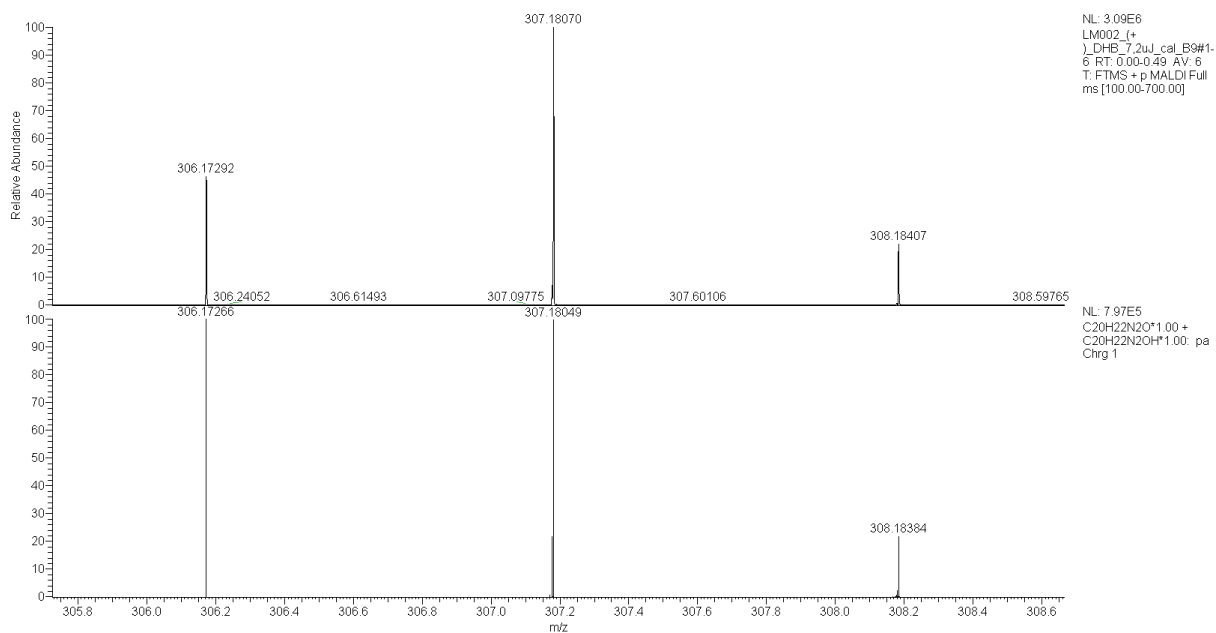
HRMS spektrum\* látky **5b**.



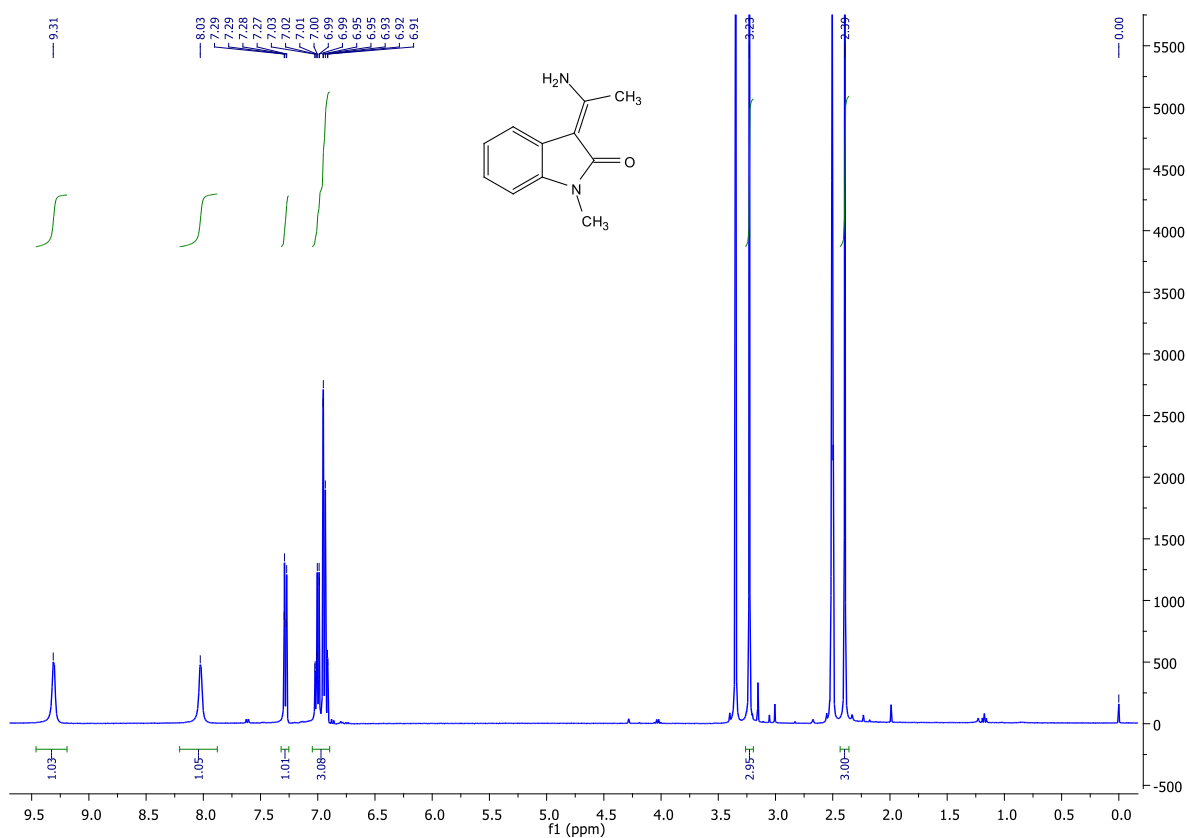
**<sup>1</sup>H NMR spektrum látky 5c.**



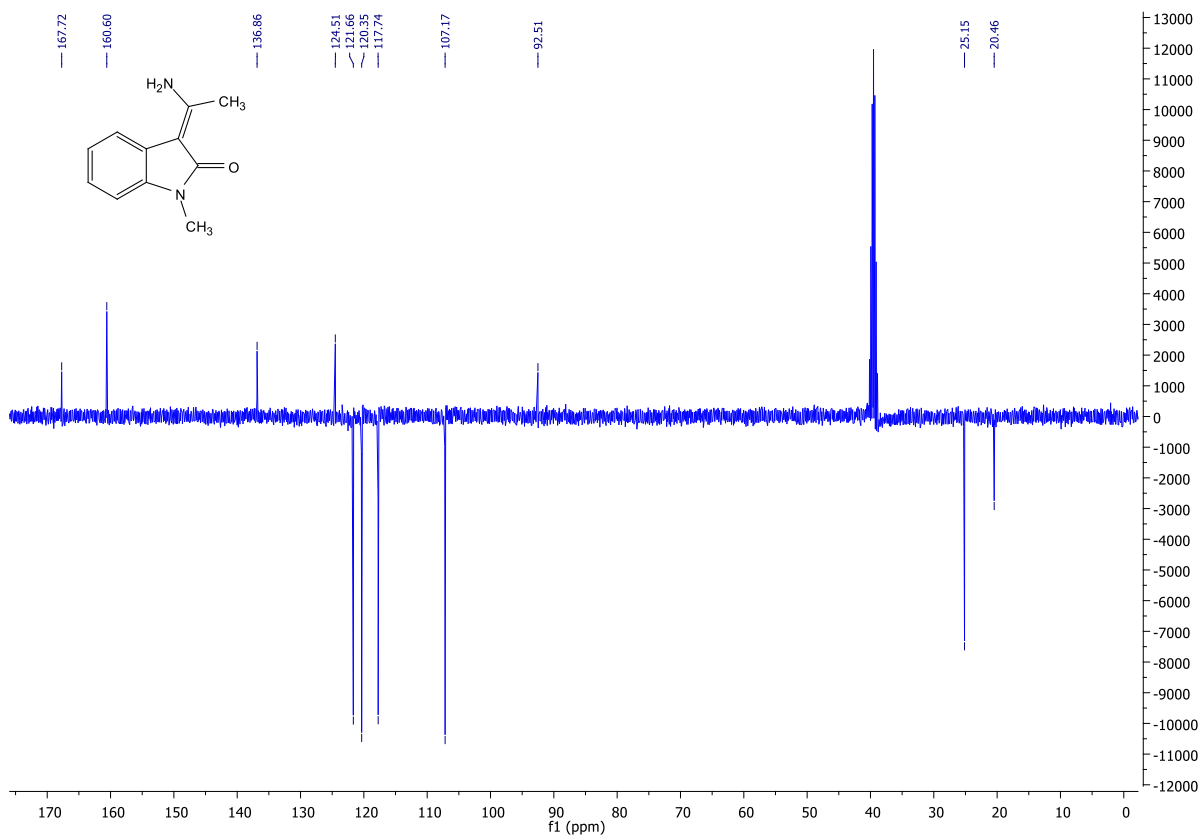
**<sup>13</sup>C NMR spektrum látky 5c.**



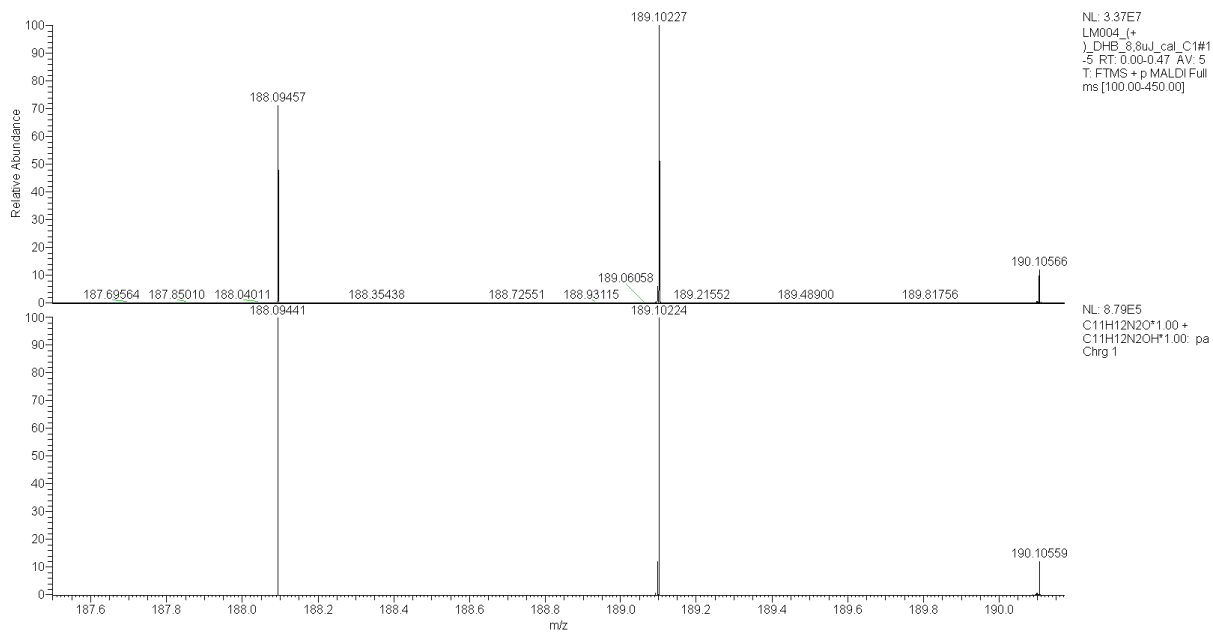
HRMS spektrum\* látky 5c.



<sup>1</sup>H NMR spektrum látky 5d.



<sup>13</sup>C NMR spektrum látky 5d.



HRMS spektrum\* látky 5d.

\*HRMS spektra jsou složeny ze dvou částí. První část je spektrum skutečné, změřené (nahore), druhá část je spektrum teoretické, vypočtené (dole).