

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Gabriela Panýrková

Příprava amidů 3,4-benzotropolon-karboxylové kyseliny
Synthesis of amides of 3,4-benzotropolone-carboxylic acid

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Ing. Aleš Machara, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze 1. 5. 2024

.....

Gabriela Panýrková

ABSTRAKT

Tropolonové a benzotropolonové skelety, jež jsou součástí struktur řady přírodních látek, jsou spojovány s velkým množstvím velmi zajímavých biologických účinků. Tato bakalářská práce se zabývá přípravou derivátů 3,4,6-trihydroxy-5*H*-benzo[7]annulen-5-onu, tedy dehydroxypurpurogallinu včetně dalších možných příprav jeho derivátů za využití enzymatické katalýzy a jejich následným dalším využitím. Hlavní důraz je ovšem kladen na přípravu kyseliny 3,4-benzotropolon-karboxylové a přípravu množství jejích amidů spolu s optimalizací amidační reakce. Dále byly prozkoumány palladium katalyzované karboxylace na enzymaticky připraveném bromderivátu dehydroxypurpurogallinu.

Klíčová slova

tropolony, benzotropolony, dehydroxypurpurogallin-4-karboxylová kyseliny, amidy, optimalizace, enzymatická katalýza, karboxylace

ABSTRACT

Tropolone and benzotropolone are both naturally occurring motifs with broad spectrum of bioactivities and interesting properties that are connected to these structures. This bachelor thesis explores preparation of 3,4,6-trihydroxy-5*H*-benzo[7]annulen-5-one, so called purpurogallin and its possible preparation by enzyme catalyzed reactions and further synthetic use of these products. The study is mainly focused on synthesis of 3,4-benzotropolon-carboxylic acid, specially its amides. First part deals with choosing the optimal reaction conditions for formation of these amides. In the next part palladium catalyzed carboxylations were performed on prepared bromoderivate of dehydroxypurpurogallin.

Key words

tropolones, benzotropolones, dehydroxypurpurogallin-4-carboxylic acid, amides, optimization, enzymatic catalysis, carboxylation

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Použité zkratky	6
1. Úvod	8
2. Teoretická část	10
2.1 Tropon	10
2.2 Tropolony a benzotropolony	10
2.3 Přírodní deriváty tropolonů	13
2.4 Přírodní deriváty benzotropolonů	15
2.4.1 Purpurogalliny a jejich medicínální použití	20
2.4.2 Reakční mechanismus vzniku purpurogallinů	20
2.4.3 Laboratorní syntéza purpurogallinů	21
3. Cíle práce	24
4. Výsledky a diskuse	25
4.1 Optimalizace a provedení amidací dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny	25
4.2 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymaticky katalyzovaných reakcí	31
4.2.1 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymu laccasa	31
4.2.2 Amidace kyseliny 35	33
4.2.3 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymu horseradish peroxidáza (HRP)	34
4.3.4 Palladium katalyzovaná karbonylace látky 53	34
5. Experimentální část	37
5.1 Obecné postupy a chemikálie	37
5.2 Příprava kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové a její acetylace	38
5.3 Syntéza amidů kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové	40
5.4 Enzymatická syntéza kyseliny 35 a jejích derivátů	53
5.5 Acetylace kyseliny 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5 <i>H</i> -benzo[7]annulen-8-karboxylové a syntéza jejích amidů	56
5.6 Enzymatická syntéza látky 52 a její palladiem katalyzované reakce	59
6. Závěr	61
7. Poděkování	63
8. Seznam Literatury	64

POUŽITÉ ZKRATKY

Ac ₂ O	anhydrid kyseliny octové
Bu	butyl
bs	široký signál, z angl. <i>broad signal</i>
cHex	cyklohexan
d	dublet
DCM	dichlormethan
dd	dublet dubletu
ddd	dublet dubletu dubletu
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DPPB	1,4-bis(difenylfosfino)butan
DPPP	1,3-bis(difenylfosfino)propan
dt	dublet tripletu
EEDQ	<i>N</i> -ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EGC	epigallokatechin
EGCG	epigallokatechin gallát
ESI	elektrosprejová ionizace, z angl. <i>Electrospray ionization</i>
EtOAc	ethyl-acetát
ekv.	molární ekvivalent
HATU	(1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,4- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HI	kyselina jodovodíková, z angl. <i>Hydroiodic acid</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	horseradish peroxidáza, z angl. <i>Horseradish peroxidase</i>
m	multiplet
MeOH	methanol

NMR	nukleární magnetická rezonance, z angl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NSAID	skupina léčiv, z angl. <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
POD	peroxidáza, z ang. <i>Peroxidase</i>
POG	polyfenoloxidáza, z ang. <i>Polyphenoloxidase</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku, z angl. <i>Reactive Oxygen Species</i>
RP-HPLC	reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. <i>Reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
RPM	počet otáček za minutu, z ang. <i>Rounds Per Minute</i>
RT	laboratorní teplota, z ang. <i>Room Temperature</i>
RVFV	virus chřipkového typu, z ang. <i>Rift Valley fever virus</i>
RVO	rotační vakuová odparka
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluorborát
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie, z ang. <i>Thin-Layer Chromatography</i>
TLR	receptory vrozené imunitní odpovědi, z ang. <i>Toll-Like Receptor</i>
UPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, z angl. <i>Ultra-Performance Chromatography-Mass Spectrometry</i>
UV	ultrafialové záření, z angl. <i>Ultra Violet</i>
δ	chemický posun v jednotkách ppm

1. ÚVOD

Role nízkomolekulárních látek jsou zcela zásadní nejen pro pochopení buněčných dějů a biochemických drah, ale tyto sloučeniny také představují hlavní chemickou skupinu látek používaných pro léčbu širokého spektra onemocnění. Při terapeutické intervenci se tyto látky nejčastěji používají jako takzvané inhibitory a jejich vývojem se zabývá obor zvaný medicínální chemie. V tomto oboru se za zásadní milník při vývoji nového léčiva považuje objev nového strukturního motivu s velkým potenciálem pro následný vývoj zvaný farmakofor, který se medicínálně-chemickým úsilím převede na nové, ještě účinnější a bezpečnější terapeutikum, ideálně třeba i s doposud nevyužívaným mechanismem účinku. Chemie nám dává neuvěřitelnou variabilitu takových strukturních motivů, což v pravdě může vést k onomu příslovečnému hledání jehly v kupce sena. Však považte – dle jistých odhadů je možné sestavit či spíš na papíře navrhnout až 10^{62} sloučenin s molekulovou hmotností nižší než 500 Da, o nichž medicínální chemici odhadují, že mohou mít „drug-like“ vlastnosti. Jinými slovy, tyto látky má smysl posuzovat jako potenciální aktivní farmaceutické substance. Číslo 10^{62} je zcela ohromující, obzvlášť pokud si uvědomíme, že na planetě Zemi je „jen“ 10^{50} atomů. Čili ani kdyby chemici chtěli, tak 10^{62} sloučenin nemohou připravit, protože k tomu nemají dost atomů. A to uvažujeme jen o jedné molekule jako zástupci oněch 10^{62} chemických entit. Čistě statisticky se tedy může zdát, že hledání nových terapeutik nemůže být úspěšné. Realita je však našťástí jiná. Za posledních sto let bylo na trh uvedeno bezpočet farmaceuticky aktivních substancí použitelných pro léčbu velkého množství onemocnění.

Jedno řešení, jak úspěšně hledat nové inhibitory je založené na preferování takzvaně privilegovaných strukturních motivů, které již mají vhodné biologicko-chemické vlastnosti. Tyto motivy často nalézáme v přírodě. Jejich geneze je jistě výsledkem evoluce. Pěkným příkladem, na kterém si tuto genezi privilegovaných chemických motivů můžeme představit je boj jednobuněčných a vícebuněčných organismů proti patogenům. Za miliony let se vyselektovaly účinné látky proti patogenům a ty poté v rukou chemiků a biochemiků ve 40.-tých a 50.-tých letech poskytly antibiotika. Příběh o objevu penicilinu je všeobecně velmi dobře známý, a není třeba jej zde uvádět. Existuje však jiný příběh ze stejné problematiky, který velmi dobře dokáže vysvětlit motivy, jež nás vedly k výzkumu popsaném v předložené bakalářské práci.

Po objevu penicilinu nastalo rozsáhlé hledání antibiotik ze všech možných přírodních vzorků, přesněji řečeno především z půdních vzorků. Farmaceutické firmy vyzývaly svoje zaměstnance, amatérské nadšence i studenty formou inzerátů, aby posílali cokoliv, co najdou,

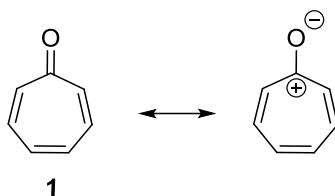
respektive vykopou v polích, na horách, v dolech nebo u sebe na dvorku a firmy tak mohly v zaslaných vzorcích hledat nová „léčiva“. Tuto snahu můžeme přisoudit oboru farmakognosie, jenž se právě zabývá objevováním nových přírodních látek, identifikací jejich struktury a popsání jejich biologických účinku. Farmakognosie se ze své podstaty zabývá chemií a biochemií oněch privilegovaných motivů. Farmakognosii lze bezesporu považovat za obor ze kterého se vyvinula současná medicínální chemie a pouto mezi oběma obory stále existuje. Tím poutem jsou právě uvedené privilegované strukturní motivy. Vraťme se však k avizovanému příběhu. V roce 1945 firma Lederle Laboratories objevila ze vzorku odeslaném z University of Missouri velmi účinné antibiotikum později nazvané chlortetracyklin. Tato látka dostala obchodní název Aureomycin a byla velmi úspěšná jak při léčbě infekcí, tak obchodně. Tetracykliny se následně na popud firmy Pfizer začala zabývat i laboratoř legendárního R.B. Woodwarda z Harvardovy univerzity. Byl to Lloyd Conover z této laboratoře, kdo provedl v pravdě revoluční čin, když se rozhodl přírodní chlortetracyklin dehalogenovat pomocí katalytické hydrogenace. Získal tak velmi účinné antibiotikum tetracyklin, což bylo pro všechny zainteresované velmi překvapující, protože v té době vládla všeobecná představa, že pouze antibiotika přírodního původu produkovaná mikrobiálním metabolismem mohou mít žádané biologické vlastnosti. Lloyd Conover tedy vytvořil polosyntetické antibiotikum a zároveň ukázal, že chemická modifikace přírodní látky může vést k účinnému „léku“. A tím odstartoval nejen výzkum nových antibiotik, ale do značné míry stál i u zrodu medicínální chemie. Z našeho pohledu můžeme na jeho snažení nahlížet jako na chemické modifikace správně vybraného privilegovaného strukturního motivu. Conoverův počín je pro nás velmi inspirující a vedl k výzkumu, který je prezentován na následujících stranách. Tato bakalářská práce si klade za cíl studovat chemii jednoho konkrétního strukturního motivu a vypracovat syntetické postupy pro jeho chemickou modifikaci, tak abychom mohli připravit celou škálu nových látek. Tím motivem je možná neprávem opomíjený benzotropolon.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tropon

Tropon **1**, látka se systematickým názvem 2,4,6-cykloheptatrien-1-on, je cyklická aromatická organická sloučenina nebenzenového typu, která je tvořena sedmičlenným kruhem. Aromatického charakteru je docíleno konjugací dvojných vazeb spolu s keto skupinou, jež se ve struktuře troponu **1** také nachází a která výrazně ovlivňuje jeho fyzikální a chemické vlastnosti.¹

Látky odvozené od troponu **1** nebo zahrnující jeho strukturu s řadou postranních řetězců, se často v různém provedení vyskytují jako sekundární metabolity rostlin a hub a obecně jsou pojmenovány slovem „troponoidy“. Tímto názvem označujeme obsáhlou skupinu biochemicky aktivních látek, která zahrnuje i struktury spadající do velkých tříd látek jako například isoprenoidy, flavonoidy a alkaloidy.²



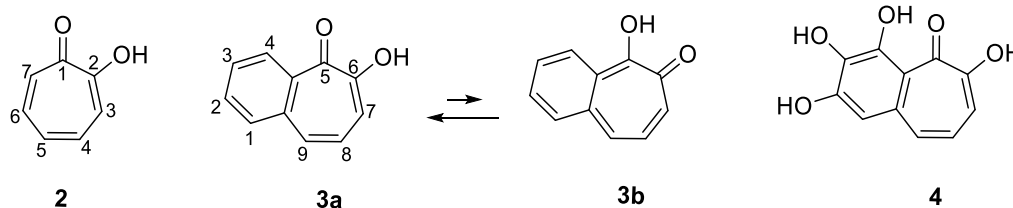
Tropon **1** sám o sobě se v přírodě samostatně nevyskytuje nicméně nelze vyloučit, že vystupuje jako intermediát v průběhu biosyntézy složitějších troponoidů.² Troponoidy jsou obecně hydrofobní látky a jak již bylo uvedeno výše - mohou být substituovány řadou postranních řetězců počínaje velkými postranními zbytky jako například terpenoidy-, alkaloidy-, nebo flavonoidy – až po malé postranní řetězce, respektive funkční skupiny jako příklad isopropyl, acetyl nebo hydroxy skupinu.²

2.2 Tropolony a benzotropolony

Tropolon **2**, neboli strukturním názvem 2-hydroxy-2,4,6-cykloheptatrien-1-on je přírodní látka aromatického charakteru, která byla izolována z bakterií *Pseudomonas* ATCC 31099.³ Z názvu je zřejmé, že tropolony **2** jsou obecně hydroxy deriváty troponu **1**, přičemž hydroxy skupina se nachází na uhlíku číslo dva. Základním motivem těchto látek, i sloučenin od nich odvozených, je tedy opět charakteristický sedmičlenný aromatický kruh, který může být různě substituován,^{1,2} případně je k němu anelován další aromatický kruh. Konkrétně v případě benzotropolony⁴ **3** je k tropolonu anelováno benzenové jádro.¹ Látka **3** může existovat ve dvou tautomerních formách, přičemž struktura **3a** je termodynamicky stabilnější

než *ortho*-chinoidní tautomer **3b** (viz Clarovo π -sextetové pravidlo⁵). Tato látka má nejen dvě tautomerní formy, ale má i dva názvy. Původně byla nazývána 3:4-benzotropolonem (případně 3,4-benzotropolonem), nyní je pro ni častější název 6,7-benzotropolon.⁶ Terminologie je to poněkud matoucí a proto látku **3** budeme v této bakalářské práci nazývat jen jako „benzotropolon“ a číslování jednotlivých atomů uhlíku přebereme z jejího systematického názvu 6-hydroxy-5*H*-benzo[7]annulen-5-on.

Co se reaktivity týče tropolony i benzotropolony mohou díky svému unikátnímu strukturnímu motivu vystupovat například jako dieny v Diels-Alderových reakcích.⁷ Jiné klasické reakce typické pro aromáty, tedy Friedel-Craftsové alkylace naopak nepodléhají, což lze dobře vysvětlit nižší elektronovou hustotou troponu způsobenou přítomností karbonylové funkční skupiny.¹ Jednoznačně nejznámějším derivátem benzotropolonu **3** je purpurogallin **4**. Příprava této látky byla poprvé popsána v roce 1869 a roce 1895 byla popsána jeho příprava pomocí enzymaticky katalyzované reakce. Jeho struktura byla dlouhou dobu záhadou až do roku 1948, kdy byl purpurogallin identifikován jako trihydroxyderivát benzotropolonu.⁸



Benzotropolonový skelet se vyskytuje v řadě přírodních látek^{2,9} a v dalších podkapitolách budou vybrané látky blíže diskutovány. V laboratoři je standardně připravován sloučením dvou aromatických benzoderivátů, přičemž tato reakce má značně složitý mechanismus (schéma 1).¹⁰ Jmenovitě se reakce účastní katecholy **5**, respektive chinony **6** a pyrogallyoly **7**, nejčastěji alkyl-galláty. V literatuře¹⁰ popsaný mechanismus začíná nejprve oxidací fenolických skupin katecholu **5** za vzniku *ortho*-chinonu **6** (dále označován jako chinon), který podléhá následné 1,4-adici pyrogallolem **7** (druhá reakční komponenta). Poté následuje oxidace pyrogallové části molekuly a intramolekulární adice enolu na takto vzniklý velmi reaktivní „trionový“ motiv. Po sérii keto-enolových přeměn a otevření můstkového karbonylového uskupení benzobicyklo[3.2.1]oktanového typu **10** a následné dekarboxylaci vzniká sedmičlenný kruh benzotropolonového typu. Posledním krokem v literatuře navrženého mechanismu je oxidace fenolu na karbonylovou funkční skupinu **13** doprovázená opět keto-enol tautomerií. V laboratoři ovšem k takovéto na první pohled složité reakci dochází již po smísení dvou výchozích látek. A právě ona lehkost, se kterou mohou být benzotropolony

v laboratoři připravovány v kombinaci s jejich potenciálním využitím vedly k myšlence se těmito látkám blíže věnovat v našem výzkumném týmu.

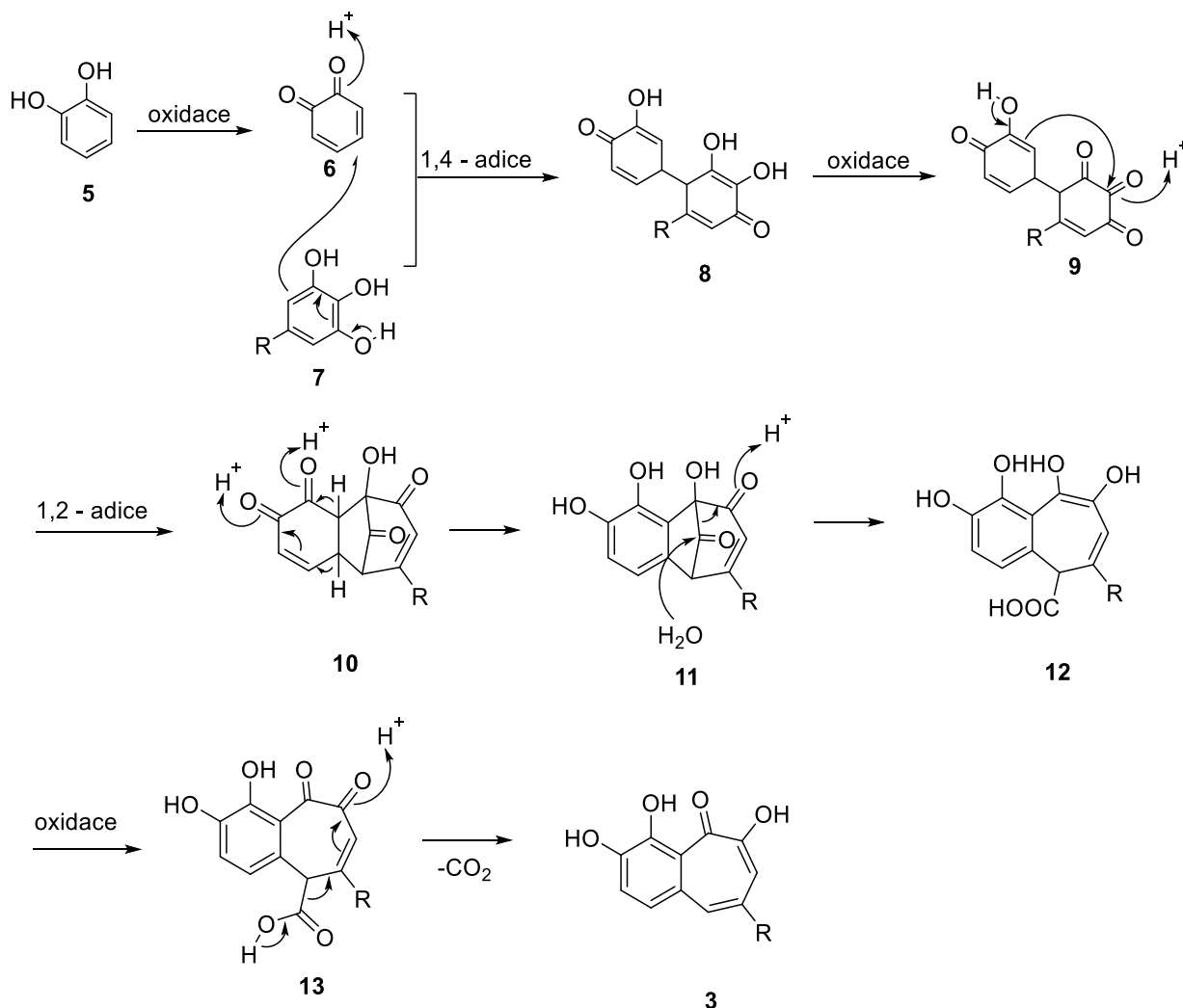


Schéma 1. Obecný reakční mechanismus syntézy benzotropolonů/ purpurogallinů¹⁰

Tropolony a jejich deriváty vykazují široké spektrum biologických účinků. Kupříkladu některé deriváty těchto látek mají protinádorové účinky.¹¹ Další pak mohou představovat cestu k léčbě anemie zapříčiněné chronickým renálním selháním, jelikož určité tropolony fungálního původu dokážou indukovat genovou expresi erythropoetinu.¹² Troponoidy poutají pozornost také pro své antibakteriální účinky.² Vzhledem ke zvyšující se rezistenci bakterií na dostupná antibiotika jsou troponoidy předmětem vědeckého bádání. Ukázalo se, že v boji proti běžným bakteriím mohou mít velmi dobrý potenciál.² Dle literatury vykazují rovněž antioxidační,¹³ a antivirové účinky.¹⁴

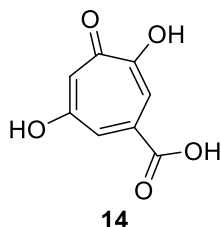
U derivátů benzotropolonu **3** byly též popsány některé biologické účinky, nicméně vzhledem k unikátní struktuře kombinující specifický planární aromatický systém doplněný o α -hydroxykarbonylový motiv si dovolueme tvrdit, že veškerý potenciál těchto látek jistě nebyl

popsán. Omezený počet vědeckých prací o biologických aktivitách benzotropolonů je dozajista zapříčiněn malým počtem jeho známých derivátů. Což samo o sobě přímo vyzývá k prostudování chemie těchto látek.

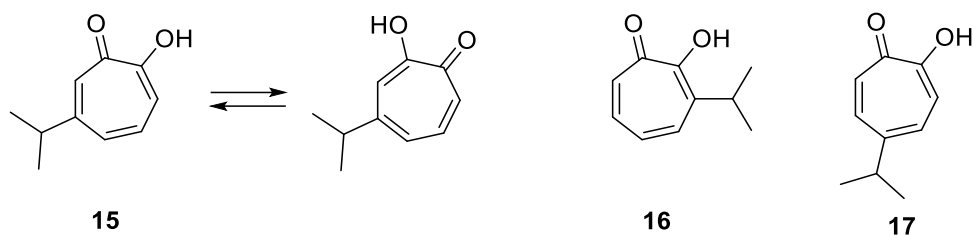
2.3 Přírodní deriváty tropolonů

První rostlinné troponoidy, které byly objeveny již na počátku dvacátého století, nebyly dlouho dobu dostatečně studovány, což lze přisoudit jejich omezené dostupnosti v přírodních vzorcích. K dnešnímu dni je známo okolo 200 těchto látek přírodního původu, které se vyznačují širokým spektrem biologických aktivit a strukturních motivů. Pro průmysl pak představují zdroj řady farmak, vůní, barev, chutí i chemikálií pro další výzkum.² Níže bude následovat výčet nejznámějších látek obsahující ve své struktuře tropolon **2**.

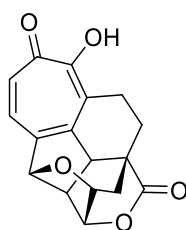
V roce 1942 byl Haroldem Raistrickem¹⁵ a jeho kolegy proveden experiment¹⁶ ve snaze izolovat fungální metabolit houby *Penicillium stipitatum*. Jejich snažení vedlo k objevu látky jejíž strukturu nedokázali vhodně navrhnout a kterou nazvali kyselina stipitátová **14** (dle názvu houby). O tři roky později M.J.S. Dewar publikoval v časopise Nature¹⁷ článek ve kterém na základě Raistrickova pozorování chemického chování této kyseliny navrhl strukturu obsahující tropolon **2** a celkově tedy strukturu kyseliny stipitátové **14**. Tímto článkem Dewar zahájil novou éru chemie aromatických látek, protože světu představil první karbocyklickou, aromatickou látku takzvaně „nebenzenového“ typu.



β -Thujaplicin **15**, neboli hinokitiol, je látka vyskytující se ve dřevě stromů z čeledi cypřišovitých. Tento derivát tropolonu vykazuje antibakteriální¹⁸ a antimykotické¹⁹ účinky. Jedná se o látku u které byla mezi prvními popsána přítomnost nebenzenového aromatického systému a následně i první laboratorní příprava tropolonu vůbec.²⁰ Tato látka existující ve dvou tautomerních formách se používá v kosmetice a přípravcích pro ústní hygienu. Rovněž jsou známy i její izomery a to α -thujaplicin **16** a γ -thujaplicin **17**.

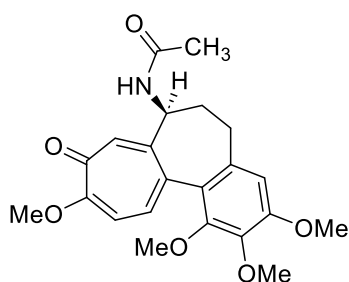


Harringtonolid **18** (hainanolid) byl izolován a strukturně identifikován v roce 1978.²¹ Tato látka izolovaná ze semen hlavotise peckovitého vykazuje antivirové²², protizánětlivé²³ a antiproliferační^{24, 25} účinky. Další studie prokázaly inhibiční potenci harringtonolidu proti chřipce typu A, japonské B encefalidě²² a také protinádorové účinky proti Lewisovu plicnímu karcinomu, Walkerově karcinomu a některým leukémiím.²⁶



18

Mezi významné přírodní deriváty tropolonu **2** patří prudce jedovatý alkaloid kolchicin **19**. Při identifikaci jeho struktury svojí roli opět sehrál M.J.S. Dewar, který správně předpověděl, že kolchicin je derivátem tropolonu **2**.²⁷ Nejznámější rostliny obsahující kolchicin **19** jsou ocún jesenní (*Colchicum autumnale*) a glorióza vznešená (*Gloriosa superba*).²⁸



19

Jedná se o látku lipofilní povahy, disponující řadou medicínsky zajímavých vlastností. U kolchicinu **19** jsou prokázány protizánětlivé a cytotoxické účinky.²⁹ Kolchicin **19** se o své místo mezi klinicky používanými farmaky zasloužil mimo jiné i díky své schopnosti ulevit od bolesti pro pacienty trpící dnou.³⁰ Dokáže totiž zmírnit zánětlivé účinky krystalů urátu (soli kyseliny močové) pomocí řady mechanismů, například inhibicí migrace a adheze neutrofilů a fagocytózy v oblasti zánětu.³¹ Ovšem napříč všem svým přínosným účinkům je klasifikován jako riskantní léčivo z důvodu velice úzkého terapeutického indexu s přesně nastavenou

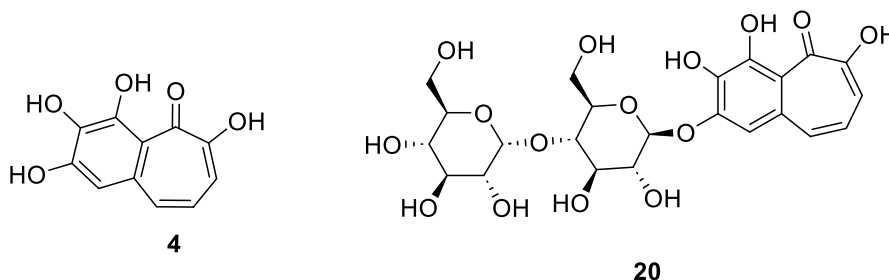
hranicí mezi netoxickým účinkem a již smrtelnou dávkou.³² Výrazná toxicita kolchicinu **19** pak může při nesprávném užívání vést k závažným zdravotním následkům, včetně úmrtí pacienta. V případě dny jsou tedy řadou pacientů při léčbě preferovanější alternativy kolchicinu **19** jako například NSAIDy.³³

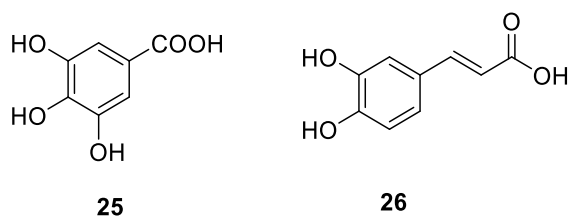
Nejprostudovanější z účinků, kterými kolchicin **19** působí na lidský organismus je jeho schopnost vázat se na tubulinové dimery, čímž zapříčiní jejich destabilizaci.^{28,31} Zablokuje totiž přeskupování a polymerizaci mikrotubulů, které jsou klíčovou komponentou cytoskeletu buněk. Mikrotubuly se uplatňují v řadě buněčných procesů jako je například buněčné dělení, udržování buněčné integrity, intracelulární transport, či regulace buněčných iontových kanálků.³¹ Kolchicin **19** vystupuje jako mitotický jed blokováním mitotických buněk v metafázi buněčného dělení. Jeho účinek je založený na vazbě s tubulinem za vytvoření komplexu tubulin-kolchicin.³¹ Proces vzniku tohoto komplexu je jen těžko zvratný, komplex se tedy hromadí a následně váže na konce mikrotubulů, kde zamezuje prodlužování polymeru mikrotubulu.³¹ V nižších koncentracích kolchicin **19** působí proti růstu mikrotubulů, ale v koncentracích vyšších způsobuje jejich depolymerizaci, což působí toxicky i na zdravé tkáň.³¹

2.4 Přírodní deriváty benzotropolonů

2,3,4,6-Tetrahydroxy-5*H*-benzo[7]annulen-5-on, dále v této práci označován jako purpurogallin **4** je oranžová krystalická látka, která je nejčastěji se vyskytujícím derivátem benzotropolonu **3**.¹ V přírodě je možné nalézt látky obsahující purpurogallin například ve vzorcích z dubové kůry a duběnek, kde se deriváty purpurogallinu vyskytují spolu s taniny.³⁴

K výzkumu v oblasti těchto látek významně přispěl oxfordský chemik John A. Baltrop.⁸ V průběhu padesátých let se zabýval purpurogallinem, jakožto syntetickým analogem přírodní červeně zbarvené látky, dryophantinemu **20**, který se vyskytuje právě v duběnkách a je prekurzorem purpurogallinu **4**.¹⁵





V popsané laboratorní syntéze crocipodinu **24** z roku 2010 byl ovšem využit 4-bromkatechol **27** a kyselina gallová **25**.⁹ Oxidační kondenzace pomocí peroxidu vodíku za enzymatické katalýzy horseradish peroxidásou (HRP) poskytla bromovaný reakční intermediát **28** (schéma 2). Ten byl následně nasazen do Heckovy reakce s akrylátem za vzniku crocipodinového skeletu, který byl po odchránění fenolických a karboxylových funkčních skupin převeden na samotný crocipodin **24**.⁹

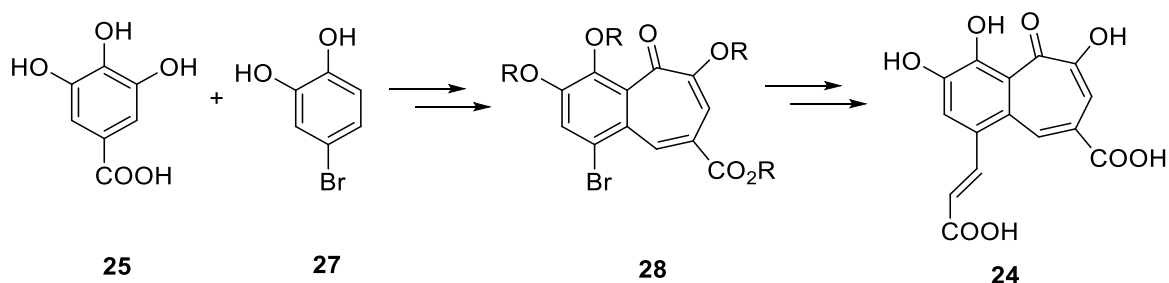
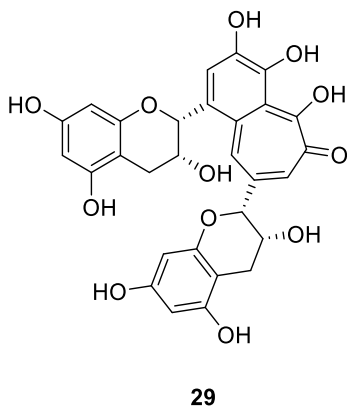


Schéma 2. Reakční schéma syntézy crocipodinu **24**. (Laboratorní postup zahrnuje chránění fenolových skupin a řadu reagentů, které nejsou ve schématu vypsány).

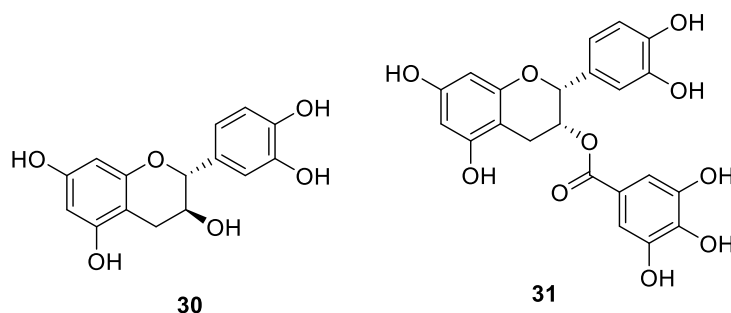


Theaflavin **29** je přírodní látka tmavě oranžové barvy, která se vyskytuje především v čaji, tedy konkrétně rostlině čajovníku čínském (*Camellia sinensis*).¹³ Účinky theaflavinu **29** na lidský organismus jsou mimo jiné spojovány například s prevencí rakoviny a srdečních příhod.³⁷

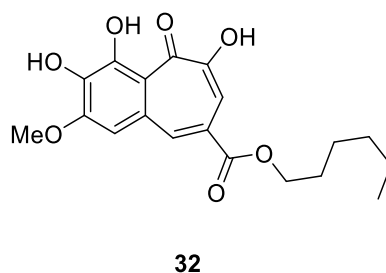
Theaflavin **29** vykazuje silné antioxidační účinky.³⁸ Ve své struktuře má obsažen benzotropolon **3**,¹ ke kterému jsou ještě připojené flavonoidy.³⁹ Řada terapeutických účinků theaflavinu je připisována právě aktivitě benzotropolonového jádra,¹ ale je nutné k tomu

přístupovat poměrně kriticky, protože i přítomné flavonoidy vykazují ohromné množství biologických účinku.

Pro přípravu populárního černého čaje je nutné ponechat nasbírané čajové lístky fermentovat. Při fermentaci se uplatňují dva základní kroky - oxidace a polymerace a jejichž finálním produktem je právě theaflavin.³⁹ Benzotropolonové jádro theaflavinů **29** je tvořeno enzymaticky katalyzovanou oxidací polyfenolických prekurzorů katechinů, ke které dochází v průběhu fermentace. Původní katechiny ze zeleného čaje EGC **30** (epigallokatechin) a EGCG **31** (epigallokatechin gallát) jsou pomocí enzymů PPO (polyfenolooxidáza) a POD (peroxidáza) oxidovány na chinony.¹¹ Katechin EGCG reaguje s ROS, čímž působí antioxidačně.¹¹ Po oxidaci nově vzniklé gallokatechinové chinony podléhají nukleofilní adici s katechinovými chinony¹³, eliminuje se oxid uhličitý a po následném sledu chemických přeměn vzniká theaflavin **29**. Zmíněná reakce v podstatě odpovídá mechanismu nakreslenému na schématu 1.¹⁰

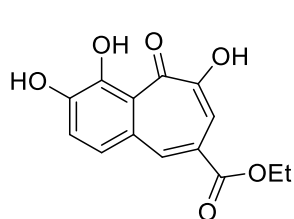


Látka CU-CPT22 **32** purpurogallinového typu inhibuje regulátory vrozené imunity a to konkrétně Toll-like receptory 1 a 2 typu (TLR1/TLR2).⁴⁰ Dle literatury CU-CPT22 **32** vykazují nejen vysokou inhibiční potenci, ale i vysokou specifitu vůči uvedeným receptorům.

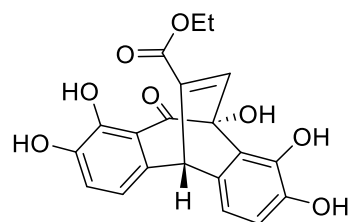


Některé další látky zahrnující ve své struktuře dehydroxypurpurogallin **22** disponují schopností zamezit rakovinnému bujení.^{11,24} Příkladem mohou být přírodní látky goupiolon A **33** a goupiolon B **34**, které byly izolovány z listů rostliny druhu *Goupia glabra*. Goupiolony A i B jsou látky s genotoxickou aktivitou,⁶ jelikož u nich byla prokázána výrazná toxicita vůči DNA.¹⁰ Obě látky působí cytotoxicky v každém checkpointu defektní části DNA, což bylo testováno na zmutovaných kvasinkách.¹² Genotoxicita pak spočívá v jejich schopnosti narušovat DNA, čímž je následně indukována buněčná smrt, která je v případě tumorů

potlačována. Látky tohoto typu by tedy potencionálně mohly být dobrými kandidáty pro další design cytostatik.¹⁰

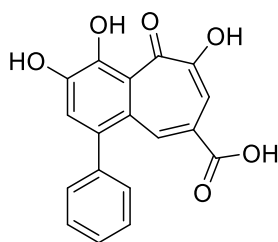


33



34

Jumonji C enzymy jsou v lidském organismu malou třídou asi 60 druhů proteinu, které se řadí mezi oxygenasy nehemového typu katalyzující demethylaci *Nε*-methylovaných lysinových zbytků na histonových koncích (histone tails). Tyto demethylasy jsou up-regulovány v řadě nádorových buněk. Například v případě nádoru prsu, prostaty a tlustého střeva. Dehydroxypurpurogallin **22** je přírodním inhibítozem jedné z těchto demethylas, konkrétně typu KDM4M. Medicinálně-chemickým úsilím bylo připravit purpurogallinový optimalizovaný skelet s cílem nalézt účinnější analog a jeho výsledkem byla příprava látky **35**,⁴¹ která vykazovala dobrou inhibici KDM4A *in vitro* u buněk nádoru tlustého střeva.⁴² Tato látka vykazovala silné protinádorové účinky i proti dalším liniím lidských nádorových buněk.



35

Široké spektrum biologických účinků dehydroxypurpurogallinů a jejich derivátů vedlo ke snaze o přípravu knihovny jejich amidů, jejichž využití by ovšem především cílilo na inhibici chřipkové endonukleasy a endonukleasy podobnému enzymu z viru „horečky údolí Rift“ (RVFV). Pro amidy jsme se rozhodli z několika důvodů, přičemž hlavní roli hrála jejich strukturní blízkost ke kyselinám (viz látka **22**) a především snadnost s jakou se dají zavádět strukturně velmi rozmanité aminy a aniliny. Při designu látek popsanych v této bakalářské práci jsme cílili k vzniku dalších nekovalentních interakcí studovaných endonukleás s deriváty dehydroxypurpurogallinů právě v oblastech, které by měly okupovat části takto zavedených aminů či anilinů.

2.4.1 Purpurogalliny a jejich medicínální použití

Purpurogallin **4** býval v dřívější době přidáván k jedlým i nejedlým tukům, kde vystupoval jako oxidaci potlačující aditivum.⁴³ Tato vlastnost rovněž navádí k myšlence využití purpurogallinu při zkoumání patofyziologických poruch spojených s působením radikálů kyslíku na buňky.⁴³

V současné době purpurogalliny **4** a dehydroxypurpurogalliny **22** budí zájem v oblasti medicínální chemie díky unikátnímu strukturnímu motivu. Jejich planární struktura spolu s karbonylovou funkční skupinou a množstvím hydroxylových skupin jim dává schopnost chelatovat ionty kovů, které se nachází v enzymatickém místě metaloenzymů.⁴⁴

Design inhibitorů této velké podskupiny enzymů je výrazně spojen s hledáním vhodného chelátoru, který nutně musí být schopen koordinovat ionty kovů metaloenzymu. Na základě vhodného strukturního uspořádání by tímto chelátorem potencionálně mohly být právě purpurogalliny, případně dehydroxypurpurogalliny.

Své místo v medicínální chemii si deriváty purpurogallinu **4** našly i díky svým protinádorovým, antioxidačním⁴³ a protizánětlivým účinkům jak již bylo uvedeno výše.⁵ Samotný purpurogallin **4** je například inhibitorem „toll like receptorů“ prvního a druhého typu,⁴⁰ katechol-O-methyltransferasy, a také endonukleasy viru chřipky.⁴⁴ Zmíněná inhibice chřipkové endonukleasy purpurogallinem **4** byla popsána naší výzkumnou skupinou⁴⁴ a z dat, které máme, můžeme prohlásit, že purpurogallin **4** a jeho deriváty mají potenciál inhibovat jakýkoliv metaloenzym se dvěma ionty kovů ve své katalyticky-aktivní části. Právě unikátní strukturní motiv purpurogallinu **4** s řadou fenolových a jednou karbonylovou funkční skupinou, které jsou orientovány vedle sebe na jedné straně molekuly, tuto sloučeninu přímo předurčuje do role chelátoru kovových iontů. Konkrétně v případě chřipkové endonukleasy se jedná o ionty Mg^{2+} a Mn^{2+} .

2.4.2 Reakční mechanismus vzniku purpurogallinů

Syntéza samotného purpurogallinu **4** probíhá podle obecného mechanismu uvedeného v reakčním schématu 1,¹⁰ tedy reakcí pyrogallolu **7** a jeho oxidované formy s následnou tvorbou řady intermediátů, které se nakonec přemění na kýžený produkt se sedmičlenným kruhem.¹³ Výtěžky nejsou obvykle uspokojivé, nicméně nedávno publikovaná práce popsala přípravu purpurogallinu **4** pomocí specificky upraveného oxidu manganického s výtěžkem 94 %.⁴⁵

2.4.3 Laboratorní syntéza purpurogallinů

V laboratoři lze vybrané purpurogallinové deriváty, respektive dehydroxypurpurogallinové deriváty připravit oxidačně-kondenzačními reakcemi, které probíhají podle reakčního schématu 1.¹⁰ K výchozím látkám se přidávají většinou anorganická oxidační činidla pro nutnou oxidaci benzen-1,2-diolu **5** na chinon **6**. Hojně využívaným činidlem pro tento typ reakcí je NaIO₃ nebo KIO₃.⁴⁶ Jako účinná se ovšem prokázala být i enzymaticky katalyzovaná syntéza purpurogallinového, respektive dehydroxypurpurogallinového derivátu za využití enzymu horseradish peroxydásy⁹ či laccasy⁴⁷ (*T. versicolor*).

V rámci laboratorní syntézy byla popsána relativně omezená řada derivátů purpurogallinu. Variabilita navázaných funkčních skupin se odvíjí od charakteru použitých výchozích látek. Je-li namísto katecholu **5** či pyrogallolu **7** využít jejich derivát, dojde ke vzniku benzotropolonového skeletu obdobným mechanismem jako je naznačeno ve schématu 1. Výsledný produkt však bude substituován stejnými funkčními skupinami jako reagenty. Takto je možné obohatit purpurogallinový motiv například o funkční skupinu karboxylové kyseliny a připravit tak 3,4-benzotropolon-karboxylovou kyselinu **36**⁴⁸ (dále v této práci označovanou jako kyselinu purpurogallin-4-karboxylovou) a to využitím katecholu **5** a kyseliny gallové **25** jako výchozích látek.

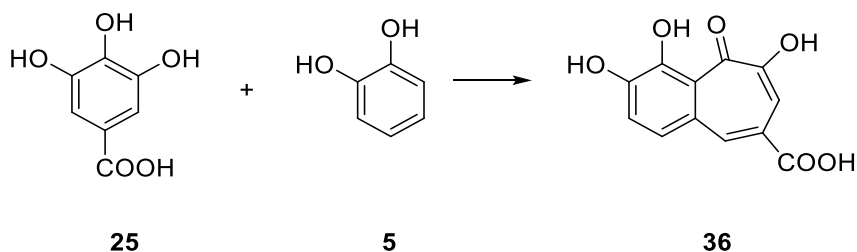


Schéma 3. Příprava dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **36**

Klasickým příkladem takového přístupu je syntéza fomentariolu **21** popsaná německých chemikem Wolfgangem Steglichem v roce 1978.⁴⁹ Steglich cílovou sloučeninu připravil oxidační kondenzací, respektive jakousi oxidační dimerizací trihydroxycinamyl alkoholu **37** účinkem jodičnanu draselného (schéma 4).

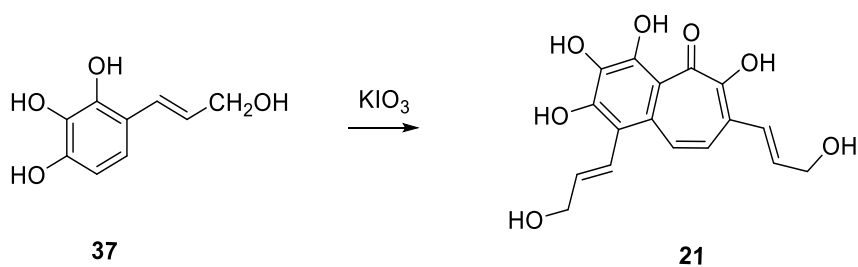
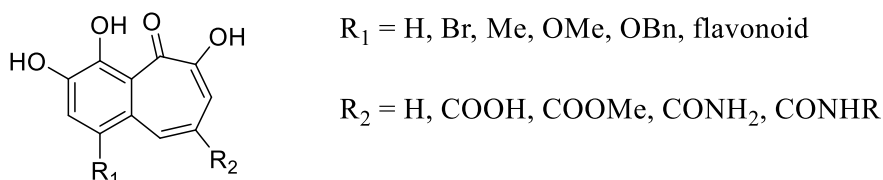


Schéma 4. Příprava fomentariolu dle W. Steglicha

Analogicky lze připravit i deriváty dehydroxypurpurogallinu, a to jmenovitě reakcí katecholu **5** a pyrogallolu **7**.⁴⁶ Vzniklý produkt má o jednu fenolovou funkční skupinu méně v porovnání se strukturou purpurogallinu, a proto jej nazýváme dehydroxypurpurogallin. Při použití kyseliny gallové **18** či jejího derivátu (ester či amid) poskytuje oxidačně-kondenzační reakce, provedená obvykle jodičnanem, deriváty dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **36** (schéma 3).³ Dle literatury je též možné připravit deriváty dehydroxypurpurogallinu i odlišným způsobem založeným na methathesi.⁵⁰



Obrázek 1. Výčet zmiňovaných substituentů

Obrázek 1 shrnuje většinu známých dehydroxypurpurogallinů. Substituentem R^1 může být například halogen, konkrétně brom. Bromderivát lze připravit výše zmíněnou enzymaticky katalyzovanou syntézou⁹ pomocí 4-bromkatecholu **27**. Při syntéze crocipodinu **24** byla po ochránění fenolových skupin provedena Heckova reakce a dál již syntetický potenciál uvedených bromderivátů využit nebyl. Nabízí se však i možnost vyzkoušet provedení palladium katalyzované karbonylace na bromovaném derivátu, a tudíž zavést karboxylát na dehydroxypurpurogallinový skelet. Tím se však již dostáváme k cílům této bakalářské práce.

V neposlední řadě je na místě uvést i modifikaci oxidačně-kondenzačních reakcí derivátů katecholu s pyrogalloly založené na cílené oxidaci katecholu **38** na odpovídající derivát chinonu **39** v prvním kroku.⁵¹ Po přidavku methylpyrogallolu **40**, který má vytvořit tropolonovou část molekuly, následuje již vícekrát popsany sled reakcí. Ten však vyžaduje jeden oxidační krok alkoholu v tropolonové části. Tato oxidace je zprostředkována výše zmíněným předpřipraveným derivátem chinonu **39**, který se do reakce dává v nadbytku vůči methylpyrogallolu **40** a transformuje se na produkt **43**. Tento postup je popsán ve schématu 5.

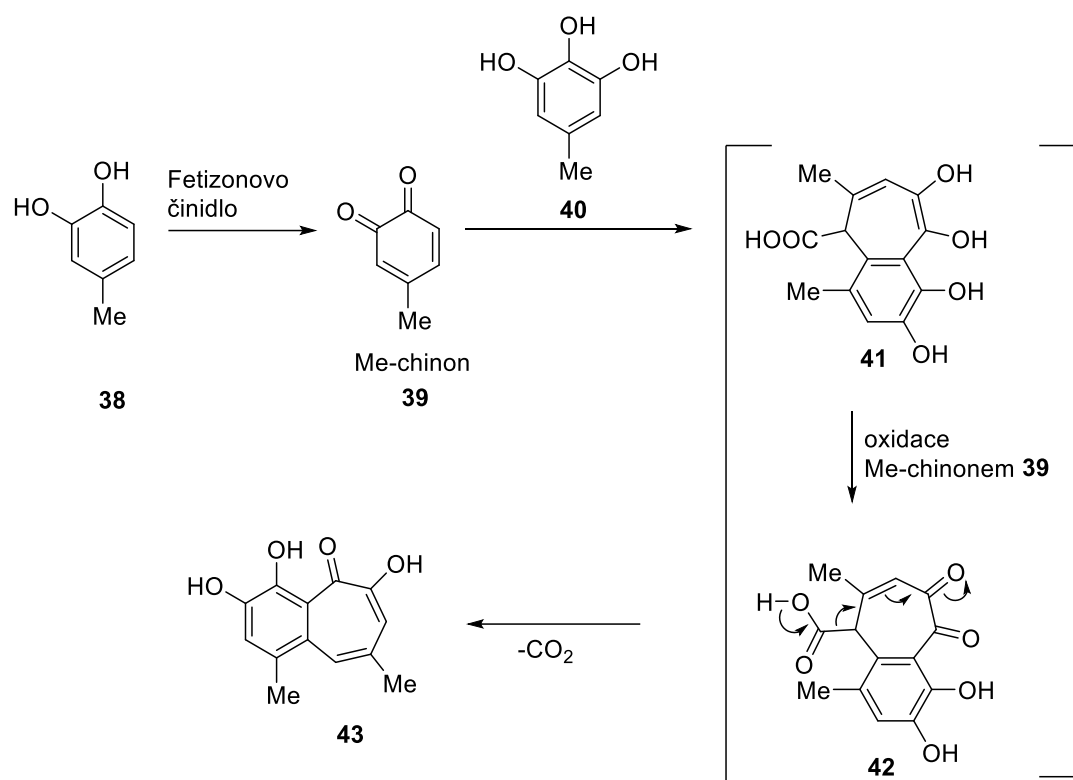


Schéma 5. Příprava tropolonu s využitím předchozí cílené oxidace katecholu na chinon

3. CÍLE PRÁCE

- Příprava dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny
- Příprava derivátů dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny enzymatickou cestou
- Optimalizace amidační reakce dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny a příprava jejích amidů
- Provedení palladium katalyzované karboxylace na enzymaticky připraveném bromderivátu

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Hlavním cílem této práce bylo připravit sérii amidů odvozených od výchozí dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **36**, které byly následně využity v rámci studie o jejich potenciálním účinku v souvislosti s inhibicí endonukleasy chřipkového viru. Vzhledem k nedostatečnému povědomí o těchto látkách, a tudíž i jejich přípravě bylo nejprve nutné optimalizovat podmínky jejich syntézy, respektive vyvinout nové postupy jejich přípravy.

Takto syntetizované látky byly podrobeny biochemickému testování, které bylo provedeno ve spolupráci s biochemiky z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR a jehož výsledky nejsou zahrnuty v této bakalářské práci.

4.1 Optimalizace a provedení amidací dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny

Hlavní část této bakalářské práce byla věnovaná přípravě amidů kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové **36** pomocí amidační reakce (schéma 6), jejíž podmínky bylo nutné optimalizovat. Ve většině případů se jednalo o nové doposud nepřipravované sloučeniny a nelze tedy zahrnout porovnání výtěžků s literaturou.

Výchozí látkou v úvodní sérii amidací byla kyselina dehydroxypurpurogallin-4-karboxylová **36**, která byla připravena dle literatury⁴⁶ (podrobný postup je pak uveden v experimentální části práce). Optimalizovanými parametry následné amidační reakce bylo použité amidační činidlo, rozpouštědlo, reakční teplota a zpracování reakční směsi.

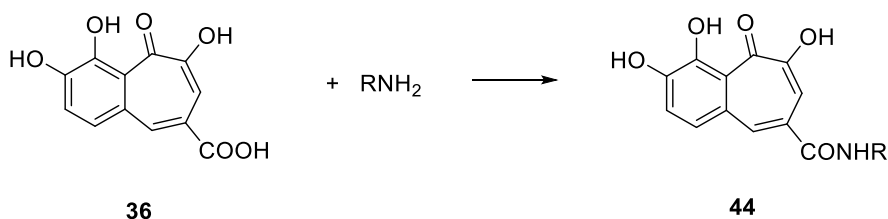


Schéma 6. Amidační reakce kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové

Jako první bylo optimalizováno použité amidační činidlo. Pro tento účel byla využita kyselina dehydroxypurpurogallin-4-karboxylová **36** v surové podobě, která reagovala s vybraným substrátem s aminovou funkční skupinou, kterým byl zvolen *p*-anisidin. Testována byla obecně používaná amidační činidla.

Byla testována především dvě amidační činidla, konkrétně EEDQ a HBTU jejichž výběr vycházel z předchozího širšího screeningu amidačních činidel, ve kterém tyto dvě látky

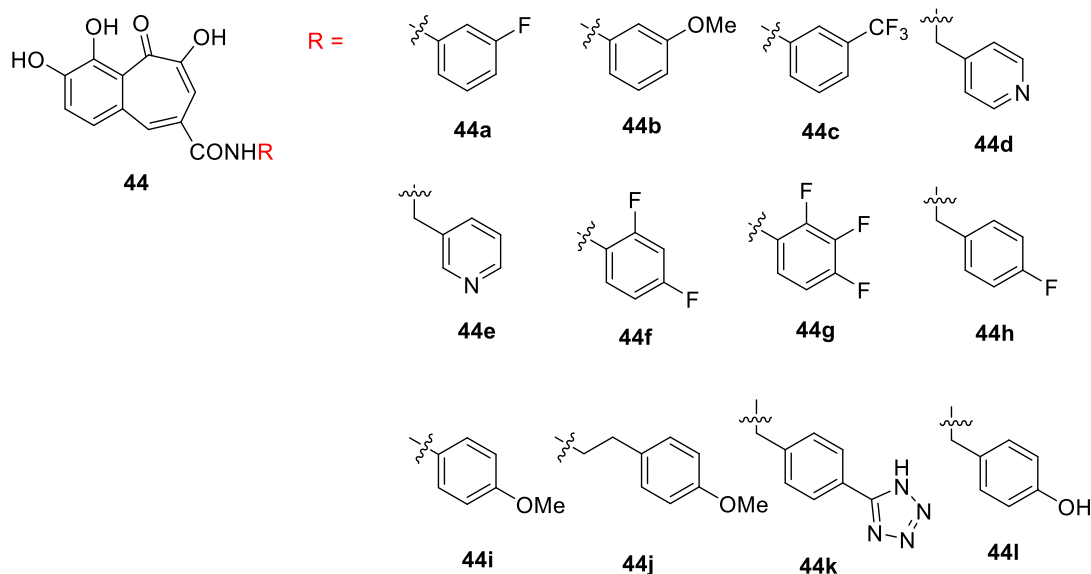
vykázaly nenulový výtěžek požadovaného produktu. Amidační činidlo bylo rozpuštěno v suchém THF v reakční ampuli spolu s výchozí kyselinou a *p*-anisidinem. Ampule byla zakremповána a zahřívána v kovovém bloku na 80 °C po dobu 2 h. Poté bylo provedeno kontrolní měření obou reakčních směsí pomocí UPLC-MS. Analýza chromatogramu prokázala přítomnost žádaného produktu pouze u experimentu s EEDQ (tabulka 1). Oproti tomu v reakci s HBTU ke vzniku produktu docházelo pouze ve stopovém množství, a proto byl pozorován jen vysoký obsah výchozí nezreagované kyseliny. Ve snaze zamezit nutnosti zahřívání reakční směsi byla vyzkoušena amidace pomocí HATU, jenž je obecně známo jako účinnější činidlo než EEDQ a HBTU. Reakce byla provedena obdobným způsobem jako předchozí dva experimenty s tím rozdílem, že probíhala za laboratorní teploty. Tento experiment rovněž nevedl ke vzniku produktu, tudíž bylo pro přípravu první série látek zvoleno jako amidační činidlo EEDQ.

Dále bylo vyzkoušeno několik různých rozpouštědel, ale THF jako jediné vykazovalo nenulový výtěžek požadovaného amidu. Optimální teplotou reakční směsi bylo 80 °C a reakční doba 2 h.

Amidační činidlo	Reakční teplota (°C)	Výtěžek (%)
EEDQ	80	6
HBTU	80	-
HATU	20	-

Tabulka 1. Výběr vhodného amidačního činidla

Pro první sérii derivátů byly navrženy níže uvedené struktury (obrázek 2), jejichž příprava probíhala za uvedených reakčních podmínek, které budou souhrnně dále označovány jako reakční postup A. Výsledky zdařených experimentů jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 2. První série navržených struktur amidů dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **44a-l**

Z důvodu neuspokojivé konverze výchozích látek u řady provedených reakcí v rámci první série bylo nutné reakční postup upravit. Jako možný důvod špatného průběhu reakcí za použití EEDQ se nabízela přítomnost volných fenolových skupin. Proto byly nezdařené přípravy derivátů první série opakovány za využití triacetátu **45** namísto surové kyseliny purpurogallin-4-karboxylové **36**. Zmíněný triacetát **45** byl připraven postupem převzatým z literatury.⁵² (schéma 7)

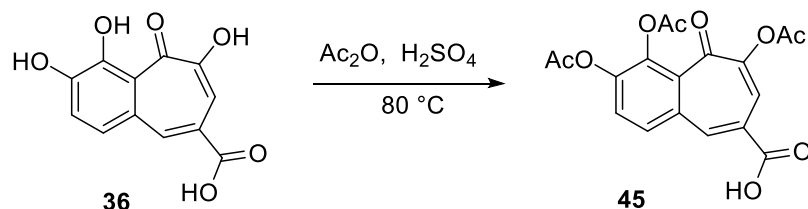


Schéma 7. Acetylace kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové **36**

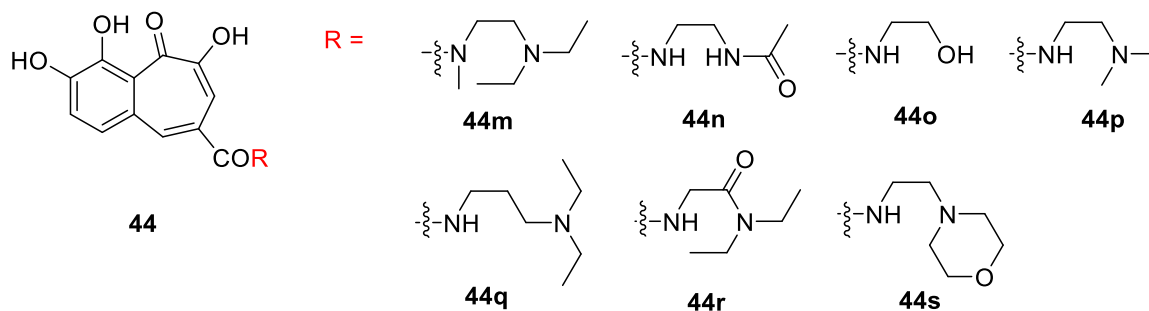
Jelikož se chránění fenolových skupin ukázalo být vhodným řešením a podařilo se úspěšně opakovat nevydařené reakce, byla znovu vyzkoušena i reakce s HATU. Při využití substrátu **45** se pomocí HATU podařilo provést amidace již při laboratorní teplotě. Z důvodu zamezení nutnosti zahřívání reakční směsi bylo pro další experimenty EEDQ nahrazeno HATU. Jako další reakční komponenta musela být použita báze, jmenovitě triethylamin, pro deprotonaci kyseliny za vzniku karboxylátového anionu, který dle obecně přijímaného mechanismu atakuje HATU. Jako rozpouštědlo bylo použito suché DMF. Tento postup, který byl použit pro přípravu nezdařených struktur první série, a který byl proveden za využití výše zmíněných podmínek, bude nadále označován jako reakční postup **B**.

Reakční postup **B** se od postupu **A** odlišoval i ve zpracování reakční směsi, kdy bylo nutné provést odchránění fenolových skupin. Odchránění bylo provedeno kyselou methanolýzou, tedy rozpuštěním odparku extraktu reakční směsi po ukončení reakční doby nutné pro průběh amidace v methanolu spolu s malým množstvím koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Porovnání neúspěšných pokusů provedených postupem **A** s jejich opakováním postupem **B** je uvedeno v tabulce 2.

Produkt	Pracovní postup A Výtěžek (%)	Pracovní postup B Výtěžek (%)
44f	-	8
44g	-	13
44h	19	53
44i	6	11

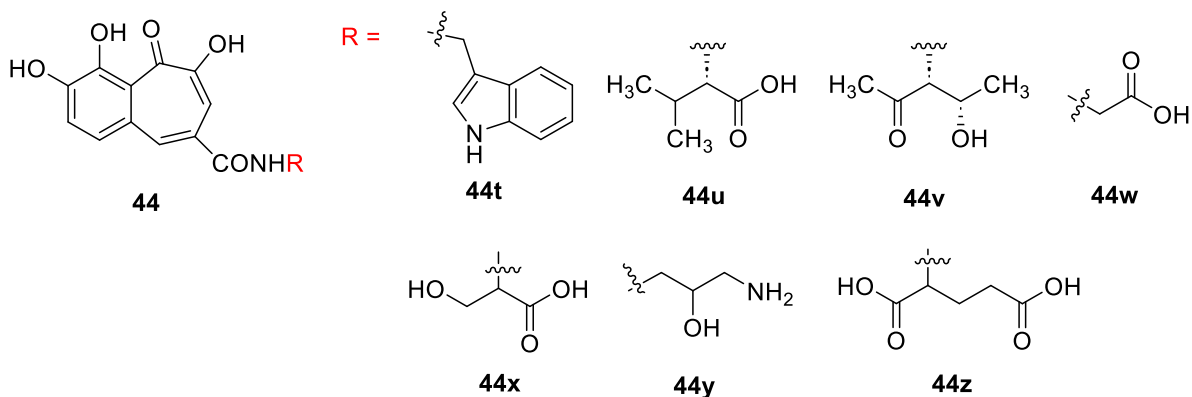
Tabulka 2. Porovnání průběhu vybraných amidací provedených postupy **A** a **B**

První sérii derivátů následovala druhá série struktur navržených z alifatických aminů, viz obrázek 3. Všechny amidace této série byly provedeny reakčním postupem **B**. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 3. Druhá série navržených struktur amidů dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **44m-s**

Pro třetí, a poslední sérii byly navrženy deriváty odvozené od aminokyselin, jejichž struktury jsou prezentované na obrázku 4, přičemž v tabulce 3 jsou uvedeny jejich izolované výtěžky.



Obrázek 4. Třetí série navržených struktur amidů dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové kyseliny **44t-z**

Postup pro syntézu amidů třetí série je obdobou pracovního postupu **B**. Ovšem některé kroky syntézy bylo nutné upravit, aby amidace i s těmito substráty úspěšně proběhly. Experimentální cestou bylo zjištěno, že vznik amidu podpoří předchozí příprava aktivovaného komplexu karboxylátový anion-HATU. Postup pro třetí sérii byl tedy následující. Do ampule byl předložen triacetát výchozí kyseliny **45** spolu s HATU, reakční směs byla následně rozpuštěna v DMF a byl k ní přidán triethylamin. Takto připravená směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu minimálně pěti minut. Poté byl přidán amin. Postup se dále odlišuje v ochránění fenolových skupin, kdy byla methanolýza nahrazena kyselou hydrolyzou. Důvodem bylo zamezení vzniku nežádoucího methylesteru, ke kterému docházelo u derivátu **44w** s volnou karboxylovou skupinou (experimentálně ověřeno). Kyselá hydrolyza byla provedena rozpuštěním odparku zpracované reakční směsi po dokončení amidace a extrakci, v THF spolu s kyselinou chlorovodíkovou. Reakční postup zahrnující aktivaci komplexu karboxylátový anion-HATU a ochránění kyselou hydrolyzou bude nadále označován jako pracovní postup **C**. Výjimkou je produkt **44t**, který byl připraven postupem **B**, jelikož zde nedocházelo ke komplikaci s ochráněním v methanolu. Výsledky třetí série jsou uvedeny v tabulce 3.

Reakce	Produkt	Pracovní postup	Výtěžek (%)
1	44a	A	19
2	44b	A	14
3	44c	A	7
4	44d	A	50
5	44e	B	56
6	44f	B	8
7	44g	B	13
8	44h	B	53
9	44i	B	11
10	44j	B	26
11	44k	B	28
12	44l	B	19
13	44m	B	19
14	44n	B	47
15	44o	B	63
16	44p	B	34
17	44q	B	49
18	44r	B	25
19	44s	B	70
20	44t	B	40
21	44u	C	24
22	44v	C	14
23	44w	C	28
24	44x	C	16
25	44y	C	-
26	44z	C	-

Tabulka 3. Výsledky experimentů připravených zvolenými postupy A, B nebo C.

4.2 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymaticky katalyzovaných reakcí

Další část této bakalářské práce je věnována studiu přípravy derivátů dehydroxypurpurogallinu **22** za využití enzymatické katalýzy. V praxi byly použity dva komerčně zakoupené enzymy a to jmenovitě horseradish peroxidáza (zkratka HRP)⁹ a laccasa (z houby outkovky pestré, *Trametes versicolor*)⁴⁷. Provedení enzymaticky katalyzovaných reakcí probíhalo na bázi smísení enzymu a obou reaktantů ve vodném prostředí obsahujícím reoxidující komponentu. Tou je v případě horseradish peroxidázy vodný peroxid vodíků, jenž však sám o sobě způsobuje oxidaci katecholu a tím vede ke složitému sledu reakcí (nechtěná boční reakce). V případě laccasy je reoxidantem vzdušný kyslík vstupující do reakční směsi při jejím intenzivním míchání. Experimenty provedené s laccasou probíhaly o poznání lépe než ty provedené pomocí horseradish peroxidázy. Z tohoto důvodu budou níže uvedeny především výsledky získané pomocí laccasy.

4.2.1 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymu laccasa

Enzym laccasa byl použit pro přípravu celé série experimentů, které probíhaly podle schématu 8.

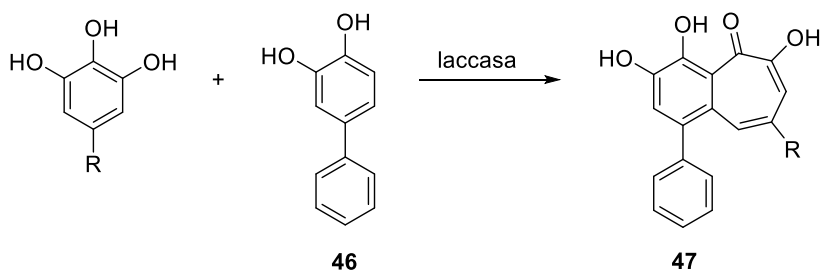


Schéma 8. Obecné schéma reakcí katalyzovaných enzymem laccasou.

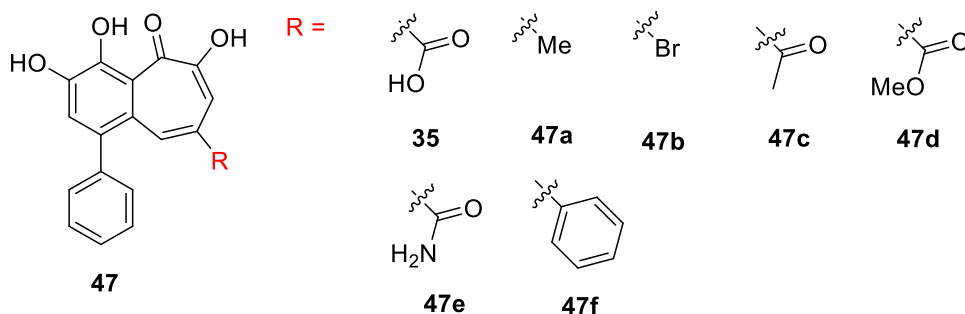
Jako derivát katecholu byl pro následující experimenty využit připravený [1,1'-bifeny]-3,4-diol **46**, který reagoval s vybranými deriváty pyrogallolu mechanismem diskutovaným ve schématu 1. Volba bifenyldiolu **46** nebyla náhodná, tato sloučenina byla zvolena na základě designu možného inhibitoru chřipkové endonukleasy. Podrobnější diskuse o návrhu těchto derivátů však přesahuje rozsah této práce.

Experimenty s laccasou byly zahájeny z důvodu nutnosti přípravy především výše zmíněné látky **35**, jejíž triacetát by následně mohl rovněž sloužit k přípravě vybraných amidů obdobnou cestou jako tomu bylo v případě amidů kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-

karboxylové **44**. Zároveň byly pro přípravu navrženy i další struktury, jejichž výčet se nachází v obrázku 5.

Kyselina **35** byla připravena podle schématu 8 a to konkrétně z látky **46** a kyseliny gallové **25**. Identicky probíhala i příprava ostatních derivátů z obrázku 5. I v tomto případě vystupovala jako derivát katecholu látka **46**. Použité deriváty pyrogallolu se odvíjely od struktury cílového produktu. Proces přípravy všech derivátů spočíval ve smísení obou výchozích látek, tedy látky **46** a vybraného derivátu pyrogallolu a jejich rozpuštění ve směsi acetonu a fosfátového pufru v poměru 1:2. Následně byl přidán enzym laccasa a reakční směs byla intenzivně míchána do druhého dne.

Výsledky i postup zpracování reakční směsi jednotlivých produktů byly ovšem velice rozdílné. Produkty **47a**, **47b** a **47f** se touto cestou připravit nepodařilo. Analýza UPLC-MS chromatogramů indikovala pouze přítomnost nezreagovaných výchozích látek. V případě derivátu **47d** došlo již v průběhu reakce k vyloučení suspenze, která byla následnou centrifugací dovedena do velice uspokojivé čistoty a po reverzní chromatografii byl produkt získán v dobrém výtěžku. Oproti tomu připravit produkty **47c**, **47e** a **35** bylo o poznání komplikovanější. Většinou nedošlo k vyloučení suspenze a bylo tedy nutné centrifugaci nahradit extrakcí a následnou reverzní chromatografií. Výsledky všech experimentů s laccasou jsou uvedeny v tabulce 4.



Obrázek 5. Struktury derivátů připravovaných pomocí enzymu laccasa

Z výsledků této malé série experimentů usuzujeme, že je pro tento typ reakce klíčové, aby benzenové jádro, které podléhá rozšiřování na sedmičlenný kruh neslo elektronodtahující skupinu, jak je tomu v případě acetofenonu a kyseliny gallové **25**, respektive jejího esteru. Dobrý výtěžek kyseliny **35** umožnil, aby mohly být následně provedeny její amidace.

Reakce	Produkt	Výtěžek (%)
1	35	64
2	47a	-
3	47b	-
4	47c	5
5	47d	48
6	47e	16
7	47f	-

Tabulka 4. Výsledky experimentů reakcí s enzymem laccasa

4.2.2 Amidace kyseliny 35

Po vzoru amidů odvozených od kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové se nabízela možnost provést obdobným postupem amidace látky **35**. Nejprve byla provedena kysele katalyzovaná triacetylace kyseliny **35** pomocí acetanhydridu (viz schéma 7 popisující obdobné chránění látky **36**). Tato reakce se ukázala být poněkud hůře reprodukovatelnou, avšak při rychlém zpracování reakční směsi, a především při rychlé kolonové chromatografii byl výtěžek látky **48** dostatečný. Samotné amidační reakce pak byly provedeny optimalizovaným postupem **B**, ovšem obdobně jako u postupu **C** byla před přidavkem aminu výchozí látka 5 min mísená s HATU. Odpovídající reakční postup je pak znázorněn ve schématu 9.

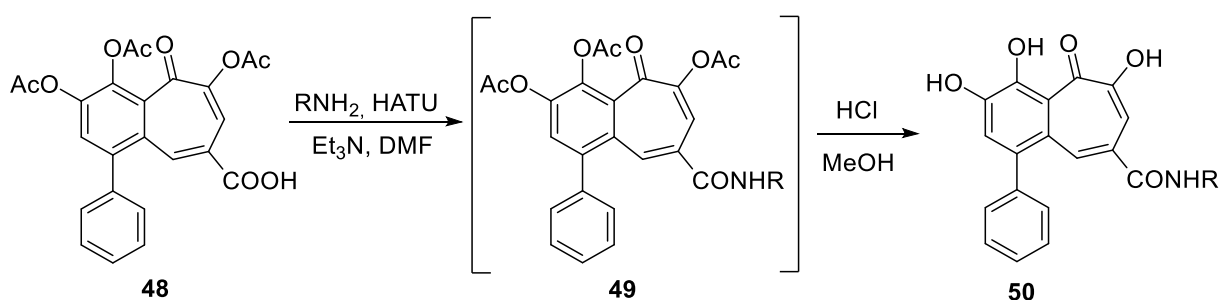
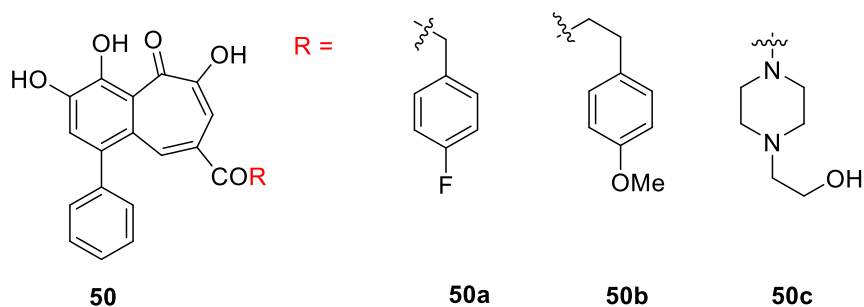


Schéma 9. Amidace za využití triacetátu **48**

Nakonec byly provedeny pouze tři amidace vzhledem k odklonu projektu k jiným strukturním motivům, které mají vykazovat vyšší inhibiční potenciál vůči vybraným endonukleasám. Navržené struktury vybraných amidů jsou uvedeny v obrázku 6. V tabulce 5 jsou pak uvedeny jejich izolované výtěžky.



Obrázek 6. Navržené struktury pro přípravu amidů **50a-c**

Reakce	Produkt	Výtěžek (%)
1	50a	40
2	50b	68
3	50c	25

Tabulka 5. Výtěžky amidací triacetátu **48**

4.2.3 Příprava derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymu horseradish peroxidáza (HRP)

HRP byla použita k přípravě pouze jediného derivátu, bromderivátu **52**, jenž měl sloužit jako výchozí produkt pro další sérii experimentů. Látka **52** byla připravena podle literatury⁹ a produkt **52** byl získán v několika reakcích v konstantním výtěžku (až 17 %) a bez nutnosti dalšího přečištění.

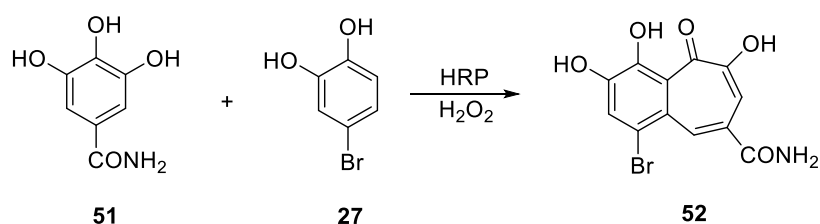


Schéma 10. Příprava látky **52** pomocí reakce katalyzované HRP

4.3.4 Palladium katalyzovaná karboxylace látky **53**

Poslední část této bakalářské práce se věnuje couplingovým reakcím provedeným na substrátu **52** ve snaze nahradit atom bromu karboxylovou, resp. karbonylovou funkční skupinou. Tyto typy reakcí zatím na derivátech purpurogallinů publikovány nebyly. První palladiem katalyzované karboxylace látky **52** vykazovaly dle UPLC-MS jen stopové množství produktu, jenž nebylo izolováno. Opět bylo nutné změnit strategii a dále pracovat jen

Jako zdroj karbonylu byl použit *N*-formylsacharin, do reakce dále vstupoval 1,4-bis(difenylfosfino)butan (DPPB) jako ligand, pre-katalyzátorem byl opět Pd(OAc)₂ a jako báze tentokrát vystupoval uhličitan sodný. Touto cestou se však produkt **55** připravit nepodařilo.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Obecné postupy a chemikálie

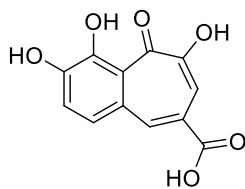
Komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny u běžných prodejců (Sigma Aldrich, Alfa Aesar, TCI, Fluorochem a Combi-Blocks). Voda, zmiňována v pracovních postupech, představuje destilovanou vodu. V případě separace za využití sloupcové chromatografie byl použit silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm), zakoupený od firmy Fluka. Flash chromatografie byla provedena za využití flash chromatografie na přístroji Teledyne ISCO Combi Flash Rf+ a kolony RediSep Rf Gold Silica, nebo RediSep Rf Gold Reversed-phase C18 v případě reverzní chromatografie. Přístroj byl opatřen detektorem s oblastí detekce 210–254 nm. Doba separace a průtok za minutu se odvíjeli od množství separované směsi, a tudíž délky kolony. Jako mobilní fáze, není-li uvedeno jinak, byl použit acetonitril spolu s demineralizovanou vodou s 0,1 % TFA v příslušném gradientu. Standardně byl používán narůstající gradient 5-75 % acetonitrilu. V případě složitějších separací bylo využito preparativní HPLC na přístroji Jasco, opatřeném pumpou PU-986 s detekcí pomocí UV-975 detektoru. Za využití kolony C18 značky WATREX s parametry 250×4 mm. Jako mobilní fáze byl opět použit acetonitril spolu s demineralizovanou vodou s 0,1 % TFA.

Čistota produktů, složení reakčních směsí a míra konverze výchozích látek na produkty byly kontrolovány pomocí přístroje Waters UPLC H-Class Core System s QDa Mass detektorem a následujícími parametry (průtok 15 ml/min, gradient 0-100, rozpouštědla: MeCN/H₂O nebo MeOH po dobu 7 min) za využití ACQUITY UPLC BEH C18 Column kolony, 130Å, 1,7 μm, 2,1 mm × 100 mm s 2,1 mm × 5 mm předkolonou. Přístroj byl opatřen detekcí Waters Acquity UPLC PDA diodového pole s rozsahem oblasti působení 190–800 nm v kombinaci s přístrojem Waters SQD2 Mass spectrometer, který byl řízen za pomoci softwaru MassLynx.

Složení reakčních směsí a schopnost jejich separace byla zároveň kontrolována pomocí TLC za použití hliníkových destiček pokrytých vrstvou silikagelu typu 60 F₂₅₄, které byly zakoupeny od firmy Merck. V případě TLC byla k detekci využita UV lampa o vlnové délce 254 nm. Kontrola struktury produktů byla prováděna pomocí NMR spektrometrie na přístroji Bruker Avance IIITM HD 400 MHz Prodigy, opatřeném kryosondou. ¹H-NMR spektra byla měřena při 400, 500 nebo 600 MHz; ¹³C-NMR spektra byla měřena při 101, 126 nebo 151 MHz. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách δ, konstanty štěpení *J* jsou uvedeny v jednotkách Hz. Jako rozpouštědlo, pokud není uvedeno jinak, byl použit DMSO.

5.2 Příprava kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové a její acetylace

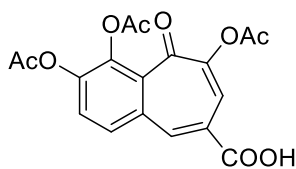
Kyselina dehydroxypurpurogallin-4-karboxylová (36)



Do baňky s kulatým dnem, opatřené míchadlem, byla předložena směs pyrokatecholu (1,5 g; 13,6 mmol) a kyseliny gallové **25** (2,5 g; 13,6 mmol). Obsah baňky byl rozpuštěn ve směsi vody (40 ml) a acetonu (10 ml). Za stálého míchání byl ke směsi přikapávací nálevkou převeden roztok KIO_3 (3,2 g; 15,0 mmol) a to s frekvencí přikapávání jedna kapka po deseti sekundách. Po přikapání veškerého KIO_3 byla baňka opatřena zátkou a ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu 3,5 hodin. Po uplynutí reakční doby byla směs okyselena přidavkem 5% roztoku kyseliny chlorovodíkové (15 ml) a ponechána míchat přes noc. Reakční směs, spolu s uvolněnou suspenzí, byla centrifugována po dobu 15 min s nastavenou rychlostí otáčení na 4 000 RPM. Po ukončení centrifugace byl odstraněn supernatant a odseparovaná suspenze byla zdekantována a následně převedena do baňky s kulatým dnem. Suspenze byla za horka rozpuštěna v 1,4-dioxanu (60 ml) a pod zpětným chladičem ponechána k rekrystalizaci a následně opět zcentrifugována po dobu 15 min při 4 000 RPM. Po vysušení bylo získáno 2,5 g (73 %) surové kyseliny.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 14,80 (s, 1H); 13,31 (s, 1H); 10,35 (s, 1H); 9,64 (s, 1H); 8,30 (d, J = 1,5 Hz, 1H); 7,67 – 7,57 (m, 2H); 7,46 (d, J = 8,6 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 185,0; 167,6; 153,1; 151,2; 148,6; 138,8; 128,7; 128,2; 123,4; 122,0; 120,4; 115,9; Spektra jsou ve shodě s literaturou.⁴⁶ **HRMS** (ESI-): m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_6$ = 247,0248; nalezeno 247,0247 [M-H].

3,4,6-Tris(acetyloxy)-5-oxo-5H-benzocyclohepten-8-karboxylová kyselina (45)



Do baňky s kulatým dnem, opatřené míchadlem, byla předložena surová kyselina **36** (1,0 g; 4,0 mmol) ke které byl přidán anhydrid kyseliny octové (10 ml). Baňka byla opatřena zpětným chladičem a vložena do olejové lázně vyhřáté na 80 °C. Reakční směs byla v lázni ponechána 10 min během kterých byly přidány 4 kapky koncentrované kyseliny sírové. Po uplynutí 10 min byla reakční baňka vyjmuta z lázně a ponechána zchladnout na laboratorní teplotu. Po ochlazení byl obsah reakční baňky vlit do předem připravené kádinky s vodou a ledem. Po vlití došlo k vytvoření oranžové husté sraženiny. Směs byla ponechána v ledové vodě k míchání po dobu 1h. Následně byla vzniklá suspenze extrahována EtOAc (3 × 20 ml), spojené

organické vrstvy byly promyty solankou (20 ml) a vysušeny MgSO₄. Filtrát byl odpařen na RVO. Byla provedena kontrola průběhu reakce pomocí TLC (eluent 10:1; DCM: MeOH). Následně byla provedena kolonová chromatografie za využití stejné mobilní fáze jako pro TLC. Surový produkt byl rekrystalizován (1:1; toluen: EtOAc). Bylo připraveno 1,1 g (74 %) pevné látky oranžovo-žluté barvy.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8,42 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H); 8,10 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,82 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,49 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H); 2,33 (s, 3H); 2,28 (s, 3H); 2,25 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,1; 180,5; 168,1; 168,0; 166,8; 147,7; 145,6; 141,3; 139,5; 132,5; 131,8; 131,0; 127,7; 125,4; 121,2; 20,5; 20,2; 20,1; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₃O₉ = 373,0565; nalezeno 373,0562 [M-H]⁻.

5.3 Syntéza amidů kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové

Obecný postup pro přípravy amidů A

Do skleněné ampule, opatřené míchadlem, byla předložena výchozí dehydroxypurpurogallin-4-karboxylová kyselina **36** spolu s vybraným aminem (1,2 ekv.). Směs byla rozpuštěna přidavkem suchého THF (4 ml) a za míchání k ní bylo přidáno EEDQ (1,2 ekv.). Po přidání veškerého činidla byla ampule uzavřena a vložena do kovového bloku, kde byla míchána při teplotě 80 °C po dobu 2 h. Po dokončení zahřívání byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě přes noc. Následně byl obsah ampule naředěn přidavkem vody (5 ml) a byla provedena extrakce DCM (3 × 10 ml). Získaný organický podíl byl promyt solankou (10 ml), vysušen MgSO₄ a odpařen na RVO. Odparek byl následně rozpuštěn v DMSO (3 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí reverzní flash chromatografie z mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok).

Obecný postup pro přípravy amidů B

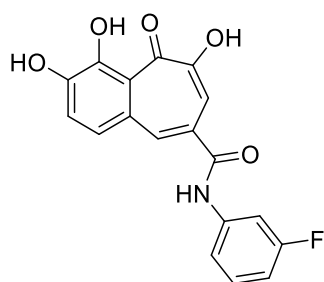
Do skleněné ampule, opatřené míchadlem, byl předložen triacetát kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové **45** spolu s HATU (1,2 ekv.). Směs byla rozpuštěna v DMF (4 ml). Následně byl přidán vybraný amin (1,2 ekv.) a triethylamin (2,0 ekv.). Ampule byla uzavřena a směs ponechána míchat přes noc za RT. Následně byl obsah ampule naředěn přidavkem vody (5 ml) a byla provedena extrakce DCM (3 × 10 ml). Získaný organický podíl byl promyt solankou (10 ml), vysušen MgSO₄ a odpařen na RVO. Odparek byl následně rozpuštěn v MeOH (10 ml) a byl k němu přidán roztok HCl v dioxanu (4 M roztok; 3 ml). Směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Na RVO byla směs odpařena a vzniklý odparek byl následně rozpuštěn v DMSO (3 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí reverzní flash chromatografie z mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok).

Obecný postup pro přípravy amidů C

Do skleněné ampule, opatřené míchadlem, byl předložen triacetát kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové **45** spolu s HATU (1,2 ekv.). Směs byla rozpuštěna v DMF (4 ml). Poté byl přidán triethylamin (2,0 ekv.) a směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Následně byl přidán vybraný amin (1,2 ekv.), ampule byla uzavřena a ponechána míchat při laboratorní teplotě přes noc. Následně byla obsah ampule naředěn přidavkem vody (5 ml) a byla provedena extrakce DCM (3 × 10 ml). Získaný organický podíl

byl promyt solankou (10 ml), vysušen MgSO₄ a odpařen na RVO. Odparek byl následně rozpuštěn ve směsi THF (5 ml) a vody (5 ml) a byla k němu přikapána koncentrovaná HCl (2 ml). Hydrolýza probíhala při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Po ukončení hydrolýzy byla reakční směs odpařena a vzniklý odparek rozpuštěn v DMSO (3 ml). Vzorek byl následně nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí reverzní flash chromatografie z mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok).

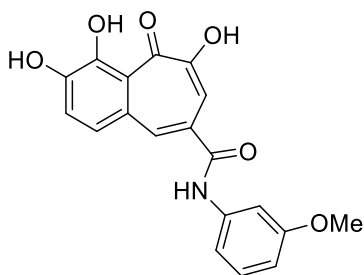
***N*-(3-Fluorfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44a)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **A** z látky **36** (100 mg; 0,4 mmol), THF (4 ml), s *m*-fluoranilinem (53 mg; 0,5 mmol) a EEDQ (118 mg; 0,5 mmol). Bylo získáno 26 mg (19 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,78 (s, 1H); 10,65 (s, 1H); 10,30 (s, 1H); 9,77 (s, 1H); 8,06 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,70 (dt, *J* = 11,8, 2,3 Hz, 1H); 7,66 – 7,58 (m, 1H); 7,56 – 7,44 (m, 3H); 7,48 – 7,33 (m, 1H); 7,00 – 6,90 (m, 1H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,8; 166,9; 162,1 (d, *J* = 241,0 Hz); 153,6; 151,0; 148,0; 140,9 (d, *J* = 10,9 Hz); 135,9; 130,3 (d, *J* = 9,5 Hz); 127,5; 122,2; 116,3; 116,0 (d, *J* = 2,9 Hz); 110,3 (d, *J* = 20,9 Hz); 106,9 (d, *J* = 26,4 Hz); **HRMS** (ESI⁻): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₁O₅NF = 340,0627; nalezeno 340,0623 [M-H]⁻.

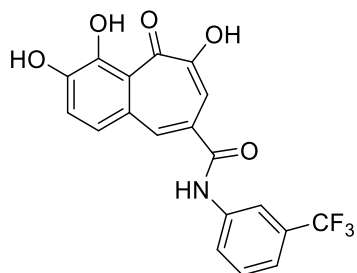
***N*-(3-Methoxyfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44b)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **A** z látky **36** (100 mg; 0,4 mmol), THF (4 ml), *m*-methoxyanilinu (60 mg; 0,5 mmol) a EEDQ (120 mg; 0,5 mmol). Reakce poskytla 20 mg (14 %) oranžové pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,80 (s, 1H); 10,44 (s, 1H); 10,25 (s, 1H); 9,74 (s, 1H); 8,06 (d, *J* = 1,6 Hz; 1H); 7,66 – 7,58 (m, 1H); 7,54 – 7,46 (m, 2H); 7,42 (t, *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,37 – 7,30 (m, 1H); 7,26 (t, *J* = 8,1 Hz; 1H); 6,74 – 6,66 (m, 1H); 3,76 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,7; 166,7; 159,5; 153,6; 150,9; 147,9; 140,3; 135,7; 129,5; 129,2; 129,0; 127,4; 122,2; 120,2; 116,5; 112,5; 109,3; 106,0; 55,0; **HRMS** (ESI⁻): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₁₄O₆N = 352,0827; nalezeno 352,0823 [M-H]⁻.

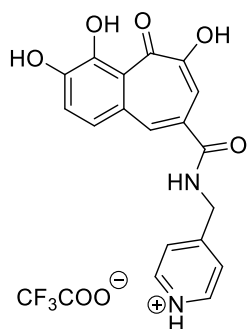
***N*-(3-Trifluormethylfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (44c)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **A** z látky **36** (100 mg; 0,4 mmol), THF (4 ml), 3-(trifluormetyl)anilinu (77 mg; 0,5 mmol) a EEDQ (120 mg, 0,5 mmol). Po lyofilizaci bylo získáno 11 mg (7 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,79 (s, 1H); 10,76 (s, 1H); 10,29 (s, 1H); 9,77 (s, 1H); 8,23 – 8,17 (m, 1H); 8,11 (d, *J* = 1,7 Hz; 1H); 8,05 – 7,98 (m, 1H); 7,73 – 7,57 (m, 2H); 7,56 – 7,46 (m, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,8; 167,1; 153,6; 151,0; 148,1; 140,0; 136,0; 130,0; 129,4 (q, *J* = 31,5 Hz); 129,1; 128,4; 127,6; 124,6 (q, *J* = 272,3 Hz); 123,8; 122,2; 120,2; 120,2 – 120,1 (m); 116,4 (q, *J* = 4,1 Hz); 116,2. Z důvodu složitého štěpení nebylo možné identifikovat multiplicitu všech signálů. **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₁₁O₅NF₃ = 390,0595; nalezeno 390,0590 [M-H]⁻.

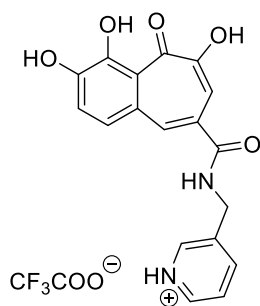
***N*-(Pyridin-4-ylmethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (44d)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **A** z látky **36** (100 mg; 0,4 mmol), THF (4 ml), 4-(aminomethyl)pyridinu (52 mg; 0,5 mmol) a EEDQ (120 mg; 0,5 mmol). Experiment poskytl 70 mg (50 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,78 (s, 1H); 10,30 (s, 1H); 9,71 (s, 1H); 9,45 (t, *J* = 5,8 Hz; 1H); 8,76 (d, *J* = 5,8; 2H); 8,12 (s, 1H); 7,87 (d, *J* = 5,7; 2H); 7,60 – 7,54 (m, 2H); 4,67 (d, *J* = 5,7 Hz; 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,7; 167,8; 158,1; 156,4; 153,5; 151,0; 147,9; 144,3; 135,6; 129,2; 127,4; 127,4; 124,0; 122,2; 120,2; 116,1; 42,7; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₃O₅N₂ = 337,0830; nalezeno 337,0827 [M-H]⁻.

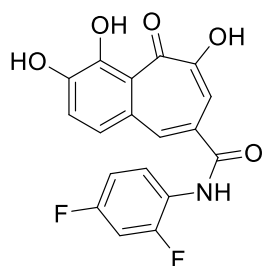
***N*-(Pyridin-3-ylmethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44e)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), 3-pikolyllaminu (52 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 100 mg (56 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,78 (s, 1H); 9,69 (bs, 1H); 9,34 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 8,78 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,69 (dd, *J* = 5,3, 1,5 Hz, 1H); 8,21 (dt, *J* = 8,0, 1,8 Hz, 1H); 8,08 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,76 (ddd, *J* = 8,0, 5,3, 0,7 Hz, 1H); 7,60 – 7,46 (m, 3H); 4,59 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,1; 168,1; 153,9; 151,4; 148,3; 144,9; 144,5; 141,1; 137,8; 135,9; 129,7; 128,0; 127,8; 125,9; 122,7; 120,7; 116,6; 41,2; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₃O₅N₂ = 337,0830; nalezeno 337,0830 [M-H]⁻.

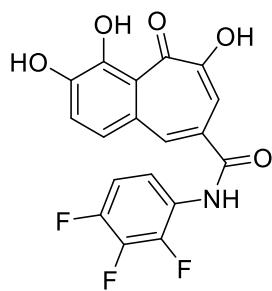
***N*-(2,4-Difluorfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44f)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (200 mg; 0,5 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol), DMF (8 ml), 2,4-difluoranilinu (83 mg; 0,6 mmol) a triethylaminu (0,150 ml; 1,0 mmol). Bylo získáno 15 mg (8 %) oranžové pevné látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,80 (s, 1H); 10,32 (s, 1H); 9,74 (s, 1H); 8,14 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,66 – 7,56 (m, 2H); 7,60 – 7,54 (m, 2H); 7,51 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,42 – 7,32 (m, 1H); 7,18 – 7,06 (m, 1H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,8; 166,7; 159,7 (dd, *J* = 254,0; 11,2 Hz); 155,9 (dd, *J* = 250,6; 12,8 Hz); 153,5; 151,0; 148,1; 136,1; 129,1; 128,2 (dd, *J* = 9,7; 3,0 Hz); 127,6; 127,5; 122,4 (dd, *J* = 12,5, 3,7 Hz); 122,2; 120,2; 116,2; 111,3 (dd, *J* = 22,1; 3,6 Hz); 104,4 (dd, *J* = 26,7; 24,2 Hz); **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₀O₅NF₂ = 358,0533; nalezeno 358,0530 [M-H]⁻.

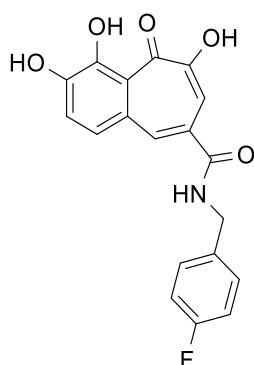
***N*-(2,3,4-Trifluorfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44g)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (200 mg; 0,5 mmol), HATU (245 mg; 0,6 mmol), DMF (8 ml) 2,3,4-trifluoranilinu (80 mg; 0,6 mmol) a triethylaminu (0,15 ml; 1,0 mmol). Bylo získáno 25 mg (13 %) pevné oranžové látky.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,79 (s, 1H); 10,54 (s, 1H); 10,32 (s, 1H); 9,76 (s, 1H); 8,15 (d, J = 1,6 Hz, 1H); 7,69 (d, J = 8,7 Hz; 1H); 7,68 – 7,53 (m, 2H); 7,54 – 7,34 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 185,3; 167,1; 154,0; 151,5; 148,6; 149,7 – 147,1 (m); 145,6 (ddd; J = 251,0; 11,0; 3,6 Hz); 139,9 (dt; J = 248,1; 14,7 Hz); 136,8; 129,4; 128,1; 127,6; 124,3 (dd; J = 9,6; 3,5 Hz); 122,6; 121,7 – 121,6 (m); 120,7; 116,4; 112,3 (dd; J = 17,7; 3,7 Hz). Z důvodu složitého štěpení nebylo možné identifikovat multiplicitu všech signálů. **HRMS** (ESI-): m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{O}_5\text{NF}_3$ = 376,0438; nalezeno 376,0435 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

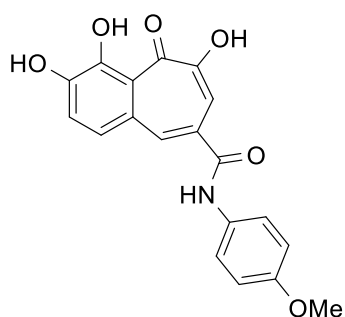
***N*-(4-Fluorbenzyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44h)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (500 mg; 1,3 mmol), HATU (610 mg; 1,6 mmol), DMF (25 ml), (4-fluorfenyl)methanaminu (200 mg; 1,6 mmol) a triethylaminu (0,4 ml; 2,7 mmol). Bylo získáno 250 mg (53 %) oranžového pevného produktu.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,80 (s, 1H); 10,21 (s, 1H); 9,66 (s, 1H); 9,20 (t, J = 5,9 Hz; 1H); 8,05 (s, 1H); 7,58 – 7,45 (m, 3H); 7,44 – 7,34 (m, 2H); 7,22 – 7,11 (m, 2H); 4,46 (d, J = 5,8 Hz; 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 184,6; 167,3; 161,3 (d, J = 242,3 Hz); 153,5; 150,9; 147,8; 135,6 (d, J = 3,1 Hz); 135,4; 129,4 (d, J = 8,1 Hz); 129,4; 128,0; 127,3; 122,2; 120,2; 116,4; 115,1 (d, J = 21,3 Hz); 42,6; **HRMS** (ESI-): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_5\text{NF}$ = 354,0783; nalezeno 354,0780 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

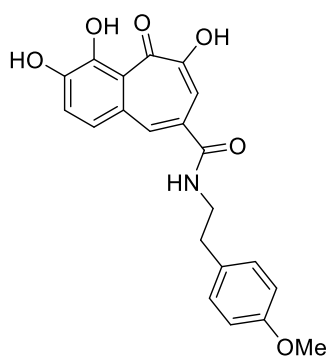
***N*-(4-Methoxyfenyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (44i)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (100 mg; 0,3 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol) DMF (4 ml), *p*-anisidinu (40 mg; 0,3 mmol) a triethylaminu (0,075 ml; 0,5 mmol). Bylo získáno 10 mg (11 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,34 (s, 1H); 10,23 (s, 1H); 9,72 (s, 1H); 8,07 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,69 – 7,57 (m, 3H); 7,56 – 7,47 (m, 2H); 7,11 – 7,07 (m, 2H); 3,75 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,7; 166,2; 155,6; 153,5; 150,9; 147,7; 135,5; 132,2; 129,3; 129,1; 127,3; 122,2; 121,9; 120,2; 116,6; 113,8; 55,2; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₁₄O₆N = 352,0827; nalezeno 352,0823 [M-H]⁻.

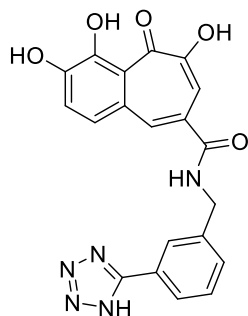
***N*-(4-Methoxyfenethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (44j)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,50 mmol), DMF (6 ml) 4-methoxyfenetylaminu (80 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 40 mg (26 %) oranžového pevného produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,18 (s, 1H); 9,64 (s, 1H); 8,68 (s, 1H); 7,93 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,49 (m, 3H); 7,17 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 6,87 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 3,72 (s, 3H); 3,44 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H); 2,79 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,0; 167,6; 158,2; 153,9; 151,3; 148,0; 135,5; 131,8; 130,1; 129,9; 128,9; 127,5; 122,7; 120,6; 116,9; 114,3; 55,5; 42,1; 34,5; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₂₁H₁₈O₆N = 380,1140; nalezeno 380,1140 [M-H]⁻.

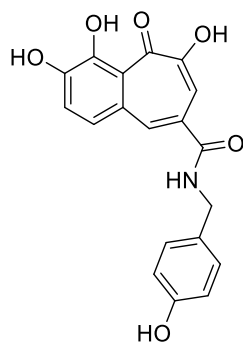
***N*-(3-(1*H*-tetrazol-5-yl)benzyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44k)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,50 mmol), DMF (6 ml), [3-(1*H*-tetrazol-5-yl)benzyl]amin hydrochloridu (100 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 45 mg (28 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,80 (s, 1H); 10,22 (bs, 1H); 9,68 (bs, 1H); 9,31 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H); 8,10 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,93 (dt, *J* = 6,7, 2,1 Hz, 1H); 7,80 – 7,56 (m, 3H); 7,56 – 7,44 (m, 2H); 4,58 (d, *J* = 5,80 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,1; 167,8; 153,9; 151,4; 148,2; 141,3; 135,9; 130,7; 129,9; 129,8; 128,3; 127,7; 126,2; 125,9; 122,7; 120,7; 116,8; 43,5; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₂₀H₁₄O₅N₅ = 404,1000; nalezeno 404,1000[M-H]⁻

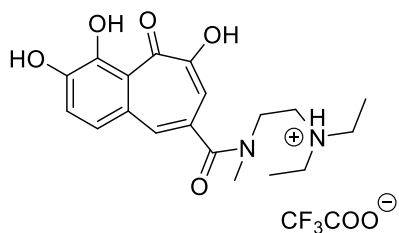
***N*-(4-Hydroxybenzyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44l)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), 4-hydroxybenzylaminu (60 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 26 mg (19 %) oranžového pevného produktu.

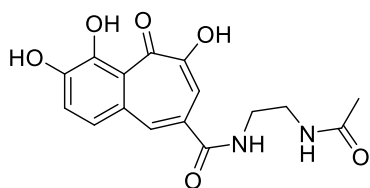
¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,20 (s, 1H); 9,65 (s, 1H); 9,30 (bs, 1H); 9,07 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 8,03 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,57 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,50 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,18 – 7,10 (m, 2H); 6,77 – 6,66 (m, 2H); 4,36 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO) δ = 185,0; 167,5; 156,8; 153,9; 151,3; 148,1; 135,7; 130,0; 129,8; 129,2; 128,6; 127,7; 122,7; 120,7; 117,0; 115,5; 43,2; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₁₄O₆N = 352,0827; nalezeno 352,0826 [M-H]⁻.

***N*-(2-Diethylamino-ethyl)-*N*-methyl-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid trifluoracetát (44m)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5mmol), DMF (6 ml), *N,N*-diethyl-*N'*-methylethylendiaminu (63 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 28 mg (19 %) pevného oranžového produktu. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ = 14,75 (s, 1H); 10,16 (bs, 1H); 9,79 (bs, 1H); 9,48 (s, 1H); 7,55 – 7,44 (m, 3H); 7,13 (s, 1H); 3,76 (s, 2H); 3,35 (d, J = 8,6 Hz, 2H); 3,30 – 3,20 (m, 0H); 3,01 (s, 3H); 1,25 (s, 6H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ = 185,1; 171,6; 158,73 (q, J = 33,2 Hz); 154,6; 151,3; 147,7; 134,3; 130,2; 130,0; 126,6; 122,7; 120,6; 117,2; 47,9; 47,2; 42,5; 37,8; 8,9; **HRMS** (ESI-): m/z vypočteno pro $C_{19}H_{23}O_5N_2$ = 359,1613; nalezeno 359,1612 [M-H]⁻.

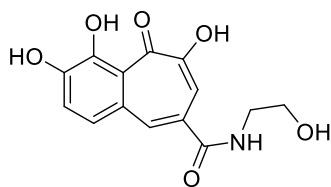
***N*-(2-Acetamino-ethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44n)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (200 mg; 0,5 mmol), HATU (250 mg; 0,6 mmol), DMF (8 ml), *N*-(2-aminoethyl)acetamidu (66 mg; 0,6 mmol) a triethylaminu (0,15 ml; 1,0 mmol). Bylo připraveno 84 mg (47 %) oranžového pevného produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,81 (s, 1H); 10,19 (s, 1H); 9,64 (s, 1H); 8,66 (t, J = 5,5 Hz, 1H); 8,02 – 7,95 (m, 2H); 7,54 (d, J = 1,5 Hz, 1H); 7,50 (d, J = 2,5 Hz, 2H); 3,34 – 3,26 (m, 2H); 3,25 – 3,18 (m, 2H); 1,82 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 184,6; 169,5; 167,4; 153,4; 150,8; 147,6; 135,2; 129,4; 128,4; 127,1; 122,2; 120,2; 116,5; 39,5; 38,2; 22,7; **HRMS** (ESI+): m/z vypočteno pro $C_{16}H_{17}O_6N_2$ = 333,1081; nalezeno 333,1080 [M+H]⁺

***N*-(2-Hydroxyethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44o)**

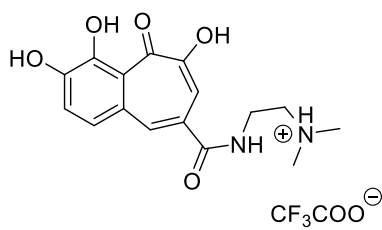


Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (200 mg; 0,5 mmol), HATU (250 mg; 0,6 mmol), DMF (8 ml), ethanolaminu (40 mg; 0,6 mmol) a triethylaminu (0,15 ml; 1,0 mmol). Bylo připraveno 98 mg (63 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,81 (s, 1H); 10,18 (s, 1H); 9,63 (s, 1H); 8,61 (t, J = 5,7 Hz, 1H); 8,02 (d, J = 1,6 Hz, 1H); 7,59 – 7,45 (m, 3H); 4,75 (s, 1H); 3,53 (t, J = 6,2 Hz, 2H);

3,37 – 3,30 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 185,0; 167,8; 153,8; 151,3; 148,1; 135,6; 129,9; 128,8; 127,6; 122,7; 120,7; 117,0; 60,1; 43,2; 36,2; HRMS (ESI+): m/z vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{N} = 292,0816$; nalezeno 292,0815 $[\text{M}+\text{H}]^+$

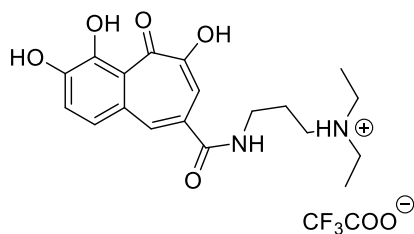
***N*-(2-Dimethylamino-ethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid trifluoracetát (44p)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), *N,N'*-dimethylethylendiaminu (43 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 43 mg (34 %) pevného oranžového produktu.

^1H NMR (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,78 (s, 1H); 10,30 (s, 1H); 9,71 (s, 1H); 9,42 (bs, 1H); 8,85 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H); 8,03 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H); 7,56 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 7,52 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H); 3,61 (q, $J = 5,8$ Hz, 2H); 3,28 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H); 2,86 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 185,1; 168,4; 153,8; 151,4; 148,4; 136,1; 129,6; 128,1; 127,7; 122,7; 120,6; 116,7; 56,4; 43,0; 35,6; HRMS (ESI+): m/z vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_2 = 319,1289$; nalezeno 319,1288 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

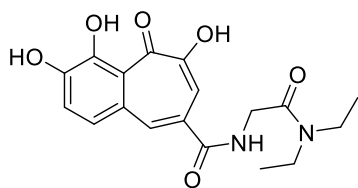
***N*-(3-Diethylamino-propyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid trifluoracetát (44q)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), *N,N*-diethylpropan-1,3-diaminu (63 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 70 mg (49 %) pevného oranžového produktu.

^1H NMR (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,78 (s, 1H); 10,29 (bs, 1H); 9,68 (bs, 1H); 9,43 (s, 1H); 8,81 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H); 8,00 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 7,52 (dd, $J = 9,9, 1,7$ Hz, 3H); 3,35 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H); 3,13 (m, $J = 8,8, 6,0$ Hz, 6H); 1,96 – 1,84 (m, 2H); 1,19 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ = 184,6; 167,6; 158,4 (q; $J = 33,0$ Hz); 153,4; 150,9; 147,8; 135,2; 129,3; 128,1; 127,2; 122,2; 120,2; 118,2; 116,3; 115,2; 112,3; 48,8; 46,4; 37,0; 23,6; 8,6; HRMS (ESI+): m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_2 = 361,1758$; nalezeno 361,1757 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(2-(Diethylamino)-2-oxoethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44r)**

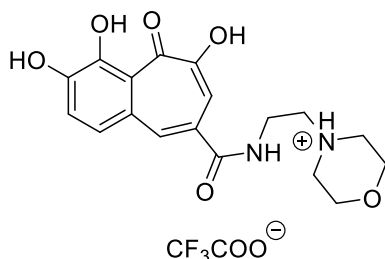


Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), 2-amino-*N,N*-diethyl acetamidu (63 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 34 mg (25

%) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,21 (s, 1H); 9,66 (s, 1H); 8,75 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,06 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,56 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,54 – 7,46 (m, 2H); 4,11 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H); 3,41 – 3,33 (m, 2H); 3,30 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H); 1,17 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 1,04 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,1; 167,8; 167,7; 153,9; 151,4; 148,2; 135,8; 129,8; 128,4; 127,6; 122,7; 120,7; 116,8; 41,6; 41,0; 40,4 (překryv s DMSO-*d*₆); 14,5; 13,5; **HRMS** (ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₂₁O₆N₂ = 361,1394; nalezeno 361,1391 [M+H]⁺.

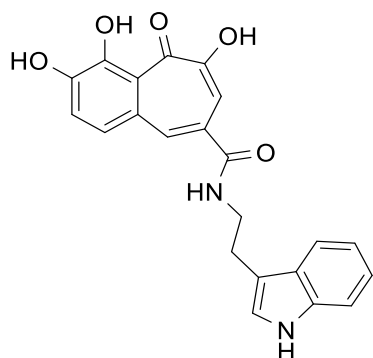
***N*-(2-(Morpholin-4-yl)-ethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44s)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (150 mg; 0,4 mmol), HATU (190 mg; 0,5 mmol), DMF (6 ml), 4-(2-aminoethyl)morfolinu (63 mg; 0,5 mmol) a triethylaminu (0,11 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 100 mg (70 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,77 (s, 1H); 10,31 (bs, 1H); 9,84 (s, 1H); 9,71 (s, 1H); 8,90 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,02 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,58 – 7,47 (m, 3H); 4,05 – 3,97 (m, 2H); 3,73 – 3,60 (m, 4H); 3,60 – 3,52 (m, 2H); 3,33 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); 3,15 (m, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO) δ = 185,1; 168,3; 158,4 (q; *J* = 33,0 Hz) 153,9; 151,4; 148,4; 136,0; 129,6; 128,0; 127,8; 122,7; 120,6; 116,6; 63,8; 55,7; 51,7; 34,8; **HRMS** (ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₂₁O₆N₂ = 361,1394; nalezeno 361,1391 [M+H]⁺

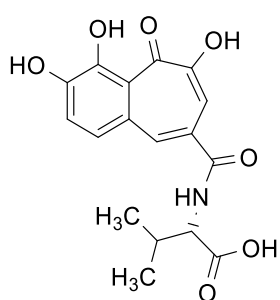
***N*-(2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (44t)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **B** z látky **45** (100 mg; 0,3 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol), DMF (4 ml), tryptamin hydrochloridu (63 mg; 0,3 mmol) a triethylaminu (0,113 ml; 0,8 mmol). Bylo připraveno 42 mg (40 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,83 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H); 10,20 (s, 1H); 9,65 (s, 1H); 8,76 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,96 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,63 – 7,52 (m, 2H); 7,48 (s, 2H); 7,35 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,20 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); 7,13 – 7,02 (m, 1H); 7,02 – 6,95 (m, 1H); 3,59 – 3,49 (m, 2H); 3,01 – 2,91 (m, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,6; 167,2; 153,4; 150,8; 147,6; 129,4; 128,6; 127,3; 127,1; 122,7; 122,2; 121,0; 120,2; 118,3; 116,5; 111,9; 111,4; 40,8; 25,0; **HRMS** (ESI⁻): *m/z* vypočteno pro C₂₂H₁₇O₅N₂ = 389,1143; nalezeno 389,1140 [M-H]⁻.

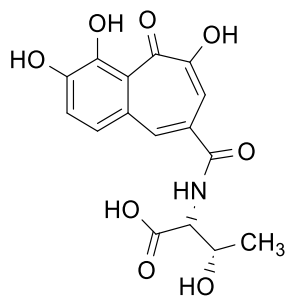
(2*R*)-3-Methyl-2-[(3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karbonyl)-amino]butánová kyselina (44u)



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **C** z látky **45** (100 mg; 0,3 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol), DMF (4 ml), triethylaminu (0,113 ml; 0,8 mmol) a L-valin *terc*-butyl ester hydrochloridu (70 mg; 0,3 mmol). Bylo získáno 23 mg (24 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,82 (s, 1H); 12,65 (s, 1H); 10,21 (s, 1H); 9,67 (s, 1H); 8,69 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 8,00 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,54 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,54 – 7,46 (m, 2H); 4,27 (dd, *J* = 8,0, 6,7 Hz, 1H); 2,18 (hept, *J* = 6,8 Hz, 1H); 1,00 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); 0,97 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,6; 173,0; 168,0; 153,3; 150,9; 147,7; 135,6; 129,2; 128,0; 127,3; 122,1; 120,2; 116,7; 58,8; 29,5; 19,3; 18,8; **HRMS** (ESI⁻): *m/z* vypočteno pro C₁₇H₁₆O₇N = 346,0932; nalezeno 346,0929 [M-H]⁻.

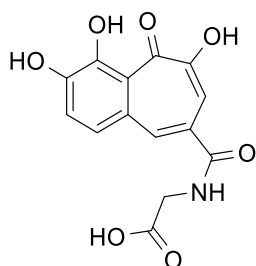
(2*S*, 3*S*)-3-Hydroxy-2-[(3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karbonyl)-amino]butánová kyselina (44v)



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **C** z látky **45** (300 mg; 0,8 mmol), HATU (370 mg; 1,0 mmol), DMF (12 ml), triethylaminu (0,339 ml; 2,4 mmol) a *O-terc*-butyl L-threonin *terc*-butyl ester acetátu (280 mg; 1,0 mmol). Bylo získáno 40 mg (14 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,23 (s, 1H); 9,70 (s, 1H); 8,37 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 8,05 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,60 – 7,46 (m, 3H); 4,92 (s, 1H); 4,43 – 4,36 (m, 1H); 4,25 – 4,15 (m, 1H); 1,17 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,7; 172,0; 167,9; 153,4; 150,9; 147,8; 135,5; 129,2; 127,9; 127,3; 122,2; 120,2; 112,0; 66,5; 59,3; 20,5; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₆H₁₄O₈N = 348,0725; nalezeno 348,0722 [M-H]⁻.

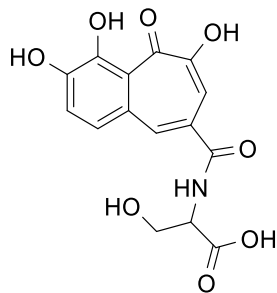
2-[(3,4,6-Trihydroxy-5-oxo-5*H*-benzocyclohepten-8-karbonyl)-amino]ethanová kyselina (44w)



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **C** z látky **45** (100 mg; 0,3 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol), DMF (4 ml), triethylaminu (0,113 ml; 0,8 mmol) a glycin *terc*-butyl ester hydrochloridu (54 mg; 0,3 mmol). Experiment poskytl 23 mg (28 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,80 (s, 1H); 12,63 (s, 1H); 10,24 (s, 1H); 9,68 (s, 1H); 9,01 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,57 – 7,46 (m, 2H); 3,93 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,30 (s, 1H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,7; 171,2; 167,5; 153,4; 150,9; 147,8; 135,4; 129,2; 127,5; 127,3; 122,2; 120,2; 116,1; 41,7; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₄H₁₀O₇N = 304,0463; nalezeno 304,0460 [M-H]⁻.

3-Hydroxy-2-[(3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5H-benzocyclohepten-8-karbonyl)-amino]propanová kyselina (44x)

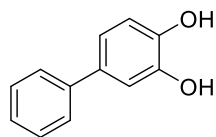


Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu **C** z látky **45** (100 mg; 0,3 mmol), HATU (123 mg; 0,3 mmol), DMF (4 ml), triethylaminu (0,113 ml; 0,8 mmol) a *O-tert*-butyl serin hydrochloridu (64 mg; 0,3 mmol). Bylo získáno 14 mg (16 %) pevné oranžové látky.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,81 (s, 1H); 10,23 (s, 1H); 9,68 (s, 1H); 8,68 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 8,06 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,58 – 7,52 (m, 2H); 7,52 – 7,46 (m, 1H); 5,01 (s, 1H); 4,50 – 4,41 (m, 1H); 3,80 (d, *J* = 5,3 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 184,6; 171,8; 167,5; 153,4; 150,9; 147,8; 135,6; 129,3; 127,8; 127,2; 122,2; 120,2; 116,4; 61,1; 56,2; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₅H₁₂O₈N = 334,0568; nalezeno 334,0565 [M-H]⁻.

5.4 Enzymatická syntéza kyseliny 35 a jejích derivátů

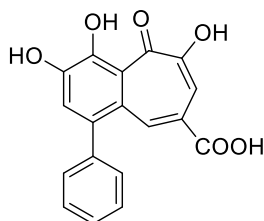
Příprava [1,1'-bifeny]-3,4-diolu (46)



Do dvouhrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen jodbenzen (4,0 g; 20 mmol), (3,4-dimethoxyfenyl)boronová kyselina (4,3 g; 24 mmol), SPhos Pd G4 (0,3 g; 0,4 mmol) a K_2CO_3 (7 g; 50 mmol). Výchozí látky byly rozpuštěny ve směsi toluen/ H_2O ; 10/1 (55 ml). Baňka byla opatřena zpětným chladičem a druhé hrdlo uzavřeno septem. Reakční směs byla při laboratorní teplotě probublávána dusíkem po dobu 20 min a následně, za stálého probublávání dusíkem, zahřívána na 110 °C po dobu 2,5 h. Po vychladnutí byl obsah baňky přefiltrován přes křemelinu, naředěn přídatkem vody (20 ml) a extrahován do Et_2O (3 × 20 ml). Spojený organický podíl byl promyt solankou (20 ml) a odpařen na RVO. Byla provedena kontrola průběhu reakce pomocí TLC (eluent 2:1; cHex:EtOAc). Následně byla provedena kolonová chromatografie za využití stejné mobilní fáze jako pro TLC. Spojené frakce obsahující čistý produkt byly odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve směsi HI (10 ml) a H_3PO_2 (1 ml). Směs byla přes noc zahřívána pod Dean-Starkovým nástavcem na teplotu 125 °C. Po vychladnutí byla směs naředěna přídatkem vody (10 ml) a extrahována Et_2O (3 × 20 ml). Organický podíl byl promyt solankou (20 ml) a odpařen na RVO. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze cHex/EtOAc (10–60 % EtOAc gradient). Po odpaření bylo získáno 1,4 g (38 %) pevné bílé látky.

1H NMR (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 9,04 (s, 2H), 7,60 – 7,45 (m, 2H), 7,42 – 7,34 (m, 2H), 7,29 – 7,21 (m, 1H), 7,05 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,97 – 6,90 (m, 1H), 6,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 145,7; 145,2; 140,5; 131,6; 128,8; 126,4; 126,0; 117,7; 116,1; 114,0; HRMS (ESI⁺): m/z vypočteno pro $C_{12}H_{10}O_2$ = 186,0675; nalezeno 186,0673 $[M+H]^+$.

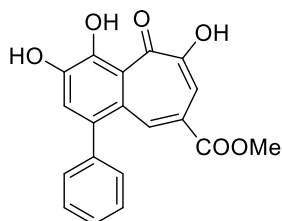
Kyselina 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5H-benzo[7]annulen-8-karboxylová (35)



Do Erlenmeyerovy baňky byl předložen dihydrát kyseliny gallové **25** (400 mg; 2,4 mmol) spolu s [1,1'-bifeny]-3,4-diolem **46** (400 mg; 2,4 mmol). Výchozí látky byly rozpuštěny v acetonu (20 ml) a fosfátovém pufru (40 ml; pH 5,0; 50 mM Na_2HPO_4). Po rozpuštění pevného podílu byl do reakční baňky přidán enzym lacassa (200 mg). Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 30 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byl obsah reakční baňky zcentrifugován. Získaná suspenze byla odfiltrována a vysušena na fritě. Experiment poskytl 440 mg (64 %) pevného červeného produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,95 (s, 1H); 13,02 (s, 1H); 10,49 (s, 1H); 9,77 (s, 1H); 8,37 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,60 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,55 – 7,42 (m, 3H); 7,42 – 7,31 (m, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,6; 167,6; 153,3; 151,1; 147,8; 140,7; 138,2; 135,6; 130,2; 128,5; 127,8; 126,1; 123,7; 122,9; 121,3; 115,7; 40,1; 39,9; 39,7; 39,5; 39,4; 39,3; 39,1; 38,9; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₁O₆ = 323,0561; nalezeno 323,0560 [M-H]⁻.

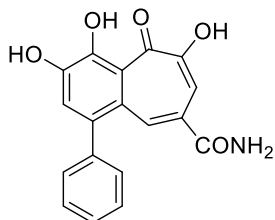
Methyl-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxylát (47d)



Do Erlenmeyerovy baňky byl předložen methyl-3,4,5-trihydroxybenzoát (1,0 g; 5,4 mmol) spolu s [1,1'-bifenyl]-3,4-diolem **46** (1,0 g; 5,3 mmol). Výchozí látky byly rozpuštěny v acetonu (50 ml) a fosfátovém pufru (100 ml; pH 5,0; 50 mM Na₂HPO₄). Po rozpuštění pevného podílu byl do reakční baňky přidán enzym lacassa (200 mg). Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 30 h při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zcentrifugována a oddělená suspenze byla rozpuštěna v DMSO (6 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok). Experiment poskytl 0,9 g (48 %) pevného červeného produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,89 (s, 1H); 10,56 (s, 1H); 9,84 (s, 1H); 8,33 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,55 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 7,54 – 7,43 (m, 3H); 7,40 (s, 1H); 7,38 – 7,29 (m, 2H); 3,69 (s, 3H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 186,1; 167,0; 153,9; 151,5; 148,6; 141,0; 138,9; 136,3; 130,7; 129,0; 128,3; 126,3; 124,1; 122,2; 121,7; 115,3; 53,3; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₃H₉O₆ = 261,0405; nalezeno 261,0402 [M-H]⁻.

3,4,6-Trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5*H*-benzocyclohepten-8-karboxamid (47e)

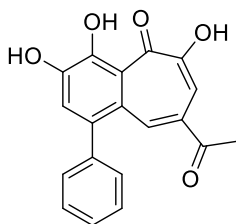


Do Erlenmeyerovy baňky byl předložen methyl-3,4,5-trihydroxybenzamid **51** (400 mg; 2,4 mmol) spolu s [1,1'-bifenyl]-3,4-diolem **46** (400 mg; 2,3 mmol). Výchozí látky byly rozpuštěny v acetonu (20 ml) a fosfátovém pufru (40 ml; pH 5,0; 50 mM Na₂HPO₄). Po rozpuštění pevného podílu byl do reakční baňky přidán enzym lacassa (100 mg). Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 30 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byl obsah reakční baňky extrahován EtOAc (3 × 10 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty vodou (10 ml), solankou (10 ml) a následně odpařeny na RVO. Získaný odparek byl rozpuštěn v DMSO (6 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní

chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok). Experiment poskytl 120 mg (16 %) pevného produktu červené barvy.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,94 (s, 1H); 10,31 (s, 1H); 9,73 (s, 1H); 8,01 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,81 – 7,77 (m, 1H); 7,54 – 7,40 (m, 4H); 7,43 – 7,22 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,2; 169,3; 153,5; 150,6; 146,8; 140,9; 137,3; 132,8; 130,2; 128,5; 128,0; 127,6; 126,7; 124,0; 121,2; 116,1; HRMS (ESI+): *m/z* vypočteno pro C₁₈H₁₄O₅N = 324,0867; nalezeno 324,0868 [M+H]⁺.

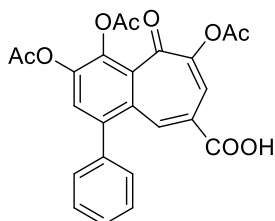
8-Acyl-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5*H*-benzocyclohepten (47c)



Do Erlenmeyerovy baňky byl předložen 3,4,5-trihydroxyacetofenon (140 mg; 0,8 mmol) spolu s [1,1'-bifenyl]-3,4-diolem **46** (140 mg; 0,8 mmol). Výchozí látky byly rozpuštěny v acetonu (7 ml) a fosfátovém pufru (14 ml; pH 5,0; 50 mM Na₂HPO₄). Po rozpuštění pevného podílu byl do reakční baňky přidán enzym lacassa (36 mg). Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 30 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byl obsah reakční baňky extrahován EtOAc (3 × 5 ml). Spojený organický podíl byl promyt vodou (10 ml), solankou (10 ml) a následně odpařen na RVO. Získaný odparek byl rozpuštěn v DMSO (3 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok). Frakce s produktem byly zlyofilizovány a výsledný produkt purifikován na preparativní RP-HPLC (gradient 0,1% TFA, 50-100% MeCN, 60 min, průtok 120 ml·min⁻¹). Reakce poskytla 11 mg (5 %) pevného produktu červené barvy. ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,85 (s, 1H); 10,59 (s, 1H); 9,79 (s, 1H); 8,16 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,57 – 7,48 (m, 4H); 7,44 – 7,38 (m, 3H); 2,14 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 197,2; 185,8; 153,4; 151,2; 148,2; 140,5; 138,4; 136,1; 130,3; 129,3; 128,6; 128,0; 125,9; 123,5; 121,1; 113,6; 25,8; HRMS (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₁₃O₅ = 321,0769; nalezeno 321,0767 [M-H]⁻.

5.5 Acetylace kyseliny 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5H-benzo[7]annulen-8-karboxylové a syntéza jejích amidů

3,4,6-Tris(acetyloxy)-5-oxo-1-fenyl-5H-benzocyclohepten-8-karboxylová kyselina (**48**)



Látka **35** (430 mg; 1,3 mmol) byla rozpuštěna v acetanhydridu (5 ml) a byly k ní přikapány dvě kapky koncentrované H₂SO₄. Reakční směs byla následně zahřátá na 80 °C po dobu 10 min. Směs byla následně ponechána zchladnout na pokojovou teplotu a poté vlita do kádinky s ledem a vodou. Takto vzniklá směs byla míchána po dobu 1 h. Obsah

kádinky byl extrahován EtOAc (3 × 10 ml), spojené organické vrstvy byly promyty solankou a vysušeny MgSO₄. Extrakt byl následně odpařen na RVO. Byla provedena kontrola průběhu reakce pomocí TLC (eluent 1:1; cHex:EtOAc). Následně byla provedena sloupcová chromatografie, kdy byly nejprve dva objemy kolony promyty mobilní fází (1:1; cHex:EtOAc) a následně byl přidáván už jen čistý EtOAc do ukončení separace. Bylo připraveno 153 mg (26 %) pevného produktu žluté barvy.

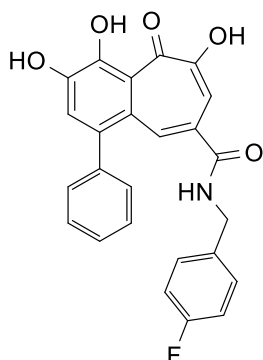
¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13,40 (s, 1H); 8,18 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,56 – 7,53 (m, 3H); 7,46 – 7,43 (m, 2H); 7,38 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H); 2,31 (s, 3H); 2,29 (s, 3H); 2,26 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 182,0; 168,0; 167,9; 166,6; 147,1; 144,6; 142,5; 139,9; 138,4; 136,1; 132,5; 130,1; 128,9; 128,6; 124,7; 119,7; 20,5; 20,1; 19,9; HRMS (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₂₄H₁₇O₉ = 449,0878; nalezeno 449,0877 [M-H]⁻.

Obecný postup pro přípravy amidů kyseliny 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5H-benzo[7]annulen-8-karboxylové

Do skleněné ampule, opatřené míchadlem, byla předloženo výchozí kyselina ve formě triacetátu **48** spolu s HATU (1,2 ekv.). Směs byla následně rozpuštěna v DMF (4 ml). Takto připravená směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Následně byl přidán vybraný amin (1,2 ekv.) a triethylamin (2,0 ekv.). Ampule byla uzavřena a směs ponechána míchat přes noc za laboratorní teploty. Následně byla obsah ampule naředěn přidávkem vody (5 ml) a byla provedena extrakce do EtOAc (3 × 10 ml) spolu s malým množstvím 10 % vodného roztoku kyseliny citronové. Spojené organické podíly byly promyty solankou (10 ml) a odpařeny. Odparek byl následně rozpuštěn v MeOH (10 ml) a byl přidán roztok HCl v dioxanu (4 M roztok; 3 ml). Směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Na RVO bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo a vzniklý odparek byl následně rozpuštěn v DMSO (3 ml)

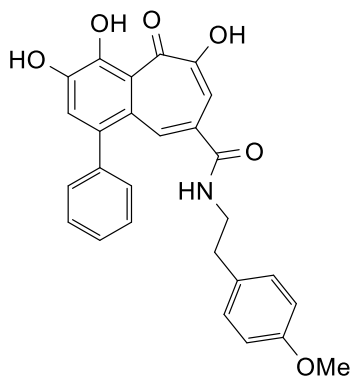
a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí flash chromatografie z mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok).

***N*-(4-Fluorbenzyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (50a)**



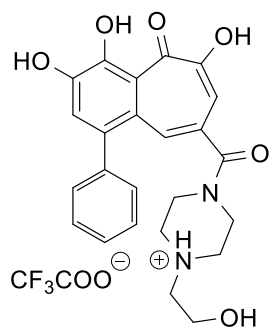
Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu z látky **48** (100 mg; 0,2 mmol), HATU (100 mg; 0,3 mmol) DMF (4 ml), 4-fluorbenzylaminu (40 mg; 0,3 mmol) a triethylaminu (0,075 ml; 0,5 mmol). Bylo získáno 35 mg (40 %) pevného oranžového produktu. **¹H NMR** (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,90 (s, 1H); 10,32 (s, 1H); 9,80 (s, 1H); 8,87 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H); 7,98 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,52 – 7,47 (m, 3H); 7,42 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,41 – 7,31 (m, 3H); 7,18 – 7,06 (m, 4H); 4,28 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,3; 167,8; 153,7; 150,6; 146,9; 140,8; 137,3; 135,4; 132,4; 130,2; 128,8; 128,8; 128,5; 128,0; 127,7; 126,7; 123,9; 121,2; 115,7; 115,1; 114,9; 42,1; **HRMS** (ESI-): *m/z* vypočteno pro C₂₅H₁₇O₅NF = 430,1096; nalezeno 430,1093 [M-H]⁻.

***N*-(4-Methoxyfenethyl)-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-1-fenyl-5*H*-benzocyklohepten-8-karboxamid (50b)**



Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu z látky **48** (150 mg; 0,3 mmol), HATU (150 mg; 0,4 mmol) DMF (4 ml), 4-methoxyfenethylaminu (55 mg; 0,4 mmol) a triethylaminu (0,075 ml; 0,5 mmol). Bylo získáno 65 mg (68 %) pevného oranžového produktu. **¹H NMR** (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,93 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H); 10,31 (s, 1H); 9,76 (s, 1H); 8,40 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,00 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 7,55 – 7,41 (m, 3H); 7,41 – 7,31 (m, 4H); 7,07 – 6,99 (m, 2H); 6,85 – 6,77 (m, 2H); 3,71 (s, 3H); 3,28 (dt, *J* = 7,7, 6,0 Hz, 2H); 2,62 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,2; 167,3; 157,6; 153,6; 150,6; 146,8; 140,8; 137,3; 132,6; 131,2; 130,2; 129,5; 128,5; 128,2; 127,7; 126,8; 124,0; 121,1; 115,8; 113,7; 54,9; 41,4; 34,1; **HRMS** (ESI+): *m/z* vypočteno pro C₂₇H₂₄O₆N = 458,1598; nalezeno 458,1597 [M+H]⁺.

3,4,6-Trihydroxy-8-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-karbonyl)-1-fenyl-5H-benzocyklohepten-5-one trifluoroacetát (50c)



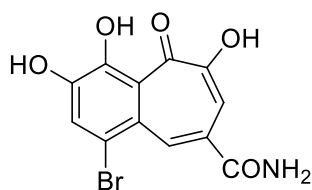
Tato sloučenina byla připravena podle obecného postupu z látky **48** (150 mg; 0,3 mmol), HATU (150 mg; 0,4 mmol) DMF (4 ml), 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (67 mg; 0,4 mmol) a triethylaminu (0,075 ml; 0,5 mmol). Bylo získáno 22 mg (25 %) pevného oranžového produktu.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 14,88 (s, 1H); 10,36 (s, 1H); 9,94 (s, 1H); 9,83 (bs, 1H); 7,55 – 7,47 (m, 2H); 7,50 – 7,43 (m, 1H); 7,38 – 7,32 (m, 3H); 7,29 (d, J = 1,3 Hz, 1H); 7,08 (d, J = 1,4 Hz, 1H); 4,06 (bs, 1H);

3,74 – 3,69 (m, 2H); 3,38 (bs, 4H); 3,13 (bs, 2H); 2,86 (bs, 4H); **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 185,4; 169,5; 157,93 (q, J = 31,0 Hz); 154,6; 150,9; 146,7; 140,8; 136,5; 130,6; 130,2; 128,7; 127,9; 127,8; 126,7; 124,0; 121,0; 116,1; 57,8; **HRMS** (ESI+): m/z vypočteno pro C₂₄H₂₅O₆N₂ = 437,1707; nalezeno 437,1710 [M+H]⁺.

5.6 Enzymatická syntéza látky 52 a její palladiem katalyzované reakce

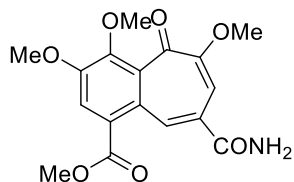
1-Brom-3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5H-benzocyclohepten-8-karboxamid (52)



V baňce s kulatým dnem, opatřené míchadlem, byl smísen 4-bromkatechol **27** (0,6 ml; 5,0 mmol) a 3,4,5-trihydroxybenzamid **51** (600 mg; 3,5 mmol). Pevný podíl byl rozpuštěn ve směsi acetonu a fosfáto-citrátového pufru upraveného na pH 5,0 (1:10; 50 ml). Po rozpuštění pevného podílu byl do reakční směsi přidán 3% vodný roztok peroxidu vodíku (0,6 ml) a první dávka enzymu horseradish peroxidázy (2 mg). Roztok peroxidu vodíku (3 %) byl do reakce přidán celkem čtyřikrát, a to s časovým rozestupem 15 min. HRP byla přidána ve třech dávkách vždy po 20 min. První a druhá navážka HPR činily 2 mg, třetí 1 mg. V průběhu reakce byl obsah baňky několikrát krouživými pohyby promísen. Po posledním přidavku 3% roztoku peroxidu vodíku byla reakční směs ponechána míchat po dobu dalších 15 min. Došlo k vyloučení tmavě oranžové sraženiny, která byla následně ze směsi odfiltrována. Filtrační koláč byl jednou promyt vodou a ponechán vyschnout na vzduchu. Následně byl vysušený filtrační koláč rozpuštěn přidavkem MeOH (3,5 ml) a poté byla směs krátce povařena. Obsah baňky byl ponechán přes noc stát při laboratorní teplotě. Další den byla vzniklá tmavě oranžová suspenze ze směsi odfiltrována a vysušena. Bylo připraveno 200 mg (17 %) pevného červeného produktu.

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, DMSO- d_6) δ = 14,81 (s, 1H); 10,59 (s, 1H); 9,96 (s, 1H); 8,51 (d, J = 1,5 Hz, 1H); 7,84 (s, 1H); 7,56 (s, 1H); 7,47 (d, J = 1,5 Hz, 1H); 6,83 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 185,0; 169,2; 154,3; 151,2; 147,7; 132,7; 129,8; 126,5; 126,2; 121,5; 117,5; 115,7; **HRMS** (ESI-): m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_5\text{NBr}$ = 323,9513; nalezeno 323,9511 [M-H] $^-$

1-Methoxykarbonyl-3,4,6-trimethoxy-5-oxo-5H-benzocyclohepten-8-karboxamid (54)



Do skelněné ampule, opatřené míchadlem, byla předložena látka **52** (100 mg; 0,3 mmol) a K_2CO_3 (500 mg; 3,7 mmol). Ampule byla uzavřena a zainertována argonem. Směs byla rozpuštěna v suchém DMF (4 ml) a následně vychlazena na 0 °C. Pod argonem byl k reakční směsi pomalu přidán methyl jodid (0,15 ml; 2,5 mmol). Reakční směs byla vyjmuta ze studené lázně a ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu dvou dnů. Po uplynutí dvou dnů byla reakce ukončena přidavkem vody (10 ml). Reakční směs byla extrahována EtOAc (3 \times 10 ml). Spojené organické podíly byly promyty solankou (1 \times 10 ml), vysušeny a odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn v DMSO (3 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní

chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze acetonitril/voda s TFA (0,1% roztok). Získaný meziproduct **53** (100 mg; 0,3 mmol) byl předložen do skleněné ampule spolu s XantPhosem Pd G2 (12 mg; 0,014 mmol) a Mo(CO)₆ (72 mg; 0,3 mmol). Ampule byla následně uzavřena a po uzavření byl její obsah rozpuštěn v DMSO (1 ml) a MeOH (0,5 ml) a poté byl po dobu 15 min probubláván dusíkem. Po ukončení probublávání byl přidán triethylamin (0,15 ml) a reakční směs byla ponechána míchat při teplotě 100 °C po dobu 24 h. Reakční směs byla následně naředěna přídatkem MeOH (1 ml) a přes jednorázový injekční filtr byla přefiltrována a odpařena. Odparek byl rozpuštěn v DMSO (3 ml) a nanesen na kolonu pro reverzní chromatografii. Reakční směs byla čištěna pomocí mobilní fáze MeCN/H₂O s TFA (0,1% roztok). Reakce poskytla 44 mg (46 %) pevného žlutého produktu.

¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8,04 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H); 7,87 (s, 1H); 7,76 (s, 1H); 7,40 (s, 1H); 6,50 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H); 3,93 (s, 3 H); 3,87 (s, 3H); 3,83 (s, 3H); 3,77 (s, 3H).

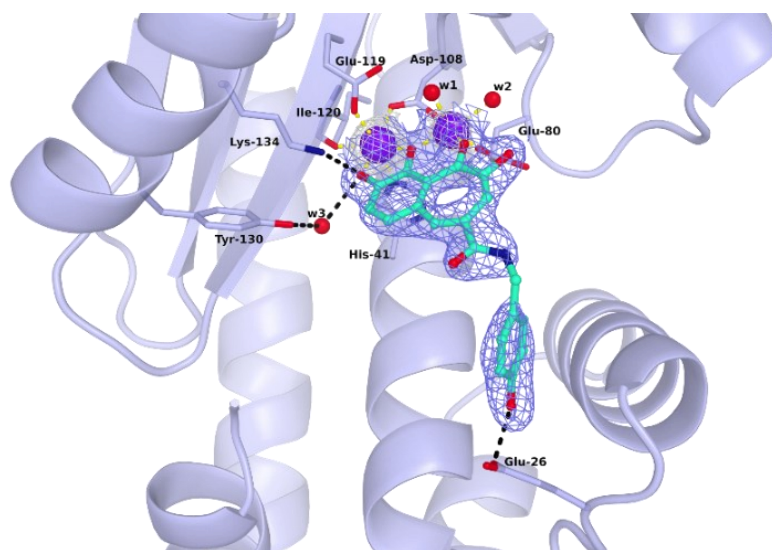
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 186,6; 169,5; 166,9; 155,9; 152,5; 147,2; 133,3; 129,7; 126,6; 125,4; 124,8; 117,4; 101,5; 62,0; 56,5; 56,0; 52,8; **HRMS** (ESI+): *m/z* vypočteno pro C₁₇H₁₈O₇N = 348,1078; nalezeno 348,1077 [M+H]⁺.

6. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce se podařilo úspěšně naplnit všechny cíle. Jedním z cílů byla příprava kyseliny dehydroxypurpurogallin-4-karboxylové **36** a množství jejích amidů. Výchozí kyselinu **36** se podařilo připravit ve vysokém výtěžku reakcí založené na oxidaci pomocí KIO_3 . Zároveň byla připravena řada dalších derivátů dehydroxypurpurogallinu pomocí enzymaticky katalyzovaných reakcí, konkrétně látky **35** a **47c-d** pomocí enzymu laccasa a látku **52** pomocí enzymu HRP.

Co se amidů **44a-z** týče, byly provedeny tři série experimentů pomocí tří různých pracovních postupů **A**, **B** a **C**. Postup **A** využíval jako výchozí substrát kyselinu **36** v surové podobě a jako amidační činidlo zde vystupovalo EEDQ za zvýšené reakční teploty. Touto cestou se podařilo připravit amidy **44a-d**. Vyšších výtěžků bylo dosaženo reakčním postupem **B**, kterým byly připraveny deriváty **44f-t**. Tento postup využíval místo kyseliny **36** její triacetát **45**, přičemž EEDQ bylo nahrazeno činidlem HATU a reakce probíhala bez zahřívání. Postup **C** byl využit k přípravě třetí série derivátů **44u-x**, kde bylo dosaženo o poznání nižších výtěžků, než u předchozích dvou sérií.

Na spolupracujícím pracovišti se podařilo získat krystalovou strukturu komplexu chřípkové endonukleasy spolu s látkou **44I**, jenž je prezentována na obrázku 7. V aktivním místě enzymu je možné si povšimnout iontů Mn^{2+} a Mg^{2+} , které jsou chelátovány zmíněnou látkou **44I**, jenž je v aktivním místě stabilizována řadou dalších nekovalentních interakcí s postranními zbytky aminokyselin tvořící enzym.



Obrázek 7. Krystalová struktura látky **44I** (modrá barva) s endonukleasou (sekundární struktura proteinů zobrazená světle fialovou barvou). Tmavě fialové kulovité útvary pak představují ionty Mn^{2+} (vlevo) a Mg^{2+} (vpravo).

Dále byly provedeny amidace na triacetátu **48**. Touto cestou byly získány deriváty **50a-c**. Nakonec byla provedena palladiem katalyzované karboxylace na látce **53**, kde se podařilo dosáhnout výtěžku 46 % odpovídající karboxylové kyseliny.

7. PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své práce panu Aleši Macharovi za cenné rady, trpělivost a ochotu, jenž mi byly poskytnuty v průběhu řešení mého projektu. Dále bych ráda poděkovala slečně Lucii Svobodové za nesmírnou ochotu, pomoc, zkušenosti a znalosti, které mi pomohly v široké škále jak laboratorních dovedností, tak samotného psaní mé práce. Nemalé díky za poskytnuté rady a pomoc při vykonávání laboratorních úkonů náleží též panu Róbertu Reibergerovi. Též děkuji panu Tomáši Kotačkovi za poskytnutí obrázku 7. Rovněž bych ráda poděkovala celému kolektivu výzkumného týmu Drug Discovery Pavla Majera za ochotu, milé přátelské prostředí a příležitost vypracovat mou bakalářskou práci právě zde. Mé díky rovněž náleží mé rodině, a to za nesmírnou podporu během celé doby mého studia.

Tato práce vznikla za podpory projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103), financovaného Evropskou unií – Next Generation EU.

8. SEZNAM LITERATURY

- (1) Pauson, P. L. Tropones and Tropolones. *Chem. Rev.* **1955**, 55 (1), 9-136.
- (2) Zhao, J. Plant troponoids: Chemistry, biological activity, and biosynthesis. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14 (24), 2597-2621.
- (3) Lindberg, G. D.; Larkin, J. M.; Whaley, H. A. Production of Tropolone by A Pseudomonas. *J. Nat. Prod.* **1980**, 43 (5), 592-594.
- (4) Dastan, A.; Kilic, H.; Saracoglu, N. One hundred years of benzotropone chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, 14, 1120-1180.
- (5) Portella, G.; Poater, J.; Solà, M. Assessment of Clar's aromatic π -sextet rule by means of PDI, NICS and HOMA indicators of local aromaticity. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18 (8), 785-791.
- (6) Koblischek, P.; Brückner, R. Syntheses of 7-, 8-and 9-Bromobenzotropolone, Cross-Couplings of Their Methyl Ethers, and Deprotection to 7-, 8-or 9-Substituted Benzotropolones. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, 2022 (37).
- (7) Gamemara, D.; Dias, E.; Tancredi, N.; Heinzen, H.; Moyna, P.; Forbes, E. J. Hetero Diels-Alder adduct formation between nitrosobenzene and tetra-methyl purpurogallin and its -Diels-Alder reaction. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2001**, 12 (4), 489-492.
- (8) Barltrop, J. A.; Nicholson, J. S. The Oxidation Products of Phenols .1. The Structure of Purpurogallin. *J. Chem. Soc.* **1948**, (Feb), 116-120.
- (9) Kerschensteiner, L.; Löbermann, F.; Steglich, W.; Trauner, D. Crocipopdin, a benzotropolone pigment from the mushroom *Leccinum crocipodium* (Boletales). *Tetrahedron* **2011**, 67 (8), 1536-1539.
- (10) Matsuo, Y.; Yoshida, A.; Saito, Y.; Tanaka, T. Structural Revision and Biomimetic Synthesis of Goupiolone B. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2017**, 56 (39), 11855-11859.
- (11) Yang, C. S.; Wang, X.; Lu, G.; Picinich, S. C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9 (6), 429-439.
- (12) Mesa-Siverio, D.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Murguía, J. R.; Rodríguez-Afonso, A. Novel DNA-Damaging tropolone derivatives from *Goupia glabra*. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003 (21), 4243-4247.
- (13) Sang, S. M.; Lambert, J. D.; Tian, S. Y.; Hong, J. L.; Hou, Z.; Ryu, J. H.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Huang, M. T.; Yang, C. S.; Ho, C. T. Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Bioorgan. Med. Chem.* **2004**, 12 (2), 459-467.
- (14) Kirschberg, T. A.; Balakrishnan, M.; Squires, N. H.; Barnes, T.; Brendza, K. M.; Chen, X. W.; Eisenberg, E. J.; Jin, W. L.; Kutty, N.; Leavitt, S.; et al. RNase H Active Site Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase: Design, Biochemical Activity, and Structural Information. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (19), 5781-5784.
- (15) Kelly-Hunt, A. E.; Mehan, A.; Brooks, S.; Leanca, M. A.; McKay, J. E. D.; Mahamed, N.; Lambert, D.; Dempster, N. M.; Allen, R. J.; Evans, A. R.; et al. Synthesis and Analytical Characterization of Purpurogallin: A Pharmacologically Active Constituent of Oak Galls. *J. Chem. Educ.* **2022**, 99 (2), 983-993.
- (16) Birkinshaw, J. H.; Chambers, A. R.; Raistrick, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Stipitatic acid, C₈H₆O₅, a Metabolic Product of *Penicillium stipitatum* Thom. *Biochem. J.* **1942**, 36, 242-251.
- (17) Dewar, M. J. S. Structure of Stipitatic Acid. *Nature* **1945**, 155 (3924), 50-51.
- (18) Erdtman, H.; Gripenberg, J. Antibiotic Substances from the Heart Wood of Thuja-Plicata Don. *Nature* **1948**, 161 (4097), 719-719.

- (19) Zhao, J.; Fujita, K.; Yamada, J.; Sakai, K. Improved β -thujaplicin production in suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl. Microbiol. Biot.* **2001**, *55* (3), 301-305.
- (20) Nozoe, T. Substitution Products of Tropolone and Allied Compounds. *Nature* **1951**, *167* (4261), 1055-1057.
- (21) Buta, J. G.; Flippen, J. L.; Lusby, W. R. Harringtonolide, a Plant-Growth Inhibitory Tropone from *Cephalotaxus harringtonia* (Forbes) K. Koch. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (5), 1002-1003.
- (22) Kang, S.; Cai, S.; Teng, L. The antiviral effect of hainanolide, a compound isolated from *Cephalotaxus hainanensis* (author's transl). *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* **1981**, *16* (11), 867-868.
- (23) Ni, L.; Zhong, X. H.; Chen, X. J.; Zhang, B. J.; Bao, M. F.; Cai, X. H. Bioactive norditerpenoids from *Cephalotaxus fortunei* var. *alpina* and *C. lanceolata*. *Phytochemistry* **2018**, *151*, 50-60.
- (24) Zhu, T. Y.; Wu, X. T.; Chen, C.; Liu, X. Q.; Zhu, L.; Luo, J. G.; Kong, L. Y. Photoaffinity Probe Reveals the Potential Target of Harringtonolide for Cancer Cell Migration Inhibition. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13* (3), 449-456.
- (25) Evanno, L.; Jossang, A.; Nguyen-Pouplin, J.; Delaroche, D.; Herson, P.; Seuleiman, M.; Bodo, B.; Nay, B. Further studies of the norditerpene (+)-Harringtonolide isolated from *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*: Absolute Configuration, Cytotoxic and Antifungal Activities. *Planta Med.* **2008**, *74* (8), 870-872.
- (26) Sun, N.; Xue, Z.; Liang, X.; Huang, L. Studies on the structure of a new antitumor agent-hainanolide. *Acta Pharm. Sin.* **1979**, *14*, 41-46.
- (27) Dewar, M. J. S. Structure of Colchicine - Reply. *Nature* **1945**, *155* (3938), 479-479.
- (28) Nett, R. S.; Sattely, E. S. Total Biosynthesis of the Tubulin-Binding Alkaloid Colchicine. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (46), 19454-19465.
- (29) Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (1), 155-183.
- (30) Shekelle, P. G.; Newberry, S. J.; FitzGerald, J. D.; Motala, A.; O'Hanlon, C. E.; Tariq, A.; Okunogbe, A.; Han, D.; Shanman, R. Management of Gout: A Systematic Review in Support of an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. *Ann. Intern. Med.* **2017**, *166* (1), 37-51
- (31) Leung, Y. Y.; Hui, L. L. Y.; Kraus, V. B. Colchicine - Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin. Arthritis. Rheum.* **2015**, *45* (3), 341-350.
- (32) Finkelstein, Y.; Aks, S. E.; Hutson, J. R.; Juurlink, D. N.; Nguyen, P.; Dubnov-Raz, G.; Pollak, U.; Koren, G.; Bentur, Y. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48* (5), 407-414.
- (33) Ehrlich, G. E. Other NSAIDs of Choice for Rheumatoid-Arthritis. *Drug Intel. Clin. Phar.* **1984**, *18* (1), 39-41.
- (34) Nierenstein, M. The colouring matter of the red pea gall. *J. Chem. Soc.* **1919**, *115*, 1328-1332.
- (35) Maljuric, N.; Golubovic, J.; Ravnikar, M.; Zigon, D.; Strukelj, B.; Otasevic, B. Isolation and Determination of Fomentariol: Novel Potential Antidiabetic Drug from Fungal Material. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, *2018*.
- (36) Klostermeyer, D.; Knops, L.; Sindlinger, T.; Polborn, K.; Steglich, W. Novel Benzotropolone and 2*H*-Furo[3,2-*b*]benzopyran-2-one Pigments from *Tricholoma aurantium* (Agaricales). *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000* (4), 603-609.
- (37) Sang, S. M.; Lambert, J. D.; Ho, C. T.; Yang, C. S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* **2011**, *64* (2), 87-99.

- (38) Yang, Z. Y.; Jie, G. L.; Dong, F.; Xu, Y.; Watanabe, N.; Tu, Y. Y. Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H₂O₂-mediated oxidative damage system in the HPF-1 cells. *Toxicol. in Vitro* **2008**, *22* (5), 1250-1256.
- (39) Takino, Y.; Ferretti, A.; Flanagan, V.; Gianturco, M. A.; Vogel, M. Spectral Evidence for the structure of three flavanotropolones related to theaflavin, an orange-red pigment of black tea. *Can. J. Chemistry* **1967**, *45* (17), 1949-1956.
- (40) Cheng, K.; Wang, X. H.; Zhang, S. T.; Yin, H. Discovery of Small-Molecule Inhibitors of the TLR1/TLR2 Complex. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2012**, *51* (49), 12246-12249.
- (41) Souto, J. A. Continuous-Flow Preparation of Benzotropolones: Combined Batch and Flow Synthesis of Epigenetic Modulators of the (JmjC)-Containing Domain. *ChemistrySelect* **2021**, *6* (39), 10717-10721.
- (42) Souto, J. A.; Sarno, F.; Nebbioso, A.; Papulino, C.; Alvarez, R.; Lombino, J.; Perricone, U.; Padova, A.; Altucci, L.; de Lera, A. R. A New Family of Jumonji C Domain-Containing KDM Inhibitors Inspired by Natural Product Purpurogallin. *Front. Chem.* **2020**, *8*.
- (43) Prasad, K.; Kapoor, R.; Lee, P. Purpurogallin, a Scavenger of Polymorphonuclear Leukocyte-Derived Oxyradicals. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *139* (1), 27-32.
- (44) Zima, V.; Radilová, K.; Kožíšek, M.; Albiñana, C. B.; Karlukova, E.; Brynda, J.; Fanfrlík, J.; Fliieger, M.; Hodek, J.; Weber, J.; et al. Unraveling the anti-influenza effect of flavonoids: Experimental validation of luteolin and its congeners as potent influenza endonuclease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*.
- (45) Ferlin, F.; Marini, A.; Ascani, N.; Ackermann, L.; Lanari, D.; Vaccaro, L. Heterogeneous Manganese-Catalyzed Oxidase C-H/C-O Cyclization to Access Pharmaceutically Active Compounds. *ChemCatChem* **2020**, *12* (2), 449-454.
- (46) Kim, B.; Jo, S.; Park, S. B.; Chae, C. H.; Lee, K.; Koh, B.; Shin, I. Development and structure-activity relationship study of SHP2 inhibitor containing 3,4,6-trihydroxy-5-oxo-5H-benzo[7]annulene. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (1).
- (47) Baisch, G.; Wagner, B.; Öhrlein, R. An efficient chemo-enzymatic approach towards variably functionalized benzotropolones. *Tetrahedron* **2010**, *66* (21), 3742-3748.
- (48) Rambabu, M.; Jayanthi, S. Virtual screening of National Cancer Institute database for claudin-4 inhibitors: Synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics studies. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120* (5), 8588-8600.
- (49) Steglich, W.; Zechlin, L. Pilzpigmente, 33: Synthese des Fomentariols. Eine neue Methode zur Darstellung von Zimtalkoholen. *Chemische Berichte* **1978**, *111* (12), 3939-3948.
- (50) Arican, D.; Braukmüller, S.; Brückner, R. Regioselective Bromination of Benzocycloheptadienones for the Synthesis of Substituted 3,4-Benzotropolones Including Goupiolone A. *Chem-Eur. J.* **2017**, *23* (19), 4537-4541.
- (51) Horner, L.; Dürckheimer, W. Notizen: Zur Kenntnis der o-Chinone XIV Benzotropolone aus o-Chinonen. *Zeitschrift für Naturforschung B* **1959**, *14* (11), 743-744.
- (52) Tanc, M.; Cleenewerck, M.; Kurdi, A.; Roelandt, R.; Declercq, W.; De Meyer, G.; Augustyns, K.; Martinet, W.; Van der Veken, P. Synthesis and evaluation of novel benzotropolones as Atg4B inhibiting autophagy blockers. *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 163-168.
- (53) Reiberger, R.; Radilová, K.; Král, M.; Zima, V.; Majer, P.; Brynda, J.; Dračinský, M.; Konvalinka, J.; Kožíšek, M.; Machara, A. Synthesis and In Vitro Evaluation of C-7 and C-8 Luteolin Derivatives as Influenza Endonuclease Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (14).
- (54) Ueda, T.; Konishi, H.; Manabe, K. Palladium-Catalyzed Reductive Carbonylation of Aryl Halides with *N*-Formylsaccharin as a CO Source. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52* (33), 8611-8615.