Univerzita Komenského v Bratislave Prírodovedecká Fakulta Katedra organickej chémie

Syntéza dibenzocyklooktínu, počítačový návrh triazolických inhibítorov KDR a ich príprava

Diplomová práca

Študijný odbor:	4.1.14 Chémia
Študijný program:	Organická a bioorganická chémia
Školiace pracovisko:	Katedra organickej chémie

Školiteľ: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava, 28.4.2013 Bc. Juraj Dobiaš



Univerzita Komenského v Bratislave Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priez Študijný prog	visko študenta: gram:	Bc. Juraj Dobiaš organická a bioorganická chémia (Jednoodborové štúdium, magisterský II. st., denná forma)	
Študijný odbor: Typ záverečnej práce: Jazyk záverečnej práce:		4.1.14. chémia	
		diplomová slovenský	
Názov:	Syntéza dibenzocyklooktínu, počítačový návrh triazolických inhibítorov KDR a ich príprava		
Literatúra:	J. Med Chem, Eur J. Med Chem, databázy Reaxys, SciFinder Scholar, Discovery Studio		
Ciel':	syntéza vnútome napätého cyklooktínového ligandu, identifikácia triazolových ligandov s in Silico predikovanou biologickou aktivitou		
Kľúčové slová:	organická syntéza, vytvorenie knižníc, druglike filtrovanie, molekulové modelovanie, in Silico docking		
Vedúci: Oponent: Katedra:	doc. RNI prof. Ing PriF.KO	Dr. Andrej Boháč, CSc. – . Milan Remko, DrSc. rCh - Katedra organickej chémie	

PriF vedúci
katedry:doc. RNDr. Martin Putala, CSc.Dátum zadania:01.09.2012Dátum schválenia:23.04.2013

Wi fubula

doc. RNDr. Martin Putala, CSc. vedúci katedry

4:61

vedúci práce, oponent

13374207

študent

Prehlásenie

Čestne prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu spracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry a ďalších informačných zdrojov.

V Bratislave 28. 4. 2013

.....

podpis autora práce

Pod'akovanie:

Chcel by som sa poďakovať najmä vedúcemu diplomovej práce doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. a Biomagi Ltd. za odbornú a metodickú pomoc pri vypracovávaní tejto diplomovej práce, ako aj Lucii Lintnerovej a Michalovi Hasprovi za odovzdanie ich praktických skúseností s prácou v organickom laboratóriu, ďalej pani Mirke a ostatným pracovníkom katedry organickej chémie. Osobitné poďakovanie patrí mojim rodičom za ich podporu a motiváciu.

Obsah

Grafický abstrakt		1
Abstrakt		6
Abstract		7
Použité skratky		8
rotačná vákuová	i odparka	8
1. Ciele diplomove	ej práce	9
2. Teoretická časť		9
2.1. Bioortogona	ílne reakcie	9
3.1.1. Úvod		9
3.1.2. Využitie	bioortogonálnych reakcií v živých organizmoch	10
3.1.3. Prečo je ť	ažké uskutočniť selektívnu reakciu v živých organizmoch?	10
3.1.4. Známe bi	oortogonálne reakcie	11
3.1.5. Príklady	využitia DIBO v bioortogonálnych reakciách	16
3.1.6. Syntéza E	DIBO	17
2.2. Angiogenéz	a a jej inhibícia	
3.2.1. Úvod		
3.2.2. VEGF rec	ceptory	19
3.2.3. Štruktúra	VEGFR	
3.2.4. Inhibícia	VEGFRs	
3.2.5. Schválene	é antiangiogénne liečivá	23
3.3. Využitie der	rivátov 1,2,3-triazolu v medicínskej chémii	25
3.3.1. Úvod		25
3.3.2. Syntéza		

	3.3.3.	Príklady využitia derivátov triazolu pri vývoji bioaktívnych molekúl
3.	Exp	perimentálna časť
	3.1.	Syntéza a testovanie reaktivity dibenzocyklooktinolu - DIBO 6
	3.2.	Návrh potenciálnych VEGFR-2 inhibítorov
	3.2.1.	Tvorba kombinatoriálnej knižnice
	3.2.2.	Dokovanie knižnice
	3.2.3.	Vyhodnotenie dokovania
	3.2.4.	Vybrané štruktúry s počítačom predpovedanými interakciami
	3.3.	Syntézy navrhnutých VEGFR-2 inhibítorov
	3.3.1.	Syntéza prekurzorov <i>click</i> reakcií40
	3.3.2.	Cykloadície organických azidov a alkínov (<i>click</i> reakcie)
	3.3.3.	Odchránenia amino skupín57
4.	. Výs	sledky a diskusia61
	4.1.	Syntéza dibenzocyklooktínu (DIBO, 6)
	4.2.	Počítačom uskutočnený návrh štruktúr inhibítorov VEGFR-2 receptoru
	4.3.	Syntéza počítačom navrhnutých VEGFR-2 inhibítorov67
	4.3.1.	Optimalizácia click reakcie uskutočnenej s alkínom 57 obsahujúcom primárnu
	amíno	skupinu
	4.3.2.	Príprava azidov 35 a 37 - prekurzorov click cykloadícií
	4.3.3.	Syntéza chránených alkínov 40, 44, 4670
	4.3.4.	<i>Click</i> reakcie - syntéza intermediátov 47 – 49 a konečného produktu 51 71
	4.3.5.	Príprava predpovedaných triazolových produktov 52 – 54
Ζ	áver	
S	ummar	y

Grafický abstrakt

Syntéza dibenzocyklooktinolu DIBO 6



Testovanie reaktivity DIBO s benzylazidom, syntéza regioizomérnych triazolov 30 a 31



Počítačový návrh, výber štruktúr a syntéza potenciálnych VEGFR-2 inhibítorov



Schéma virtuálneho skríningu a výberu štruktúr

Vybrané štruktúry s predpovedanými väzobnými energiami (E_{bind}), ligandovou efektivitou (LE) a interakciami s VEGFR2 proteínovým variantom z PDB: 3CP9



Optimalizácia *click* reakcie pomocou benzylazidu 29 a alkínu 57



Príprava prekurzorov click reakcií: azidov 35, 37 a alkínov 40, 44, 46



Syntéza počítačom predpovedaných VEGFR-2 inhibítorov 51 - 54



Abstrakt

V prvej časti práce sa zaoberáme problematikou [3+2] dipolárnych cykloadícií organických alkínov a azidov (*Click reactions*) využívaných v biologických sústavách, pri ktorých je nežiaduce používanie toxických, či proteín denaturujúcich medných katalyzátorov. Pri týchto reakciách je katalyzátor nahradený špeciálnymi napätými alkínmi, ktoré s azidmi reagujú samovoľne, rýchlo a za miernych podmienok, čo im dáva **bioortogonálne** vlastnosti. V praktickej časti sme uskutočnili prípravu jedného zo zástupcov takýchto alkínov dibenzocyklooktínu (**DIBO 6**).

Druhá časť práce je venovaná vývoju predikovaných inhibítorov kinázovej časti **VEGFR-2** receptoru. Návrh štruktúr aktívnych zlúčenín sme robili *in silico*, **fragmentovo** orientovanými metódami. Ako vstupné fragmenty sme si vybrali komerčne dostupné alkíny a azidy, ktoré pomocou meďou katalyzovanej cykloadície (*Copper catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition*, **CuAAC**) poskytujú substituované 1,2,3-triazolové zlúčeniny. Vytvorili sme virtuálnu kombinatoriálnu knižnicu, ktorú sme, po odfiltrovaní farmakokineticky nevýhodných štruktúr, dokovali do modelu VEGFR-2 kinázy. Následne sme vyselektovali niekoľko zlúčenín na syntézu a testovanie zamýšľanej biologickej aktivity.

Kľúčové slová: DIBO, bioortogonálne reakcie, in silico predikcie, inhibícia angiogenézy, VEGFR-2, *Click* chémia, 1,2,3-triazol

Abstract

In the first part of this diploma thesis, we dealt with [3+2] dipolar cycloadditions of organic alkynes and azides (*Click* reactions) used in biologic systems, where toxic or protein denaturing copper catalysts cannot be used. In these reactions the catalyst is replaced by special strained alkynes, which spontaneously react with organic azides under mild conditions, what gives them **bioorthogonal** properties. In experimental part we performed synthesis of such alkyne dibenzocyclooctine (**DIBO 6**).

The second part includes development of predicted VEGFR-2 receptor kinase domain inhibitors. The inhibitors were designed by *in silico* **fragment** based methods. Commercially available alkynes and azides were selected as input fragments. These compounds easily provide 1,2,3-triazole derivatives by copper catalyzed alkyne azide cycloaddition (**CuAAC**). We created a combinatorial library that was docked to VEGFR-2 kinase model after filtering out structures with inconvenient pharmacokinetics properties. Several compounds were selected for synthesis and bioactivity screening.

Key words: DIBO, bioorthogonal reactions, in silico predictions, inhibition of angiogenesis, VEGFR-2, *Click* chemistry, 1,2,3-triazole

Použité skratky	
Skratka	Vysvetlenie
AChE	acetylcholínesteráza
AN	acetonitril
ATP	adenozín trifosfát
CuAAC	Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition,
	Cu(I) katalyzovaná click reakcia
DCM	dichlórmetán
DIBAL	diizobutylalumíniumhydrid
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EA	etyl acetát
FDA	Food and Drug Administration Office
FLC	Flash Liquid Chromatography, rýchla
	preparatívna kvapalinová chromatografia
Hex	zmes hexánov
KDR	Kinase insert Domain Receptor (tiež VEGFR2)
LDA	lítiumdiizopropylamid
NaAsc	askorbát sodný
PDB	Protein Data Bank, databáza štruktúr
	biomakromolekúl
Phth	ftalimidová chrániaca skupina
PSR	Plasmon Surface Resonance
RCC	Renal Cell Carcinoma
RT	Room Temperature, laboratórna teplota
RuAAC	Rutenium catalyzed Alkyne Azide
	Cycloaddiction
RVO	rotačná vákuová odparka
SPAAC	Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition,
	cykloadícia akcelerovaná vnútorným napätím
TBDMS	tercbutyldimetylsilylová chrániaca skupina
TEA	trietylamín
THF	tetrahydrofurán
TLC	Thin Layer Chromatography,
	tenkovrstvová chromatografia
TMS	trimetylsilylová chrániaca skupina

1. Ciele diplomovej práce

- Príprava dibenzocyklooktínu (DIBO) vhodného na bioortogonálne reakcie pomocou SPAAC.
- Počítačový návrh štruktúr inhibítorov tyrozín kinázovej domény VEGFR-2 receptoru dokovaním virtuálnej kombinatoriálnej knižnice substituovaných 1,2,3-triazolov.
- Syntéza vybraných 1,2,3-triazolových zlúčenín s predpovedanou VEGFR2 inhibičnou aktivitou.

2. Teoretická časť

2.1. Bioortogonálne reakcie

3.1.1. Úvod

Polovica minulého storočia bola éra fyzikálnej organickej chémie. Cieľom bolo pochopiť základné vzťahy medzi štruktúrou a reaktivitou a navrhnúť postupy na syntézu rôznorodých látok, ktoré ale nemali vopred určené využitie. Trend sa zmenil orientujúc sa viac na aplikačné ciele a zistenia chemikov ako napr. Huisgen a Krebs¹, ktorých práce zažili renesanciu vo forme meďou katalyzovanej cykloadície alkínov a azidov (CuAAC) často označovanej aj "click" chémiou.²

Click reakcie sú širšie definované ako reakcie, ktoré sú selektívne, rýchle, tolerantné voči väčšine funkčných skupín a majú vysoké výťažky. Reakcie, ktoré sú navyše inertné voči

¹ Huisgen, R. Proc. Chem. Soc. **1961**, 357-396.

² Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004-2021.

chemickým skupinám prirodzene sa vyskytujúcim v biologických systémoch (amíny, karboxylové kyseliny, tioly, alkoholy...) sú označované ako **bioortogonálne**. V tejto práci sa zaoberáme cykloadíciami, ktoré nepotrebujú kovové katalyzátory, tzv. *Cu-free click* reakcie. Exogénne ióny kovov môžu mať cytotoxické alebo denaturačné efekty, a tým narúšať študované systémy.

3.1.2. Využitie bioortogonálnych reakcií v živých organizmoch

Vizualizačné techniky ako elektrónová mikroskopia nám umožňujú pozrieť sa do vnútra bunkových organel, ale nepostačuje na priame pozorovanie biomakromolekúl. Kovalentným pripojením stopovacích molekúl (ako sú napr. florescenčné sondy, rádioaktívne značky) sme schopní sledovať pohyb a výskyt študovaných objektov v rámci bunky, a tým objasniť mnohé biologické mechanizmy. Toto vyžaduje zavedenie externej zlúčeniny do cieľovej biomolekuly bez ovplyvnenia rovnováhy študovaného systému.

Nielen živé bunky, ale aj izolované proteíny alebo nukleové kyseliny vyžadujú opatrné zaobchádzanie, nakoľko tieto môžu byť náchylné na poškodenie denaturáciu. Bioortogonálne reakcie môžu byť využité aj na imobilizáciu biomakromolekúl napr. na zlatý čip, čo je potrebné pri stanovení väzbovej afinity malých molekúl k proteínu metódou *plasmon surface resonance*.

3.1.3. Prečo je ťažké uskutočniť selektívnu reakciu v živých organizmoch?

Príroda si po miliónoch rokoch optimalizácie vyvinula selektívne enzýmy, ktoré sú schopné rozpoznať substrát a následne vykonať potrebnú modifikáciu. Zatiaľ čo takýto prístup vynikajúco funguje v prírode, pre vedcov je nepraktické vyvíjať špeciálny enzým pre každý novo študovaný biologický cieľ. Ak by sme chceli použiť konvenčné reakcie narazíme na množstvo obmedzení. Prirodzeným prostredím pre biomolekuly je voda, na ktorú je množstvo organických činidiel citlivých, navyše vzniká problém s rozpustnosťou. Použité zlúčeniny nemôžu byť náchylné na nukleofilný atak amínov alebo tiolov a takmer všetky bežné činidlá (alkylačné, redoxné, halogenačné...) sú príliš reaktívne a teda aj toxické pre biologické systémy. Navyše mnohé látky sú v cytosole jednoducho strávené enzýmami ako napr. esteráza, fosfatáza, sulfatáza.

3.1.4. Známe bioortogonálne reakcie

Jednou z najpopulárnejších bioortogonálnych funkčných skupín je azid, kvôli malej veľkosti, syntetickej dostupnosti inertnosti v biologických systémoch a veľkému obsahu vnútornej energie, ktorá sa reakciou môže uvoľniť. Navyše azidy poskytujú unikátnu chémiu s ostatnými bioortogonálnymi skupinami, najmä fosfínmi a alkínmi. Reakcia azidov s triarylfosfínmi publikovaná Bertozzim³ bola prvou skutočne bioortogonálnou ligáciou (kovalentným spojením veľkej a malej molekuly). Reakcia je založená na známej Staudingerovej reakcii (redukcia azidu fosfínom), (**Schéma 1 A**), pričom sa reaktívny aza-ylid zachytí v rámci intramolekulovej reakcie na susednom karboxyle (**Schéma 1 B**). Jedným z nedostatkov metódy je senzitivita fosfínov na kyslík, navyše je uvedená reakcia dosť pomalá, čo sa nepodarilo výrazne zlepšiť ani zavádzaním elektrón-donorných skupín na fenyly viazané na fosfor.⁴ Nilsson a kolektív⁵ vyvinuli modifikáciu, po ktorej sa vo výslednej štruktúre nachádza len amidová funkcia (**Schéma 1**-c).



Schéma 1. A) Mechanizmus Staudingerovej reakcie. Po nukleofilnom ataku trifenylfosfínu na krajný atom dusíka dochádza k preorganizovaniu molekuly a k odstúpeniu dusíka za vzniku aza-ylidu, ktorý sa hydrolyzuje na príslušný amín a trifenylfosfínoxid. **B**) Bentoziho metóda

³ Saxon, E.; Bertozzi, C.E. *Science* **2000**, 287, 2007-2010.

⁴Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2686-2695.

⁵ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Org. Lett. **2000**, 2, 1939-1941.

na tvorbu amidov. Po vzniku reaktívneho aza-ylidu podobne ako v štandardnej Staudingerovej reakcii dochádza k intramolekulovej nukleofilnej substitúcii za vzniku cyklickej amidofosfóniovej soli, ktorej hydrolýzou dostaneme výsledný amid **2**. **c**) Nilssonova modifikácia za vzniku konjungátu obsahujúceho len amidového produktu.

Štaudingerova reakcia poukázala na výhodné vlastnosti azidov, pre ktoré je známa aj cykloadícia s alkínmi. Oba komponenty majú vysokú vnútornú energiu. Hoci tvorba aromatického triazolu je silne exotermická reakcia, táto vyžaduje zvýšenú teplotu na prekonanie vysokej aktivačnej bariéry, ktorá súvisí s nutnosťou deformácie pôvodne lineárnych alkínov a azidov. Sharpless s kol.⁶ a Medal s kol.⁷ vyvinuli pri terminálnych alkínoch Cu(I) katalyzovanú modifikáciu reakcie. Toxicita kovového katalyzátoru však znemožňuje použitie tejto reakcie v živých systémoch. Zvýšenie rýchlosti cykloadície bez potreby katalyzátora pomocou napätia v kruhu je už dlho známe.⁸ Cyklooktín s fenylazidom reagujú explozívne, čo sa dá z termodynamického hľadiska vysvetliť uvoľnením napätia v osemčlennom kruhu po zmene sp hybridizácie zúčastnených uhlíkových atómov na sp², súčasne sa znižuje aj energetická bariéra, lebo na prechod do tranzitného stavu už nie je potrebná taká deformácia väzbových uhlov ako je tomu pri lineárnych alkínoch. Tento typ *click* reakcií sa označuje v anglickej literatúre termínom *Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition* (**SPAAC**).

Štruktúry najznámejších vnútorne napätých derivatizovaných cyklooktínových derivátov sú v Schéma 2. Najjednoduchší z nich OCT 1 vykazuje značné zrýchlenie cykloadície s benzylazidom porovnaním s lineárnymi alkínmi. Reakčná rýchlosť je stále porovnateľná so Staudingerovou ligáciou⁹. Zvýšenie reaktivity je možné aj zavedením elektrón akceptornej skupiny, ktorá zníži energiu LUMO orbitálu alkínu, a tým aj aktivačnú energiu. S ohľadom na túto skutočnosť boli navrhnuté fluórované deriváty cyklooktínu 1.

Pri deriváte **MOFO 3** došlo k dvojnásobnému urýchleniu reakcie. Pridaním ďalšieho flóru (**DIFO 4**) bol pozorovaný až 32 násobný nárast reakčnej rýchlosti. Aj keď rýchlosť reakcie s DIFO bola vynikajúca rozpustnosť vo vode nebola ideálna. Problém s rozpustnosť ou bol riešený inkorporáciou heteroatómov do kruhu a pridaním polárnych funkčných skupín za vzniku **DIMAC 5**.¹⁰

⁶ Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K. B. Angew Chem, Int Ed. 2002, 41, 2596-2599.

⁷ Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. J. Org Chem. 2002, 67, 3057-3064.

⁸ Wittig, G.; Krebs, A. Chem. Ber. 1961, 94, 3260-3275.

⁹ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. J. Am. Chem Soc. **2004**, 126, 15046-15047.

¹⁰ Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Org Lett **2008**, 10, 3097-3099.

Boons so skupinou vyvinuli štruktúrne viac odlišný cyklooktín s dvoma symetricky prikondenzovanými benzénovými jadrami **DIBO 6**.¹¹ Aromatické jadrá rigidizujú štruktúru, čím zvyšujú kruhové pnutie, ale zároveň ju konjungáciou s trojnou väzbou stabilizujú. Vyvážený pomer medzi stabilitou a reaktivitou v spojení so syntetickou dostupnosťou robí DIBO jeden z najpoužívanejších reaktantov pri bioortogonálnych reakciách. Problémom stále zostáva vysoká hydrofobicita, čo bolo čiastočne vyriešené pridaním štyroch metoxy skupín na benzénové jadrá v TMDIBO 9.¹² Oxidácia hydroxylu v DIBO na karbonyl 7, cez ktorý sa viaže biomolekula, zavádza do kruhu ďalší sp² hybridizovaný atóm, čo má za následok zvýšenie napätia v kruhu, čím sa 3 krát zvyšuje rýchlosť cykloadície. Fúzia oxidovaného DIBO 7 a biomolekuly bola potom cez imínové deriváty. Zaujímavé je že imínové deriváty alkínu 7 pred "skliknutím" vykazujú florescenčné vlastnosti, zatiaľ čo ich triazolové produkty už nefloreskujú, čo sa dá využiť na sledovanie priebehu cykloadičnej reakcie. Fotochemické spustenie SPAAC vyvinul Popik s kolektívom¹³ pomocou maskovania trojitej väzby prostredníctvom cyklopropenónovej funkčnej skupiny (cyklooktín 11). Cyklopropenóny sú termicky stabilné, ale fotochemicky sa s vysokým výťažkom rýchlo rozpadajú na príslušné acetylény. Prínosom metódy je nielen lepšia možnosť kontroly biokonjugácie, ale aj nový spôsob syntézy DIBO derivátov.

Pridaním ďalšej dvojitej väzby do osemčlenného cyklu na DIBO skelet je možné ešte viac zvýšiť vnútorné napätie, ale takéto zlúčeniny sa už samovoľne rozpadajú aj za nízkych teplôt,¹⁴ napriek tomu sa do cyklu podarilo zaviesť amidovú väzbu, ktorú možno považovať svojou podstatou za čiastočne nenasýtenú. Výsledná zlúčenina **BARAC 8** je dostatočne stabilná napr. na chomatografickú separáciu a zároveň dáva 400 násobne rýchlejšiu reakciu v porovnaní so základným cyklooktínom OCT 1.¹⁵ Verzia zlúčeniny 8 s exocyklickým amidom predstavuje látku **DIBAC 9**, ktorá bola nezávisle publikovaná skupinami van Delfta¹⁶ a Popika.¹⁷

¹¹ Ning. X.; Guo. J.; Wolfert, M.; Boons, G. J. Angew Chem, Int Ed. 2008, 47, 2253-2255.

¹² Stockmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. Chem. Sci. 2011, 2, 932-936.

¹³ Poloukhtine, A.; Mbua, N. E.; Boons, G.-J.; Popik, V. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 15769-15776.

¹⁴ Wong, H. N. C.; Garratt, P. J.; Sondheimer, F. J. Am. Chem. Soc. **1974**, 96, 5604-5605. Gugel, H.; Meier, H. Chem. Ber. **1980**, 113, 1431-1443.

¹⁵ Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 3688-3690.

¹⁶ Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 97-99.

¹⁷ Kuzmin, A.; Poloukhtine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2076-2085.



Schéma 2. Prehľad štruktúr obsahujúcich cyklooktínový fragment využívaných v SPAAC reakciách spolu s ich zaužívanými skratkami a relatívnymi rýchlostnými konštantami. OCT – cyclooctine, MONO - monoflorinated cyclooctine, DIFO – diflorinated cyclooctine, DIMAC – dimethoxyaza cyclooctine, DIBO – dibenzocyclooctine BARAC – biarylazacyclooctine, DIBAC – dibenzoazacyclooctine, TMDIBO – tetramethoxydibenzocyclooctine

Na tvorbe stabilných triazolových kruhov sú založené aj reakcie organických azidov s oxanorbornadiénmi (**Schéma 3**). Prvým krokom je [3+2] cykloadícia, ktorej produkt sa cez retro-Dielsovu-Alderovu reakciu rozpadá na furán a požadovaný triazol. Rýchlosť reakcií tohto typu je porovnateľná so Staudingerovou ligáciou a SPAAC za použitia OCT. Vo východiskových oxanorbornandiénoch sú prítomné dve napäté dvojité väzby, pričom reakcia s nesubstituovanou má za následok tvorbu nežiadúceho nesubstituovaného triazolu. Selektivita reakcie môže byť ovplyvnená aj aktiváciou násobnej väzby norbonandiénu CF₃

skupinou.¹⁸ Funkčnosť tejto metódy bola overená naviazaním oxanorbornandiénu na lyzozým z vaječného bielku cez polyetylénglykolové ramienko. Modifikovaný proteín potom reagoval s azido-kumarínom, čím získal študovaný polypeptid florescenčnú značku.



Schéma 3. Mechanizmus dvojstupňovej reakcie oxanorbornandiénmi s azidmi za vzniku triazolov.

[4+2] Cykloadičné reakcie 1,2,4,5-tetrazínov s napätými alkénmi zaviedli do biologickej chémie Fox s kol.¹⁹ (Schéma 4) Po inverzne elektrónovej Diels-Alderovej reakcii (*inverse-electron demand Diels-Alder*) vzniká bicyklický intermediát, ktorý sa rýchlo rozpadá za uvoľnenia N₂. Fox používal diarylsubstituované tetrazíny, ktoré sú dostatočne stabilné vo vodnom prostredí a *trans*-cyklooktén **A** ako reaktívny dienofil. *trans*-Cyklooktén je možné fotoizomeráciou pripraviť z *cis*-izoméru, čím sa o 7 rádov zvýši jeho reaktivita v D-A reakciách. Rýchlosť reakcií s *trans*-cyklookténom je o niekoľko rádov väčšia ako pri najrýchlejších **SPAAC**, čo umožňuje robiť reakcie pri nižších koncentráciách. Obmedzením metódy je spätná fotoizomerizácia *trans*-cyklookténu na jeho *cis* izomér.

Krátko po Foxovi prezentovali Hilderbrand so skupinou podobnú prácu s tetrazínmi.²⁰ Namiesto trans-cyklookténu **A** použili stabilnejší norbornén **B**, čo samozrejme viedlo aj k zníženiu reaktivity (Schéma 4). Bioortogonalitu reakcie testovali pripojením norbornénu na protilátku trastuzumab, ktorá sa selektívne viaže na Her2/neu rastový faktor premnožený pri niektorých typoch tumoroch prsníka. Ľudské rakovinové bunky inkubovali s modifikovanou protilátkou a potom pridali tetrazínový derivát s pripojenou florescenčnou sondou. Týmto spôsobom sa im podarilo zobraziť rakovinové bunky.

¹⁸ van Berkel S. S.; Dirks A. J.; Debets M. F.; van Delft F. L.; Cornelissen J. J. L. M.; Nolte R. J. M.; Rutjes F. P. J. T. *ChemBioChem* **2007**, 8, 1504-1508.

¹⁹ Blackman, M.L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 13518-13519.

²⁰ Devaraj, N. K.; Weissleder, R; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 2297-2299.

Ďalšiu modifikáciu dienofilu spravil Pipkorn,²¹ pričom využil vysoko reaktívny cyklobuténový kruh nachádzajúci sa v molekule **C** (Schéma 4), ktorý sa dá pripraviť z cyklooktatetraénu a maleínimidu.²² Autori použili túto biokonjungáciu na pripojenie temozolomidu (alkylačné liečivo používané pri agresívnej rakovine mozgu glioblastómua rakovine kože - melanómu) k bielkovinovému prenášaču, ktorý uľahčil prechod liečiva do jadra bunky.



Schéma 4. Bioortogonálne reakcie s využitím Diels-Alderovej reakcie napätých alkínov A – C s tetrazínmi.

3.1.5. Príklady využitia DIBO v bioortogonálnych reakciách

Je výhodné určiť K_D hodnoty pre vyvinuté VEGFR-2 inhibítory pomocou *Surface Plasmon Resonance* (**SPR**). SPR metóda je založená na zmene indexu lomu na pevnom povrchu (zvyčajne zlatý čip), na ktorý je imobilizovaný skúmaný proteín. Zmena indexu lomu priamo súvisí s množstvom naviazaného ligandu, preto SPR poskytuje excelentnú metódu na priame stanovenie väzbovej energie. Hlavným problémom je ukotvenie samotného proteínu bez jeho poškodenia, na čo je ideálne použiť jednu z bioortogonálnych reakcií.

DIBO bolo použité pri množstve biokonjungácii napr.:

- Pri značení neštandardných nukleotidov biotínovou značkou cez azidocukry,²³ čo bolo využité na rozlíšenie cytozínu od jeho hydroxymetyl derivátu.
- Pri Activity-Based Protein Profiling štúdie, kde bola click reakcia využitá na spojenie špecifickej sondy, ktorej viazanie je závislé na aktivite sledovaných proteínov

²¹ Pipkorn, R.; Waldeck, W.; Didinger, B.; Mueller, G.; Wiessler, M.; Braun, K. J. Pept. Sci. 2009, 15, 235-241.

²² Reppe, W.; Schlichting, O.; Klager, K.; Toepel, T. Justus Liebigs Ann. Chem. **1948**, 560, 1-92.

²³ Song, C. X.; Yu, M.; Dai, Q.; He, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5075-5077.

(*Activity-Based Probe*) a biotínu.²⁴ Článok porovnával úspešnosť ligácie medzi tromi cykooktínmi a Staudingerovou reakciou, pričom DIBO dávalo najlepšie výsledky.

- Pri vizualizácií špeciálneho druhu baktérií pomocou biokonjungácie azidom modifikovaného proteínu lyzostafínu viažuceho sa na bunkovú stenu baktérii s DIBO-Alexa sondou.²⁵
- Na označenie proteínu nitroxidom, ktorý bolo následne možné určiť EPR analýzou.²⁶
- Na prepojenie proteínu s oligonukleotidom.²⁷

3.1.6. Syntéza DIBO

DIBO je možné pripraviť viacerými spôsobmi (**Schéma 5**). Prvý krát ho pripravil Boons s kolektívom,¹¹ pričom vychádzal zo známeho dibenzocyklookténu **22**, dostupného z fenylacetaldehydu **23** v dvoch syntetikých stupňoch.²⁸ Medziprodukt **22** potom reagoval s Br₂ za vzniku derivátu **21**, ktorý po dvojnásobnej eliminácii HBr pomocou LDA poskytol cieľovú molekulu **6**. Intermediát **22** môže byť pripravený s lepším výťažkom aj z dibenzosuberenónu **19** po rozšírení kruhu za vzniku intermediátu **20** a jeho následnou redukciou NaBH₄. ²⁹ Alternatívnu syntézu DIBO **6** vypracoval Kornmayer s kolektívom.³⁰ Táto metodika vycházala z komerčne dostupného dibenzosuberenónu **19**, ktorý po adícii Br₂ poskytol zlúčeninu **16** (pripraviteľná aj bromáciou látky **15**), z ktorého sa následne eliminoval HBr s NaOH za refluxu v MeOH za vzniku monobróm derivátu **17**. Tento po rozšírení kruhu trimetylsilyldiazometánom za katalýzy BF₃OEt₂ poskytol medziprodukt **14**, ktorý bol zredukovaný s DIBAL-om na alkohol **13** a jeho hydroxylová skupina bola chránená cez *terc*butyldimetylsilylovou skupinou. Toto umožnilo použiť *terc*-BuOK na vytvorenie trojitej väzby v produkte **18**. Chrániaca skupina bola nakoniec odstránená pomocou TBAF za vzniku cieľovej molekulu DIBO **6**.

²⁴van der Linden, W. A.; Li N.; Hoogendoorn, S.; Ruben, M.; Verdoes, M.; Guo, J.; Boons, G.J.; van der Marel, G. A.; Florea, B. I.; Overkleeft, H. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 15, 662-666.

²⁵ Potapova, I.; Eglin, D.; Laschke, M. W.; Bischoff, M.; Richards, R. G.; Moriarty, T. F. J. Microbiol. Methods 2013, 92, 90-98.

²⁶ Kalai, T.; Fleissner, M. R.; Jek, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2747-2749.

²⁷ Khatwani, S. L.; Kang, J. S.; Mullen, D. G.; Hast, M. A.; Beese, L. S.; Distefano, M. D; Taton, T. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 20, 4532-4539.

²⁸ Jung, M. E.; Miller, S. J. J. Am. Chem. Soc. **1981**, 103, 1984 - 1992.

²⁹ Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G. J. *ChemBioChem* **2011**, 12, 1912 - 1921.

³⁰ Kornmayer, S. C.; Rominger, F.; Gleiter, R. *Synthesis* **2009**, 15, 2547-2552.



Schéma 5. Rôzne spôsoby prípravy DIBO (6) opísané v literatúre.

2.2. Angiogenéza a jej inhibícia

3.2.1. Úvod

Angiogenéza je proces novotvorby ciev z pôvodného cievneho systému. Endoteliálne bunky, ktoré pokrývajú vnútornú stranu ciev, sa aktivujú, odpútavajú od povrchu, migrujú a proliferujú, pričom tvoria nové cievne výrastky.³¹ Prirodzená angiogenéza nastáva počas ovulácie, reprodukcie a hojenia rán. Za týchto fyziologických podmienok je angiogenéza stimulovaná množstvom endogénnych molekúl, ako napr. rastové faktory (VEFG A), adhézne

³¹ Risau, W. *Nature* **1997**, 386, 671–674.

faktory (integríny, cadheríny), proteinázy (MMPs), mimobunkové proteíny matrixu (fibronectíny, kolagény), transkripčné faktory a signálne molekuly (PKA, mTOR, COX-2). Fyziologická angiogenéza je vysoko kontrolovaná rovnováhou medzi proangiogenických a antiangiogenických faktormi.³² Chybná regulácia angiogenézy je príčinou mnohých ochorení ako napr. zápal sietnice, artritída, endometrióza, arteroskleróza a rakovina.³³ Bolo dokázané, že rast primárnych tumorov a následných metastáz je závislý na angiogenéze.³⁴ Na to aby mohol tumor narásť na veľkosť väčšiu ako 1-2 mm, potrebuje nové krvné kapiláry zabezpečujúce prísun živín a odvod metabolitov. Hypoxické podmienky vnútri tumoru stimulujú uvoľňovanie proangiogénnych faktorov z buniek tumoru, ktoré sú v blízkosti existujúceho cievneho systému, a tým spúšťajú angiogenézu, čo vedie k tvorbe nových kapilár smerujúcich k tumoru.³⁵ V takejto situácii dochádza k vaskulogenéze, t.j. procesu, kedy sa priťahujú do okolia tumoru aj endoteliálne progenitorové bunky z kostnej drene, diferencujú sa na endoteliálne bunky a zúčastňujú sa neovaskularizácie ischemického rakovinového tkaniva.³⁶

3.2.2. VEGF receptory

V roku 1989 Ferara s kolektívom publikoval primárnu sekvenciu peptidu VEGF (neskôr nazývaným aj VEGF-A), ktorý výrazne stimuluje endoteliálne bunky.³⁷ Následné štúdie ukázali, že tento rastový faktor je účinný angiogenický stimulátor patriaci do rodiny piatich homodimérnych glykoproteínov VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, a rastový faktor placenty (PIGF).

Členovia rodiny VEGF sú viazané troma rôznymi ale štruktúrne podobnými receptormi (VEGFR), ktoré majú tyrozín kinázovú aktivitu. VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (ľudský KDR alebo Flk-1) dôležitý pri aktivácii endoteliálnych buniek a angiogenézy a VEGFR-3, ktorý sa uplatňuje vaskulonegenéze. Bolo dokázané, že proteosyntéza VEGFR-3 súvisí s rozširovaním rakovinových buniek do lymfatických uzlín.³⁸

³² Ferrara, N. Oncologist **2004**, 9, 2–10.

³³ Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Cell **2011**, 146, 873–887.

³⁴ Folkman, J. N. *Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182–1186.

³⁵ Kerbel, R. S. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 501–515.

³⁶ Sharpe, E. E.; Maupin, A. B.; Teleron, A. A.; Pyle, A. L.; Carmeliet, P.; Young, P. P. *FASEB J.* **2006**, 20, 1495-1497.

³⁷Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. Science **1989**, 246, 1306–1309.

³⁸ Stuttfeld, E.; Ballmer-Hofer, K. *IUBMB Life* **2009**, 61, 915–922.

Expresia VEGFR-1 je sústredená do vaskulárnych endoteliálnych buniek, ale receptor je tiež prítomný v neendoteliálnych bunkách ako napr. monocytoch, makrofágoch a vo vaskulárnych bunkách hladkého svalstva. Bolo dokázané, že VEGFR-1 sprostredkúva migráciu monocytov, prežitie krvotvorných kmeňových buniek a uvoľňovanie rastových faktorov z pečeňových endoteliálnych buniek.³⁹ Presná funkcia VEGFR-1 je stále predmetom výskumu a v súčasnosti sa verí, že primárne slúži ako pasca na VEGF-A, čím moduluje jeho dostupnosť pre iné receptory, hlavne pre VEGFR-2.⁴⁰ Napriek tomu bolo ukázané, že VEGFR-1 zohráva dôležitú úlohu v angiogenéze niektorých tumorov ako aj pri rozvoji artritídy a arterosklerózy.⁴¹

VEGFR-2 viaže VEGF-A s 10 krát menšou afinitou ako VEGFR-1, napriek tomu predstavuje hlavný regulátor angiogenézy, kvôli jeho intenzívnej tyrozín kinázovej aktivite.⁴² VEGFR-2 sa nachádza na povrchu vaskulárnych endoteliálnych bunniek a tiež v krvotvorných kmeňových bunkách. VEGFR-2 je produkovaný v nadbytku pri viacerých zhubných ochoreniach ako napr. rakovina vaječníkov a štítnej žľazy.⁴³

VEGFR-3 je aktivovaný prostredníctvom VEGF-C a VEGF-D⁴⁴ a súvisí s budovaním a udržiavaním lymfatického systému. Jeho nadexpresia koreluje so zvýšenou tvorbou metastáz a kratším prežívaním pacientov.⁴⁵

3.2.3. Štruktúra VEGFR

VEGF receptory pozostávajú z extracelulárnej časti tvorenej siedmimi doménami viažucimi VEGF. Cez jeden transmembránový segment je napojená vnútrobunková časť receptoru, ktorá je rozdelená na juxtamembránový segment (JM), tyrozín kinázovú doménu a chvost obsahujúci C-koniec. Naviazanie VEGF spôsobuje dimerizáciu receptorov, ktorá vyústi k autofosforylácii a aktivácii samotnej kinázy. Aktívna forma kinázy fosforyluje špecifické tyrozínové zvyšky na proteínoch nižšieho stupňa signálnej kaskády. Tento mechanizmus vedie k spusteniu enzymatických procesov a signálnych dráh ako napr.

³⁹ Maharaj, A. S.; Saint-Geniez, M.; Maldonado, A. E.; D'Amore, P. A. Am. J. Pathol. 2006, 168, 639–648.

⁴⁰ Rahimi, N. Front. *Biosci.* **2006**, 818-829.

⁴¹ Carmeliet, P.; Moons, L.; Foidart, J. M.; Schaper, W.; Jones, D. S.; Hicklin, D. J.; Herbert, J. M.; Collen, D.; Persico, M. G. *Nat.Med.* **2001**, *7*, 575–583.

⁴² Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Heldin, C.H. J. Biol. Chem. **1994**, 269, 26988-26995.

 ⁴³ Rodríguez-Antona, C.; Pallares, J.; Montero-Conde, C.; Inglada-Pe´rez, L.; Casco´n, A.; Lerma, E.; Martin, M. C.; Carralero, M. C.; Mauricio, D.; Cigudosa, J. C.; Matias-Guiu, X.;Robledo, M. *Cancer* 2010, 17, 7–16.

⁴⁴ Koch, S.; Tugues, S.; Li, X.; Gualandi, L.; Claesson-Welsh, L. *Biochem. J.* **2011**, 437, 169–183.

⁴⁵ Achen, M. G.; Mann, G. B.; Stacker, S. A. Br. J. *Cancer* **2006**, 94 1355–1360.

p38/MAPK, Raf/MEK/ERK a PI3K/PKB.⁴⁶ Aktivita VEGF receptorov je prísne regulovaná rovnováhou medzi fosforyláciou a defosforyláciou cez rôzne proteín tyrozín fosfatázy.⁴⁷

VEGFR-2 je jediným z receptorov VEGF, pre ktorý bola kryštalograficky rozlúštená jeho priestorová štruktúra. Tyrozín kinázová doména VEGFR-2 má štruktúru dvoch lalokov typickú pre všetky proteín kinázy. Aktívne miesto sa nachádza medzi dvoma lalokmi. Ako väčšina proteín kináz aj VEGFR-2 podlieha dvom charakteristickým konformačným zmenám.⁴⁸ Prvý predstavuje prechod medzi aktívnymi a neaktívnymi stavmi kinázy a zahŕňa zmeny v pozícii αC helixu v N-laloku a v konformácii aktivačného segmentu v C-laloku. (**Obrázok 1**) Druhý typ konformačných zmien nastáva pri samotnej fosforylácii proteínového substrátu, keď sa laloky vzhľadom na seba hýbu, čím sa otvára a zatvára štrbina. Týmto pohybom prechádza enzým cez svoj katalytický cyklus.

Menší lalok s N-koncom obsahuje prevažne štruktúru antiparalelne skladaného listu. Jeho súčasťou je aj na glycín bohatá (GXGXXG) ATP viažuca slučka. Väčší lalok s C-koncom, ktorý je tvorený najmä α -helixami, obsahuje katalytickú slučku a aktivačný segment. V aktivovanej forme Lys868 tvorí iónový pár s α - a β - fosfátmi ATP a s Glu885 z α C helixu. V neaktívnom enzýme bez ATP sa Lys868 viaže na aktivačný segment a je ďaleko od Glu885. Najväčšie zmeny v C-laloku sú v aktivačnej slučke, ktorá začína medzi kinázami konzervovanou **DFG** (AspPheGly) sekvenciou.⁴⁹ V aktívnej, nazývanej aj **DFG-in**, forme viaže aspartát katióny horčíka, ktoré potom koordinujú β a γ fosfáty ATP, súčasne je fenylalanín z DFG slučky umiestnený (**in**) v hydrofóbnom vrecku pod α C helixom. Neaktívna konformácia (**DFG-out**) je dosiahnutá rotáciou spomínaného fenylalanínu do ATP-väzobného miesta, čím znemožňuje naviazaniu sa ATP. Kvôli existencii aktívnej a neaktívnej formy enzýmu je možné vyvíjať viacero typov inhibítorov. Niektoré súťažia s ATP o väzbové miesto a iné stabilizujú neaktívnu konformáciu.⁵⁰

⁴⁶ Morabito, A.; De Maio, E.; Di Maio, M.; Normanno, N.; Perrone, F. Oncologist **2006**, 11, 753–764.

⁴⁷ Kappert, K.; Peters, K. G.; Bohmer, F. D.; Ostman, A. *Cardiovasc. Res.* **2005**, 65, 587–598.

⁴⁸ Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S; Eyck, L.F. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 17783-17788.

⁴⁹ Regan, J. J. Med. Chem. **2003**, 46, 4676.

⁵⁰ Dietrich J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5738-5748.



Obrázok 1. Štruktúra protein kinázy VEGFR-2 pripravená na základe 2OH4 pdb súboru.

3.2.4. Inhibícia VEGFRs

Inhibícia VEGF alebo jeho receptorov je atraktívny prístup liečenia rôznych ochorení, primárne tumorov. Bolo dokázané, že inhibítory tyrozín kinázových častí VEGFR1-3, spomaľujúce angiogenézu alebo lymfangiogenézu, vykazujú protirakovinovú aktivitu. Zvyčajne ide o malé syntetické molekuly viažúce sa do ATP väzbového miesta proteín kinázovej domény.⁵¹ Podobnosť medzi VEGF receptormi spôsobuje, že inhibítory často krát účinne ovplyvňujú viac ako jeden receptor. Nedostatok selektivity je v tomto viac výhoda ako nevýhoda, pretože sa ukázalo, že na prevenciu proti metastázam je potrebná inhibícia všetkých členov rodiny VEGF receptorov. Navyše niekoľko klinicky zavedených liečiv nie sú selektívne inhibítory VEGFRs a ukazujú značnú afinitu aj k iným tyrozín kinázam podobným VEGFR, čo ich robí multikinázovými inhibítormi. Týmto spôsobom sú narušené hneď viacere

⁵¹ Boyer, S. Curr. Top. Med.Chem. **2002**, 2, 973–1000.

biologické dráhy dôležité pre rast tumoru a metastáz.⁵² Navyše hypoxické prostredie vyvolané inhibíciou VEGFRs môže spustiť iné proangiogenické mechanizmi, ktoré môžu byť takýmto spôsobom potlačené.

Terapie založené na antiangiogénnych liekoch by mali byť menej toxické ako konvenčná chemoterapia, pretože angiogenéza je proces zvyčajne obmedzený na rastúce tumory. Výhodou je aj väčšia genetická stabilita cieľových endoteliálnych buniek v porovnaní s labilnými bunkami tumoru.⁵³ Tento typ liečiv by mal byť potom menej citlivý na mutácie spôsobujúce rezistenciu.

Inhibícia angiogenézy so sebou prináša niekoľko problémov. Zakrpatený cievny systém síce inhibuje rast tumoru, ale na druhej strane spôsobuje aj znížený prístup konvenčných liečiv k tkanivu tumoru.⁵⁴ Niekoľko štúdií upozornilo na možnosť, že VEGFR inhibítory môžu spúšťať tvorbu metastáz "vyháňaním" rakovinových buniek z hypoxického tumoru, preto niektoré typy rakoviny sa po vyvinutí rezistencie stávajú viac invazívne a spôsobujú rozvoj metastického ochorenie.⁵⁵

3.2.5. Schválené antiangiogénne liečivá

Sorafenib **24** (Nexavar, **Schéma 6**) je bisarylmočovinový multikinázový inhibítor. Inhibuje VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR β , c-Kit a Raf.⁵⁶ Je jediným schváleným liečivom schopným znižovať aktivitu Raf, dôležitého regulátora pri delení buniek, kvôli čomu sa okrem karcinómu ľadvín (*Renal Cell Carcinoma*, RCC) používa aj pri rakovine pečene.⁵⁷

Pazopanib **25** (Votrient, **Schéma 6**) je účinný inhibítor všetkých VEGFRs. Jeho chemická štruktúra obsahuje pyrimídin-2,4-diamínový skelet substituovaný indazolom a 2metylbenzénsulfónamidovou skupinou. V roku 2009 bol schválený FDA na liečbu RCC a v r. 2012 na liečbu sarkómu jemných tkanív.

⁵² Ivy, S. P.; Wick, J. Y.; Kaufman, B. M. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2009, 6, 569–579.

⁵³ Kerbel, R. S. *Science* **2006**, 312, 1171–1175.

⁵⁴ Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 417–427.

⁵⁵ Rapisarda, A.; Melillo, G. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, 9, 378–390.

⁵⁶ Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. *Nat. Rev. Drug* Discovery **2006**, *5*, 835–844.

⁵⁷ Woo, H. Y.; Heo, J. Exp. Opin. Pharmacother. **2012**, 13, 1059–1067.

Vandetanib **26** (Caprelsa, **Schéma 6**) inhibuje VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR a RET.⁵⁸ Je to derivát anilinochinazolínu s bázickým postranným reťazcom zvyšujúcim rozpustnosť vo vode. Používa sa na liečbu rakoviny štítnej žľazy, pri ktorej dochádza k nadexpresii RET-u.

Sunitinib 27 (Sutent, Schéma 6) je multikinázový inhibítor s indol-2ónovým a pyrolovým heterocyklom a rozpustnosť modulujúcim terciálnym amínom. Inhibuje VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR β a iné kinázy ako napr. FLT3. V roku 2006 bol schválený FDA na liečbu RCC a gastrointestinálneho stromálneho tumoru (GIST).

Axitinib **28** (Inlyta, **Schéma 6**) je indazolový multikinázový inhibítor vyvinutý vo firme Pfizer. Je aktívny na VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR a c-Kit.⁵⁹ V roku 2012 bol schválený FDA na použitie pri RCC po neúspešnej liečbe inými liečivami.



Schéma 6. Štruktúry antiangiogénnych liečiv inhibujúcich VEGFRs schválených v FDA.

⁵⁸ Morabito, A.; Piccirillo, M. C.; Costanzo, R.; Sandomenico, C.; Carillio, G.; Daniele, G.; Giordano, P.; Bryce, J.; Carotenuto, P.; La Rocca, A.; Di Maio, M.; Normanno, N.; Rocco, G.; Perrone, F. *Drugs Today* **2010**, 46, 683–698.

⁵⁹ Ho, T. H.; Jonasch, E. Future Oncol. **2011**, 7, 1247–1253.

3.3. Využitie derivátov 1,2,3-triazolu v medicínskej chémii

3.3.1. Úvod

1,2,3-Triazol sa od objavenia meďou katalyzovanej cykloadície organických alkínov a azidov (CuAAC)² stále viac objavuje v štruktúrach nových biologicky aktívnych zlúčenín. CuAAC umožňuje rýchly prístup k rôznorodým štruktúram, vzhľadom na dostupnosť východiskových terminálnych alkínov a azidov a toleranciu *click* reakcie k väčšine funkčných skupín. Triazolový kruh môže v ideálnom prípade mať okrem funkcie premostenia aj farmakofórické vlastnosti. Dusíky na triazole môžu slúžiť ako akceptory vodíkových väzieb a aromatické vlastnosti kruhu poskytujú rôzne typy π -interakcií (π -katión, π - π , π - σ), navyše triazolová skupina môže byť bioizostérom peptidovej väzby.⁶⁰

3.3.2. Syntéza

V súčasnosti existujú tri spôsoby prípravy 1,2,3-triazolového kruhu, pričom všetky sú založené na [3+2] cykloadícii derivátov organických alkínov a azidov. (**Schéma 7**) Prvý predstavuje termickú cykloadíciu a bol objavený Huisgenom ešte v 60-tych rokoch minulého storočia.¹

Problém vysokej teploty a vzniku zmesi regioizomérov bol prekonaný spomínanou CuAAC. Pri Cu(I) katalýze vznikajú za labolatórnej teploty z terminálnych alkínov výlučne *anti*-1,4 regioizoméry. Ako zdroje katalytickej medi môžu byť používané meď né halogenidy (CuCl, CuBr, CuI), soli organických kyselín (CuAc, CuOOCPh), alebo meď može byť generovaná *in situ* z CuSO₄ a askorbátu sodného. Výhodou generovania Cu(I) *in situ* je že sa môže použiť nadbytok redukčného činidla, čo zabraňuje oxidačnému znehodnocovaniu katalyzátora. Reakčné prostredie zvyčajne tvorí zmes organických rozpúšťadiel (MeOH, EtOH, *i*-PrOH, *terc*-BuOH, DMSO, DMF, AN) s vodou. V niektorých prípadoch je na zvýšenie výťažku potrebné pridať bázický ligand ako napr. DIPEA alebo TEA.⁶¹

Na selektívnu prípravu *syn*-1,5 disubstituovanych 1,2,3-triazolov bola vypracovaná metóda založená na ruténiových katalyzátoroch. Mechanizmus RuAAC je odlišný vzhľadom na to, že je takto katalyzovaná aj reakcia s disubstituovanými acetylénmi. V koordinačnej

⁶⁰ Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; Van Maarseveen, J.H. Org. Biomol. Chem. 2007, 5, 971-975.

⁶¹ Meldal, M.; Tornøe, Ch. W. Chemical Reviews 2008, 108, 2952-3015.

sfére ruténia sa zvyčajne nachádza rôzne substituovaný cyklopentadiénový kruh spolu s ligandmi ako sú napr. PPh₃ a $Cl^{-.62}$



Schéma 7. Známe spôsoby prípravy substituovaných 1,2,3-triazolov z derivátov organických azidov a acetylénov.

3.3.3. Príklady využitia derivátov triazolu pri vývoji bioaktívnych molekúl

Výhodné vlastnosti triazolu boli využité napr. pri vývoji arylsulfónamidových inhibítorov karbonickej anhydrázy,⁶³ analógov zenavimiru,⁶⁴ β-D glukopyranozylových inhibítorov glukozidázy ⁶⁵ a inhibítorov histón deacetylázy.⁶⁶

Knižnica zlúčenín obsahujúcich triazolový kruh bola použitá aj na inhibíciu VEGF receptorov.⁶⁷ Autori pripravili 25 derivátov (**Schéma 8**), ktorých základný skelet bol navrhnutý ako analóg známych inhibítorov. Aromatický kruh Ar^1 bol rôzne substituovaný (napr.: -Cl, -CF₃, -COCF₃, -Me, -*i*Pr, -*t*Bu) a v prípade Ar^2 používali heteroaromatické kruhy (pyridyl, piperidyl, chinolinyl, imidazoyl). Ako najlepšia kombinácia sa ukázal byť derivát kombinujúci Ar^1 : 3-CF3-(C6H4), Ar^2 : pyrid-4-yl, ktorý mal aktivitu v enzymatických testoch

⁶² Xinguo, L. Z.; Xue, C. P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 15998-15999.

⁶³ Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocente, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. J. Med. Chem. 2006, 6539-6548.

⁶⁴ Li, J.; Zheng, M.; Tang, W.; He, P. L.; Zhu, W.; Li, T.; Zuo, J. P.; Liu, H.; Jiang, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 49, 5009-5013.

⁶⁵ Dedola, S.; Hughes, D. L.; Nepogodiev, S. A.; Rejzek, M.; Field, R. A. Carbohydr. Res. **2010**, 345, 1123-1134.

⁶⁶ Chen, P. C.: Patil, V.; Guerrant, W.; Green, P.; Oyelere, A. K. Bioorg. Med. Chem. 2008, 16, 4839-4858.

⁶⁷ Kiselyova, A. S.; Semenovab, M.; Semenov, V. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 17, 1344-1348.

51 nM pre VEGFR-2 a 66 nM pre VEGFR-1 a pri testoch na bunkových líniach 96 nM pre VEGFR-2.



Schéma 8. Spôsob prípravy jednotlivých triazolových členov knižnice inhibítorov VEGFR.

Najzaujímavejšou aplikáciou vo využívaní triazolového kruhu tvorí Sharplessova *in situ click* chémia, ktorá využíva samotnú cieľovú biomakromolekulu pri riadení procesu výberu a syntézy aktívnych molekúl. *In situ click* chémia prináša úplne nový prístup k hľadaniu vhodnej kombinácie vstupných fragmentov, bez nutnosti prípravy a testovania veľkého množstva zlúčenín.

Sharpless ukázal účinnosť metódy spájaním fragmentov, o ktorých bolo známe, že sa viažu na rôzne miesta acetyl-cholín esterázy (**AChE**) cez rôzne dlhé alifatické ramienka. Vytvoril knižnicu pozostávajúcu z takrínových a fenantridíniových derivátov. (**Schéma 9**) Knižnica fragmentov bola inkubovaná s AChE a výsledná zmes bola analyzovaná pomocou HPLC-MS porovnávaním so štandardmi získanými termickou cykloadíciou. Touto metódou dokázal vyselektovať dosiaľ najpotentnejší inhibítor (**TZ2 + PA6**) AChE s femtomolárnou aktivitou.⁶⁸ Predpokladaná úloha AChE ako templátu bola potvrdená kovalentným aj nekovalentným blokovaním aktívneho miesta enzýmu, pri ktorom sa vznik triazolového produktu nepozoroval. Navyše cykloadičný produkt vznikal približne v ekvimolárnom množstve s AChE enzýmom, čo naznačuje, že vzniknutý produkt je účinný inhibítor.

⁶⁸ Manetsch, R.; Krasiński, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 12809-12818.



Schéma 9. *In situ click* knižnica takrínových (**T**) a fenantridíniových (**P**) derivátov s rôzne dlhými (**n**) alifatickými ramienkami s azidovým (**Z**) alebo alkínovým (**A**) zakončením.

3. Experimentálna časť

3.1. Syntéza a testovanie reaktivity dibenzocyklooktinolu - DIBO 6

Príprava10,11-dibróm-10,11-dihydrodibenzo[a,d]cykloheptén-5-ónu (16)



Experimentálny postup: Do miešaného roztoku 3.20 g (15.40 mmol, 1.00 mol ekv) dibenzosuberónu **15** v 40 ml CCl₄ sme prikvapkali 3.2 ml (9.90 g, 62.00 mmol, 4.00 mol ekv) Br₂. Reakčnú zmes sme miešali pri RT, pričom počas reakcie z nej vypadával kryštalický produkt **16**. Po 36 h sme kryštály produktu odfiltrovali a premyli čistým CCl₄. Produkt sme sušili pomocou RVO a HV. Získali sme 4.12 g (11.6 mmol) produktu **16**, čo predstavuje 74.0 % výťažok. Experimentálny postup sme prebrali z lit⁶⁹.

⁶⁹ van Der Stelt, C.; Harms, A. F.; Nauta, W. Th. J. Med. Chem., **1961**, 4, 335-349.



Experimentálny postup: Do miešaného roztoku 2.00 g (9.70 mmol, 1.00 mol ekv) dibenzosuberenónu **19** v 30 ml CHCl₃ sme prikvapkali 1 ml (3.10 g, 18.40 mmol, 2.00 mol ekv) Br₂. Reakčnú zmes sme miešali pri RT, pričom počas reakcie z nej vypadával kryštalický produkt **16**. Po 18 h sme kryštály produktu odfiltrovali a premyli čistým CHCl₃. Produkt sme sušili pomocou RVO a HV. Získali sme 2.65 g (7.24 mmol) produktu **16**, čo predstavuje 74.4 % výťažok. Experimentálny postup sme prebrali z lit.³⁰

M.p.: 193.0-195.0 °C [CCl₄], žltohnedá kryštalická látka



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD 05-11.fid): δ 8.09 (dd, 2H, J(3,4) = 7.7 Hz, J(2,4) = 1.7 Hz, H-C(4)), 7.57 (ddd, 2H, J(1,2) = J(2,3) = 7.4 Hz, J(2,4) = 1.7 Hz, H-C(2)), 7.50 (ddd, 2H, J(3,4) = 7.7 Hz, J(2,3) = 7.4 Hz, J(1,3) =1.6 Hz, H-C(3)), 7.40 (dd, 2H, J(1,2) = 7.4 Hz, J(1,3) =1.6 Hz, H-C(1)) 5.80 (s, 2H, H-C(11)). Spektrá zhodné s literatúrou.³⁰



Príprava 10-bróm-5H-dibenzo[a,d]cykloheptén-5-ónu (17)



Experimentálny postup: Do roztoku 2.00g (5.50 mmol, 1.00 mol ekv) dibrómovanej zlúčeniny **16** v 65 ml MeOH sme pridali 1.10 g NaOH (27.5 mmol, 5.00 mol ekv). Reakčnú zmes refluxovali počas 18 h. Po ochladení z roztoku vypadla biela zrazenina. MeOH sme odparili za zníženého tlaku a pevný zvyšok sme rozpustili v 50 ml zmesi DCM / H₂O (1 / 1). Organickú fázu sme oddelili a vodnú fázu extrahovali 3 x 15 ml DCM. Spojené organické fázy sme sušili nad Na₂SO₄. Po odparení rozpúšťadla sme dostali 1.55 g (5.43 mmol, 98.7 %) surového produktu **17**, ktorý sme bez ďalšieho čistenia použili do nasledujúcej reakcie. Experimentálny postup sme prebrali z lit.³⁰





¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD14-11.fid):** δ 8.15 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, H-Ar), 7.93 (m, 2H, H-Ar), 7.79 (s, 1H, H-C(11)), 7.50-7.68 (m, 4H, H-Ar), 7.43 (m, 1H, H-Ar).


Spektrá zhodné z literatúrou.³⁰

Príprava brómdibenzo[a,e]cyclooktén-5(6H)-ónu (14)



Experimentálny postup: 2.63 ml (5.26 mmol, 1.50 mol ekv) TMSCHN₂ (2M roztok v hexánoch) sme pridávali v priebehu 3 h k roztoku 1.00 g (3.51 mmol, 1.00 mol ekv) zlúčeniny **17** a 670 μ l (750 mg, 5.26 mmol, 1.50 mol ekv) BF₃. Et₂O v 50 ml DCM abs pod Ar atmosférou vychladenému na 0 °C. Po 18 h sme reakčnú zmes premyli vodou a vodnú fázu extrahovali 3 x 10 ml DCM. Spojené organické vrstvy sme sušili nad Na₂SO₄ a DCM sme následne odparili. Surový produkt sme čistili FLC chromatografiou v zmesi EA / Hex (1 / 20). Výsledný produkt sme kryštalizovali z EA a získali 357 mg (1.19 mmol, 34.1 %) produktu **14**. Experimentálny postup sme prebrali z lit.³⁰





¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD23-11.fid): δ 8.07 (dd, 1H, J = 8.0, 1.5 Hz, H-Ar), 7.58 (s, 1H, H-C(11 alebo12)), 7.42 - 7.54 (m, 2H, H-Ar), 7.21 - 7.34 (m, 5H, H-Ar), 4.38 (d, 1H, $J_{gem} = 13.3$ Hz, H-C(6)), 3.91 (d, 1H, $J_{gem} = 13.3$ Hz, H-C(6)).



Spektrá zhodné s literatúrou.³⁰

Príprava bróm-5,6-dihydrodibenzo[a,e]cyclooktén-5-olu (13)



Experimentálny postup: Do miešaného roztoku 150 mg (0.50 mmol, 1.00 mol ekv) **14** v 10 ml DCM abs sme za chladenia (N₂ (l) / iPrOH) naraz pridali 0.6 ml (0.6 mmol, 1.20 mol ekv) 1.0 M roztoku DIBAL-u v DCM. Reakčnú zmes sme potom nechali ohriať na RT a pri tejto teplote ju miešali 18 h. (V prípade že podľa TLC analýzy tam ketón **14** ešte bol, pridali sme ďalší ekvivalent DIBAL-u) Ak sme na TLC už nepozorovali prítomnosť východiskového ketónu **14**, reakciu sme ukončili pridaním nasýteného roztoku NH₄Cl a 1.0 M HCl. Organickú fázu sme oddelili a vodnú extrahovali 3 x 5 ml DCM. Spojené organické fázy sme vysušili státím nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní sušidla sme prchavé podiely odparili pomocou RVO. Surový produkt sme prečistili FLC s elučnou zmesou EA / Hex (1 / 4). Získali sme 138.5 mg (0.46 mmol, 92 %) produktu **13**. Experimentálny postup sme prebrali z lit.³⁰



HO 5.20 (9.3, 7.7)

5 6

12

Β̈́r

7.39

3.43 (13.7, 7.7) 3.27 (13.7, 9.3)

13

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD57-12.fid): δ 7.39 (s, 1H, H-C(11 alebo 12)), 7.27 - 7.35 (m, 2H, H-Ar), 7.06 - 7.16 (m, 5H, H-Ar), 7.03 - 6.97 (m, 1H, H-Ar), 5.20 (dd, 1H, J(5,6) = 9.3 Hz, J(5,6) = 7.7 Hz, H-C(5)), 3.43 (dd, 1H, $J_{gem} = 13.7$ Hz, J(5,6) = 7.7 Hz, H-C(6)), 3.27 (dd, 1H, $J_{gem} = 13.7$ Hz, J(5,6) = 9.3 Hz, H-C(6)).

Spektrá zhodné s literatúrou.³⁰

Príprava dibenzocyklooktinolu (DIBO, 6)



Experimentálny postup: Do miešaného roztoku 100.0 mg (0.33 mmol, 1.00 mol ekv) východiskového alkoholu **13** v 5 ml THF abs sme počas 5 min pri RT prikvapkali 1.66 ml (1.33 mmol, 4.00 mol ekv) čerstvo pripraveného 0.8 M roztoku LDA v THF. Po 30 min sme reakciu ukončili pridaním vody. Vzniknutú zmes sme extrahovali 3 x 5 ml DCM a spojené organické fázy sme sušili pomocou Na₂SO₄. Následne sme odfiltrovali sušidlo, odparili

CDCI₃

300 MHz

JD57-12

7.27 - 7.35 (m)

7.06 - 7.16 (m)

7.03 - 6.97 (m)

rozpúšťadlá a surový produkt sme prečistili pomocou FLC v zmesi EA / Hex (1 / 3). Získali sme 57.7 mg (0.26 mmol, 79 %) produktu. Experimentálny postup sme prebrali z lit.30



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD0805-13.fid): δ 7.75 (m, 1H, H-Ar), 7.27 - 7.47 (m, 7H, H-Ar), 4.64 (m, 1H, H-C(5)), 3.11 (dd, 1H, J_{gem} = 14.7 Hz, J(5,6) = 2.3 Hz, H-C(6)), 2.94 (dd, 1H, J_{gem} = 14.7, J(5,6) = 3.8 Hz, H-C(6)), 2.14 (d, 1H, J(-CH-OH, OH) = 4.6 Hz, OH).



Spektrá zhodné s literatúrou.²⁹

Príprava DIBO cykloaduktov s benzylazidom 30 a 31



Experimentálny postup: Do roztoku 4.0 mg (0.018 mmol, 1.00 mol ekv) DIBO v 0.5 ml MeOH sme prikvapkali 0.5 ml (0.018 mmol, 1.00 mol ekv) 0.036 M roztoku benzylazidu **29** v MeOH. Reakčnú zmes sme nechali miešať 30 minút pri RT, po ktorých sme na základe

TLC zistili, že sa spotrebovali všetky východiskové látky a vzniklo niekoľko polárnejších zlúčenín. Za zníženého tlaku sme odparili MeOH a získali sme 6.4 mg (100 %) produktov **30** a **31**. Kvôli nedostatku času a východiskového alkínu **6** sme vzniknutú zmes nečistili a uvádzame len jej zmesné ¹H-NMR spektrum, v ktorom sme na základe hodnôt integrálov a interakčných konštánt identifikovali oba regioizoméry, ktoré vznikli v pomere 43 : 57. Experimentálny postup sme prebrali z lit.30



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD3901-13.fid):

Regioizomér s 57 % zastúpením: δ 5.51 (d, 1H, J_{gem} = 14.9 Hz,-CH₂Ph), 5.65 (d, 1H, J_{gem} = 14.9 Hz,-CH₂Ph), 4.70 (ddd, 1H, $J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_B) = 10.5$ Hz, $J(-C\underline{H}OH, OH) = 6.6$ Hz, $J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_B) = 5.4$ Hz, $-C\underline{H}OH$), 3.56 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.9$ Hz, $J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_B) = 5.4$ Hz, $-C\underline{H}(H)Ar_B$), 3.06 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.9$ Hz,



 $\begin{aligned} J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_{B}) &= 10.5 \text{ Hz}, -C\underline{H}(H)Ar_{B}), 1.78 \text{ (d, 1H, } J(-C\underline{H}OH, OH) &= 6.6 \text{ Hz}, OH). \\ \text{Regioizomér so 43 \% zastúpením: } \delta 5.88 \text{ (d, 1H, } J_{gem} &= 14.9 \text{ Hz}, -CH_{2}Ph), 5.58 \text{ (d, 1H, } J_{gem} &= 14.9 \text{ Hz}, -CH_{2}Ph), 5.58 \text{ (d, 1H, } J_{gem} &= 14.9 \text{ Hz}, -CH_{2}Ph), 4.86 \text{ (ddd, 1H, } J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_{B}) &= 11.5 \text{ Hz}, J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_{B}) &= 7.4 \text{ Hz}, J(-C\underline{H}OH, -OH) &= 6.6 \text{ Hz}, -C\underline{H}OH), 3.09 \text{ (dd, 1H, } J_{gem} &= 13.4 \text{ Hz}, J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}OH), -C\underline{H}OH). \end{aligned}$

 $C\underline{H}(H)Ar_B) = 7.4 \text{ Hz}, -C\underline{H}(H)Ar_B), 2.54 \text{ (dd, 1H, } J_{gem} = 13.4 \text{ Hz}, J(-C\underline{H}OH, -C\underline{H}(H)Ar_B) = 11.5 \text{ Hz}, -C\underline{H}(H)Ar_B), 1.95 \text{ (d, 1H, } J(-C\underline{H}OH, -OH) = 6.6 \text{ Hz}, -OH).$ Spektrá zhodné s literatúrou.²⁹

3.2. Návrh potenciálnych VEGFR-2 inhibítorov

3.2.1. Tvorba kombinatoriálnej knižnice

Našim cieľom bolo navrhnúť také štruktúry potenciálnych inhibítorov VEGFR-2, ktoré je možné rýchlo a efektívne pripraviť. Preto sme sa rozhodli pre využitie *click* reakcie alkínov a organických azidov. Ako východiskové fragmenty sme použili terminálne alkíny a azidy dostupné prostredníctvom Sigma-Aldrich.

Týmto spôsobom sme získali 100 azidov a 392 alkínov, ktorých kombináciou sme vytvorili všetky možné 1,4 a 1,5 substituované triazolické zlúčeniny. Knižnicu sme vytvorili pomocou protokolu *Enumerate Library by Reaction*, pričom sme použili reakcie s nasledujúcimi SMIRKS definíciami:

Základná kombinatoriálna knižnica obsahovala 100 x 392 x 2 = 78 400 štruktúr. Štruktúry ligandov sme si pripravili protokolom *Prepare Ligands*, ktorý upravil protonizačné stavy, tak aby odzrkadľovali pH v rozmedzí 6 – 8. Protokol zároveň pridal vodíkové atómy a nahrubo optimalizoval geometriu molekúl. Z knižnice boli odstránené duplicity a štruktúry porušujúce *drug-like* pravidlá. Výsledná knižnica potom obsahovala 60 707 štruktúr.

3.2.2. Dokovanie knižnice

Predpoveď aktivity sme urobili pomocou dokovania jednotlivých štruktúr knižnice do modelu proteínu. Ako model sme použili komplex kinázovej časti VEGFR-2 receptoru s ligandom, ktorý je voľne prístupný v PDB databáze pod označením 3CP9. (**Obrázok 3**, Obrázok 3) Väzbové miesto sme definovali pomocou nástrojov v záložke *Define and Edit Binding Site*. Z modelu sme vymazali molekuly vody a pôvodného ligandu a dopočítali polohy polárnych vodíkov. Do takto pripraveného modelu proteínu sme dokovali vygenerovanú knižnicu pomocou programu CDOCKER.



Obrázok 2. PDB komplex kinázovej časti VEGFR-2 s inhibítorom 3CP9.

CDOCKER je založený na CHARMm *forcefield*. Najskôr sa vygeneruje určitý počet náhodných konformácií (*Random Conformations*) molekulovou dynamikou pri vysokej teplote. Vytvorené konformácie sú potom náhodne vkladané do definovaného väzbového miesta, pričom sú skórované mriežkovou (*Grid-based*) energiou s jemným potenciálom. Tieto polohy sú pre každú konformáciu generované do vtedy, kým sa nenájde definovaný počet zlých (*Maximum Bad Orientations*), alebo dobrých (*Orientations to Refine*) (majú lepšie skóre ako je definovaná hranica – *Orientation VdW Energy Treshold*) polôh. Takto získané pózy sú potom optimalizované metódou nazývanou *Simulated Annealing*, ktorá simuluje zahrievanie na vysokú teplotu a následné postupné ochladzovanie systému. Je možné nastaviť počet zohrievacích krokov (*Heating Steps*), cieľovú teplotu ohrievania (*Heating Target Temperature*), počet krokov chladenia (*Cooling Steps*) a cieľovú teplotu chladenia (*Cooling Target Temperature*). Polohy ligandov sú nakoniec minimalizované gradientovou metódou s normálnym tvrdým potenciálom. Výstupom protokolu sú zadokované pózy ligandov s vypočítanými energiami:

- -*CDOCKER_INTERACTION_ENERGY* vyjadruje interakčnú energiu rozdiel medzi energiou samotného proteínu spolu s ligandom a komplexu ligand-proteín
- -CDOCKER_ENERGY je interakčná energia a pnutie v molekule ligandu

CDOCKER sme testovali na prednastavených hodnotách, pričom výpočet jednej molekuly trval v priemere 5 minút. Pôvodný ligand sa zadokoval s RMSD 1.35 Å vzhľadom na pôvodnú kryštálovú polohu, pričom hlavným rozdielom bol indolylový kruh ktorý je v zadokovanej póze otočený o približne 180 °. (**Obrázok 3**) Táto časť ligandu prispieva hlavne π interakciou, ktorá zostala zachovaná aj pri zadokovanej póze. Indolyl vytŕča smerom k okraju proteínu čo spôsobuje jeho pohyblivosť, a preto je ťažké predpovedať jeho konformáciu. Skóre zadokovaného pôvodného ligandu bolo –*CDOCKER_ENERGY* = 16.7, *-CDOCKER_INTERACTION_ENERGY* = 62.5.



Obrázok 3. Komplex PDB: 3CP9: interakcie pôvodného ligandu s kinázou (vľavo), časť pôvodného ligandu smerovaného von z proteínu k cytosolu (vpravo hore) a reálna pozícia pôvodného ligandu z komplexu 3CP9 (zelený) a poloha získaná jeho dokovaním (červený) (vpravo dole).

Dokovanie ligandu do modelu proteínu pochádzajúceho z komplexu s dokovaným ligandom je oveľa jednoduchšie v porovnaní s cudzími ligandmi, pretože konformácia proteínu silne závisí od štruktúry ligandu (*induced fit*). Z tohto dôvodu sme sa rozhodli dokovať každú štruktúru s väčším množstvom konformérov (*Random Conformations* = 30 vs. prednastavené=10) ako aj väčším množstvom orientácii do optimalizačnej fázy (*Orientations to Refine* = 20 vs. prednastavené=10). Dokovanie knižnice trvalo približne 50 dní na počítači

s 8 2.6 GHz jadrami. Pre zadokované ligandy sme vypočítali efektívne hodnoty väzobnej energie (*ligand efficiency, LE*) podľa vzorca: *-CDOCKER_INTERACTION_ENERGY*/počet ťažkých atómov.

3.2.3. Vyhodnotenie dokovania

Zadokované ligandy sme filtrovali multiparametrovou Paretovou metódou, pričom sme hľadali ligandy s maximálnymi efektivitami a minimálnymi energiami. Do ďalšej fázy sme si ponechali 3 Paretove fronty, čo predstavovalo 371 zlúčenín.

Vzhľadom na to, že skórovanie je všeobecne pri dokovacích experimentoch zvyčajne väčší problém ako samotné hľadanie polohy ligandu sme všetky vybrané zadokované ligandy pozreli v komplexe s proteínom, kde sme okrem numerických skóre hodnotili aj:

- množstvo a kvalitu zobrazených interakcií (vodíkové väzby, π-interakcie, soľné mostíky)
- hydrofóbne interakcie
- polohu ligandu (napríklad či nie je len na povrchu väzbového miesta)
- špeciálne polohu a interakcie samotného triazolového kruhu vo väzobnom mieste
- neuvažovali sme dobre skórujúce triazoly pochádzajúce z acylazidov (problematická syntéza a nestabilita)
- snažili sme sa odhadnúť desolvatačnú pokutu (je nevhodné napr. ak sa nachádza nabitá skupina vo vnútri hydrofóbneho väzbového miesta)
- finančnú dostupnosť vstupných fragmentov

3.2.4. Vybrané štruktúry s počítačom predpovedanými interakciami

Po niekoľkých kolách selekcie sme na prípravu vybrali 4 štruktúry. (

Obrázok 4) Tri z nich sú vytvorené *click* reakciou s 3-benzyloxy-4metoxybenzylazidom a alkínmi, ktoré obsahujú voľnú amino skupinu. Posledný triazolový derivát je štruktúrne odlišný a obsahuje piperazínový kruh viazaný cez amidovu väzbu na benzénové jadro.

Spoločným znakom všetkých ligandov štruktúr je prítomnosť bázickej amino skupiny, ktorá vytvára soľný mostík s Asp1046 a niekedy π – katión interakciu s His1026 VEGFR-2 kinázy.



Obrázok 4. Interakčné mapy 4 vybraných ligandov v komplexe s 3CP9 modelom VEGFR-2.

- 3.3. Syntézy navrhnutých VEGFR-2 inhibítorov
 - 3.3.1. Syntéza prekurzorov click reakcií

Príprava 3-benzyloxy-4-metoxybenzyl alkoholu (33)



Experimentálny postup: Do miešaného roztoku 1.00 g (4.13 mmol, 1.00 mol ekv) aldehydu **32** v 20 ml EtOH sme prisypali 187.4 mg (4.96 mmol, 1.20 mol ekv) NaBH₄ a reakčnú zmes sme miešali 30 min pri RT. Ak sme na základe TLC analýzy zistili neprítomnosť východiskovej látky **32**, tak sme reakciu ukončili opatrným prikvapkávaním nasýteného vodného roztoku NH₄Cl dovtedy, kým prestal únik vodíka z r. zmesi. Reakčnú zmes sme zahustili odparením EtOH a zvyšok sme rozpustili v zmesi EA / H₂O. Oddelili sme organickú fázu a vodnú fázu sme extrahovali 2 x 20 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl a vysušili nad Na₂SO₄. Po odparení sme dostali 0.99 g (4.09 mmol, 99 %) alkoholu **33**. Experimentálny postup sme prebrali s literatúry.⁷⁰



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD1104-12.fid): δ 7.45 (m, 2H, H-C_B(2)), 7.37 (m, 2H, H-C_B(3)), 7.31 (m, 1H, H-C_B(4)), 6.96 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.8 Hz, H-C_A(2)), 6.92 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.2 Hz, *J*(2,6) = 1.8 Hz, HC_A(6)), 6.87 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.2 Hz, H-C_A(5)), 5.16 (s, 2H, -OCH₂Ar_B), 4.57 (s, 2H, -C<u>H₂OH</u>), 3.89 (s, 3H, CH₃O-).



Spektrá sú zhodné s literatúrou.⁷¹

⁷⁰ Bhandari, P.; Leslie Crombie, L.; Daniels, P.; Holden, I.; N.; Whiting, D. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1 **1992**, 839-849.

⁷¹ Taylor, L. L.; Hii, K. K. M.; Goldberg, F. W. *Org. Biomol. Chem.* **2012**,10, 4424 – 4432.



Experimentálny postup: Do suchej banky sme navážili 1.00 g (4.10 mmol, 1.00 mol ekv) alkoholu **33** a pridali 20 ml DCM abs. Do roztoku sme za intenzívneho miešania pod Ar atmosférou v priebehu 5 min pridali 297 μ l (487.7 mg, 3.82 mmol, 1.00 mol ekv) SOCl₂. Reakciu sme nechali bežať nasledujúcich 10 min, po ktorých sme ju ukončili prídavkom vody. Oddelili sme organickú fázu a vodnú fázu sme extrahovali 2 x 20 ml DCM. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a sušili nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní sušidla sme za zníženého tlaku odparili rozpúšťadlá a iné prchavé podiely. Týmto spôsobom sme získali 1.05 g (4.02 mmol, 98 %) chlórderivátu **34**. Experimentálny postup sme prebrali s literatúry.⁷²



⁷² Lisowski, V.; Enguehard, C.; Lancelot, J.-C.; Caignard, D.-H.; Lambel, S.; Leonce, S.; Sylvain Rault, S; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2205-2208.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD1306-13a.fid): δ 7.45 (m, 2H, H-C_B(2)), 7.38 (m, 2H, H-C_B(3)), 7.32 (m, 1H, H-C_B(4)), 6.951 (d, 1H, J(3,5) = 2.1Hz, H-C_A(3)), 6.949 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(3,5) = 2.1 Hz, HC_A(5)), 6.85 (d, 1H, J(5,6) = 8.7Hz, H-C_A(6)), 5.16 (s, 2H, -OCH₂Ar_B), 4.52 (s, 2H, -CH₂Cl), 3.89 (s, 3H, CH₃O-).



Spektrá sú zhodné s literatúrou.⁷³

Príprava 4-(azidometyl)-2-(benzyloxy)-1-metoxybenzénu (35)



Experimentálny postup: Rozpustili sme 1.00 g (3.82 mmol, 1.00 mol ekv) chlórderivátu **34** v 25 ml AN. Do roztoku sme pridali 370.0 mg (5.73 mmol, 1.50 mol ekv) NaN₃ a nechali 3 dni miešať pri teplote 45 °C. Po TLC analýze sme AN odparili a k zvyšku sme pridali zmes H₂O a EA. Po extrakcii sme oddelili organickú fázu a vodnú fázu sme extrahovali 2 x 20 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a nechali sušiť nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní Na₂SO₄ a odparení EA sme získali 1.01 g (3.78 mmol, 99 %) produktu **35** v podobe hustého oleja. Experimentálny postup sme prebrali s literatúry.⁷⁴

⁷³ Barton, D.H.R. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **1975**, 579 - 586.

⁷⁴ Battersby, A. R.; Staunton, J.; Wiltshire, H. R.; Bircher, B. J.; Fuganti, C. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1975, 1162-1171.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD1506-13.fid): δ 7.45 (m, 2H, H-C_B(2)), 7.37 (m, 2H, H-C_B(3)), 7.31 (m, 1H, H-C_B(4)), 6.85 – 6.89 (m, 3H, H-C_A), 5.16 (s, 2H, -OCH₂Ar_B), 4.21 (s, 2H, -CH₂N₃), 3.88 (s, 3H, -OCH₃).

Spektrá sú zhodné s literatúrou.⁷⁴



Príprava 1-(azidometyl)-4-fluórbenzénu (37)



Experimentálny postup: Do zmesi 20 ml acetónu, 20 ml H₂O a 1.00 g (6.92 mmol, 1.00 mol ekv) chlórderivátu **36** sme prisypali 0.50 g (7.61 mmol, 1.10 mol ekv) NaN₃. Po 18 h miešania pri RT sme do reakčnej zmesi pridali 50 ml H₂O a extrahovali ju 3 x 20 ml DCM. Spojené organické fázy sme sušili pomocou Na₂SO₄ a po odfiltrovaní sušidla sme rozpúšťadlo odparili. Olejovitý zvyšok sme prečistili s FLC pomocou EA / Hex (1 / 5). Získali sme 810.0 mg (5.33 mmol, 77 %) azidu **37**. Experimentálny postup sme prebrali s literatúry.⁷⁵

⁷⁵ Campbell-Verduyn, L.; Elsinga, P. H.; Mirfeizi,L.; Dierckx, R. A.; Feringa, B. L. Org. Biomol. Chem. 2008, 3461-3463.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD1001.fid): δ 7.30 (dd, 2H, J(2,3) = 8.7 Hz, J(F,H-C(2)) = 5.3 Hz, H-C(2)), 7.07 (dd, 2H, J(2,3) = 8.7 Hz, J(F,H-C(3)) = 8.7 Hz, H-C(3)), 4.32 (s, 2H, CH₂).



Spektrá sú zhodné s literatúrou.⁷⁵

•

Príprava N-propargylftalimidu (40)



Experimentálny postup: Do roztoku 2.00 g (10.81 mmol, 1.00 mol ekv) ftalimidu draselného **39** v 30 ml DMF abs sme prikvapkali 820 μ l (1.29 g, 10.81 mmol, 1.00 mol ekv) propargylbromidu **38**. Reakčnú zmes sme za miešania zahrievali na 80 °C po dobu 18 h. Potom sme ju nechali vychladnúť a následne sme do zmesi pridali H₂O, pričom vypadla biela zrazenina. Zrazeninu sme odfiltrovali na Bűchnerovom lieviku, premyli ju studenou vodou

a nechali vysušiť. Získali sme 1.90 g (10.27 mmol, 95 %) propargylfltalimidu **40**. Experimentány postup sme prebrali s patentu.⁷⁶



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD1701.fid): δ 7.86 - 7.93 (ddm, J(4,5) = 5.5 Hz, J(4,6) = 3.3 Hz, 2H, H-Ar), 7.71 - 7.79 (ddm, J(4,5) = 5.5 Hz, J(4,6) = 3.3 Hz, 2H, H-Ar), 4.46 (d, 2H, $J(CH_2, H-C\equiv C) = 2.6$ Hz, CH₂), 2.23 (t, 1H, $J(CH_2,H-C\equiv C) = 2.6$ Hz, H-C=C). Spektrá sú zhodné s literatúrou.⁷⁶



Príprava N-(1,1-dimetylproín-1-yl)ftalimidu (44)



Experimentálny postup: Do roztoku 2.00 g (9.13 mmol, 1.00 mol ekv) ftalimidu **42** v 15 ml THF sme prikvapkali 960 µl (760.0 mg, 9.13 mmol 1.00 mol ekv) amínu **41**. Po 18 h miešania pri RT sme r. zmes odparili a získali sme 2.76 g medziproduktu **43** v podobe bieleho prášku.

⁷⁶ DR. REDDY'S LABORATORIES LTD. *WO2005/82892 A2* **2005**, 58-59.

Medziprodukt **43** sme zahrievali na 150 °C v Buechi KGR za HV počas 1 h a vzniknutú zmes sme prečistili FLC s EA / H (1 / 3). Získali sme 890.0 mg (4.20 mmol, 46 %) produktu **44**.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD2901-13.fid): δ 10.84 (s, 1H, -NHCOO-), 8.32 (s, 1H, -CON<u>H</u>C(Me)₂-), 7.36 – 7.60 (m, 4H, H-Ar), 4.06 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, -COOC<u>H₂</u>CH₃), 3.08 (s, 1H, H-C=C), 1.55 (s, 6H, -C(Me)₂-), 1.17 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, -COOCH₂C<u>H₃</u>).





¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD2904-13c.fid): δ7.78
7.85 (m, 2H, H-Ar), 7.67 - 7.74 (m, 2H, H-Ar), 2.51
(s, 1H, H-C≡C), 1.99 (s, 6H, -C(Me)₂).
Spektrá sú v zhode s literatúrou.⁷⁷



Príprava N-(but-3-ín-1-yl)ftalimidu (46)



Experimentálny postup: Do roztoku 1.00 g (5.41 mmol, 1.50 mol ekv) ftalimidu draselného **39** v 20 ml DMF abs sme prikvapkali 338 µl (0.48 g, 3.60 mmol, 1.00 mol ekv) brómbutínu **45** a k zmesi sme pridali 54.0 mg (0.36 mmol, 0.10 mol ekv) NaI. Reakčnú zmes sme nechali 48 h reagovať pri 80 °C. Potom sme k nej pridali nasýtený roztok NaHCO₃. Zmes sme extrahovali 3 x 20 ml EA a spojené EA fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl. Po

⁷⁷ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Temperini, A.; Bagnoli, L.; Marini, F.; Santi, C.; Terlizzi, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3447-3458.

odparení rozpúšťadla sme tuhý zvyšok prečistili pomocou FLC s EA / H (1 / 3). Dostali sme 320.0 mg (1.62 mmol, 45 %) produktu **46**.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD3301-13b.fid): δ 7.83 – 7.90 (m, 2H, H-Ar), 7.70 – 7.77 (m, 2H, H-Ar), 3.89 (t, 2H, *J*(NCH₂,NCH₂C<u>H₂</u>) = 7.1 Hz, -NCH₂), 2.62 (dt, 2H, *J*(NCH₂,NCH₂C<u>H₂</u>) = 7.1 Hz, *J*(C=CH,CH₂C=C) = 2.7 Hz, -CH₂C=C), 1.97 (t, 1H, *J*(C=CH,CH₂C=C) = 2.7 Hz, C=CH).



Spektrá sú v zhode s literatúrou.⁷⁸

3.3.2. Cykloadície organických azidov a alkínov (click reakcie)





⁷⁸ Hess, W.; Burton, J. W. Chem. Eur. J. **2010**, 16, 12303-12306.

Experimentálny postup: Do roztoku 250.0 mg (1.35 mmol, 1.00 mol ekv) alkínu **40** v 10 ml zmesi DMSO / H_2O (9 / 1) sme prikvapkali 363.5 mg (1.35 mmol, 1.00 mol ekv) azidu **35**. Následne sme pridali 67.6 mg (0.27 mmol, 0.20 mol ekv) CuSO₄ . 5 H_2O , 107.0 mg (0.54 mmol, 0.40 mol ekv) askorbátu sodného (NaAsc) a nechali reagovať 3 h pri RT. Po TLC analýze, ktorá už neukázala prítomnosť východiskových látok sme do reakčnej zmesi pridali H_2O a extrahovali ju 3 x 15 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl a EA sme odparili. Surový produkt sme prečistili pomocou FLC s EA / Hex (1 / 1). Získali sme 552.8 mg (1.22 mmol, 90 %) produktu **47**.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD2302-13b.fid): δ 8.08 (s, 1H, H-C_B(5)), 7.80 – 7.92 (m, 4H, H-Ar_A), 7.28 – 7.46 (m, 5H, H-Ar_D), 7.07 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.6 Hz, H-C_C(2)), 6.95 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.2 Hz, H-C_C(5)), 6.88 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.2 Hz, *J*(2,6)



= 1.6 Hz, H-C_C(6)), 5.43 (s, 2H, Ar_BCH₂Ar_C), 5.01 (s, 2H, -OCH₂Ar_D), 4.82 (s, 2H, Ar_ACH₂Ar_B), 3.74 (s, 3H, OCH₃).

DMSO-d₆ 0 ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d6, 75 MHz 167.4 136.8 55.6 **JD2302-13c.fid):** δ 167.4 (s, C_A(1)=O), OMe 147.7 70.0 C₃ 149.0 (s, C_C(3)), 147.7 (s, C_C(4)), 142.5 52.7^{134.6} \$149.0⁰142.5 \$ (113.7, 112.1) (s, C_D(1)) 136.8 (d, C_A(5)) 134.6 (s, * (128.4, 128.0, 128.0, 127.9) 47 $C_{C}(1)$, 131.6 (s, $C_{B}(4)$), 128.4, 128.0, JD2302-13c #(123.2, 123.0, 121.1) 128.0 a 127.9 (4 x d, $C_D(3)$, ($C_D(2)$, $C_D(4)$ a $C_B(5)$), 123.2, 123.0 a 121.1 (d, $C_A(4)$; s, $C_A(4a)$ a d, C_C(6)) 113.7 a 112.1 (2 x d, C_C(2) a C_C(5)), 70.0 (t, -OCH₂Ar_D), 55.6 (q, -OCH₃), 52.7 (t, $Ar_BCH_2Ar_C$), 33.0 (t, $Ar_ACH_2Ar_B$).

M.p.: 141.3-143.5 °C [EA] biela kryštalická látka.

Príprava N-((1-(3-(benzyloxy)-4-metoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)dimetylmetyl)ftalimidu (48)



Experimentálny postup: Do roztoku 250.0 mg (1.17 mmol, 1.00 mol ekv) alkínu **44** v 10 ml zmesi DMSO / H_2O (9 / 1) sme prikvapkali 315.7 mg (1.17 mmol, 1.00 mol ekv) azidu **35**. Následne sme prisypali 58.6 mg (0.23 mmol, 0.20 mol ekv) CuSO₄ . 5 H_2O , 92.7 mg (0.47 mmol, 0.40 mol ekv) askorbátu sodného a nechali reagovať 2 h pri RT. Ak TLC analýza potvrdila neprítomnosť východiskových látok, pridali sme H_2O do reakčnej zmesi a extrahovali 3 x 15 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl a odparili sme EA. Surový produkt sme prečistili FLC s EA / H (1 / 1). Získali sme 538.0 mg (1.12 mmol, 95 %) produktu **48**.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD3102-13.fid): δ 8.12 (s, 1H, H-C_B(5)), 7.72 – 7.83 (m, 4H, H-Ar_A), 7.30 – 7.47 (m, 5H, H-Ar_D), 7.01 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.8 Hz, H-C_C(2)), 6.98 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.2 Hz, H-C_C(5)), 6.88 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.2



Hz, J(2,6) = 1.8 Hz, H-C_C(6)), 5.46 (s, 2H, Ar_BCH₂Ar_C), 5.03 (s, 2H, -OCH₂Ar_D), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 1.95 (s, 3H, C(Me)₂).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*6, JD3102-13b.fid): δ 168.3 (s, C=O), 152.3 (s, C_C(3)), 148.8 (s, C_C(4)), 147.7 (s, C_D(1)) 136.7 (d, C_A(5)) 134.3 (s, C_C(1)), 131.2 (s, C_B(4)), 128.3, 128.2, 127.9 a 127.8 (C_B(5), C_D(2), C_D(3) a



 $C_{D}(4)), 122.5, 120.9 a 120.5 (C_{A}(4), C_{A}(4a) a C_{C}(6)) 113.0 a 112.0 (C_{C}(2) a C_{C}(5)), 69.8 (t, OCH_{2}Ar_{D}), 55.9 (s, N\underline{C}(CH_{3})_{2}Ar_{B}), 55.5 (q, -OCH_{3}), 52.4 (t, Ar_{B}CH_{2}Ar_{C}), 28.0 (q, C(\underline{C}H_{3})_{2}).$

M.p.: 139.5 - 141.2 °C [EA] biela kryštalická látka.

FT IR (**solid, cm⁻¹**): 3113 (m), 2933 (m), 2833 (w), 1718 (s), 1708 (s), 1511 (m), 1365 (m), 1139 (s), 1006 (m), 845 (w).

Elem. Anal. vypoč.: C₂₈H₂₆N₄O₄ (482.53): C, 69.70; H, 5.43; N, 11.61 získané: C, 69.68; H, 5.74; N, 11.41. MS (ESI+): 483.3 ([M+H]⁺).

Príprava N-(2-(1-(3-(benzyloxy)-4-metoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)et-1-yl)ftalimidu (49)



Experimentálny postup: Do roztoku 250.0 mg (1.26 mmol, 1.00 mol ekv) alkínu **46** v zmesi 10 ml DMSO / H_2O (9 / 1) sme prikvapkali 337.9 mg (1.26 mmol, 1.00 mol ekv) azidu **35**. Následne sme prisypali 62.8 mg (0.25 mmol, 0.20 mol ekv) CuSO₄. 5 H_2O , 99.5 mg (0.50 mmol, 0.40 mol ekv) askorbátu sodného a zmes nechali reagovať 2 h pri RT. Po TLC analýze, ktorá už neukázala prítomnosť východiskových látok, sme do reakčnej zmesi sme pridali H_2O a extrahovali 3 x 15 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl a EA sme odparili. Surový produkt sme prečistili FLC s EA / H (1 / 1). Získali sme 281.1 mg (0.58 mmol, 46 %) produktu **49**.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD3601-13.fid): δ 7.87 (s, 1H, H-C_B(5)), 7.80 – 7.84 (m, 4H, H-Ar_A), 7.29 – 7.47 (m, 5H, H-Ar_D), 7.03 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C_C(2)), 6.92 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.3 Hz, H-C_C(5)), 6.70 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.3



Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C_C(6)), 5.40 (s, 2H, Ar_BCH₂Ar_C), 5.05 (s, 2H, -OCH₂Ar_D), 3.81 (t, 2H, $J(NCH_2,NCH_2C\underline{H}_2) = 7.1$, -NCH₂-), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 2.96 (t, 2H, $J(NCH_2,NCH_2C\underline{H}_2) = 7.1$, -NCH₂C<u>H₂-).</u>

FT IR (solid, cm⁻¹): 3460 (w), 3113 (m), 3062 (m), 3033 (w), 2921 (m), 1705 (s), 1516 (m), 1429 (m), 1258 (m), 1136 (m), 1025 (m), 867 (w).

Elem. Anal. vypoč.: C₂₇H₂₄N₄O₄ (468.18): C, 69.22; H, 5.16; N, 11.96 získané: C, 69.09; H, 5.37; N, 11.56.

Príprava (5-chlór-2-((1-(4-flórbenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)metoxy)fenyl)(4-metylpiperazín-1yl)metanínu (**51**)



Experimentálny postup: Do roztoku 15.0 mg (0.05 mmol, 1.00 mol ekv) alkínu **50** v 1 ml zmesi DMSO / H_2O (9 / 1) sme pridali 7.7 mg (0.05 mmol, 1.00 mol ekv) azidu **37**. Následne sme prisypali 2.6 mg (0.01 mmol, 0.20 mol ekv) CuSO₄ . 5 H_2O , 4.1 mg (0.02 mmol, 0.40 mol ekv) askorbátu sodného a nechali zmes reagovať 36 h pri RT. Do reakčnej zmesi sme pridali H_2O a zmes sme extrahovali 3 x 5 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl a po vysušení nad Na₂SO₄ sme EA odparili. Surový produkt sme prečistili pomocou FLC s MeOH / EA / Et₃N (25 / 74 / 1). Získali sme 15.4 mg (0.03 mmol, 68 %) produktu **51**.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, JD4102-13c.fid): δ 7.55 (s, 1H, H-C_C(5)), 7.28 (dd, 1H, J(3,4) = 8.9 Hz, J(4,6) = 2.6 Hz, H-C_B(4)), 7.27 (dd, 2H, J(2,3) = 8.6 Hz, J(F,2) = 5.9 Hz, H-C_D(2)), 7.20 (d, 1H, J(2,6) = 2.6 Hz, H-C_B(6)), 7.06 (dd, 2H, J(2,3) = 8.6 Hz, J(F,3) = 8.6 Hz, H-C(3)),



6.99 (d, 1H, J(3,4) = 8.9 Hz, H-C_B(3)), 5.52 (d, 1H, $J_{gem} = 14.8$ Hz, Ar_CC<u>H</u>(H)Ar_D), 5.45 (d, 1H, $J_{gem} = 14.8$ Hz, Ar_CCH(<u>H</u>)Ar_D), 5.24 (d, 1H, $J_{gem} = 12.4$ Hz, -OC<u>H</u>(H)Ar_C), 5.17 (d, 1H, $J_{gem} = 12.4$ Hz, -OCH(<u>H</u>)Ar_C), 3.72 (m, 2H, -CH₂NC(=O)-), 3.24 (m, 2H, -CH₂NC(=O)-), 2.23-2.53 (br m, 4H, MeN(C<u>H₂)₂-), 2.24 (br s, 3H, MeN-).</u>



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD4102-13b.fid): δ 8.23 (s, 1H, H-C_C(5)), 7.45 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.9 Hz, *J*(4,6) = 2.6 Hz, H-C_B(4)), 7.39 (dd, 2H, *J*(2,3) = 8.6 Hz, *J*(F,2) = 5.9 Hz, H-C_D(2)), 7.31 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.9 Hz, H-C_B(3)), 7.24 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.6 Hz,



H-C_B(6)), 7.21 (dd, 2H, J(2,3) = J(F,3) = 8.6 Hz, H-C_D(3)), 5.62 (s, 2H, Ar_CCH₂Ar_D), 5.19 (s, 2H, -OCH₂Ar_C), 3.31 (s, 3H, CH₃), 2.98 – 3.15 (br m, 2H), 1.99 – 2.25 (br m, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*6, JD4102-13d.fid): δ 172.1 (s, C=O), 152.4 (s, CF), 142.5 (s, C_B(2)), 132.3, 130.4, 130.3, 129.8 a 127.4 (C_B(6), C_B(4), C_C(4), C_D(1) a C_D(2)), 124.8 (d, C_C(5)), 124.6 (s, C_B(5)), 115.8, 115.5 a 114.5 (C_B(1), C_B(3)a C_D(3)), 61.8 (t,



OCH₂Ar_C), 54.4 a 53.8 (PIP_A), 52.1 (t, Ar_CCH₂Ar_D), 21.1 (q, CH₃). **MS (ESI+):** 444.3 ([M+H]⁺).

3.3.3. Odchránenia amino skupín

Príprava (1-(3-(benzyloxy)-4-metoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)metánamínu (52)



Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.22 mmol, 1.00 mol ekv) triazolu **47** v 5 ml EtOH sme prikvapkali 22.0 mg (0.44 mmol 2.00 mol ekv) NH_2NH_2 . H_2O . Reakčnú zmes sme zahriali na teplotu 70 °C a nechali reagovať 2 h. EtOH sme odparili a pevný zvyšok sme prečistili pomocou FLC s elučnou zmesou MeOH / EA / Et₃N (30 / 69 / 1). Dostali sme 62.0 mg (0.19 mmol, 87 %) amínu **52**.



 $C_{C}(5)$), 6.89 (dd, 1H, J(5,6) = 8.3 Hz, J(2,6) = 1.9 Hz, - $C_{C}(6)$), 5.43 (s, 2H, Ar_BCH₂Ar_C), 5.04 (s, 2H, -OCH₂Ar_D), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 3.72 (br s, 2H, NH₂CH₂Ar_B).

D ||7.29 - 7.47 (m)

JD2503-13

52

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*6, JD2503-13b.fid): δ 149.1 (s, C_C(3)), 147.7 (s, C_C(4)), 136.9 (s, C_D(1)), 128.4, 128.3, 128.0, 128.0 a 127.9 (C_B(4), C_C(1), C_D(2), C_D(3) a C_D(4)), 121.6 (d, C_B(5)), 121.1 (d, C_C(6)), 113.9 a 112.1 (C_C(2) a C_C(5)), 70.0 (t, OCH₂Ar_D), 55.6 (t, Ar_BCH₂Ar_C), 52.5 (q, -OCH₃), 37.2 (t, NH₂CH₂Ar_B).

M.p.: 124.3 - 127.0 °C [EA] biela kryštalická látka.
FT IR (solid, cm⁻¹): 3365 (m), 3293 (m), 3117 (m), 2921 (m), 2849 (m), 1731 (w), 1590 (m), 1512 (s), 1388 (m), 1234 (s), 1353 (s), 1009 (s), 850 (m).

MS (ESI+): 325.2 ([M+H]⁺).

Elem. Anal. vypoč.: C₁₈H₂0N₄O₂ (324.38): C, 66.65; H, 6.21; N, 17.27 získané: C, 66.34; H, 6.60; N, 16.85.

Príprava (1-(3-(benzyloxy)-4-metoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)dimetylmetánamínu (53)



Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.21 mmol, 1.00 mol ekv) triazolu **48** v 5 ml EtOH sme prikvapkali 20.7 mg (0.42 mmol, 2.00 mol ekv) NH_2NH_2 . H_2O . Reakčnú zmes sme zahriali na teplotu 70 °C a nechali reagovať 2 h. Odparili sme EtOH a pevný zvyšok sme prečistili pomocou FLC s MeOH / EA / Et₃N (24 / 75 / 1). Dostali sme 65.0 mg (0.19 mmol, 90 %) amínu **53**.





¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, JD3202-13.fid): δ 7.83 (s, 1H, H-C_B(5)), 7.29 – 7.47 (m, 5H, H-Ar_D), 7.13 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.9 Hz, H-C_C(2)), 6.97 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.3 Hz, H-C_C(5)), 6.91 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.3 Hz, *J*(2,6) = 1.9 Hz, H-C_C(6)), 5.41 (s, 2H, Ar_BCH₂Ar_C), 5.05 (s, 2H, -OCH₂Ar_D), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 1.35 (s, 6H, -C(Me)₂).



¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*6, JD3202-13b.fid): δ 149.1 (s, C_C(3)), 147.7 (s, C_C(4)), 136.9 (s, C_D(1)), 128.4, 128.2, 128.0, 128.0 a 128.0 (C_B(4), C_C(1), C_D(2), C_D(3) a C_D(4)), 121.2 (C_B(5)), 119.8 (d, C_C(6)), 113.9 a 112.1 (C_C(2) a C_C(5)), 70.0 (t, -O<u>C</u>H₂Ar_D), 55.6 (t, Ar_B<u>C</u>H₂Ar_C), 52.5 (q, -OCH₃), 48.5 (s, NH₂<u>C</u>(Me)₂Ar_B), 31.2 (q, -C(<u>C</u>H₃)₂).



M.p.: 124.8 - 127.2 °C [EA] biela kryštalická látka.

FT IR (solid, cm⁻¹): 3511 (m), 3338 (m), 3109 (s), 2958 (m), 1605 (m), 1515 (s), 1257 (s), 1237 (s), 1141 (s), 1011 (s), 850 (m). **MS (ESI+):** 353.2 ([M+H]⁺). **Elem. Anal.** vypoč.: C₂₀H₂₄N₄O₂ (352.43): C, 68.16; H, 6.86; N, 15.90 získané: C, 67.56; H, 7.04; N, 15.43.

Príprava 2-(1-(3-(benzyloxy)-4-metoxybenzyl)-1,2,3-triazol-4-yl)etán-1-amínu (54)



Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.21 mmol, 1.00 mol ekv) triazolu **49** v 5 ml EtOH sme prikvapkali 21.3 mg (0.42 mmol, 2.00 mol ekv) NH_2NH_2 . H_2O . Reakčnú zmes sme zahriali na teplotu 70 °C a nechali reagovať 2 h. Odparili sme EtOH a pevný zvyšok sme prečistili pomocou FLC s MeOH / EA / Et₃N (29 / 70 / 1). Dostali sme 49.8 mg (0.15 mmol, 69 %) amínu **54**.







4. Výsledky a diskusia

4.1. Syntéza dibenzocyklooktínu (DIBO, 6)

DIBO 6 má vo svojej štruktúre trojnú väzbu, ktorá je súčasťou 8-členného kruhu, čo spôsobuje deformáciu väzbových uhlov na sp hybridizovaných uhlíkoch a vnáša do molekuly napätie. **DIBO 6** ochotne reaguje v takých reakciách, pri ktorých dochádza k uvoľneniu vnútorného pnutia v molekule zmenou hybridizácie na uhlíkoch trojnej väzby.



Schéma syntézy DIBO 6.

Syntézu **DIBO 6** sme robili, okrem poslednej reakcie, podľa práce Kornmayera.³⁰ Prvým krokom bola adícia brómu na komerčne dostupný dibenzosuberenónu (**19**) za vzniku zlúčeniny **16**. Zlúčeninu **16** sme pripravili aj radikálovou substitúciou z dibenzosuberónu (**15**). V tomto prípade sme pri substitučnej reakcii pozorovali aj vznik monobrómovaného medziproduktu, ktorý špinil produkt **16** a znižoval jeho výťažok. Pri substitúcii sa používa nadbytok Br_2 , ktorý je nutné po reakcii odstraňovať. Navyše pri tejto reakcii vzniká HBr a ako rozpúšťadlo sa používa toxickejší CCl_4 v porovnaní s $CHCl_3$, ktorý bol použitý pri adičnej reakcii Br_2 na **19**. Z týchto dôvodov sme uprednostnili adičnú reakciu Br_2 na komerčný dibenzosuberenón (**19**) pred substitučnou reakciou Br_2 s komerčným **15**. V oboch prípadoch vypadáva produkt z reakčnej zmesi a je dostatočne čistý na použitie v nasledujúcom syntetickom stupni.

Druhým stupňom bola eliminácia molekuly HBr z intermediátu **16** v bázických podmienkach za refluxu v MeOH. Reakcia prebiehala selektívne s kvantitatívnym výťažkom. Ďalšou reakciou bolo rozšírenie kruhu zlúčeniny **17** pomocou TMSCHN₂ za katalýzy s BF₃. Et₂O. TMSCHN₂ je potrebné pridávať postupne, pretože sa za podmienok reakcie rýchlo znehodnocuje. Problémom reakcie je, že sme nenašli elučný systém, ktorý by chromatograficky rozdelil východiskovú látku **17** od jej homológu **14**. Toto komplikovalo sledovanie priebehu reakcie pomocou TLC analýzy a sťažilo tiež chromatografické čistenie produktu **14**.

Okrem produktu 14 sme v ¹H-NMR spektre urobenom zo surovej zmesi pozorovali aj prítomnosť vedľajšieho produktu 56 obsahujúceho oxiránový kruh. Zlúčeniny 14 a 56 boli v spektre v zastúpení 75 % / 25 %. Oxirán 56 často vzniká pri reakciách takéhoto typu.⁷⁹ Mechanizmus vzniku produktu 14 a vedľajšieho produktu 56 ukazujeme v Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.. Množstvo vedľajšieho produktu 56 sme sa snažili znížiť zmenou teploty (-20 °C až reflux DCM), pričom sme zistili, že teplota nemá výrazný vplyv na vzniknutý pomer produktov 14 a 56.



⁷⁹ Liu, H.; Sun, C.; Lee, N.-K.; Henry, R. F.; Lee, D., Chem. Eur. J. **2012**, 18, 11889 - 11893.

Schéma 10. Mechanizmus homologizácie **17** s TMSCHN₂ za vzniku produktu **14** a vedľajšieho produktu **56** obsahujúceho oxiránový kruh.

Surovú zmes sme najskôr prečistili pomocou FLC, po ktorej sme dostávali zmes zlúčenin 17 a 14. Z tejto zmesi sme získali po kryštalizácii čistý produkt 14 v 34 % výťažku.

V prípade produktu 14 je možný vznik dvoch regioizomérov, ktoré sa líšia polohou brómu. Napriek tomu sme po reakcii pozorovali vznik len jedného izoméru 14 s presne neurčenou štruktúrou. Informácia o presnej polohe brómu v 14 je tažko získateľná a pre nás menej dôležitá, keďže v ďalších stupňoch aj tak dôjde k jeho eliminácii.

Zaujímavou vlastnosťou zlúčeniny **14** sú signály jej metylénovej skupiny v ¹H-NMR spektre. Pre vodíky metylénu v **14** sme namiesto singletu pozorovali dva signály a každý z nich štiepený na doublet s interakčnou konštantou 13.3 Hz. Toto dokazuje, že vodíky metylénu zo **14** sú v NMR spektre neekvivalentné. V štruktúre molekuly **14** sa nenachádza žiadny stereogénny uhlík, preto si tento jav vysvetľujeme existenciou enantiomérov zlúčeniny **14**, ktoré sú výsledkom jej zabrzdeného konformačného preklápania. Počítačovým modelovaním v Hypercheme pomocou AM1 semiempirickej metódy sme zistili, že k preklopeniu metylénu je nutná zmena konformácie celej molekuly, pričom dve krajné konformácie sú navzájom zrkadlové obrazy. Porovnaním energie jednotlivých konformácií (krajné štruktúry) so štruktúrou prechodového tranzitného stavu (stredová štruktúra) sme odhadli energetickú bariéru preklopenia enantiomérov na 77 kJmol⁻¹. (**Obrázok 5**)



Obrázok 5. Enantiomérne konformácie ketónu **14** (krajné štruktúry) v porovnaní s prechodovou tranzitnou štruktúrou (v strede). Pre zjednodušenie, uvažovaná bola len jedna z možných polôh Br v molekule **14**.

Po zväčšení kruhu nasleduje redukcia karbonylu ketónu **14** DIBAL-om. Reakciu sme počas pridávania redukčného činidla chladili zmesou *i*PrOH / N_2 (l), kde sme si mohli dovoliť pridať všetok DIBAL naraz. Po pridaní sme nechali reakčnú teplotu voľne vystúpiť na RT a priebeh reakcie sme kontrolovali TLC analýzou, na základe ktorej sme sa rozhodovali, či pridáme ďalší ekvivalent DIBAL-u. Týmto spôsobom sme dosiahli kvantitatívny výťažok alkoholu **13**.

Nakoniec sme chceli eliminovať HBr z molekuly **13** pomocou *terc*-BuOK. Použitie tejto bázy sa ale neosvedčilo a neboli sme úspešní ani v prípade voľného, ako aj chráneného hydroxylu (cez TMS alebo TBDMS skupinu, ako to robil Kornmayer). Vo všetkých prípadoch sa alkohol **13**, alebo jeho silylovaný derivát menil na zlúčeniny neznámej štruktúry.

Neskôr sme zistili, že Mbua a kol.²⁹ eliminovali naraz dva brómy zo zlúčeniny **21** pomocou LDA. Tento postup sme úspešne aplikovali na náš substrát **13**. Po FLC chromatografii sme získali **DIBO 6 s** výťažkom 79 %.

Celkový výťažok prípravy **DIBO 6** vzhľadom na dibenzosuberenón **19** bol 33 % pri Kornmayerovi, 23 % pri Mbuovi a náš bol 20 % (5 syntetických stupňov). Najväčším problémom bolo rozšírenie kruhu ketónu **17**, pri ktorom sme získali iba 34 % v porovnaní s Kornmayerom, ktorý dosiahol 67 % **14**.

Reaktivitu **DIBO 6** sme testovali s benzylazidom a na základe TLC a ¹H-NMR analýzy môžeme tvrdiť, že **DIBO 6** reaguje s benzylazidom samovoľne za vzniku 2 regioizomérov pri RT. Po 30 min sme v r. zmesi už nepozorovali žiadne z východiskových látok.

Syntézu **DIBO 6** sme uskutočnili s cieľom pripraviť túto látku ako imobilizačné činidlo pre VEGFR2 proteín kvôli jeho kovalentnému ukotveniu na Au-číp pre povrchovú plazmónovú rezonanciu SPR. Táto metóda umožní študovať interakcie VEGFR2 proteínu s malými molekulami – inhibítormi tejto kinázy.

4.2. Počítačom uskutočnený návrh štruktúr inhibítorov VEGFR-2 receptoru

Pomocou počítačových metód sme navrhli 4 zlúčeniny, ktorých syntéza mala pôvodne pozostávať iba z jedného kroku – *click* reakcie. Ako stavebné bloky sme použili komerčne dostupné terminálne alkíny a organické azidy, z ktorých sme vytvorili virtuálnu kombinatoriálnu knižnicu 78 400 1,2,3-trizolových produktov.

Virtuálne kombinatoriálne knižnice umožňujú prístup k veľkému množstvu štruktúr (limitované vstupnými fragmentmi), ale aj napriek tomu pokrývajú len malú časť teoretického

chemického priestoru všetkých možných štruktúr. Navyše s počtom vstupných fragmentov prudko stúpa množstvo kombinácií, preto je ich výber, ešte na počiatku, veľmi dôležitý. Ako vstupné fragmenty sme zvolili komerčne dostupné terminálne alkíny a organické azidy. Takýto prístup umožňuje efektívnu syntézu nových zlúčenín.

Vytvorená knižnica (78 400 triazolov) po filtrácii na *drug-like* vlastnosti a úprave protonizačných foriem obsahovala viac ako 60 000 zlúčenín. Ako dokovací program sme vybrali CDOCKER, ktorý je súčasťou Discovery Studia. CDOCKER využíva molekulovú mechaniku (*CHARMm forcefield*) a patrí medzi stredne náročné na výpočtový výkon. Podľa manuálu k DS a porovnaní v literatúre⁸⁰ je najspoľahlivejší spomedzi protokolov dostupných v DS. Dokovali sme do PDB: 3CP9 VEGFR-2 variantu, ktorý sa ukázal byť pre predikčné experimenty výhodný vzhľadom na dosahované skóre v krížových docking experimentoch menšieho súboru 1,2,3-triazolových derivátov do 24 VEGFR-2 proteínových variantoch. (v tom čase dostupných v PDB databáze)

Najprv sme skúšali zadokovať s prednastavenými parametrami pôvodný ligand **C19** pochádzajúci z komplexu PDB: 3CP9. Uvedený ligand sa zadokoval správne na väzobné miesto tohto ligandu známe z roentgeno-štruktúrnej analýzy. Rozdiel medzi polohami štruktúr oboch ligandov bol RMSD = 1.35 Å. (**Obrázok 3**) Vzhľadom na to, že pôvodný ligand má len 2 rotovateľné väzby, čo zjednodušuje tvorbu konformácii, rozhodli sme sa zvýšiť počet generovaných konformérov štruktúr kombinatoriálnej knižnice a ich orientácii na dvojnásobok oproti prednastaveným parametrom. S mierne upravenými nastaveniami sme boli schopný knižnicu zadokovať do VEGFR2 receptoru v priebehu 50 dní (8 x 2.5 GHz, 16 GB RAM).

Uvedený virtuálny skríning má svoje obmedzenia, ktoré by sme tu chceli spomenúť. Dokovacie protokoly sú parametrizované tak, aby dokázali reprodukovať pozíciu ligandu známu z Röntgenovej štruktúry napr. z PDB databázy. Toto však nie celkom odzrkadľuje reálne experimenty, pri ktorých presná konformácia proteínu v komplexe s dokovaným novým ligandom nie je známa a nový ligand sa dockuje do receptoru s rigidným konformačným usporiadaním ktoré bolo vynútené určitým typom naviazaného ligandu. Tento problém je výrazný najmä v prípade proteínov s flexibilnými väzobným miestom, do ktorých sa dajú zahrnúť aj kinázy.⁸¹ Kinázy majú niekoľko hraničných konformácii - aktívnu, neaktívnu formu, rôzne stavy katalytického cyklu a veľké množstvo rôznych prechodových stavov, vzniknutých najmä pohyblivosťou aktivačnej slučky, ktorá navyše často nie je

⁸⁰ Bohari, M. H.; Sastry, G. N. J Mol Model 2012, 4263-4274.

⁸¹ Goldsmith, E. J.; Cobb, M. H. Curr. Opin. Struct.Biol. 1994, 4, 833-840.

obsiahnutá v dostupnej kryštálovej štruktúre. Predpovedanie konformácie proteínu v komplexe s ligandom predstavuje prakticky rovnaký problém ako homologické modelovanie proteínov, čo súčasné metódy dokážu len s obmedzenou presnosťou.⁸²

Ďalším častým problémom dokovacích metód vo všeobecnosti je určenie správnej polohy s pomedzi vygenerovaných orientácii - skórovanie rôznych póz tej istej štruktúry. Ešte väčšie nepresnosti sú pri porovnávaní energií rôznych štruktúr, aj napriek nájdeniu správnych väzobných módov. Z tohto dôvodu je dôležité používať kombinácie rôznych typov skóre, v ideálnom prípade využitie štatistického modelu trénovaného na študovaný biologický cieľ (VEGFR-2) a typ ligandov (triazoly). Okrem číselných skóre je nutné pozrieť zadokované ligandy v komplexe s cieľovým proteínom a vizuálne zhodnotiť reálnosť polohy umiestneného ligandu.

Napriek obmedzeniam virtuálneho skríningu majú takto vybrané štruktúry vyššiu pravdepodobnosť byť *hitom*, ako keď sa testujú látky len náhodne. Našim cieľom bolo okrem vývoja aktívnych fragmentov, alebo inhibítora pre VEGFR2 aj overenie použitej výpočtovej metodiky konfrontáciou predikovaných energii s výsledkami biologických testov, s ktorými zatiaľ z časových dôvodov nedisponujeme (testovanie v zahraničí).

⁸² Seddon, G.; Lounnas, V.; McGuire, R.; van den Bergh, T.; Bywater, R. P.; Oliveira, L.; Vriend, G. J. Comput. Aided. Mol. Des. 2012, 26, 137-150.
4.3. Syntéza počítačom navrhnutých VEGFR-2 inhibítorov



Schéma 11. Štruktúry počítačom navrhnutých inhibítorov VEGFR-2 kinázy.

4.3.1. Optimalizácia *click* reakcie uskutočnenej s alkínom **57** obsahujúcom primárnu amíno skupinu



Vzhľadom na charakter navrhnutých zlúčenín (**52** - **54**) ktoré obsahujú skupinu primárneho amínu a polárneho triazolu sme sa rozhodli uskutočniť vzorovú *click* cykloadíciu najprv na modelovej reakcii benzylazidu **29** s propargyl amínom **57**, za vzniku triazolu **58**.

Štandard produktu **58** a jeho regioizoméru sme získali po termickej reakcii azidu **29** s alkínom **57** uskutočnenej v toluéne pri teplote 100 °C počas 18 h. Vyskúšali sme rôzne postupy z literatúry, ^{83,84,85} ale nepodarilo sa nám zlúčeninu **58** pomocou CuAAC pripraviť. Pričom sme skúšali rôzne zmesi rozpúšťadiel (MeOH / H₂O, *terc*-BuOH / H₂O, DMSO / H₂O, DMF / H₂O), rôzny počet mol ekv Cu(I) (0.20, 1.00, 2.00), rôzne zdroje Cu (CuSO₄ . 5H₂O + NaAsc, CuI, Cu₂O, prášková Cu(0)) a rôzne prídavné činidlá (Na₂CO₃, TEA, NH₂CH₂CH₂NH₂, Lprolín, PhCOOH). Predpokladali sme, že problém môže spočívať v koordinácii amino skupiny s meďou, preto sme sa rozhodli problematickú amino skupinu pred reakciou chrániť. Ako chrániacu skupinu sme použili ftalimid, čo nám umožnilo vychádzať aj z komerčne dostupných halogén obasahujúcich alkínov **35** a **38**. Amíny sme po click reakcii z ftalimidových derivátov triazolových produktov uvoľňovali hydrazinolýzou. Týmto spôsobom sme dokázali pripraviť triazol **58** bez použitia termickej reakcie.





Azidový derivát **35** je komerčne dostupný (Sigma-Aldrich: 5 mg / 67.7 Euro). Azid **35** sme potrebovali vo väčšom množstve (optimalizácia 3 reakcií, po ktorých nasleduje odchránenie). Syntézu **35** sme uskutočnili v troch krokoch. Začali sme redukciou komerčného aldehydu **32** s NaBH₄, premenou alkoholu **33** na chlór derivát **34** pomocou SOCl₂ a substitúciou halogénu z **34** s NaN₃ na požadovaný azid **35**.

⁸³ Aufort, M.; Herscovici, J.; Bouhours, P.; Moreau, N.; Girard, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1195 -1198.

⁸⁴ Shao, C.; Zhu, R.; Luo, S.; Zhang, Q.; Wang, X.; Hu, Y. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 3782 - 3785.

⁸⁵ Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. Chem. Commun. 2009, 2139 - 2141.

Redukcia s NaBH₄ prebiehla v EtOH pri rt rýchlo a do 30 min sme na TLC už nepozorovali východiskový aldehyd **35**. Skúšali sme rôzne protické rozpúšťadlá, pričom sme si všimli, že NaBH₄ sa približne po 1 h degraduje v MeOH a EtOH, zatiaľ čo v *i*PrOH zostáva aktívny dlhšie ako 3 dni. Aldehyd **32** je dostatočne reaktívny a zreaguje skôr ako sa stihne NaBH₄ v MeOH alebo EtOH znehodnotiť.

S chloráciou alkoholu **33** sme mali zo začiatku problémy, kvôli relatívne vysokej reaktivite samotného produktu **34**, ktorý sa rozkladal samodeštrukciou. Jedna molekula **34** alkylovala aromatické jadro druhej molekuly **34** nakoľko donorné skupiny na benzénovom jadre stabilizujú karbokatión, ktorý môže vznikať odstúpením chloridového iónu a zároveň aktivujú benzénové jadro voči elektrofilnej substitúcii. Štruktúra produktu rozkladu **34** bola dokázaná pomocou ¹H-NMR spektra. Vzhľadom na uvedené komplikácie, bolo nutné reakciu uskutočniť rýchlo, produkt **34** spracovať a neskladovať ho v roztoku. Vysokú reaktivitu **34** dokazuje aj jeho rýchla solvolýza v MeOH za vzniku éterického metoxy derivátu.

Substitúciu s NaN₃ sme museli robiť v bezvodom AN, keďže sa derivát **34** v prítomnosti H_2O pomerne rýchlo hydrolyzoval. Obmedzená rozpustnosť NaN₃ v AN spôsobila, že reakcia prebiehala 3 dni pri teplote 45 °C.

Ďalší potrebný azid **37** sme pripravili z komerčne dostupného chlór derivátu **36**, ktorý však bol menej náchylný na hydrolýzu v porovnaní s citlivým chlór derivátom **34**. Preto sme substitúciu s NaN₃ mohli uskutočniť v zmesi acetón / voda (1 / 1). Na ¹H-NMR sme neskôr pozorovali vedľajší produkt (10 %), ktorý sme vzhľadom na výsledok TLC analýzy (výrazne polárnejšia zlúčenina) odhadli na produkt hydrolýzy. Preto by sme pri opakovaní reakcie namiesto pôvodného rozpúšťadla (zmes acetón / voda), skôr odporučili použiť AN, alebo DMSO.

4.3.3. Syntéza chránených alkínov 40, 44, 46



Reakcia ftalimidu draselného **39** s propargylbromidom **38**, spojená s elegantnou izoláciou produktu vyzrážaním s vodou, poskytla takmer kvantitatívne produkt **40**.

Alkín 44 sme pripravili z amínu 41, pričom ako zdroj ftalimidovej skupiny sme použili N-karbetoxyftalimid 42. Reakcia sa pri RT zastavila na medziprodukte 43, ktorý sa uzatváral na produkt 44 až pri vyššej teplote, čo znížilo výťažok vznikom rozkladných produktov. Uzatváranie sme robili bez rozpúšťadla pri HV.

Reakcia brómbutínu **35** a ftalimidom draselným **39** prebiehala s pomerne nízkym výťažkom aj napriek tomu, že sme použili 2.00 mol ekv **39** a bróm derivát **35** sme *in situ* aktivovali prídavkom KI. Vyšší výťažok pri reakcii s propargylbromidom **38** sa dá vysvetliť stabilizáciou kladného náboja prostredníctvom vedľajšej trojnej väzby "mezomérna stabilizácia".



4.3.4. *Click* reakcie - syntéza intermediátov 47 – 49 a konečného produktu 51

Pri CuAAC reakciách sme si ako zdroj Cu(I) zvolili redoxný systém CuSO₄ . $5H_2O$, NaAsc (0.20 mol ekv / 0.40 mol ekv). Pri tomto systéme si môžeme byť istý, že v reakčnej zmesi je prítomná meď v oxidačnom stupni 1. Cu(I) je navyše nadbytkom NaAsc chránená pred oxidáciou vzdušným kyslíkom, čo zjednodušuje uskutočnenie reakcie. Ako rozpúšťadlo sme použili zmes DMSO / H_2O (9 / 1) kvôli zlej rozpustnosti východiskových alkínov v alkoholoch a acetóne.

Reakcie s azidom **35** prebiehali 2 až 3 h, pričom bolo potrebné sledovať priebeh na TLC, pretože pokiaľ sa reakcia včas nespracovala dochádzalo k znehodnocovaniu produktu a k znižovaniu výťažku. Alkín **46** má inú povahu trojnej väzby ako **44** a **40**, keďže je o uhlík ďalej od N a poskytoval približne polovičné výťažky.

Cykloadíciu s alkínom **50** bolo ťažké sledovať na TLC, kvôli podobnej R_f hodnote VL a produktu. Vznik produktu **51** je možné pomocou TLC určiť z rozdielneho správania sa

v parách I₂ (**50** sa nefarbí, **51** sa farbí). Prekvapivo, posuny a štiepenie ¹H-NMR spektra **51** výrazne závisí od použitého rozpúšťala. Ak sme použili DMSO- d_6 , pozorovali sme štandardné singletové signály oboch prítomných metylénov OCH₂Ar_C a Ar_CCH₂Ar_D, zatiaľ čo pri použití CDCl₃ metylénové vodíky v oboch metylénových skupinách už neboli ekvivalentné a štiepili sa geminálnou interakciou. (







Schéma 12. ¹H-NMR mapy triazolu 51 a výseky spektra pre metylény v CDCl₃ a DMSO– d_6 dokazujúce odlišné správanie sa zlúčeniny 51 v dvoch odlišných rozpúšťadlách. V hornom spektre singlet pri 5.3 δ je to zvyškový DCM, ktorý sa v dolnom spektre nenachádza.

Takéto správanie si vysvetľujeme tvorbou "charge-transfer" dimérov **51** v prostredí CDCl₃ rozpúšťadla, v ktorých sú aromatické kruhy a tým aj metylény zafixované a ich vodíky chemicky neekvivalentné. (**Schéma 13**) Hypotézu sme testovali prídavkom Et₃N, ktorý by mohol komplex rozrušiť nahradením terciálneho amínu z piperazínu. A však ani po pridaní 15

mol ekv Et₃N sme nepozorovali zmenu v chemických posunoch alebo interakčných konštantách skúmaných metylénových vodíkov, čo naznačuje, že **51** tvorí pevný dimér, alebo metylény fixuje iný mechanizmus. V budúcnosti by sme chceli spraviť ¹H-NMR experimenty s postupným zvyšovaním teploty, aby sme odhadli interakčnú energiu možného diméru.



Schéma 13. Navrhnuté štruktúry dimérnych agregátov triazolu 51 v CDCl₃.

4.3.5. Príprava predpovedaných triazolových produktov 52 – 54

Konverzia ftalimidu na amín hydrazinolýzou je súčasťou Gabrielovej syntézy amínov. Ako rozpúšťadlo sa štandardne používa EtOH kvôli nízkej rozpustnosti vedľajšieho produktu ftalhydrazidu. Ftalhydrazid sme z reakčnej zmesi odstraňovali filtráciou z roztokov EtOH a z DCM. Týmto spôsobom sme dostali zmes, ktorú ešte stale bolo nutné prečistiť pomocou FLC, preto sme neskôr ftalhydrazid nefiltrovali a po reakcii sme hneď použili FLC. Príprava zlúčenín **52** a **53** dávala po čistení FLC uspokojivé výťažky. Triazolový amín **54** poskytoval v porovnaní s produktmi **52** a **53** o niečo nižšie výťažky.



Schéma 14. Syntéza triazolových zlúčenín 52 - 54 s predpovedanou afinitou k VEGFR2 receptoru.

Záver

V 5 syntetických stupňoch sme pripravili požadovaný cyklooktín **DIBO 6**, pričom sme opísali aj oxiránový vedľajší produkt získaný pri rozširovaní kruhu sedemčlenného ketónu s TMSCHN₂. Navrhli sme mechanizmus jeho vzniku. Vysvetlili sme v ¹H-NMR spektre pozorovanú diastereotopicitu metylénových vodíkov jedného z intermediátov pri príprave **DIBO.** Vypočítali sme energiu preklopenia jeho enantiomérov. Odskúšali sme reaktivitu pripraveného oktínu **DIBO 6** na modelovej nekatalyzovanej click reakcii s benzylazidom.

Pomocou počítačových metód sme navrhli štruktúry potenciálnych inhibítorov angiogenézy zameraných na blokovanie TK aktivity VEGFR-2 receptoru. Návrh inhibítorov spočíval vo vytvorení virtuálnej kombinatoriálnej knižnice 70 400 substituovaných 1,2,3-triazolov dostupných cykloadíciou terminálnych alkínov a organických azidov. Knižnicu sme filtrovali a následne 60 707 štruktúr dokovali do modelu VEGFR-2 proteínu na základe čoho sme sa rozhodli pripraviť 4 nové zlúčeniny.

Podarilo sa nám pripraviť všetky navrhnuté a vybrané triazolové zlúčeniny. V 3 prípadoch alkín obsahoval amínovú skupinu, ktorú bolo nutné pri *click* reakcii chrániť, pričom ako chrániacu skupinu sme si vybrali ftalimid. Syntézu vybraných zlúčenín sme

uskutočnili 14 reakciami, pričom sme pripravili a charakterizovali 7 zlúčenín, ktoré neboli v literatúre opísané. Opísali sme odlišné vlastnosti demonštrované výrazne inými ¹H-NMR spektrami jedného z navrhnutých triazolových produktov v dvoch rôznych deuterovaných rozpúšťadlách. Navrhli sme vysvetlenie tohto javu dimerizáciou molekúl v jednom z rozpúšťadiel.

Počítačom navrhnuté zlúčeniny sú pripravené na biologické testovanie na enzymatickú inhibičnú aktivitu VEGFR2 recetoru.

Summary

We prepared desired cyclooctine **DIBO 6** in 5 synthetic steps. We described oxirane side product from a ring enlargement reaction performed with TMSCHN₂. We proposed reaction mechanism of its formation. We explained diastereotopicity of methylene hydrogens observed in ¹H-NMR spectra in case of one from **DIBO** synthetic intermediates. We calculated energy barrier of conversion between enantiomers. We tested reactivity of prepared **DIBO 6** on a model *click* reaction performed with benzylazide without catalyst.

By computer-aided methods we designed structures of potential angiogenic inhibitors, which act as VEGFR-2 receptor TK blockers. The design of inhibitors was based on enumeration of virtual combinatorial library consisted of 70 400 substituted 1,2,3-triazoles accessible by cycloaddition of terminal alkynes and organic azides. We decided to prepare 4 new compounds selected from docking and drug like filtering experiments.

We succeeded in preparation of all selected designed triazolic compounds. In 3 cases of alkynes that contain a primary amino group, the amine was necessary to protect before a *click* reaction. Phthalimide was chosen as a protecting group. We performed the synthesis in 14 reactions, prepared and characterized 7 compounds not yet described in the literature. In one of the developed triazolic compound we observed remarkably different ¹H-NMR spectra measured in two distinct solvents. We proposed an explanation of this feature by dimerization of the compound in one of these solvents.

Computer designed compounds are prepared for biological assay on enzymatic VEGFR-2 inhibition activity.