

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

**Syntéza 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-
karbaldehydu a možnosti jeho využitia pre prípravu
angiogénneho inhibítora**

Diplomová práca

Študijný program: Organická a bioorganická chémia
Študijný odbor: 4.1.14. Chémia
Školiace pracovisko: Katedra organickej chémie, PriF UK
Školiteľ: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava 2013

Bc. Peter Šramel

Prehlásenie

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

V Bratislave, dňa 29. 04. 2013

podpis autora práce

Moje poďakovanie patrí vŕetkým, ktorí stáli pri mne a podporovali ma počas celého vysokoškolského štúdia. V prvom rade by som sa chcel poďakovať vedúcemu diplomovej práce doc. RNDr. Andrejov Boháčovi, PhD. za jeho neoceniteľné rady, obetavý prístup a pomoc pri riešení problematiky mojej diplomovej práce. Ďalej by som sa chcel poďakovať skvelému kolektívu mojich spolužiakov a kolegov Janke, Jurovi, Peťovi a pani Mirke za priateľskú a tvorivú spoluprácu. V neposlednom rade ďakujem aj firme Biomagi, Ltd. za nápad ohľadom využitia [2+2+2] cykloadícií pri syntéze cieľového inhibítora. Mimoriadna vďaka patrí mojim najbližším, rodičom a priateľom za to, že stáli pri mne za každých okolností.

Obsah

1. Abstrakt	7
2. Grafický abstrakt	9
2.1. Syntetický postup navrhnutý na prípravu angiogénneho inhibítora 19 vychádzajúci z karbaldehydového intermediátu 12	9
2.2. Alternatívne syntetické postupy navrhnuté na prípravu angiogénneho inhibítora 19	10
3. Abstrakt ¹H-NMR spektier	13
3.1. Syntéza oxazolkarbaldehydu 12	13
3.2. Alternatívne syntézy.....	15
4. Použité skratky	16
5. Úvod	17
5.1. Ciele diplomovej práce	18
6. Teoretická časť	19
6.1. Angiogenéza.....	19
6.1.1. Fyziologická vs. nefyziologická angiogenéza	19
6.1.2. Regulácia angiogénneho rastu (VEGF/VEGFR signalizácia).....	20
6.1.3. Angiogenéza tumorov a jej terapeutická inhibícia	23
6.1.4. Vývoj nízkomolekulového inhibítora angiogenézy tumorov 19	25
6.2. [2+2+2] Cykloadičné reakcie.....	27
6.2.1. Úvod do problematiky [2+2+2] cykloadičných reakcií.....	27
6.2.2. Mechanizmus [2+2+2] cykloadičných reakcií katalyzovaných komplexami prechodných kovov	29
6.2.3. Stereochémia [2+2+2] cykloadičných reakcií	30
6.2.4. Vybrané trojkomponentné [2+2+2] cykloadičné reakcie terminálnych alkínov disponujúce 1,3,5-regioselektivitou.....	32
7. Praktická časť	38
7.1. Materiál a použité metódy.....	38
7.2. Syntéza oxazolkarbaldehydu 12	39

7.2.1.	Syntéza etyl 2-chlór-3-oxopropionátu (3).....	39
7.2.2.	Syntéza etyl 2-aminoxazol-5-karboxylátu (5)	41
7.2.3.	Syntéza <i>terc</i> -butyl nitritu (7).....	43
7.2.4.	Syntéza etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylátu (8)	44
7.2.5.	Syntéza etyl 2-(5-ethylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (10)	46
7.2.6.	Syntéza 2-(5-(ethylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl) metanolu (11)	48
7.2.7.	Syntéza 2-(5-(ethylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehydu (12)	50
7.2.8.	Syntéza 4-metylbenzénsulfonyl azidu (14).....	53
7.2.9.	Syntéza dimetyl 1-diazo-2-oxopropylfosfonátu (16).....	54
7.3.	Alternatívne syntézy.....	56
7.3.1.	Syntéza etyl 2-(bis(<i>terc</i> -butoxykarbonyl)amino)oxazol-5-karboxylátu (20)	56
7.3.2.	Syntéza 2-aminoxazolu (29)	58
7.3.3.	Syntéza <i>terc</i> -butyl 5-(ethylsulfonyl)-2-metoxyfenyl (5-(hydroxymetyl) oxazol-2-yl) karbamátu (35)	60
8.	Diskusia	64
8.1.	Syntéza oxazolkarbaldehydu 12	64
8.2.	Alternatívne syntézy.....	66
9.	Záver	70
10.	Príloha	72

1. Abstrakt

Peter Šramel: Syntéza 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehydu a možnosti jeho využitia pre prípravu angiogénneho inhibítora

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie

Diplomová práca, 74 strán, 2013

Nádorové ochorenia patria medzi jedny z najrozšírenejších a najnebezpečnejších známych ochorení. Novotvorba podporného cievneho systému, ktorá je nevyhnutná pre vznik, rast a prežitie nádorových buniek, sa primárne uskutočňuje prostredníctvom biologického procesu, ktorý sa nazýva angiogenéza. Vaskulárne endoteliálne rastové faktory (VEGF) a ich príslušné endoteliálne tyrozínkinázové receptory (VEGFR) zastávajú funkciu centrálnych regulátorov angiogenézy. VEGF signalizácia prostredníctvom VEGFR-2 receptora predstavuje kľúčovú angiogénnu cestu, ktorej terapeutická inhibícia pomocou špecifických nízkomolekulových zlúčenín predstavuje zaujímavú a nádejnú stratégiu boja proti rakovine.

Kľúčové slová: angiogenéza, VEGF, VEGFR, nízkomolekulové VEGFR-2 inhibítory, [2+2+2] cykloadičné reakcie.

Abstract

Peter Šramel: Synthesis of 2-(5-(ethylsulfonyl)-2-methoxyphenylamino)oxazole-5-carbaldehyde and Its Use for the Preparation of an Angiogenic Inhibitor

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Organic Chemistry

Diploma thesis, 74 pages, 2013

Tumor diseases are one of the most widespread and the most dangerous diseases. New formation of the supportive vascular system that is essential for the birth, growth and survival of tumor cells is primarily done by means of the biological process called angiogenesis. Vascular endothelial growth factors (VEGF) and their corresponding endothelial tyrosine kinase receptors (VEGFR) function as central regulators of angiogenesis. VEGF signalization through VEGFR-2 receptor is a key angiogenic pathway whose therapeutic inhibition using specific small-molecule compounds represent an interesting and promising strategy of the fight against cancer.

Key words: angiogenesis, VEGF, VEGFR, small-molecule VEGFR-2 inhibitors, [2+2+2] cycloaddition reactions.

2. Grafický abstrakt

2.1. Syntetický postup navrhnutý na prípravu angiogénneho inhibítora 19 vychádzajúci z karbaldehydového intermediátu 12

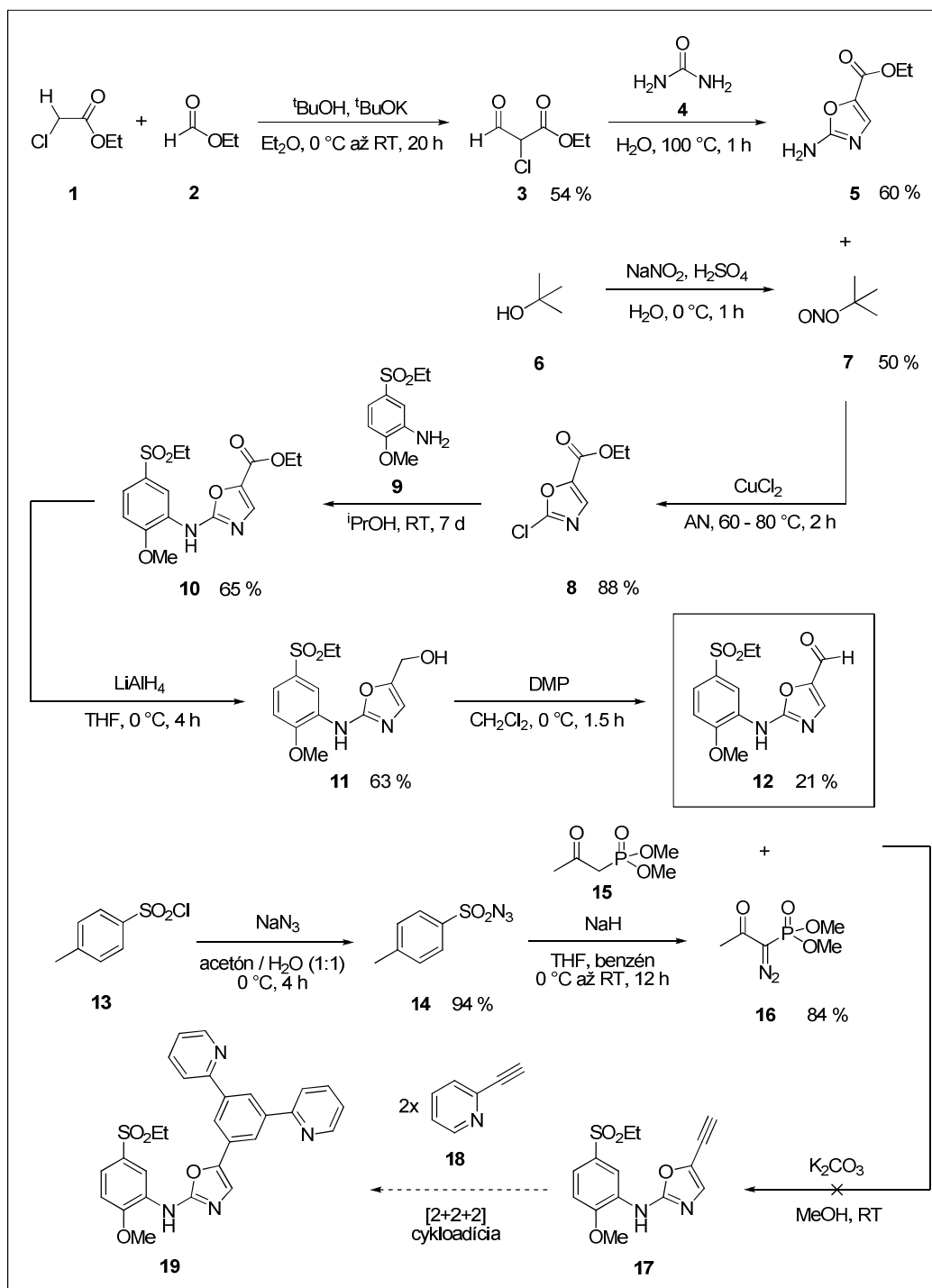


Schéma 1. Návrh prípravy angiogénneho inhibítora 19 vychádzajúci z karbaldehydového intermediátu 12.

2.2. Alternatívne syntetické postupy navrhnuté na prípravu angiogénneho inhibítora 19

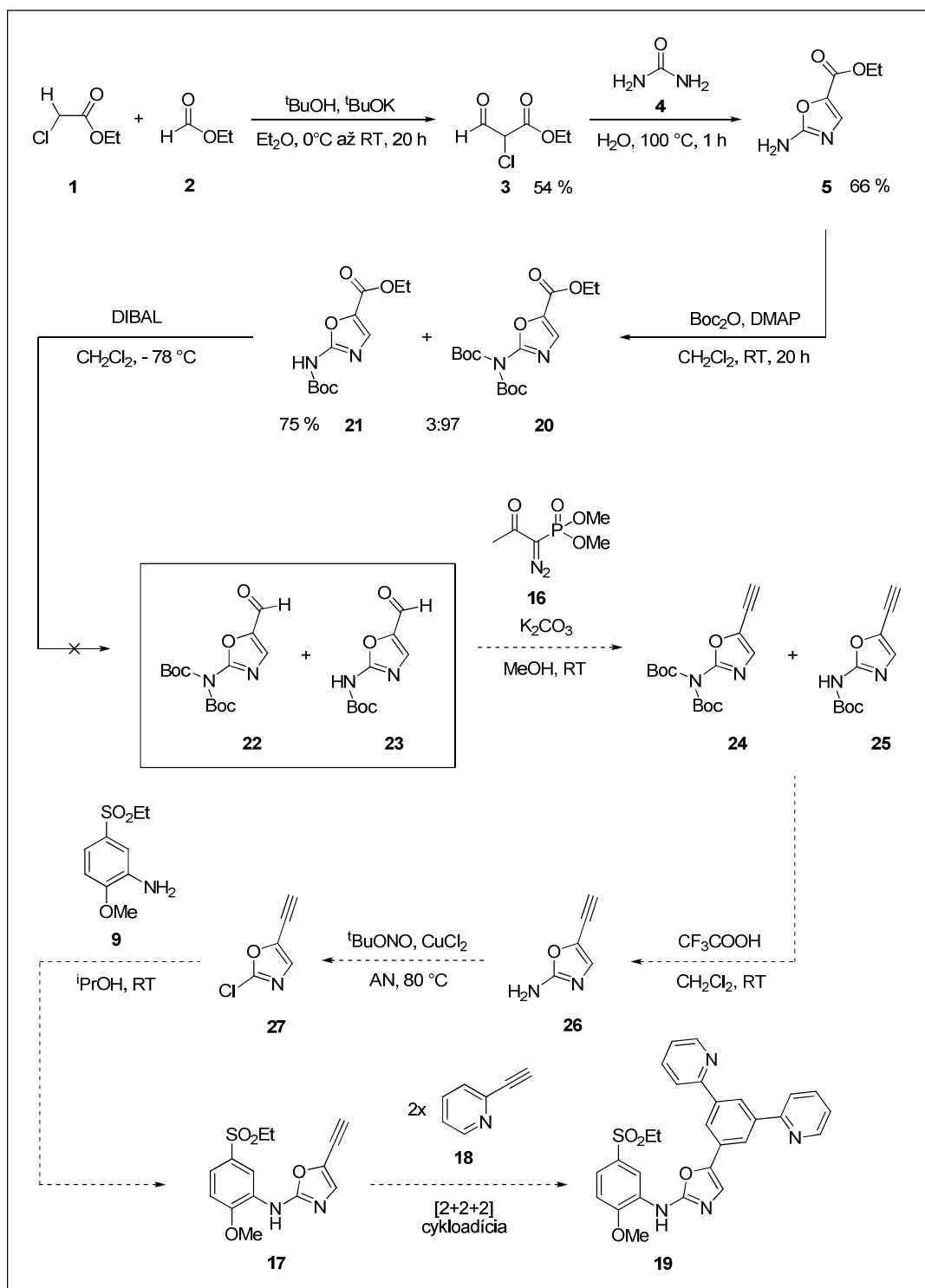


Schéma 2. Návrh prípravy angiogénneho inhibítora 19 vychádzajúci z karbaldehydového intermediátu 22, 23.

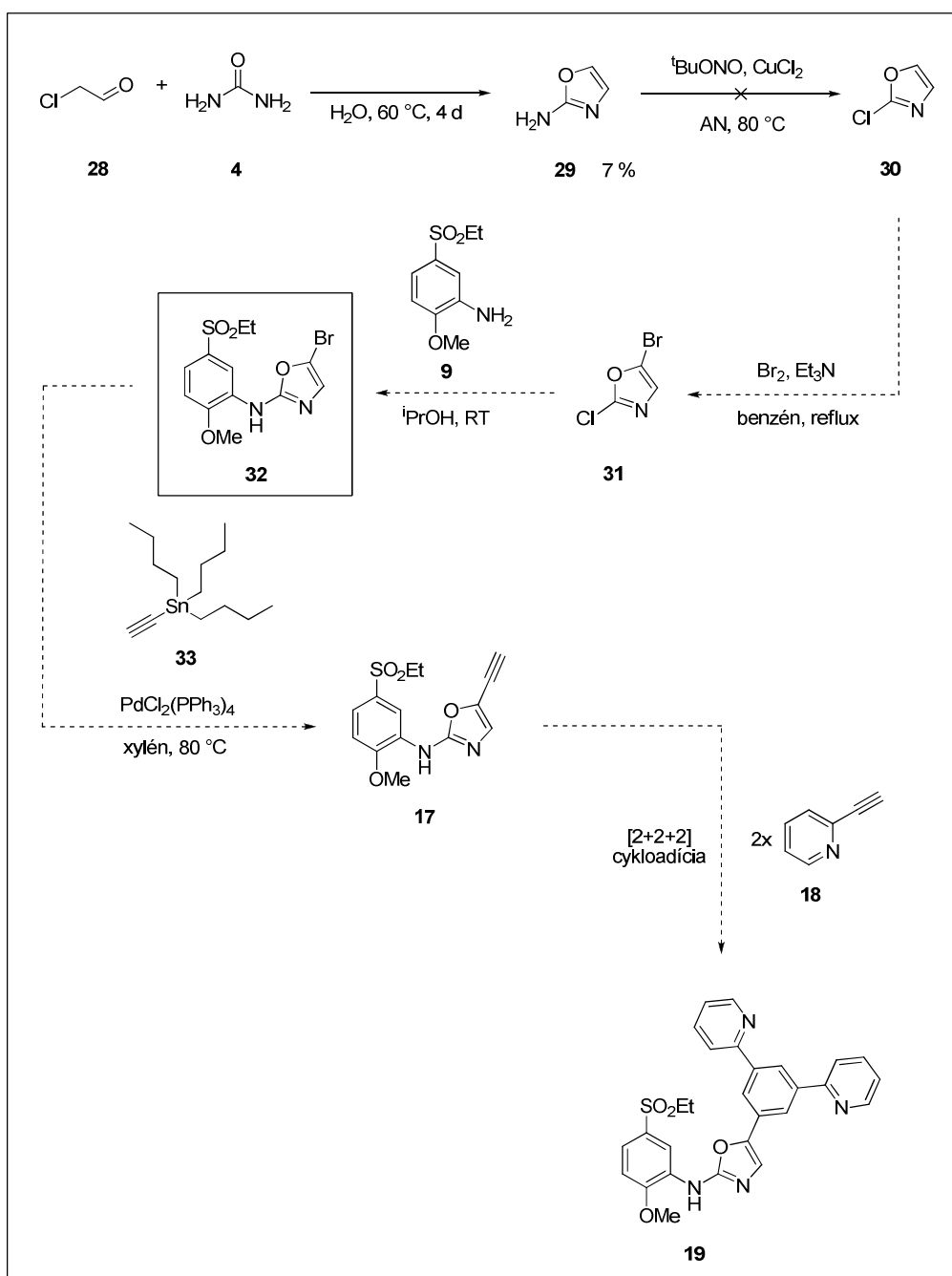


Schéma 3. Návrh přípravy angiogénneho inhibítora vychádzajúci z brómoxazolu 32.

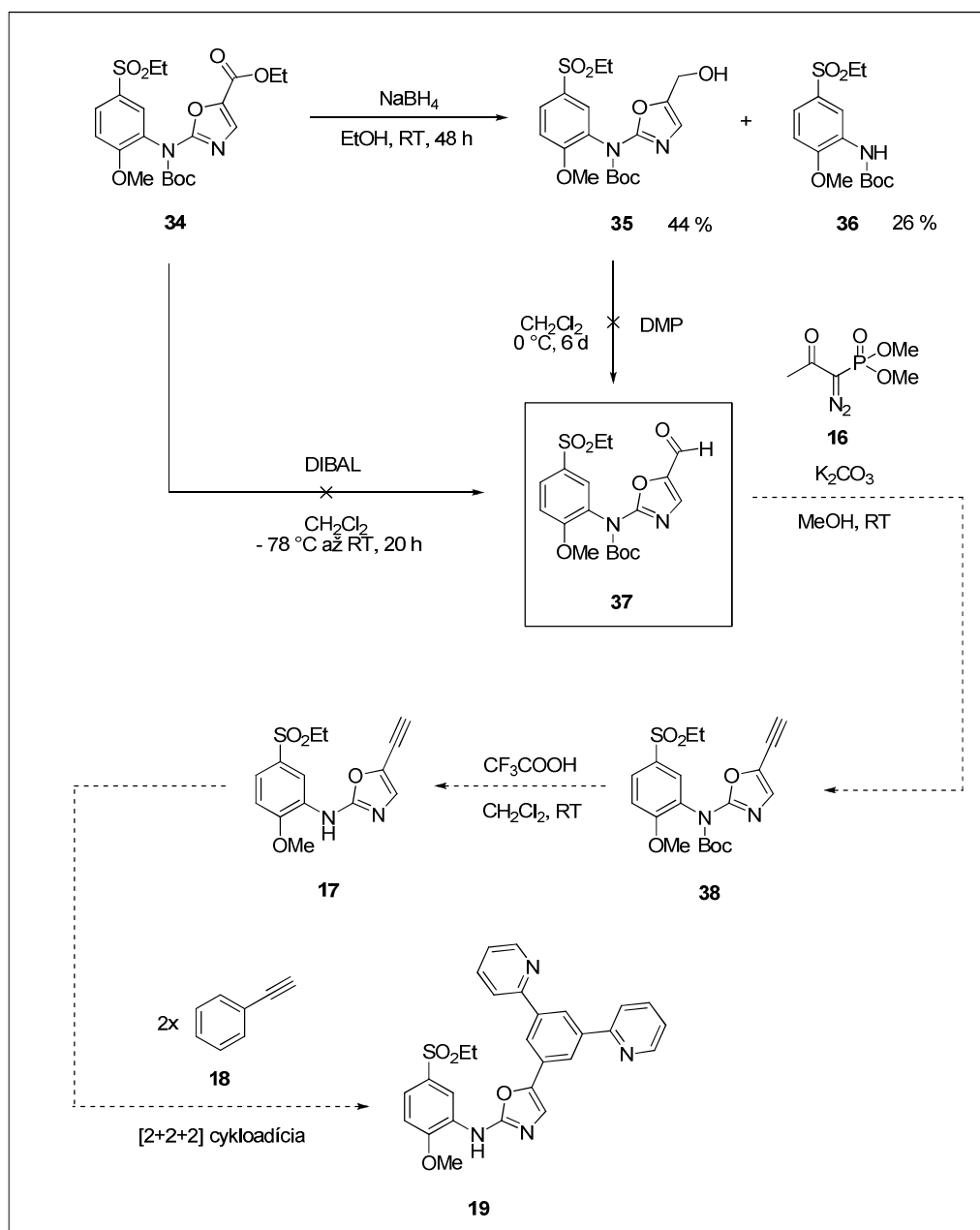
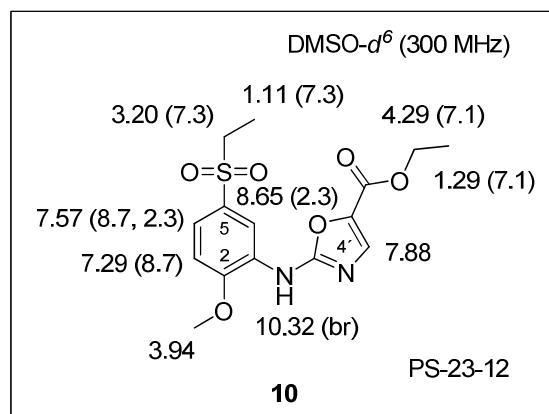
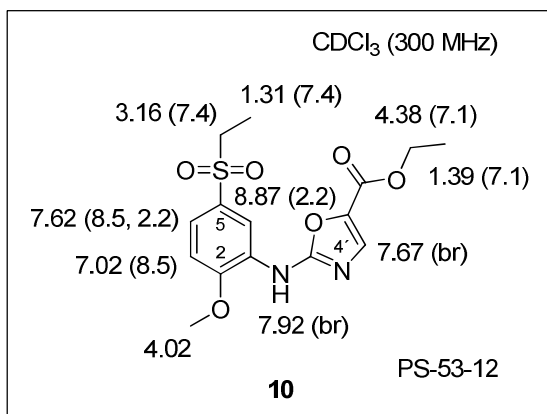
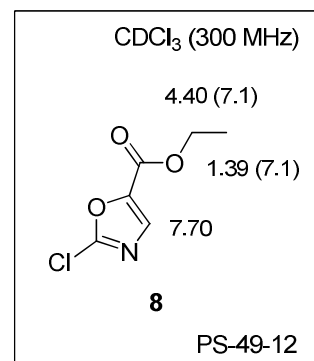
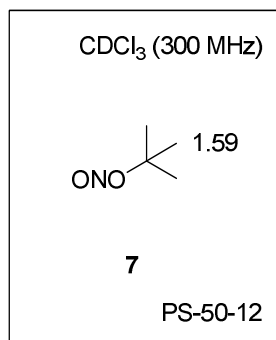
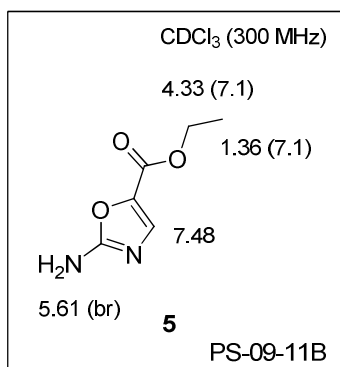
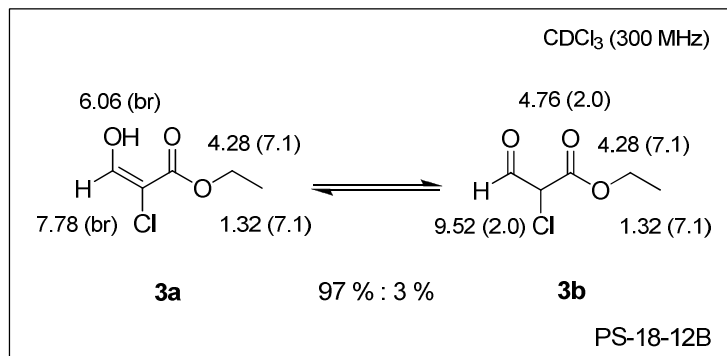
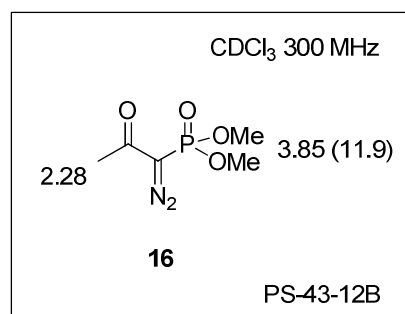
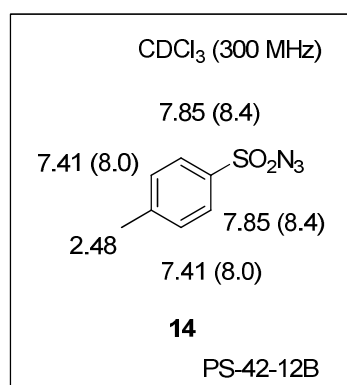
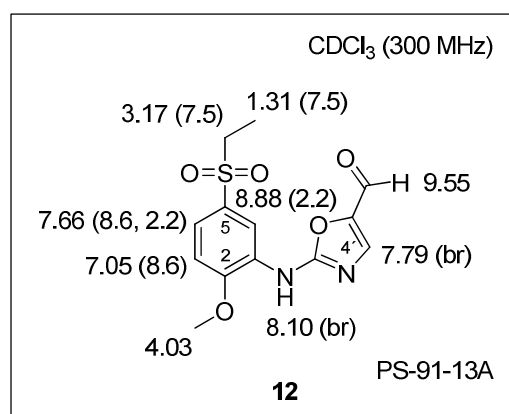
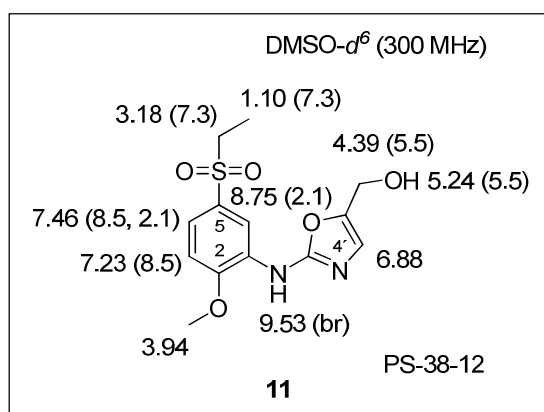
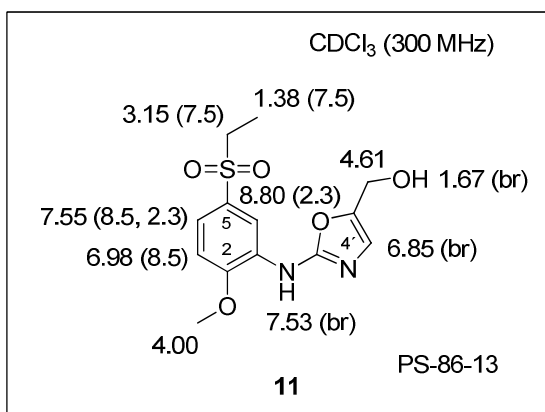


Schéma 4. Návrh syntézy angiogénneho inhibítora **19** vychádzajúci z karbaldehydového intermediátu **37**.

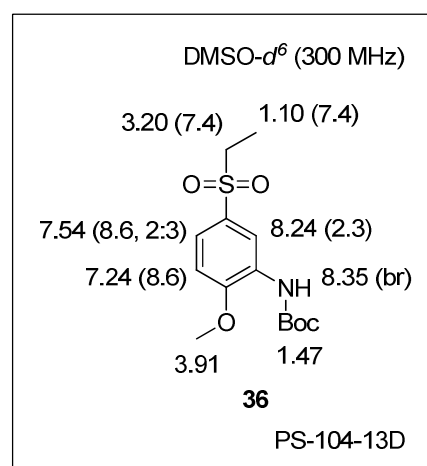
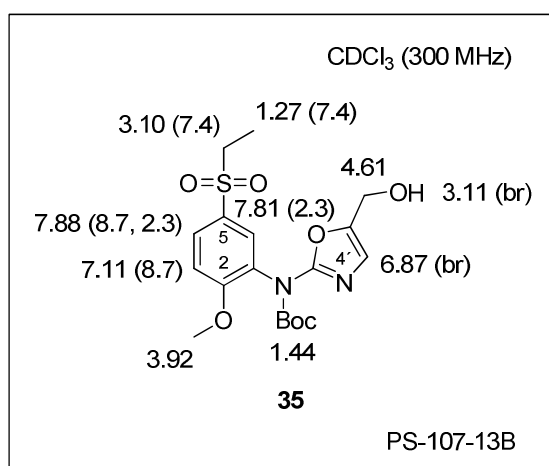
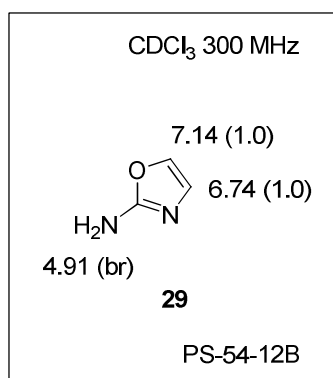
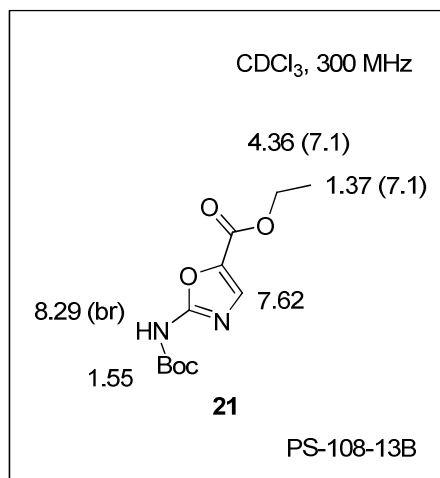
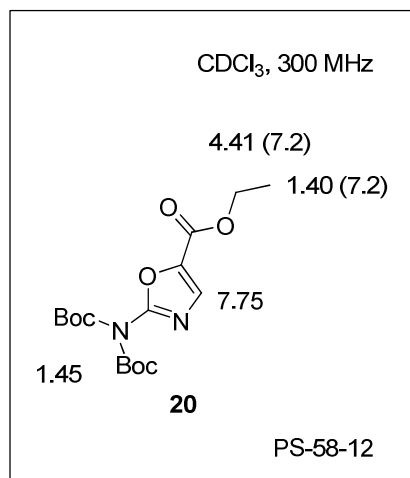
3. Abstrakt $^1\text{H-NMR}$ spektier

3.1. Syntéza oxazolkarbaldehydu 12





3.2. Alternatívne syntézy



4. Použité skratky

abs	absolútny, suchý
AN	acetonitril
Boc	<i>tert</i> -butyl oxykarbonyl
DIBAL	diizobutylaluminium hydrid
DMAP	4-dimetylaminopyridín
DMP	<i>Dess-Martin periodinane</i>
DMSO	dimetyl sulfoxid
E _{bin}	väzbová energia (<i>Binding Energy</i>)
EA	etylacetát
FLC	<i>Flash Liquid Chromatography</i>
H	hexán
HV	vákuum olejovej vývevy (<i>High Vacuum</i>)
IR	infračervené svetlo (<i>Infrared Light</i>)
IC ₅₀	koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne aktivita receptora na polovicu (<i>Half Maximal Inhibition Concentration</i>)
MS	hmotnostná spektrometria (<i>Mass Spectrometry</i>)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PCC	<i>Pyridinium chlorochromate</i>
RT	laboratórna teplota (<i>Room Temperature</i>)
RVO	rotačná vákuová odparka
RZ	reakčná zmes
THF	tetrahydrofurán
TLC	tenkovrstvová chromatografia (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
UV/Vis	ultrafialové/viditeľné svetlo (<i>Ultraviolet/Visible Light</i>)
VL	východisková látka

5. Úvod

Aberantná angiogenéza, alebo tiež neprirodzená tvorba nových krvných ciev z už existujúcich ciev, prípadne z vaskulárnych endoteliálnych buniek, predstavuje jeden z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich rozvoj mnohých typov ochorení, vrátane zápalových a kardiovaskulárnych ochorení, psoriázy, reumatoidnej artritídy, arteriosklerózy a v neposlednom rade aj rakoviny. Virchow a Thiersch už v roku 1863 dokázali, že v tumoroch je prítomná rozvetvená cievna sieť, ktorá vzniká z pôvodných okolitých ciev hostiteľského organizmu. V roku 1971 prišiel Judah Folkman ako prvý s teóriou, že kritickú závislosť tumorov na angiogenéze možno efektívne využiť pri liečbe rakoviny.¹ Folkmanove predpoklady boli neskôr potvrdené uskutočnením úspešnej syntézy skupiny špecifických nízkomolekulových látok, schopných účinne inhibovať funkciu tyrozínkinázového receptora VEGFR-2, kľúčového z hľadiska správneho priebehu angiogenézy. Rozvoj chémie nízkomolekulových tyrozínkinázových inhibítorov dnes predstavuje perspektívny nástroj v boji s rakovinovými ochoreniami.

Pozoruhodnú syntetickú metódu, využitelnú pri príprave zaujímavej skupiny nízkomolekulových angiogénnych inhibítorov, predstavujú [2+2+2] cykloadičné reakcie. Tieto reakcie, vychádzajúc z mnohých typov nenasýtených substrátov, umožňujú efektívnu syntézu polysubstituovaných derivátov benzénu, cyklohexa-1,3-diénu alebo heterocyklických zlúčenín, pričom využívajú katalytické systémy na báze komplexov prechodných kovov. V súčasnosti je známych množstvo prípadov aplikácie [2+2+2] cykloadícií pri syntéze rôznych biologicky aktívnych molekúl, netradičných aminokyselín, či iných teoreticky zaujímavých molekúl.^{2,3}

¹ Ivy, S. P.; Wick, J. Y.; Kaufman, B. M. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 569 – 579.

² Chopade, P. R.; Louie, J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2307 – 2327.

³ Kotha, S.; Brahmachary, E.; Lahiri, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4741 – 4767.

5.1. Ciele diplomovej práce

Cieľom diplomovej práce je príprava oxazolkarbaldehydu **12**, s predikovanou farmakoforickou selektivitou na VEGFR-2 receptor, a preskúmanie možností jeho aplikácie pri syntéze nami vyvinutého angiogénneho inhibítora **19** s využitím [2+2+2] cykloadičných reakcií.

1. Spracovanie problematiky fyziologickej / nefyziologickej angiogenézy a možností jej inhibície (nízkomolekulové angiogénne inhibítory) z hľadiska liečby rakovinových ochorení.
2. Spracovanie problematiky a vypracovanie prehľadu aktuálne známych [2+2+2] cykloadičných alkínových reakcií na základe nami stanovených požiadaviek (substrát, efektivita, regioselektivita) so zameraním na prípravu cieľového inhibítora **19**.
3. Syntéza oxazolkarbaldehydu **12** a jeho prípadná premena na oxazolalkínový ligand **17** – prekursor pri príprave angiogénneho inhibítora **19** s využitím [2+2+2] cykloadičných reakcií.

6. Teoretická časť

6.1. Angiogenéza

6.1.1. Fyziologická vs. nefyziologická angiogenéza

Rozvetvená obehová cievna sústava plní dôležitú funkciu v procese transportu kyslíka, živín a signálnych molekúl do buniek, tkanív a orgánov, a súčasne z nich odvádza oxid uhličitý a koncové metabolické produkty. Neovaskularizácia, inými slovami novotvorba krvných ciev sa uskutočňuje prostredníctvom dvoch základných biologických dejov: vaskulogenézy a angiogenézy. Embryonálna resp. „klasická“ **vaskulogenéza** prebiehajúca v dospelom organizme predstavuje proces tvorby nových krvných ciev, ktoré vznikajú z hemangioblastov - multipotentných kmeňových buniek schopných diferenciácie za vzniku krvných alebo endoteliálnych buniek. Na druhej strane, **angiogenéza** je procesom tvorby nových krvných ciev, prostredníctvom tzv. kapilárneho vetvenia, z ciev už existujúcich. V priebehu angiogénneho rastu dochádza k deleniu zrelých endoteliálnych buniek a ich následnému zabudovávaniu do novovznikajúcich kapilár a ciev.

Zrelé bunky vaskulárneho endotelu vystielajú cievy všetkých živočíšnych orgánov, pričom u dospelého človeka tvoria bunkové tkanivo o hmotnosti približne 1 kg. V prípade zdravého ľudského organizmu sa endoteliálne bunky nachádzajú v prevažne pokojovom stave – proces bunkového delenia prebieha v danom čase zvyčajne len u 1 z 10 000 endoteliálnych buniek. K zvýšeniu intenzity mitotického bunkového delenia a následne aj fyziologického (prirodzeného) angiogénneho rastu dochádza v prípade hojenia poranení, ktoré je spojené s obnovou tkanív, počas vytvárania tzv. žltého telieska vo vaječníkoch a počas tvorby placenty v priebehu tehotenstva. Pre rozvoj mnohých druhov ochorení, medzi ktoré patrí napr. makulárna degenerácia oka, diabetická retinopatia, endometrióza, psoriáza, reumatoidná artritída alebo rakovina je kriticky dôležitá nefyziologická (neprirodzená) angiogenéza. Inhibícia nefyziologického angiogénneho rastu sa ukázala ako perspektívna terapeutická metóda využiteľná pri liečbe vyššie uvedených ochorení, no predovšetkým rakoviny. Preto štúdium mechanizmov tak fyziologickej ako aj

nefyziologickej angiogenézy predstavuje dôležitý cieľ biomedicínskej chémie ostatných 35 rokov.⁴

6.1.2. Regulácia angiogénneho rastu (VEGF/VEGFR signalizácia)

Kontrolný mechanizmus vysoko komplexného a dynamického angiogénneho rastu obsahuje množstvo vzájomne interagujúcich antiangiogénnych a proangiogénnych signalizačných molekúl, medzi ktoré patria rastové faktory, angiopoietíny, molekuly sprostredkujúce bunkové prepojenia, kyslíkové senzory, endoteliálne senzory a iné. V prípade patologickej angiogenézy tumorov zohrávajú kľúčovú signalizačnú úlohu vaskulárne endoteliálne rastové faktory (VEGF) a ich príslušné tyrozínkinázové receptory (VEGFR).⁵

V organizmoch cicavcov rozlišujeme päť základných typov VEGF faktorov: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a placentárny rastový faktor (PLGF). Známa je však aj skupina štrukturálne podobných proteínov (homológov), do ktorej patrí rastový faktor produkovaný parapoxvírusom *Orf*, ktorý nesie označenie VEGF-E, prípadne rastový faktor izolovaný z hadieho jedu s označením VEGF-F. VEGF faktory patria do skupiny glykoproteínov – tzv. doštičkových rastových faktorov (PDGF). Sú vylučované vo forme kovalentne prepojených homodimérov stabilizovaných prostredníctvom intra- a inter-reťazcových disulfidických väzieb.⁶ Expresia VEGF faktorov je regulovaná prevažne prostredníctvom zmien parciálneho tlaku kyslíku v krvi. V prípade hypoxického stavu organizmu dochádza k spusteniu tzv. mechanizmu spätnej väzby, ktorý zabezpečí kompenzáciu nedostatku kyslíka v tkanivách prostredníctvom iniciácie tvorby nových krvných ciev.⁵

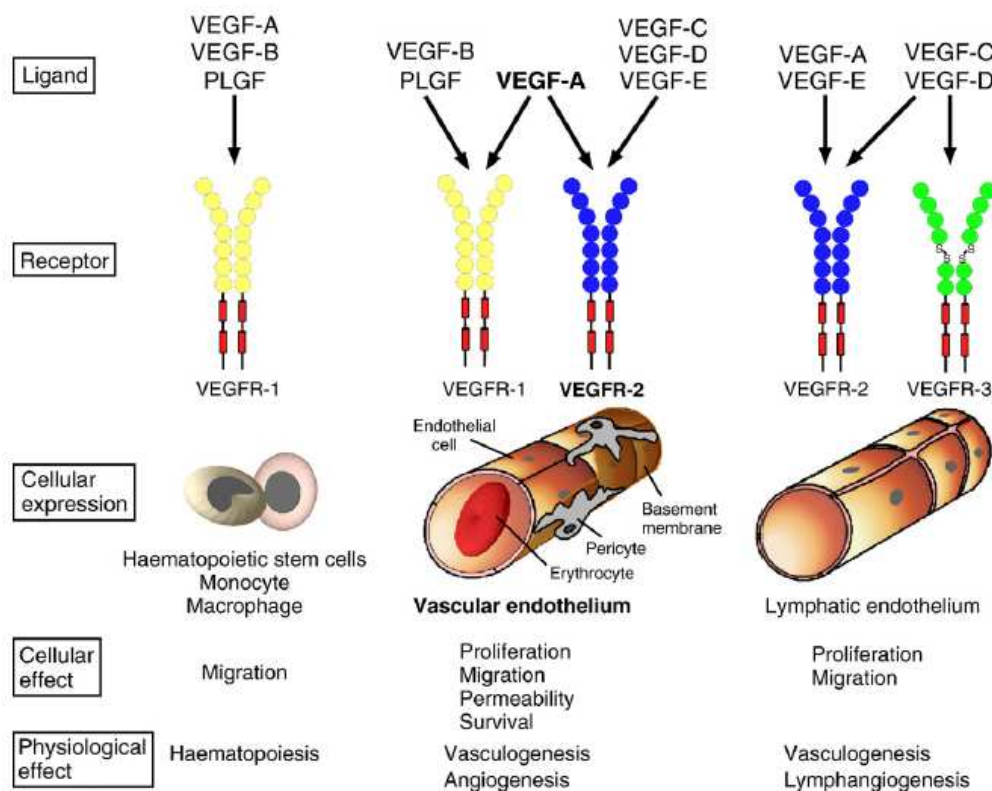
VEGF signalizácia sa uskutočňuje prostredníctvom interakcie (väzby) so špecifickými tyrozínkinázovými VEGFR receptormi, ktoré pozostávajú z extracelulárnej časti, tvorenej siedmimi imunoglobulínovými (Ig-) jednotkami, krátkej transmembránovej časti a vysoko-konzervovanej intracelulárnej časti, na ktorej je lokalizovaná dôležitá tyrozínkinázová doména. (Obrázok 1) VEGFR-1 (Flt-1) je lokalizovaný na povrchu hemangioblastov, monocytov, makrofágov a vaskulárnych endoteliálnych buniek. VEGFR-2 (Flk-1/KDR) je lokalizovaný na povrchu vaskulárnych a lymfatických endoteliálnych buniek a receptor

⁴ Roskoski Jr., R. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2007**, 62, 179 -213.

⁵ Hoff, P. M.; Machado, K. K. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, 38, 825 – 833.

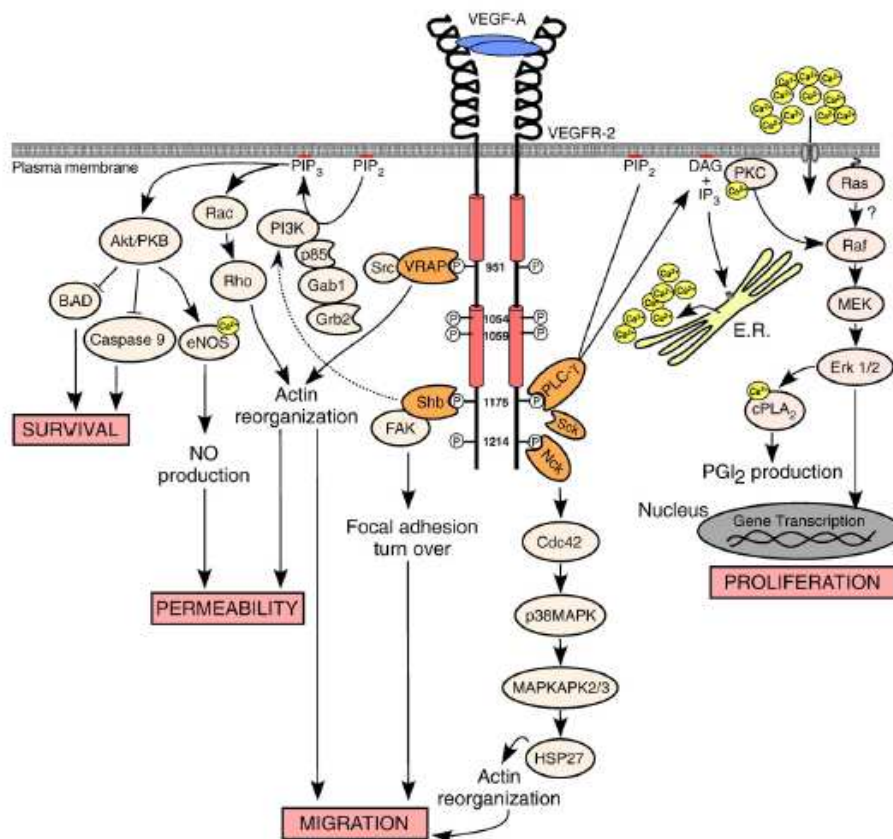
⁶ Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J. *Cell. Signal.* **2007**, 19, 2003 – 2012.

VEGFR-3 (Flt-4) sa nachádza výhradne na povrchu buniek lymfatického endotelu. Faktor VEGF-A interaguje s receptormi VEGFR-1 a VEGFR-2, faktor PLGF a VEGF-B sa viažu špecificky len na receptor VEGFR-1. VEGF-C a VEGF-D sa vo forme prvotne vytvorených pro-peptidov viažu na receptor VEGFR-3, zatiaľ čo ich proteolyticky opracované finálne formy interagujú navyše aj s receptorom VEGFR-2. Virálny faktor VEGF-E interaguje s receptorom VEGFR-2. VEGF faktory sú schopné interagovať aj s neproteínovými tyrozínkinázovými koreceptormi, akými sú napríklad neuropilíny (NRP-1 a NRP-2). Tieto koreceptory plnia funkciu pomocných receptorov, ktoré spolu s VEGFR receptormi interagujú s ich VEGF ligandami, pričom takýmto spôsobom uľahčujú rozpoznanie daného ligandu a následne aj urýchlenie príslušného biologického procesu.



Obrázok 1. Schématické znázornenie lokality expresie, ligandovej špecificity a bunkového/fyziologického účinku jednotlivých VEGFR receptorov. VEGF ligandy (-A, -B, -C, -D, -E a PLGF) špecificky interagujú s tromi typmi tyrozínkinázových receptorov VEGFR-1, -2 a -3. VEGFR-1 je lokalizovaný na povrchu hemangioblastov, makrofágov, monocytov a vaskulárnych endoteliálnych buniek. VEGFR-2 je lokalizovaný na povrchu buniek vaskulárneho a lymfatického endotelu, zatiaľ čo VEGFR-3 receptor sa nachádza výhradne na povrchu lymfatických endoteliálnych buniek. Kaskádová reakcia, ktorej spustenie je výsledkom aktivácie VEGFR-2 receptora iniciuje delenie, migráciu, zvýšenie priepustnosti a predĺženie životnosti vaskulárnych endoteliálnych buniek, čo v konečnom dôsledku vedie k angiogenéze a vaskulogenéze.⁶

Množstvo vedeckých štúdií preukázalo, že práve signalizácia vaskulárneho endoteliálneho faktora VEGF-A prostredníctvom receptora VEGFR-2 primárne iniciuje vysoko dôležité biologické procesy, ktorým podliehajú endoteliálne bunky a tým priamo ovplyvňuje priebeh fyziologickej a aj patologickej angiogenézy. Tieto procesy zahŕňajú proliferáciu, migráciu, zvyšovanie permeability a predlžovanie životnosti buniek endotelu. Schématické znázornenie intracelulárnej kaskádovej reakcie vedúcej k uvedeným procesom, aktivovanej VEGFR-2 signalizáciou, je uvedené na nasledujúcom obrázku.⁶ (Obrázok 2)



Obrázok 2. Schématická ilustrácia intracelulárnej signalizácie sprostredkovejanej VEGFR-2 receptorom. Naviazanie ligandu VEGF-A na receptor indukuje dimerizáciu a autofosforyláciu špecifických intracelulárnych tyrozínových zvyškov, čo vyústí v aktivácii dôležitých biologických procesov. Určité proteíny sa viažu na príslušné fosforylované tyrozínové zvyšky (pY) VEGFR-2 receptora prostredníctvom ich SH2 domén, pričom dochádza k ich fosforylácii a z toho vyplývajúcej aktivácii. Naviazanie PLC- γ na fosforylovaný aminokyselinový zvyšok pY1175 umožní hydrolyzu PIP₂ za vzniku sekundárnych „messengerových“ molekúl DAG a IP₃. DAG pôsobí ako fyziologický aktivátor PKC, zatiaľ čo IP₃ interaguje s receptormi endoplazmatického retikula (E.R.) a spôsobuje uvoľňovanie intracelulárneho vápníka vo forme Ca²⁺. Prísun extracelulárneho vápníka do bunky je tiež dôležitý z hľadiska aktivácie ďalších signálnych proteínov. VRAP/TsAd sa viaže na pY951, pričom vytvára komplex s Src. Interakcia Nck s pY1214 vedie k aktivácii Cdc42 a p38 MAPK. Naviazanie Shb na pY1175 umožňuje reguláciu aktivácie FAK a PI3K.

Skratky: BAD, Bcl-2 asociovaný promotor bunkovej smrti; cPLA₂, cytosolická fosfolipáza A₂; DAG, *sn*-1,2-diacylglycerol; eNOS, endoteliálna NO syntáza; Erk 1/2, extracelulárne regulovaná kináza 1 a 2; FAK, fokálna adhezívna kináza; Gab1, Grb 2 asociovaný väzbový proteín 1; HSP27, proteín teplotného šoku 27; IP3, inozitol (1,4,5)-trifosfát; MAPKAP 2/3, MAPK-aktivujúce proteínkinázy 2 a3; MEK, MAPK/Erk kináza; NO, oxid dusnatý; p38 MAPK, proteínkináza aktivovaná mitogénom p38; PI3K, fosfoinositid 3-kináza; PGI₂, prostacyklín; PIP₂, fosfatidylinozitol (4,5)-bisfosfát; PIP₃, fosfatidylinozitol (3,4,5)-trifosfát; PKB, proteínkináza B; PKC, proteínkináza C; PLC- γ , fosfolipáza C- γ ; Sck, proteín Shc-typu; VEGF, vaskulárny endoteliálny rastový faktor; VEGFR-2, VEGF receptor 2; VRAP, proteín asociovaný s VEGFR/TSAd T-bunka – špecifický molekulový adaptér.⁶

6.1.3. Angiogenéza tumorov a jej terapeutická inhibícia

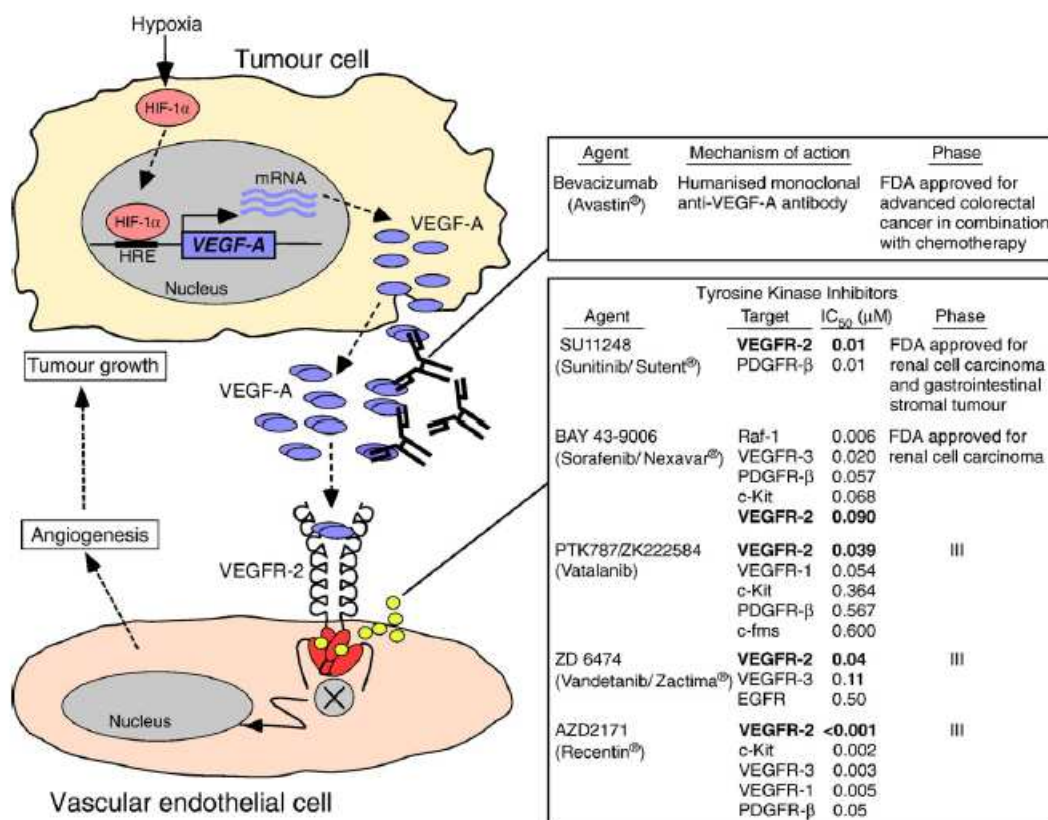
Ako už bolo uvedené vyššie, angiogénny rast sprostredkovaný VEGFR-2 signalizáciou zohráva dôležitú úlohu v patologických procesoch, ktoré môžu viesť ku vzniku a rozvoju rakovinových ochorení. Kritická potreba angiogenézy pre rast a prežitie rakovinových buniek je podmienená ich vysokou metabolickou spotrebou kyslíka a živín. Navyše, prítomnosť rozvetvenej siete ciev a kapilár umožňuje nádoru metastázovať aj do iných častí postihnutého organizmu. Takto vzniknutá nádorová vaskulatúra je však vysoko dezorganizovaná a prietok krvi chaotický. Cievny vyživujúce nádor sú takpovediac „deravé“ v dôsledku veľkého počtu ich prepojení, inter-endoteliálnych križovatiek a nespojitej, či úplne absentujúcej bazálnej membrány.

Uvoľňovanie VEGF faktorov rakovinovými bunkami počas rastu nádoru je stimulované vplyvmi biologického prostredia (hypoxia alebo genetická mutácia). Biodostupnosť VEGF faktorov sa zvyšuje aj v prípade preniknutia monocytov a makrofágov do nádoru, ktoré umožnia vylučovanie metaloproteinázy MMP-9. Účinkom tohto enzýmu dôjde k uvoľneniu VEGF viazaných v membráne endoteliálnych buniek a následnému vytvoreniu stabilného VEGF/VEGFR-2 komplexu. Intenzita expresie VEGFR-2 receptorov je v prípade patologickej vaskulatúry tumorov v porovnaní s fyziologickou vyššia.⁶

V roku 1971 prišiel Judah Folkman s teóriou, podľa ktorej je rast nádorov a ich metastázovanie kriticky závislé na angiogénnom raste, pričom jeho blokovanie by mohlo byť účinnou stratégiou inhibície rastu tumorov. Na základe svojich ďalších pozorovaní zistil, že v prípade neprítomnosti rastových faktorov VEGF sú nádorové bunky odkázané na príjem živín len z extracelulárneho prostredia, čo však nie je pre ich ďalší rast dostačujúce. Preto sa iniciácia patologickej angiogenézy začala vnímať ako jeden z

najzákladnejších krokov v priebehu rozvoja rakoviny. Neskôr uskutočnené objavy viedli k vytvoreniu konceptu tzv. „angiogénneho prepnutia“ (*angiogenic switch*), ktoré umožňuje nádorovým bunkám exponenciálne zväčšovať svoj počet a rozširovať sa mimo oblasť svojho pôvodného vzniku.⁵

Folkmanova vízia boja proti rakovine prostredníctvom inhibície angiogenézy sa stala skutočnosťou s príchodom viacerých antiangiogénnych liečiv do klinickej praxe. V súčasnosti sa antiangiogénne liečivá rozdeľujú do dvoch rozsiahlych skupín: liečivá, ktorých cieľom sú VEGF ligandy a liečivá, ktorých cieľom sú príslušné tyrozínkinázové VEGFR receptory. Úlohou týchto činidiel nie je len redukovať a obmedzovať vaskularizáciu tumoru, ale aj prispievať k vytváraniu normalizovanejších a stabilnejších ciev vo vnútri tumoru a tým zabezpečiť efektívnejší prísun antitumorogénnych liečiv (zefektívnenie chemoterapie). (Obrázok 3)



Obrázok 3. Angiogenéza tumorov a inhibítory VEGFR-2 signalizácie. Hypoxický stav (nízky parciálny tlak kyslíka v krvi), v ktorom sa nachádzajú rastúce nádory umožňuje stabilizáciu transkripčných faktorov indukovaných hypoxiou (HIF-1α). Tieto transkripčné faktory sa viažu na hypoxiu citlivé elementy VEGF-A promotora, čo vedie k zintenzívneniu transkripcie VEGF-A. Uvoľnené VEGF-A sa potom viažu na VEGFR-2 receptory nachádzajúce sa na povrchu vaskulárneho endotelu, pričom dochádza k iniciácii angiogenézy

a následne aj nádorovému rastu. Terapeutická inhibícia VEGFR-2 signalizácie sa uskutočňuje buď prostredníctvom izolácie VEGF ligandu (bevacizumab) alebo prostredníctvom blokovania kinázovej aktivity receptora pomocou nízko-molekulového inhibítora (sorafenib, vatalanib, ...).⁶

Bevacizumab (Avastin[®]) sa stal prvým antiangiogénnym liečivom, ktoré bolo oficiálne schválené FDA (U.S. Food and Drug Administration), vzhľadom na jeho úspešnú aplikáciu v kombinácii s chemoterapiou pri liečbe metastatickej rakoviny konečníka. Bevacizumab predstavuje rekombinantnú monoklonálnu IgG₁ protilátku, ktorá prostredníctvom vzájomnej interakcie inhibuje biologickú aktivitu VEGF-A.

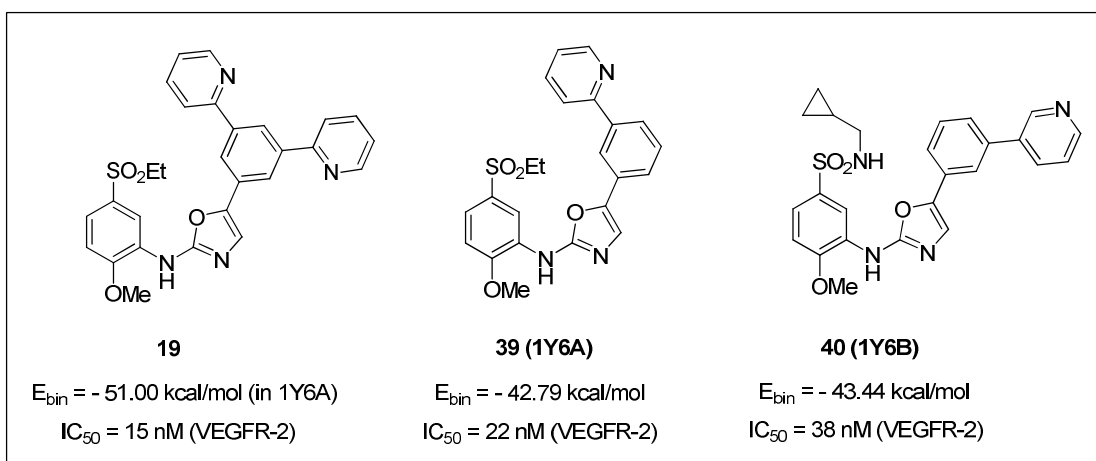
Množstvo farmaceutických spoločností sa zameralo na vývoj tzv. nízko-molekulových inhibítorov tyrozínkinázových receptorov VEGFR. Tieto činidlá blokujú kaskádové intracelulárne reakcie vedúce k angiogenéze prostredníctvom blokácie ATP-väzbového miesta na tyrozínkinázovom receptore. Medzi takéto liečivá patrí napríklad **sorafenib** (Navaxar[®]), biaryl močovinový „multitarget“ inhibítor pôvodne vytvorený proti kináze Raf-1, alebo **sunitinib** (Sutent[®]) blokujúci aktivitu napr. VEGFR-2 a PDGFR-β. Ďalšími sľubnými tyrozínkinázovými inhibítormi sú aj recentin[®], sub-nanomolárny ATP-kompetitívny inhibítor VEGFR-2; **vatalanib**, orálne-aktívny aminoftalazínový inhibítor VEGFR-1, -2, PDGFR a pri vyšších koncentráciách aj c-Kit a **vandetanib** (Zactima[®]), heteroaromaticky substituovaný anilinochinazolín s laboratórne potvrdeným protirakovinovým účinkom.⁶

6.1.4. Vývoj nízkomolekulového inhibítora angiogenézy tumorov 19

Jedným z dôležitých zameraní našej výskumnej skupiny je vývoj a syntéza nízkomolekulových zlúčenín, ktoré sú schopné pôsobiť ako ATP kompetitívne inhibítory tyrozínkinázového receptora VEGFR-2. Na základe molekulového modelovania, s využitím publikovaných štruktúrnych analýz komplexov receptor / inhibítor v PDB databáze: 1Y6A (**39**) a 1Y6B (**40**),⁷ sme navrhli a pripravili nový angiogénny inhibítor **19**.⁸ (Obrázok 4) Následné biologické testovanie potvrdilo jeho vysokú inhibičnú aktivitu voči VEGFR-2 receptoru (IC₅₀ = 15 nM).

⁷ Harris, P. A.; Cheung, M.; Hunter, R. N.; Brown, M. L.; Veal, J. M.; Nolte, R. T.; Wang, L.; Liu, W.; Crosby, R. M.; Johnson, J. H.; Epperly, A. H.; Kumar, R.; Luttrell, D. K.; Stafford, J. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1610 – 1619.

⁸ Lintnerová, L. *Dizertačná práca* **2013**, PRIF UK, Bratislava.



Obrázok 4. Štruktúra nedávno vyvinutého angiogénneho inhibítora **19** a štruktúralne podobných vzorových inhibítorov **39** a **40**.

Naším aktuálnym cieľom je, prostredníctvom vhodne navrhnutého postupu, uskutočniť syntézu oxazolkarbaldehydu **12** a jeho následnú premenu na alkínový ligand **17**, z ktorého by bolo možné pripraviť aktívny angiogénny inhibítor **19** s využitím [2+2+2] cykloadičnej reakcie. [2+2+2] Cykloadičné reakcie ligandu **17** s alternatívnymi substrátmi otvárajú možnosti pre výhodnú modulárnu syntézu ďalších navrhnutých VEGFR-2 inhibítorov napr. **41**, **43** a ďalších. (Schéma 5)

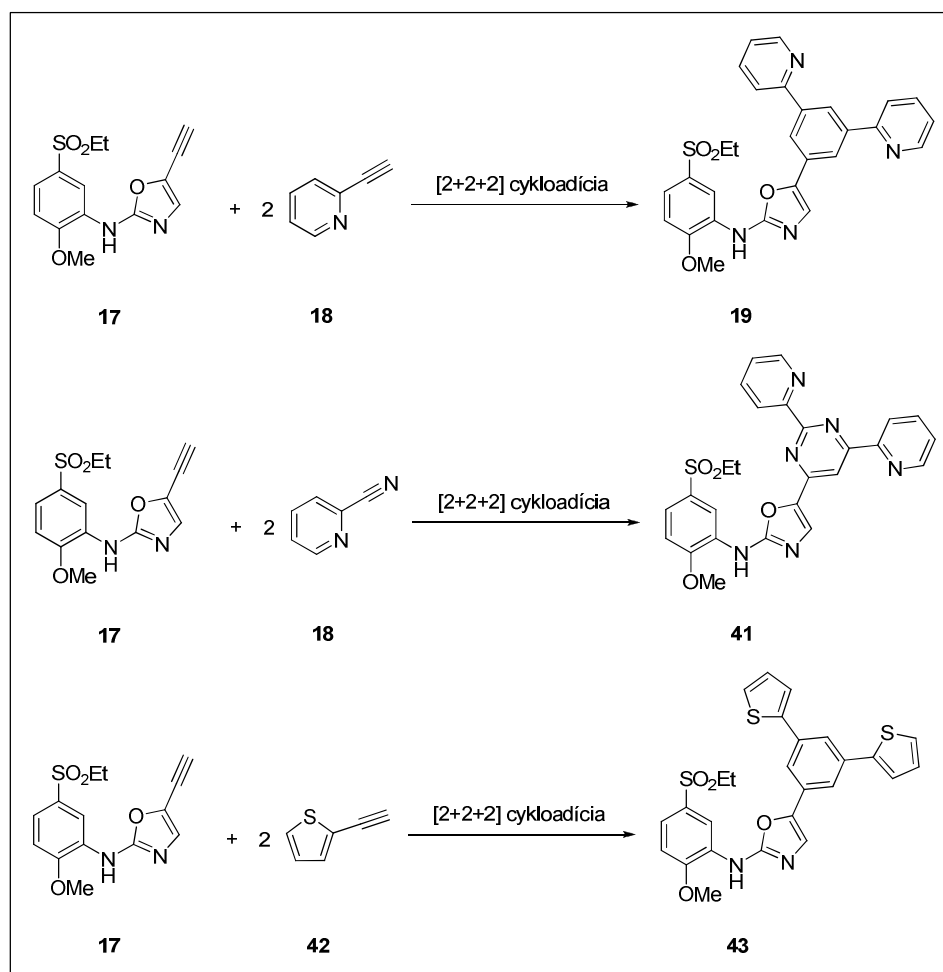


Schéma 5. Nový spôsob prípravy inhibítora **19** ako aj ďalších navrhnutých inhibítorov VEGFR-2 **41**, **43** prostredníctvom [2+2+2] cykloadičnej reakcie ligandu **17** s vhodnými alkínovými substrátmi.

6.2. [2+2+2] Cykloadičné reakcie

6.2.1. Úvod do problematiky [2+2+2] cykloadičných reakcií

V roku 1886 Bertholet, ako prvý, uskutočnil termicky katalyzovanú [2+2+2] cykloadičnú reakciu acetylénu (acetylénovú cyklotrimerizáciu) za vzniku aromatického produktu – benzénu. Vzhľadom na to, že reakcia vyžadovala na svoj priebeh pomerne vysokú teplotu (400 °C) a okrem benzénu poskytovala aj zložitú zmes vedľajších produktov, nevzbudila medzi chemikmi prílišný záujem a výskum sa v tejto oblasti zastavil. Dôležitý zlom prišiel v roku 1948, keď Reppe uskutočnil cyklotrimerizačnú reakciu alkínového substrátu za vzniku derivátu benzénu, ktorá bola katalyzovaná komplexom prechodného kovu.

Reppeho objav vzbudil záujem o vývoj nových ešte účinnejších katalytických systémov, ktoré by umožnili efektívnu aplikáciu [2+2+2] cykloadícií v chemickej praxi.³

Vďaka možnosti využitia mnohých typov nenasýtených substrátov (alkínov, diínov, alkénov, imínov, izokyanátov, izotiokyanátov, CO₂) pri príprave polysubstituovaných derivátov benzénu, ale aj pyridínu, pyridónu, cyklohexa-1,3-diénu, pyrónu, tiopyridónu či cyklohexánu, patria [2+2+2] cykloadície v súčasnosti medzi jedny z najpozoruhodnejších reakcií. Pri syntéze polysubstituovaných derivátov benzénu a pyridínu sa tradične využívali predovšetkým aromatické elektrofilné substitúcie (AES), prípadne rôzne kovom-katalyzované *couplingové* reakcie. Napriek tomu, že je príprava polysubstituovaných aromatických cyklov s využitím spomínaných reakcií vysoko efektívna, často v sebe zahŕňa zložitú viacstupňovú syntézu. Aplikácia AES je navyše limitovaná aj vplyvom elektrónových a sterických efektov substituentov prítomných na vznikajúcich cykloch, pričom zavedenie nových funkčných skupín na špecifické pozície na aromatickom kruhu môže byť veľmi zložitá, v niektorých prípadoch dokonca nemožná. Oproti tomu, [2+2+2] cykloadície sa vyznačujú vysokou atómovou efektivitou (efektivita konverzie chemického procesu vzhľadom na jednotlivé atómy prítomné v reakcii) a umožňujú vytvorenie viacerých C-C väzieb v jednom kroku. Ďalšou dôležitou výhodou použitia [2+2+2] cykloadičných reakcií je tolerancia mnohých druhov funkčných skupín, napríklad alkoholov, amínov, alkénov, éterov, esterov alebo halogénov. Navyše, možnosť efektívneho využitia rôznych dostupných katalytických systémov využívajúcich katalyzátory na báze prechodných kovov (Ni, Co, Pd, Cr, Rh, Fe, Zr, Nb, Ir, Ta...), prípadne Lewisove kyseliny, Brönstedtove kyseliny, anhydridy kyselín, amíny, či dokonca mikrovlnné žiarenie, len zväzňuje v akom širokom rozsahu je tento typ cykloadičných reakcií aplikovateľný. Ako problém využitia [2+2+2] cykloadícií sa v minulosti javila nízka chemo- a regioselektivita, v súčasnosti sú však už známe syntetické postupy, pri ktorých možno dosiahnuť vysoký stupeň chemo-, regio-, či dokonca enantioselektivity.^{2,9,10,11,12,13}

Medzi najzaujímavejšie a synteticky najviac využívané patria [2+2+2] cykloadičné reakcie katalyzované komplexami prechodných kovov. Zjednodušené znázornenie možností usporiadania takejto [2+2+2] cykloadície je uvedené na nasledujúcej schéme. (Schéma 6)

⁹ Saino, N.; Kogure, D.; Kase, K.; Okamoto, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *69*, 3129 – 3136.

¹⁰ Schmidt, E.; Gleiter, R.; Rominger, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *13*, 2818 – 2825.

¹¹ Bohlmann, F.; Herbst, P. *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 1631 – 1637.

¹² Adam, W.; Maas, W. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7650 – 7655.

¹³ Cruciani, P.; Aubert, C.; Malacria, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2664 – 2665.

Je očividné, že využitím tejto syntetickej metódy je možné pripraviť množstvo typov chemických zlúčenín.

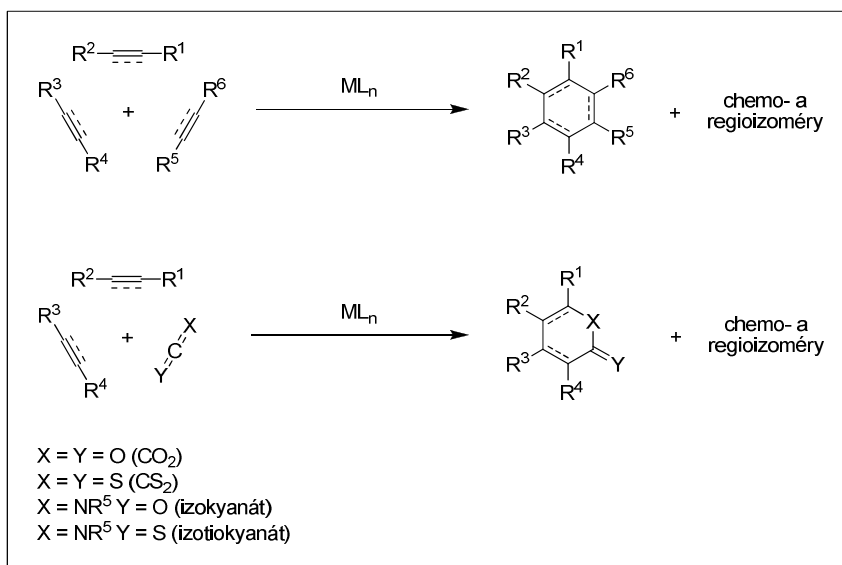


Schéma 6. Možnosti uskutočnenia [2+2+2] cykloadičných reakcií.²

6.2.2. Mechanizmus [2+2+2] cykloadičných reakcií katalyzovaných komplexami prechodných kovov

Napriek tomu, že na uskutočnenie [2+2+2] cykloadície možno využiť pomerne veľa typov kovových katalyzátorov a ešte viacej typov chemických substrátov, mechanizmus reakcie je vo väčšine prípadov identický. Cykloadičná reakcia začína koordinačným naviazaním sa dvoch mono-alkínov (prípadne jedného α,ω -diínu) na kovový katalyzátor **a**, pričom vzniká komplex **b**, ktorý sa potom prostredníctvom oxidačného *couplingu* mení na metalacyklopentadiénový medziprodukt **c**. V ďalšom reakčnom kroku dochádza k zabudovaniu tretieho nenasýteného fragmentu, ktoré môže prebiehať dvojakým spôsobom: (a) zasunutím fragmentu do väzby uhlík-kov a následným vytvorením metalacykloheptatriénového kruhu **d** alebo (b) prostredníctvom [4+2] cykloadičnej reakcie (Dielsovej-Alderovej reakcie), pri ktorej vzniká bicyklický metalanorbordiénový intermediát **e**. V poslednom kroku dochádza k redukčnej eliminácii za vzniku konečného produktu cykloadície **f** a znovuoobnoveniu katalyzátora.^{2,14,15} (Schéma 7)

¹⁴ Varela, J. A.; Saá, C. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 143 – 149.

¹⁵ Ozerov, O.V.; Patrick, B.O.; Ladipo, F.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6423 – 6431.

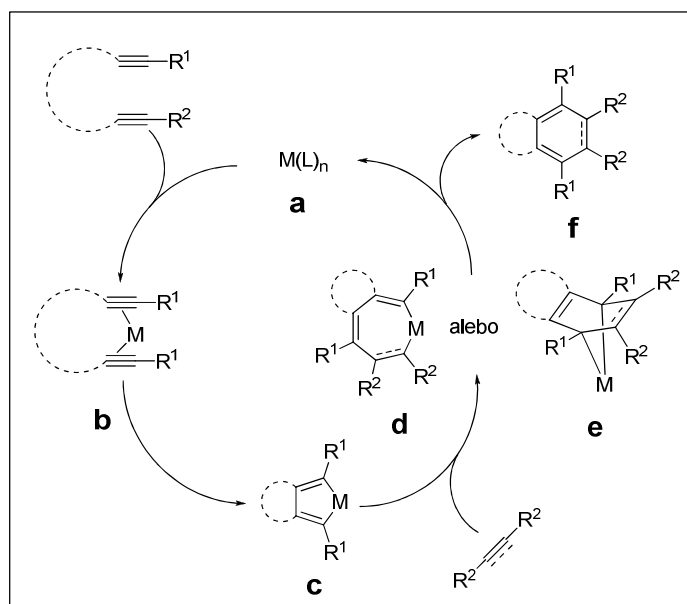


Schéma 7. Všeobecný mechanizmus [2+2+2] cykloadičných reakcií katalyzovaných komplexami prechodných kovov.^{2,14}

6.2.3. Stereochemia [2+2+2] cykloadičných reakcií

Ako už bolo vyššie spomenuté, produkty [2+2+2] cykloadičných reakcií predstavujú polysubstituované deriváty rôznych druhov aromatických, či alicyklických zlúčenín. Tieto produkty môžu vznikáť v rôznych regioizomérnych formách, pričom ich počet a preferencia vzniku (regioselektivita) závisí od spôsobu formovania metalacyklopentadiénového medziproduktu, spôsobu inkorporácie tretieho ekvivalentu reagujúceho alkínu a od chemického charakteru reagujúceho substrátu (symetrická/asymetrická substitúcia reaktívnej násobnej väzby, druh a počet substituentov) a použitého katalyzátora (druh obsiahnutého kovu, druh a počet koordinovaných ligandov). Ako jednoduchý príklad môže slúžiť [2+2+2] cyklizačná reakcia troch zhodných terminálnych alkínov (acetylénová cyklotrimerizácia), ktorá umožňuje vytvorenie trisubstituovaného benzénového derivátu v dvoch regioizomérnych formách (1,2,4-izomér a 1,3,5-izomér). Ak vezmeme do úvahy existujúce možnosti vytvorenia metalacyklopentadiénového intermediátu a možné spôsoby zabudovania tretieho reagujúceho alkínu, dominantným produktom reakcie bude 1,2,4-regioizomér. Avšak, vzhľadom na to, že dôležitým faktorom ovplyvňujúcim regioselektivitu [2+2+2]

cykloadície je aj stérický charakter substituentov reagujúcich alkínov a ligandov koordinovaných v kovovom katalyzátore, je známych množstvo [2+2+2] cykloadičných reakcií, ktoré uprednostňujú práve vznik 1,3,5-regioizoméru.^{15,16} (Schéma 8)

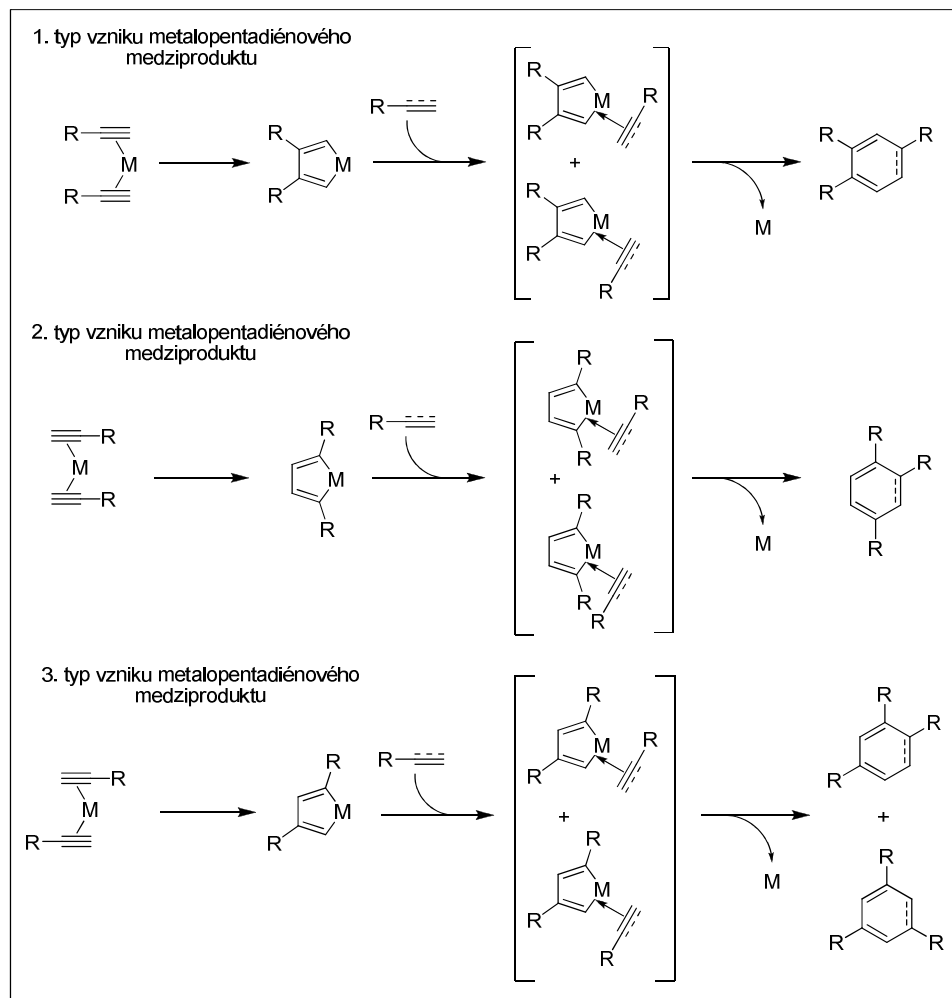


Schéma 8. Regioselektivita [2+2+2] cykloadičnej reakcie troch rovnakých terminálnych alkínov v závislosti od spôsobu vzniku metalocyklopentadiénového intermediátu a spôsobu následného zabudovania tretieho reagujúceho fragmentu.¹⁷

¹⁶ Morohashi, N.; Yokomakura, K.; Hattori, T.; Miyano, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1157 – 1161.

¹⁷ http://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem958/FS06_SS07%5CDutcher.pdf.

6.2.4. Vybrané trojkomponentné [2+2+2] cykloadičné reakcie terminálnych alkínov disponujúce 1,3,5-regioselektivitou

Vypracovali sme návrh alternatívnej syntézy VEGFR-2 inhibítora **19** a podobne substituovaných zlúčenín, využívajúcej alkínovú [2+2+2] cykloadičnú reakciu. (Schéma 5) Z hľadiska vytýčeného cieľa je dôležité, aby bola táto cyklizačná metóda efektívne aplikovateľná v prípade trojkomponentných cyklotrimerizácií alkínových substrátov obsahujúcich terminálnu trojitú väzbu, v ideálnom prípade viazanú na heterocyklickom systéme. Zároveň by mala regioselektívne uprednostňovať vznik 1,3,5-izomérneho produktu v čo najlepšom výťažku., za čo najjemnejších podmienok.

Zaujímavú metódu prípravy 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu katalyzovanú inditou soľou za prítomnosti 2-jódfenolu opísal v roku 2011 Xu so svojimi spolupracovníkmi. Táto cyklotrimerizačná reakcia prebieha za jemných podmienok, toleruje prítomnosť vzdušného kyslíka, vyznačuje sa maximálnou atómovou efektívnosťou, vynikajúcou požadovanou regioselektívnosťou a produkt poskytuje vo vysokom výťažku. Na nasledujúcej schéme sú uvedené príklady reakcií uskutočnených pomocou spomínanej metódy. (Schéma 9)

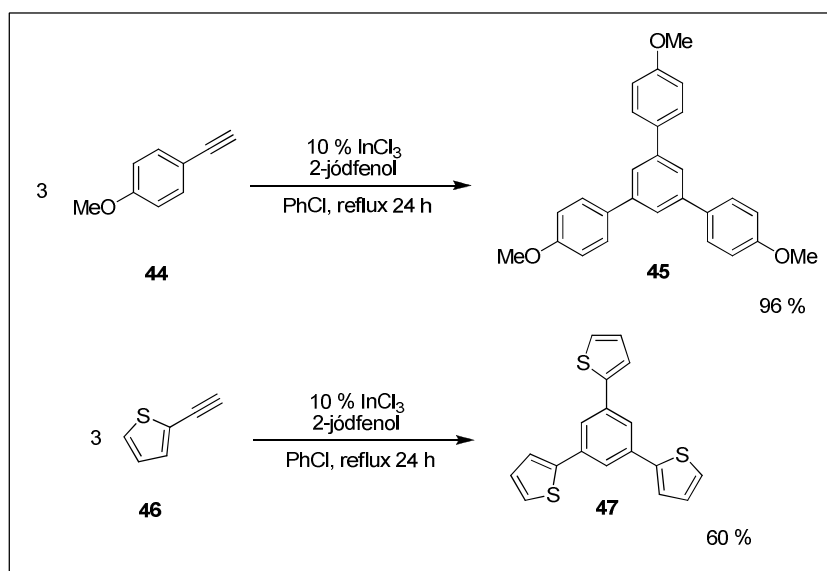


Schéma 9. Syntéza 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu katalyzovaná systémom InCl₃/2-jódfenol.¹⁸

Pre alkínové cyklotrimerizácie netradičná 1,3,5-regioselektivita je dôsledkom špecifického reakčného mechanizmu, ktorý nie je typický [2+2+2] cykloadičný. V prvom reakčnom

kroku prebieha *cis*-adičná reakcia InCl_3 na trojitú väzbu reagujúceho alkínového substrátu za vzniku *cis*-chlórinditého intermediátu **g**. Tento intermediát potom podlieha ďalšej *cis*-adícii zvyšných dvoch ekvivalentov alkínového substrátu a následnej cyklizácii za vzniku intermediátu **i**. V poslednom kroku reakcie dochádza k vytvoreniu symetrického benzénového produktu **j** a súčasnej regenerácii kovového katalyzátora, čo je umožnené v dôsledku prítomnosti aditíva 2-jódfenolu.¹⁸ (Schéma 10)

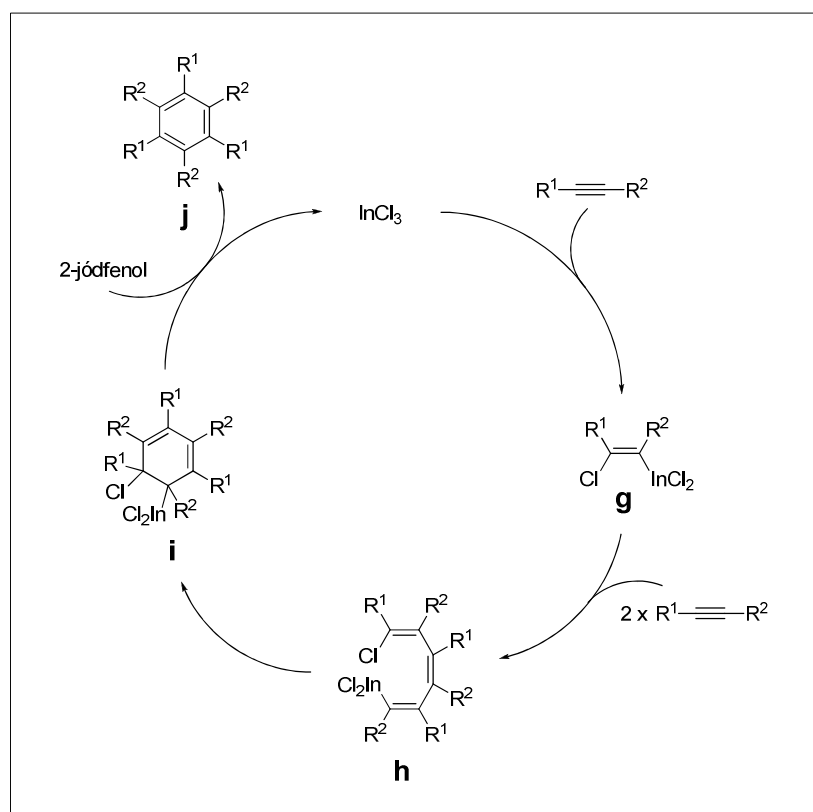


Schéma 10. Navrhnutý mechanizmus alkínovej cyklotrimerizačnej reakcie katalyzovanej $\text{InCl}_3/2$ -jódfenol.¹⁸

Podobný reakčný mechanizmus sa uplatňuje aj v prípade ďalšej zaujímavej, vysoko regio- a chemoselektívnej, alkínovej trimerizácie využívajúcej katalýzu PdCl_2 v prítomnosti kokenkatalyzátora CuCl_2 . Prostredníctvom tejto metódy možno z asymetrických alkínových substrátov efektívne pripraviť 1,3,5-trisubstituované deriváty benzénu vo vysokom výťažku.¹⁹ Príklady príslušných reakcií sú uvedené na nasledujúcej schéme. (Schéma 11)

¹⁸ Xu, Y.; Pan, Y.; Wu, Q.; Wang, H.; Liu, P. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 8472 – 8476.

¹⁹ Li, J.; Jiang, H.; Chen, M. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3627 – 3629.

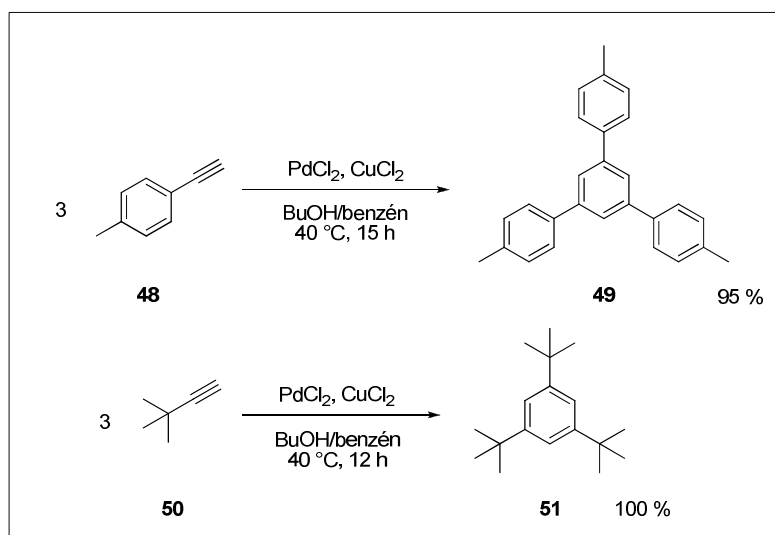


Schéma 11. Syntéza 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu katalyzovaná $\text{PdCl}_2 / \text{CuCl}_2$.¹⁹

Regioselektívnu prípravu 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu možno uskutočniť aj prostredníctvom [2+2+2] cykloadičných reakcií terminálnych alkínov katalyzovaných titaničitými komplexami *p-terc*-butyliakalix[4]arénu. Vzhľadom na želanú regioselektivitu reakcie a celkový výťažok produktov, Morohashi a Hattori vo svojej práci vyhodnotili ako najúčinnější katalyzátor dvojjadrový titaničitý komplex, ktorého štruktúra je uvedená v rámci reakčnej schémy vzorových cyklotrimerizačných reakcií. (Schéma 12)

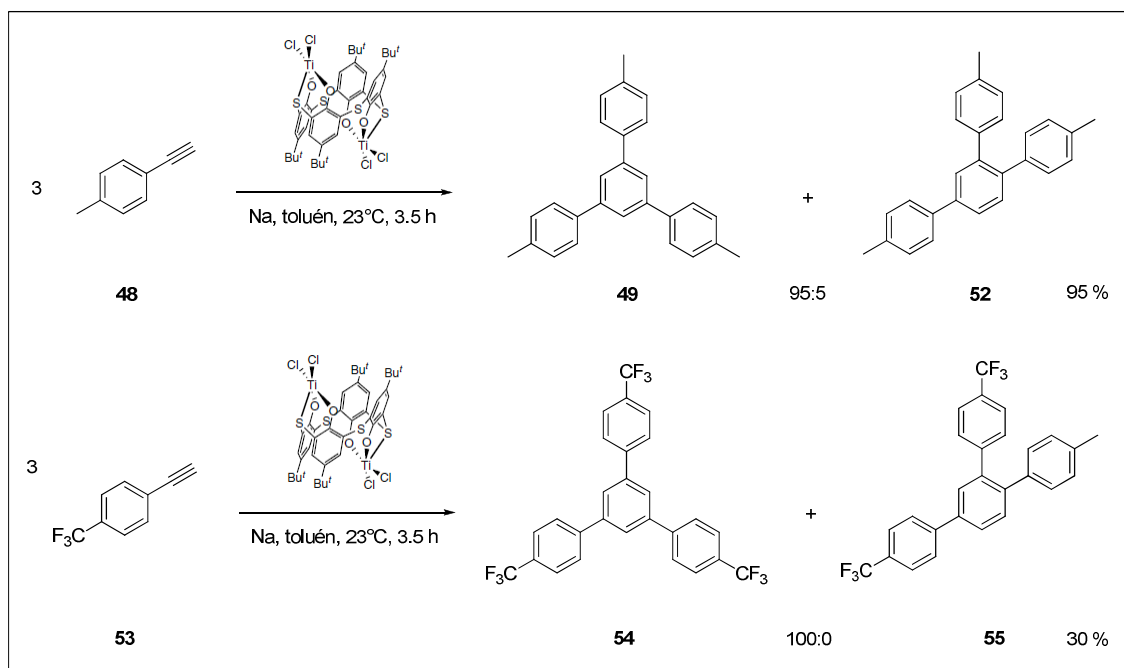
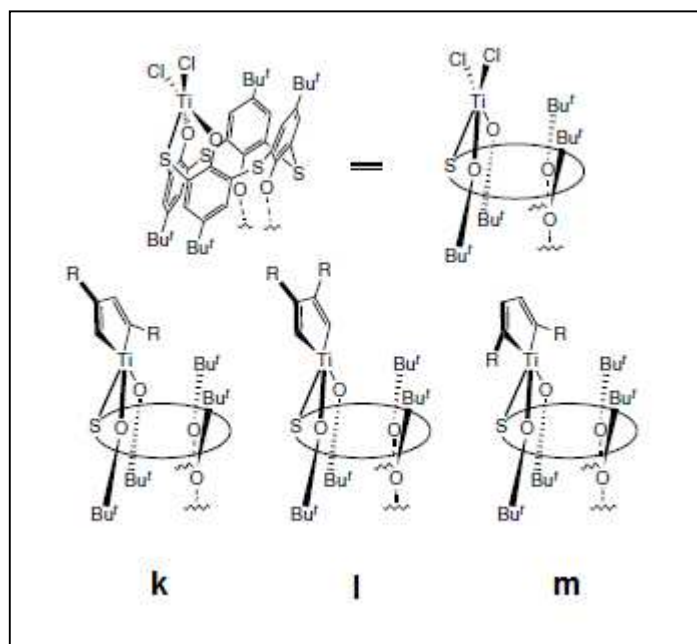


Schéma 12. Syntéza 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu katalyzovaná dvojjadrovým titaničitým *anti*-komplexom *p*-*tert*-butyliakalix[4]arénu.¹⁶

Reakčný mechanizmus je typický [2+2+2] cykloadičný, charakteristický prítomnosťou metalacyklopentadiénového medziproduktu, ktorý podlieha Dielsovej-Alderovej reakcii s molekulou terminálneho alkínu za vzniku 7-titananorborna-2,5-diénového komplexu, pričom po následnej redukčnej eliminácii dochádza k vzniku konečného cykloadičného produktu. Stereochémia reakcie je daná preferenciou vzniku termodynamicky najstabilnejšieho titanacyklopentadiénu a stéricky preferovaným spôsobom naviazania molekuly tretieho alkínu.

Na obrázku sú uvedené možné titanacyklopentadiénové regioizoméry vzájomne sa líšiace svojimi stérickými vlastnosťami. (Obrázok 5) Komplexy **l** a **m** sa v dôsledku vzájomnej sterickej repulzie medzi substituentami buta-1,3-dién-1,4-diylového ligandu (prípád **l**) a tiež v dôsledku sterickej repulzie týchto substituentov so samotným kalixarénovým ligandom (prípád **m**), javia menej stabilné ako komplex **k**. Počas reakcie dochádza výhradne k formovaniu termodynamicky najstabilnejšieho intermediátu - komplexu **k**, čo umožňuje vznik 1,3,5-trisubstituovaných derivátov benzénu ako majoritných produktov. Komplexy **l** a **m** poskytujú výhradne 1,2,4-substituované benzénové produkty bez ohľadu na to, akým spôsobom dôjde k naviazaniu tretieho alkínu.



Obrázok 5. Schématické znázornenie možných regioizomérov metalacyklopentadiénového intermediátu.¹⁶

Titanacyklopentadiénový ligand komplexu **k** je v dôsledku koordinačnej väzby medzi atómom titánu a mostíkovým atómom síry orientovaný smerom von z kalixarénového kruhu, čoho následkom dochádza k vytvoreniu kavity prechádzajúcej stredom tohto kruhu, ohraničenej benzénovými jadrami dvoch tiakalixarénových zvyškov. Tretia molekula terminálneho alkínu potom vstupuje do kavity takmer paralelne s kalixarénovým kruhom, tak aby nedošlo k sterickej repulzii medzi alkínovým substituentom a 1-substituentom buta-1,3-dién-1,4-diylového ligandu. Následne dochádza k selektívnemu vytvoreniu 1,3,5-trisubstituovaného 7-titananorborna-2,5-diénového komplexu, ktorý po redukčnej eliminácii poskytuje 1,3,5-trisubstituovaný benzénový produkt.¹⁶ (Schéma 13.)

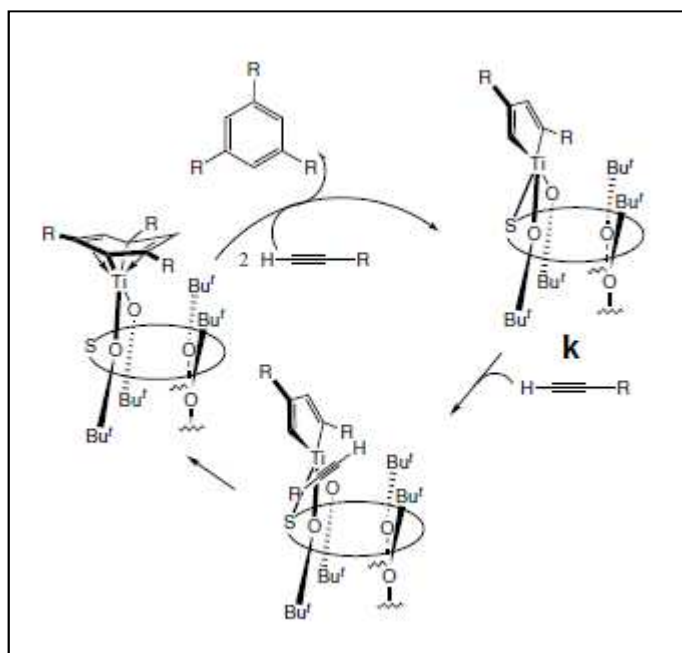


Schéma 13. Navrhnutý mechanizmus alkínovej cyklotrimerizačnej reakcie katalyzovanej dvojjadrovým titaničitým *anti*-komplexom *p-tert*-butyliakalix[4]arénu.¹⁶

7. Praktická časť

7.1. Materiál a použité metódy

^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané v CDCl_3 a DMSO na prístrojoch Varian Gemini (300 MHz pre ^1H a 75.4 MHz pre ^{13}C). Chemické posuny sú udávané v ppm, pričom ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS). MS spektrá boli merané pomocou prístroja Shimadzu LC MS-IT-TOF (Combined LC/MS system). Infračervené spektrá sme merali na prístroji FT-IR Thermo Scientific Nicolet iS10. Teploty topenia sme stanovili pomocou prístroja Büchi The Melting Point M-565, pričom namerané hodnoty neboli korigované.

Priebeh reakcií sme sledovali prostredníctvom TLC analýzy (Merck Silica gel 60 F₂₅₄), na vizualizáciu sme použili UV lampu (254 nm), prípadne pary jódu. Na FLC analýzu sme používali silikagél Merck 60 (40-63 μm)

Všetky použité rozpúšťadlá sme čistili a sušili na základe štandardných postupov, uvedených v literatúre.²⁰ Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich.

²⁰ Armarego, W. *Purifications of Laboratory Chemicals*, Butterworth Heinemann, Burligton 2003.

7.2. Syntéza oxazolkarbaldehydu 12

7.2.1. Syntéza etyl 2-chlór-3-oxopropionátu (3)²¹

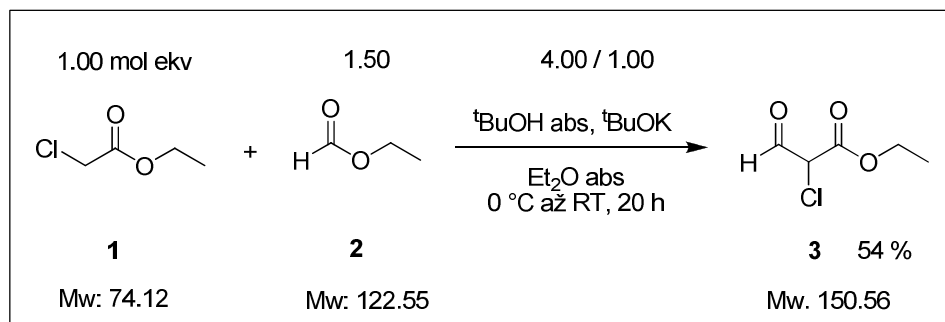


Schéma 14. Syntéza 2-chlór-3-oxopropionátu (3).

Postup syntézy: 18.3 g (163.0 mmol, 1.00 mol ekv) ^tBuOK sme rozpustili v 61 ml ^tBuOH abs (652.0 mmol, 4.00 mol ekv) a v 150 ml Et₂O abs pod Ar atmosférou. Takto pripravenú RZ sme v ľadovom kúpeli ochladili na 0 °C a následne sme do nej postupne (v priebehu 1.5 h) prikvapávali roztok pripravený z 17.5 ml (163.0 mmol, 1.00 mol ekv) etyl chlóracetátu (1), 20.0 ml (245.0 mmol, 1.50 mol ekv) etyl formiátu (2) a 150 ml Et₂O abs, pričom sme dávali pozor, aby sa teplota RZ pohybovala okolo 0 °C. Ľadový kúpeľ sme potom odstránili a RZ sme nechali reagovať pod Ar cez noc. Počas reakcie vznikla žltlooranžová soľ, ktorú sme izolovali filtráciou na Büchnerovom lieviku a potom ju triturovali pomocou EA. Roztok sme zo suspenzie odsali pomocou Pasteurovej pipety a tuhý zvyšok sušili pomocou HV. Vzniknutú bledožltú práškovú látku sme rozpustili v 750 ml vody a pH roztoku sme upravili na hodnotu 3 prídavkom primeraného množstva 10 % HCl. Vodný roztok sme potom extrahovali s EA (3 x 250 ml), spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl, vysušili státím nad Na₂SO₄ a nakoniec ofiltrovali. Zvyšné rozpúšťadlo sme odparili pomocou RVO a surový produkt dosušili na HV. Získali sme svetložltý olej, ktorý po umiestnení v mrazničke vykryštalizoval (13.3 g, 88.3 mmol, 54.2 %).

²¹ Patent; Cossrow, J.; Guan, B.; Ishchenko, A.; Jones, J. H.; Kumaravel, G.; Lugovskoy, A.; Peng, H.; Powell, N.; Raimundo, B. C.; Tanaka, H.; Vessels, J.; Wynn, T.; Xin, Z. Sunesis Pharmaceuticals, Inc; US2009/5359, 2009, (A1).

Poznámky: Postup syntézy, ktorý bol uvedený v literatúre sme modifikovali nahradením EtONa stéricky náročnejšou bázou ^tBuOK, z dôvodu pozorovanej neželanej substitúcie chlóru za etoxy skupinu v molekule cieľovej zlúčeniny **3**. Pre lepšiu rozpustnosť ^tBuOK sme namiesto pôvodného toluénu použili zmes ^tBuOH a Et₂O.

Látku **3** sme izolovali v dostatočnej čistote na to, aby mohla byť použitá do ďalšieho stupňa. V prípade potreby je možné uskutočniť dodatočné čistenie destiláciou (60 °C, 12 Torr).²¹

Napriek viacnásobnému opakovaniu reakcie, sa výťažky vždy pohyboval okolo 50 – 55 %, čo je menej ako uvádza literatúra (88 %).

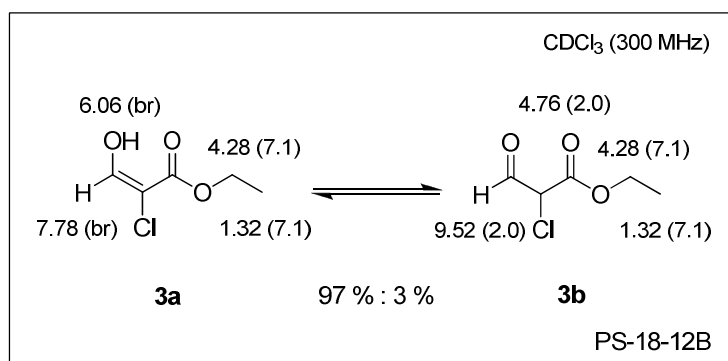
V prípade, ak sme reaktanty etyl chlóracetát (**1**) a etyl formiát (**2**) pridávali do RZ postupne za sebou, namiesto pridávania spolu v roztoku s Et₂O, dochádzalo ku znečisteniu RZ vedľajšími produktmi a zníženiu výťažku reakcie asi na 30 %. Ku značnému znečisťovaniu RZ dochádzalo aj v prípade predlžovania reakčného času nad 20 h. Čistenie sme realizovali rozpustením surového produktu vo vode, kde sa rozpustila hlavne zlúčenina **3**, pričom nečistoty sa usadili na dne banky v podobe tmavohnedého oleja. Tento olej sme následne oddelili pomocou oddeľovacieho lievika.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 2 : 1 (2 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f = 0.47.

Teplota topenia: 79.0 – 83.0 °C (lit. 83.0 – 84.0 °C [benzén]).²²

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-18-12B) Enol forma (**3a**): 7.78 (br s, 1H, CHOH), 6.06 (br s, 1H, CHOH), 4.28 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃), 1.32 (t, 3H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃) Keto forma (**3b**): 9.52 (d, 1H, J(1,2) = 2.0 Hz, CHO), 4.76 (d, 1H, J(1,2) = 2.0 Hz, CHCl), 4.28 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃), 1.32 (t, 3H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃).

²² Yoffe, S.T.; Petrovsky, P.V.; Goryunov, Y.I.; Yershova, T.V.; Kabachnik, M.I. *Tetrahedron* **1972**, 28, 2783 – 2798.



Vzhľadom na to, že internetové databázy neuvádzajú ¹H-NMR spektrum zlúčeniny **3** merané v CDCl₃, porovnali sme nami namerané údaje s dostupnými údajmi nameranými v CCl₄, pričom hodnoty posunov boli podobné.²² V literatúre je dostupná aj IR a UV/Vis spektrálna analýza zlúčeniny **3**.^{23,24}

7.2.2. Syntéza etyl 2-aminooxazol-5-karboxylátu (**5**)²⁵

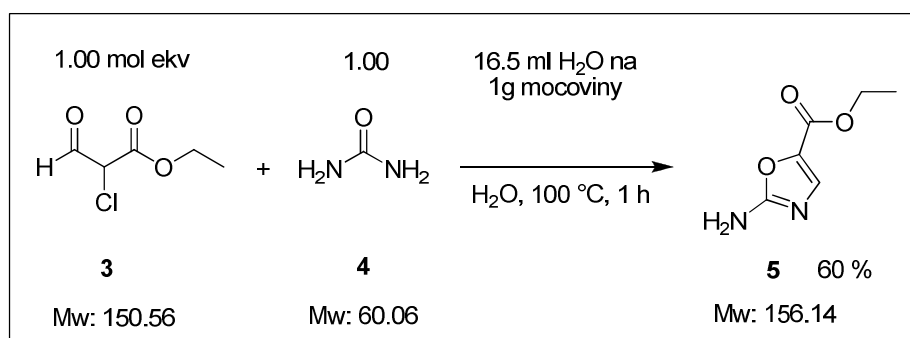


Schéma 15. Syntéza etyl 2-aminooxazol-5-karboxylátu **5**.

Postup syntézy: K 500.0 mg (3.3 mmol, 1.00 mol ekv) etyl 2-chlór-3-oxopropionátu (**3**) sme pridali 200.0 mg (3.3 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **4** a 3.3 ml vody. Takto pripravenú RZ sme nechali za refluxu miešať 1 h, pričom stav reakcie sme priebežne kontrolovali pomocou TLC analýzy. Po ukončení reakcie a následnom ochladení RZ, vznikla bledo žltá suspenzia, ktorú sme neutralizovali prídavkom vhodného množstva nasýteného roztoku NaHCO₃. Vodnú vrstvu sme extrahovali s EA (3 x 1.5 ml), spojené

²³ Noi et al. *J. Org. Chem. USSR (Eng. Trans.)* **1974**, *10*, 2000.

²⁴ Bokadia; Varna *J. Scient. Res. Banaras Hindu. Univ.* **1957**, *8*, 133.

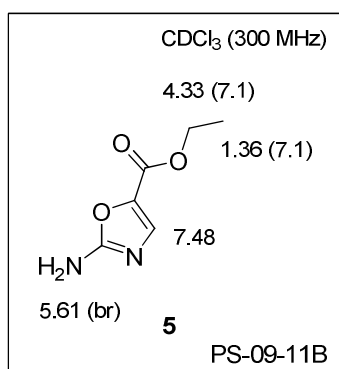
²⁵ Lange, U. E. W.; Backfisch, G.; Delzer, J.; Geneste, H.; Graef, C.; Hornberger, W.; Kling, A.; Lauterbach, A.; Subkowski, T.; Zechel, Ch. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1379 – 1382.

organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄ a nakoniec odfiltrovali. Zvyšné rozpúšťadlo sme potom odparili pomocou RVO a HV. Získali sme 310.0 mg (2.0 mmol, 59.6 %) svetlej žltohnedej tuhej látky.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 1 (3 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f = 0.51.

Teplota topenia: 150.0 – 155.0 °C [EA] (lit. 155.0 °C [EtOH]).²⁶

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-09-11B) δ = 7.48 (s, 1H, H-C(4)), 5.61 (br s, 2H, NH₂), 4.33 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃), 1.36 (t, 3H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃).



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry. V rovnakom literárnom zdroji je dostupná aj ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **5**.²⁷

²⁶ Dornow, A.; Frese, A. *Archiv der Pharmazie* **1953**, 286, 494 – 499.

²⁷ Kováčiková, L. *Dizertačná práca* **2010**, PriF UK, Bratislava.

7.2.3. Syntéza *tert*-butyl nitritu (7)²⁸

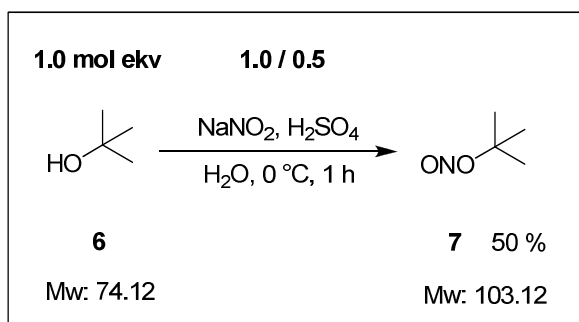


Schéma 16. Syntéza *tert*-butylnitritu 7.

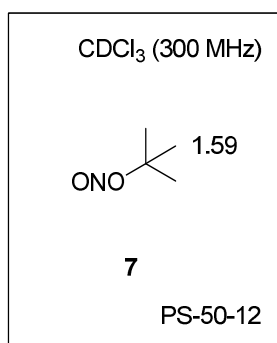
Postup syntézy: 17.4 g (252.2 mmol, 1.00 mol ekv) NaNO₂ sme rozpustili v 70 ml vody a vychladili na 0 °C v ľadovom kúpeli. Po vychladení sme do RZ pomaly pridali roztok 6.7 ml (126.1 mmol, 0.50 mol ekv) konc. H₂SO₄ v 5 ml vody a 23.9 ml (252.2 mmol, 1.00 mol ekv) ^tBuOH. RZ sme potom nechali miešať pri 0 °C ešte 1 h, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali TLC analýzou. Po ukončení reakcie sme si pripravili roztok 0.5 g Na₂CO₃ a 6.3 g NaCl v 250 ml vody, ktorým sme RZ 3-krát extrahovali. Organickú vrstvu (15 ml bledomodrej kvapaliny, 126.1 mmol, 50.0 %) sme umiestnili do banky nad sušidlo (Na₂SO₄) a uložili do mrazničky.

Poznámky: Produkt reakcie 7 sme izolovali v dostatočnej čistote na to, aby bol použitý do ďalšej syntézy. V prípade potreby je možné látku 7 destilovať (60.0 – 61.0 °C, 760 Torr).²⁸

TLC analýza: Ako eluent sme požili zmes H / EA v pomere 3 : 1 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f = 0.58.

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-50-12) 1.59 (s, 9H, C(CH₃)₃).

²⁸ Meng, G.; Yang, T.; Liu, Y. *Org. Prep. Proc. Int.* **2011**, 43, 354 – 359.



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry.²⁹ V dostupnej literatúre je dostupná aj MS, IR a UV/Vis spektrálna analýza zlúčeniny **7**.^{30,31,32}

7.2.4. Syntéza etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylátu (**8**)³³

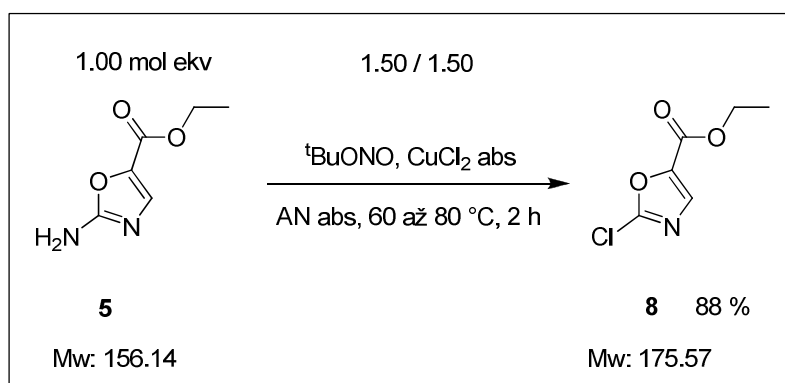


Schéma 17. Syntéza etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylátu **8**.

Postup syntézy: K 645.4 mg (4.8 mmol, 1.50 mol ekv) CuCl₂ abs. sme pridali 600 µl (4.8 mmol, 1.50 mol ekv) ^tBuONO a 11 ml AN abs. Takto pripravenú RZ sme počas miešania pod Ar atmosférou zahriali na 60 °C. Do RZ sme následne pomaly, v priebehu 30 min, pridávali 500.0 mg (3.2 mmol, 1.00 mol ekv) východiskovej látky **5**. Teplotu sme nechali vystúpiť na 80 °C a RZ sme miešali pod Ar atmosférou 2 h, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy. Po zreagovaní VL a ochladení sme do RZ pridali 5 ml

²⁹ Koley, D.; Colon, O. C.; Savlnov, S. N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4172 – 4175.

³⁰ Takagi, H.; Washida, N.; Akimoto, H.; Okuda, M. *Anal. Chem.* **1981**, *2*, 175 – 179.

³¹ McLaughlin, R. P.; Donald, W. A.; Jitjai, D.; Zhang, Y. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.* **2007**, *67*, 178 – 187.

³² Wojcik-Pastuszka, D.; Jodkowski, J. T. *Pol. J. Chem.* **2009**, *83*, 131 – 143.

³³ Hodgetts, K. J.; Kershaw, M. T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2911 – 2914.

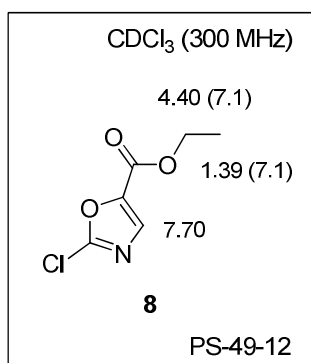
vody a 4 ml 2 M HCl. Vodnú vrstvu sme potom extrahovali s EA (3 x 7 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl, vysušili státím nad Na₂SO₄ a odfiltrovali. Rozpúšťadlo sme odparili pomocou RVO a surový produkt dosušili na HV. Získali sme žltozelený olej o hmotnosti 490.0 mg (2.8 mmol, 87.5 %).

Poznámky: Postup syntézy, na základe ktorého sme reakciu uskutočňovali bol v pôvodnej literatúre aplikovaný pri syntéze N-regioizoméneho analógu látky **8** – etyl 2-chlóroxazol-4-karboxylátu s výtťažkom 83 %.

Produkt reakcie **8** sme izolovali v dostatočnej čistote na to, aby bol použitý do ďalšieho syntetického stupňa. Na čistenie je možné použiť aj FLC (SiO₂), avšak pri tejto metóde sa dochádza k stratám, vzhľadom na to, že sa látka **8** na SiO₂ a teplom rozkladá.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 1 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f = 0.54.

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-49-12) 7.70 (s, 1H, H-C(4)), 4.40 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃), 1.39 (t, 3H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃).



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry. V rovnakom literárnom zdroji je dostupná aj ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **8**.³⁴

³⁴ Atkins, J.; Vedejs, E. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3351 – 3354.

7.2.5. Syntéza etyl 2-(5-etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (10)²⁷

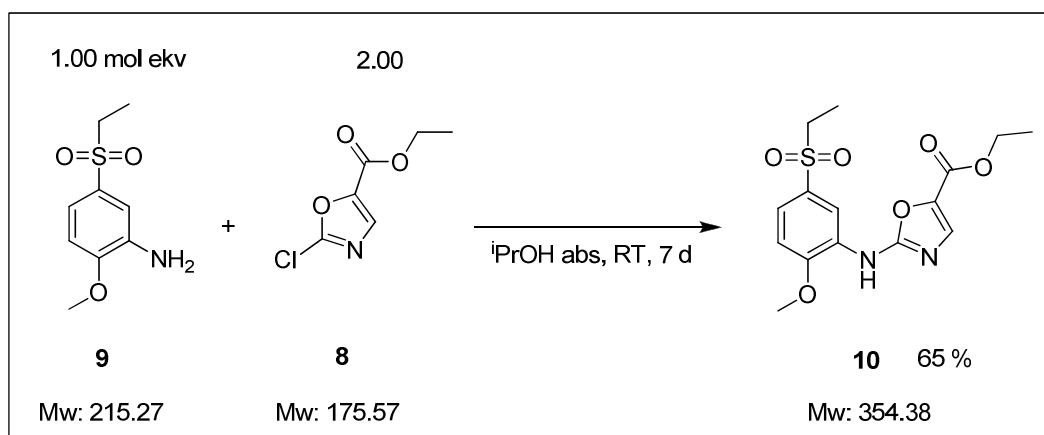


Schéma 18. Syntéza etyl 2-(5-etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (**10**).

Postup syntézy: Do roztoku pripraveného rozpustením 61.0 mg (0.3 mmol, 1.00 mol ekv) anilínu **9** v 1.2 ml *i*PrOH abs sme za stáleho miešania pod Ar atmosférou po kvapkách pridávali 100.0 mg (0.6 mmol, 2.00 mol ekv) etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylátu (**8**) rozpusteného v 0.3 ml *i*PrOH abs. Túto RZ sme potom nechali ďalej reagovať pri RT počas 7 dní, pričom stav reakcie sme priebežne kontrolovali TLC analýzou. Po úplnom zreagovaní východiskových látok, čo sa prejavilo aj výrazným zakalením RZ, sme odparili *i*PrOH a zvyšok sme rozpustili v 2 ml EA. Tento roztok sme potom extrahovali nasýteným roztokom NaHCO₃ (1 ml) a vodou (2 x 1 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a zvyšné rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a HV. Dostali sme tmavohnedý hustý olej o hmotnosti 130.0 mg, ktorý sme kryštalizovali zo zmesi H / EA. Po kryštalizácii sme získali 65.0 mg (0.2 mmol, 65.0 %) bledohnedej tuhej látky.

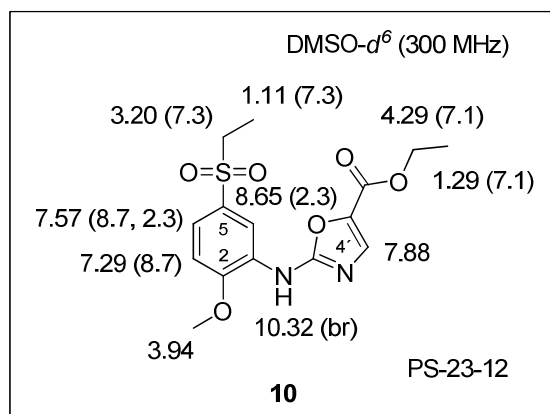
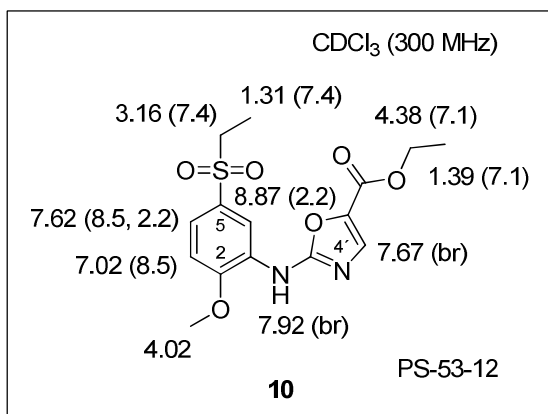
Poznámky: V niektorých prípadoch sa nám stalo, že olejovitý surový produkt nebolo možné vykryštalizovať zo zmesi H / EA. Tento problém sme vyriešili použitím, v tomto prípade, efektívnejšej kryštalizácie z EtOH.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 3 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f = 0.36.

Teplota topenia: 142.0 – 143.0 °C [H / EA] (lit. 142.0 -143.0 °C [H / EA]).²⁷

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-53-12) 8.87 (d, 1H, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(6)), 7.92 (br s, 1H, NH), 7.67 (br s, 1H, H-C(4')), 7.62 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(4)), 7.02 (d, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, H-C(3)), 4.38 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃), 4.02 (s, 3H, OCH₃), 3.16 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.39 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃), 1.31 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂CH₃).

¹H-NMR analýza: (300 MHz, DMSO-*d*⁶, PS-23-12) 10.32 (br s, 1H, NH), 8.65 (d, 1H, $J(4,6) = 2.3$ Hz, H-C(6)), 7.88 (s, 1H, H-C(4')), 7.57 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.7$ Hz, $J(4,6) = 2.3$ Hz, H-C(4)), 7.29 (d, 1H, $J(3,4) = 8.7$ Hz, H-C(3)), 4.29 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.29 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃), 1.11 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂CH₃).



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry. V rovnakom literárnom zdroji je dostupná aj elementárna analýza a ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **10**.²⁷

7.2.6. Syntéza 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)metanolu (**11**)²⁷

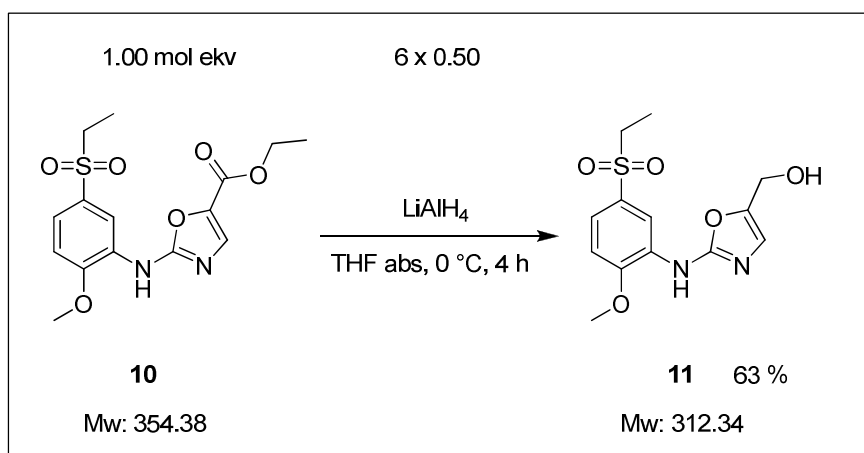


Schéma 19. Syntéza 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)metanolu (**11**).

Postup syntézy: Roztok pripravený rozpustením 350.0 mg (1.0 mmol, 1.00 mol ekv) esteru **10** v 6 ml THF abs pod Ar atmosférou, sme umiestnili do ľadového kúpeľa. Po vychladení roztoku na 0 °C sme v šiestich 30 min intervaloch prisypávali po 19.0 mg LiAlH₄ (0.5 mmol, 0.50 mol ekv). Po poslednom prisypaní sme RZ nechali miešať ešte asi 1 h pri 0 °C. Stav reakcie sme počas pridávania LiAlH₄ sledovali pomocou TLC analýzy. Po skončení reakcie sme do RZ priliali 6 ml nasýteného a vychladeného roztoku NH₄Cl a nechali miešať asi 10 min. Následne sme zmes extrahovali s EA (3 x 4 ml), spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a HV. Dostali sme 350.0 mg žltohnedej oleja, ktorý sme kryštalizovali zo zmesi H / EA. Po kryštalizácii sme izolovali 195.0 mg (0.6 mmol, 63.1 %) svetlej žltohnedej tuhej látky.

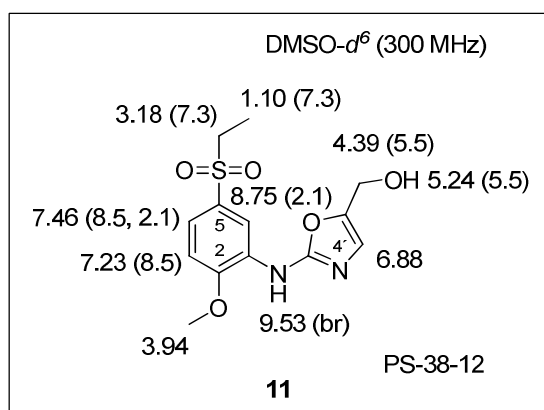
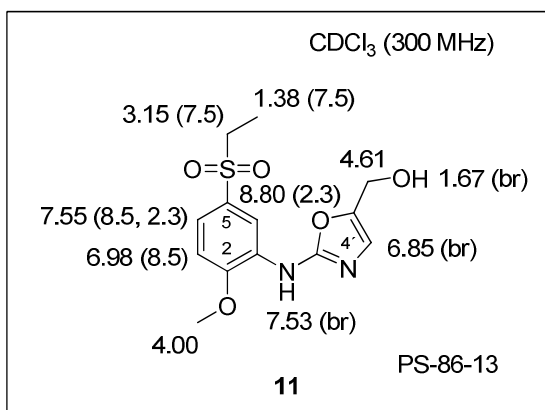
Poznámky: V prípade, že sme mali v dispozícii menej aktívny LiAlH₄, do RZ sme ho prisypali ešte o 1.00 mol ekv viac. Banku s RZ sme potom umiestnili na noc do mrazničky na doreagovanie.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 6 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV svetlo, R_f = 0.15.

Teplota topenia: 158.0 – 159.0 °C [H / EA] (lit. 157.0 – 160.0 °C [acetón]).²⁷

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-86-13) 8.80 (d, 1H, $J(4,6) = 2.3$ Hz, H-C(6)), 7.55 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, $J(4,6) = 2.3$ Hz, H-C(4)), 7.53 (br s, 1H, NH), 6.98 (d, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, H-C(3)), 6.85 (br s, 1H, H-C(4')), 4.61 (s, 2H, CH₂OH), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.5$ Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.67 (br s, 1H, CH₂OH) 1.38 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.5$ Hz, SO₂CH₂CH₃).

¹H-NMR analýza: (300 MHz, DMSO-*d*⁶, PS-38-12) 9.53 (br s, 1H, NH), 8.75 (d, 1H, $J(4,6) = 2.1$ Hz, H-C(6)), 7.46 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, $J(4,6) = 2.1$ Hz, H-C(4)), 7.23 (d, 1H, $J(3,4) = 8.5$ Hz, H-C(3)), 6.88 (s, 1H, H-C(4')), 5.24 (t, 1H, $J(\text{CH}_2, \text{OH}) = 5.5$ Hz, CH₂OH), 4.39 (d, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{OH}) = 5.5$ Hz, CH₂OH), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.10 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂CH₃).



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry. V rovnakom literárnom zdroji je dostupná aj elementárna analýza a ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **11**.²⁷

7.2.7. Syntéza 2-(5-(etyl-sulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehydu (**12**)³⁵

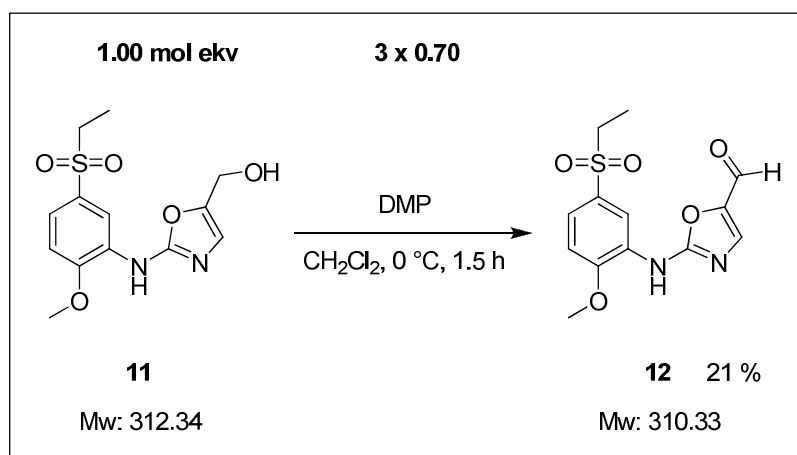


Schéma 20. Syntéza 2-(5-(etyl-sulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehydu (**12**)

Postup syntézy: 190.0 mg (0.6 mmol, 1.00 mol ekv) alkoholu **11** sme rozpustili v 21 ml CH₂Cl₂ a umiestnili do ľadového kúpeľa. Po vychladení sme do RZ prisypávali po 3 x 180.5 mg (0.4 mmol, 0.70 mol ekv) DMP v troch 30 min intervaloch. Po poslednom prisypaní DMP sme RZ miešali ešte 1 h, pričom jej teplotu sme nechali vystúpiť na RT. Stav reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy. Po skončení reakcie sme RZ extrahovali 10 ml nasýteného roztoku NaHCO₃, 10 ml H₂O a nakoniec 10 ml nasýteného roztoku NaCl. Spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, prefiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a HV. Dostali sme 182.5 mg tmavožltého oleja, ktorý sme potom čistili pomocou FLC (SiO₂, eluent H / EA v pomere 1 : 6). Po čistení sme izolovali 40.0 mg (0.1 mmol, 21.2 %) žltoranžovej tuhej látky.

Poznámky: Postup syntézy, na základe ktorého sme reakciu uskutočňovali bol v pôvodnej literatúre aplikovaný na inom, no podobnom alkoholovom substráte obsahujúcom arylaminoxazolový skelet, (4-metyl-2-(2,4,6-trichlórfenylamino)oxazol-5-yl)metanole s výťažkom 59 %. Pôvodný syntetický postup sme modifikovali (zníženie reakčnej teploty z RT na 0°C) kvôli citlivému charakteru nami použitého substrátu.

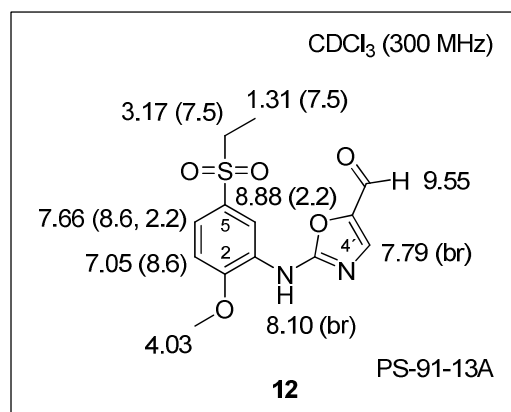
³⁵ Dubowchik, G. M.; Michne, J. A.; Zuev, D.; Schwartz, W.; Scola, P. M.; James, C. A.; Ruediger, E. H.; Pin, S. S.; Burris, K. D.; Balanda, L. A.; Gao, Q.; Wu, D.; Fung, L.; Fiedler, T.; Browman, K. E.; Taber, M. T.; Zhang, J. *Bioorg. med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3997 – 4000.

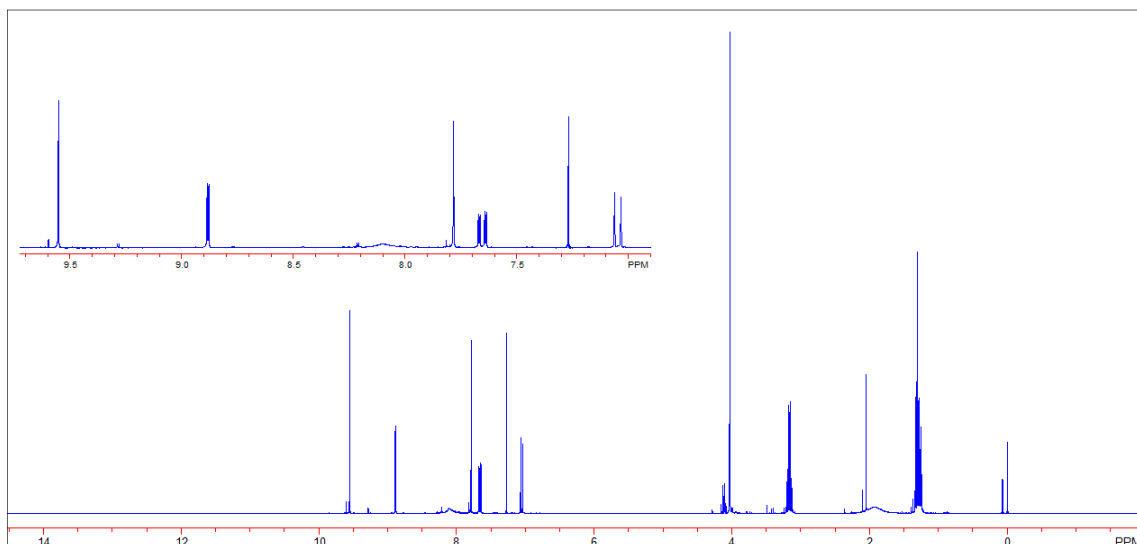
Zvyšok po DMP sa po ukončení reakcie z RZ zvyčajne odstraňuje extrakciou bázickým roztokom, najčastejšie 1 M NaOH. V našom prípade nebol tento typ čistenia možný vzhľadom na to, že látka **12** sa ukázala byť nestabilná v bázickom prostredí. Rozklad látky **12** sme pozorovali po extrakcii 1 M NaOH a aj nasýteným roztokom Na₂CO₃. Pri extrakcii nasýteným roztokom NaHCO₃ sme rozklad látky **12** už nezaznamenali, bázicita tohto roztoku však bola nízka na úplné odstránenie zvyšku po DMP. RZ sme preto čistili pomocou FLC.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 6 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV svetlo (slabá odozva), R_f = 0.27.

Teplota topenia: 140.0 – 145.0 °C [FLC].

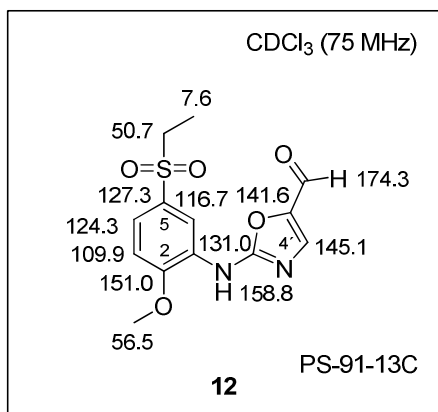
¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-91-13A) 9.55 (s, 1H, CHO), 8.88 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 8.10 (br s, 1H, NH), 7.79 (s, 1H, H-C(4')), 7.66 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, *J*(4,6) = 2.2 Hz, H-C(4)), 7.05 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 4.03 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.5 Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.31 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.5 Hz, SO₂CH₂CH₃).





Obrázok 6. $^1\text{H-NMR}$ spektrum PS-91-13A.

$^{13}\text{C-NMR}$ analýza: (75 MHz, CDCl_3 , PS-91-13C) 174.3 (CHO), 158.8 (C2'), 151.0 (C2), 145.1 (C4'), 141.6 (C5'), 131.0 (C1), 127.3 (C5), 124.3 (C4), 116.7 (C6), 109.9 (C3), 56.5 (OCH_3), 50.7 ($\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7.6 ($\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).



FR IR (solid, cm^{-1}): 3252 (w), 3086 (w), 2961 (w), 2846 (w), 1732 (w), 1654 (m), 1606 (s), 1563 (s), 1524 (m), 1455 (w), 1424 (m), 1305 (w), 1306 (m), 1266 (m), 1198 (w), 1140 (m), 1121 (s), 1087 (m), 1018 (m), 978 (w), 921 (w), 890 (w).

MS (ESI, Pos. Mod) m/z : 311.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100 %), 312.1 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ (16 %), 313.1 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ (5 %), 621.2 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ (3 %).

7.2.8. Syntéza 4-metylbenzénsulfonyl azidu (14)³⁶

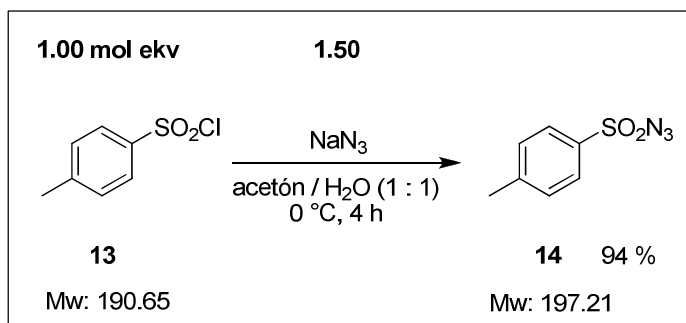


Schéma 21. Syntéza 4-metylbenzénsulfonyl azidu (14).

Postup syntézy: 2 g (10.5 mmol, 1.0 mol ekv) látky **13** sme rozpustili v 60 ml zmesi acetón / voda (1 : 1). Tento roztok sme v ľadovom kúpeli vychladili na 0 °C, pridali k nemu 1.02 g (15.7 mmol, 1.5 mol ekv) NaN₃ a nechali miešať 4 h. Reakciu sme priebežne kontrolovali TLC analýzou. Po ukončení reakcie sme acetón odparili pomocou RVO a zvyšnú vodnú vrstvu sme extrahovali s EA (3 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, prefiltrovali a zahustili pomocou RVO a HV. Dostali sme 1.85 g (9.4 mmol, 94.0 %) bezfarebného oleja, ktorý po umiestnení v mrazničke stuhol na bielu kryštalickú látku.

Poznámky: Vzhľadom na to, že pri zachovaní reakčných podmienok z pôvodnej literatúry sme z RZ izolovali okolo 10 % nezreagovanej VL, namiesto 1.0 mol ekv NaN₃ sme použili 1.5 mol ekv a reakčný čas sme predĺžili z 2 h na 4 h.

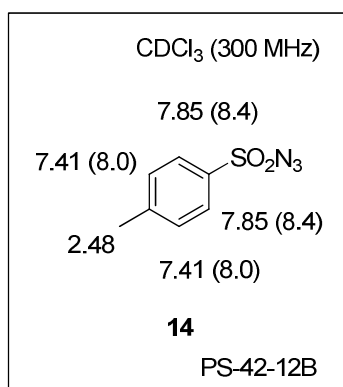
TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 2 : 1 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV svetlo, R_f = 0.50.

Teplota topenia: 21.0 – 23.0 °C (lit. 23.0 °C).³⁷

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-42-12B) 7.85 (d, 2H, *J*(2,3) = 8.4 Hz, H-C(2)), 7.41 (d, 2H, *J*(2,3) = 8.0 Hz, H-C(3)), 2.48 (s, 3H, CH₃).

³⁶ Wijnmans, M.; de Graaf, C.; de Kloe, G.; Istyastono, E.P.; Smit, J.; Lim, H.; Boonnak, R.; Nijmeijer, S.; Smits, R.A.; Jongejan, A.; Zuiderveld, O.; de Esch, I. J.; Leurs, J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1693 – 1703.

³⁷ Reiss, F.; Schulz, A.; Villinger, A.; Weding, N. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9962 – 9972.



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry.³⁸ V literatúre je dostupná aj MS, ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **14**.^{39,40,41}

7.2.9. Syntéza dimetyl 1-diazo-2-oxopropylfosfonátu (**16**)³⁶

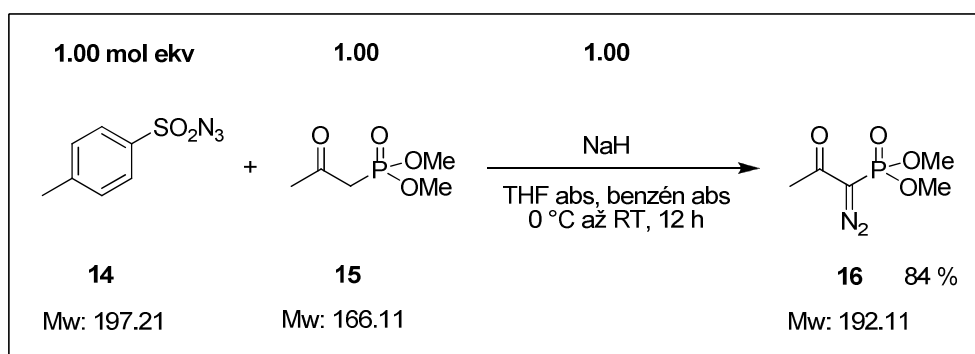


Schéma 22. Syntéza dimetyl 1-diazo-2-oxopropylfosfonátu (**16**).

Postup syntézy: 26.0 mg (1.1 mmol, 1.00 mol ekv) NaH sme rozpustili v 2 ml benzénu abs. a 0.7 ml THF abs. Takto pripravený roztok sme pod Ar atmosférou umiestnili do ľadového kúpeľa a vychladili na 0 °C. Po vychladení sme do roztoku pomaly pridali 150 µl (1.1 mmol, 1.00 mol ekv) látky **15** v 1 ml benzénu abs., pričom došlo k okamžitému vytvoreniu bielej zrazeniny. Teplotu RZ sme následne nechali vystúpiť na RT a nechali

³⁸ Kulkarni, S.S.; Iyamu, I. D.; Wang, H. G.; Doi, K.; Guida, W. C.; Santiago, D. N.; Duboulay, C. J. Patent; University of South Florida; WO2012/21486, **2012**, (A2).

³⁹ Bhurruth-Alcor, Y.; Jorgensen, M. R.; Kontogiorgis, Ch.; Miller, A. D.; Rost, T.; Skorve, J.; Berge, R. K.; Cooper, R. G.; Sheridan, R. M.; Hamilton, W. D. O.; Heal, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1169 – 1188.

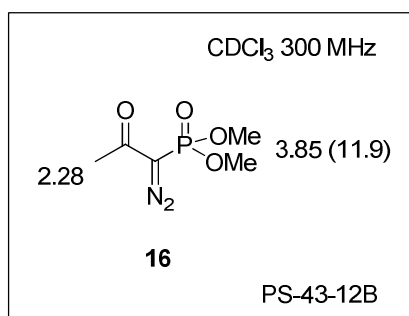
⁴⁰ Koduri, N. D.; Scott, H.; Hileman, B.; Cox, J. D.; Coffin, M.; Glicksberg, L.; Hussaini, S. R. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 440 – 443.

⁴¹ Cambeiro, X. C.; Pericas, M. A. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 113 – 124.

sme ju 1 h miešať. Potom sme do RZ pridali 214.0 mg (1.1 mmol, 1.00 mol ekv) látky **14** v 0.5 ml benzénu abs., pričom sme pozorovali rozpúšťanie spomínanej zrazeniny a postupnú zmenu farby RZ z bledožltej na oranžovú. RZ sme nechali miešať po Ar atmosférou pri RT počas noci. Kontrolu zreagovania VL sme uskutočnili pomocou TLC analýzy. RZ sme potom prefiltrovali na Büchnerovom lieviku a zahustili na RVO a HV. Dostali sme 500.0 mg oranžového oleja, ktorý sme čistili pomocou FLC (SiO₂, eluent H / EA v pomere 3 : 7). Po čistení sme izolovali 176.0 mg (0.9 mmol, 84.4 %) žltého oleja.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 3 : 7 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie a pary I₂, R_f = 0.15.

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-43-12B) 3.85 (d, 6H, J(OCH₃,OCH₃) = 11.9 Hz, OCH₃,OCH₃), 2.28 (s, 3H, COCH₃).



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry. V rovnakom literárnom zdroji je dostupná aj elementárna, MS, ¹³C-NMR a IR spektrálna analýza zlúčeniny **16**.⁴²

⁴² Nieman, J. A.; Heasley, S. E.; Schultz, B.L.; Zerth, H. M.; Chen, K.; Stephanski, K. J.; Knechtel, M. L.; Oien, N. L.; Wieber, J. L.; Wathen, M. W.; Nair, S. K.; Hopkins, T. A.; Nugent, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3039 – 3042.

7.3. Alternatívne syntézy

7.3.1. Syntéza etyl 2-(bis(*tert*-butoxykarbonyl)amino)oxazol-5-karboxylátu (**20**)⁴³

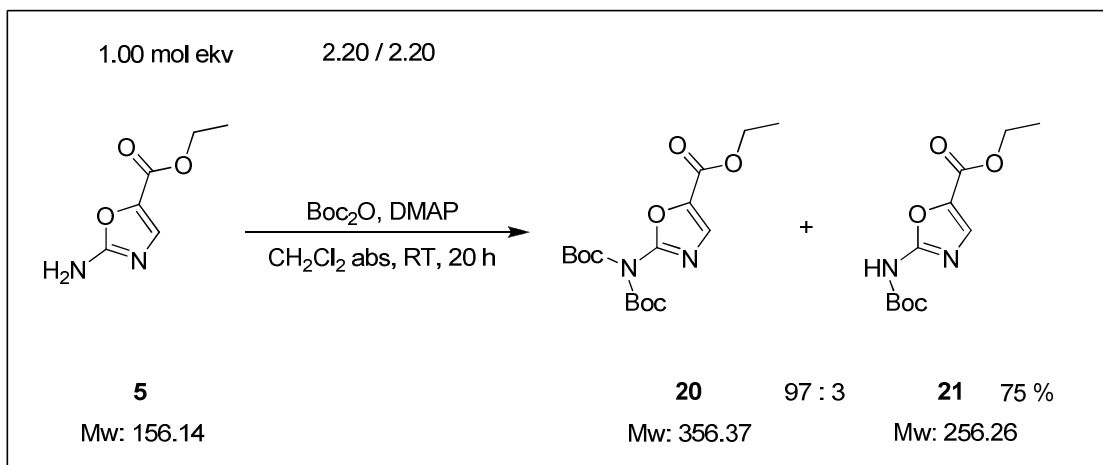


Schéma 23. Syntéza etyl 2-(bis(*tert*-butoxykarbonyl)amino)oxazol-5-karboxylátu (**20**).

Postup syntézy: 50.0 mg (0.3 mmol, 1.00 mol ekv) látky **5** sme pod Ar atmosférou rozpustili v 2 ml CH₂Cl₂ abs. Následne sme pridali 86.0 mg (0.7 mmol, 2.20 mol ekv) DMAPu a 153.6 mg (0.7 mmol, 2.20 mol ekv) Boc₂O, RZ sme nechali miešať cez noc pri RT. Pomocou TLC analýzy sme uskutočnili kontrolu doreagovania VL, do RZ sme pridali 6 ml nasýteného roztoku NaHCO₃ a extrahovali sme ju s CH₂Cl₂ (3 x 5 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli 6 ml 0.5 M HCl a 6 ml nasýteného roztoku NaCl, vysušili státím nad Na₂SO₄ a odfiltrovali. Rozpúšťadlo sme odparili pomocou RVO a surový produkt sme dosušili na HV. Dostali sme tmavohnedý hustý olej o hmotnosti 85.0 mg (0.2 mmol, 74.5 %). ¹H-NMR analýza ukázala prítomnosť látky **20** aj látky **21** v pomere 97 : 3.

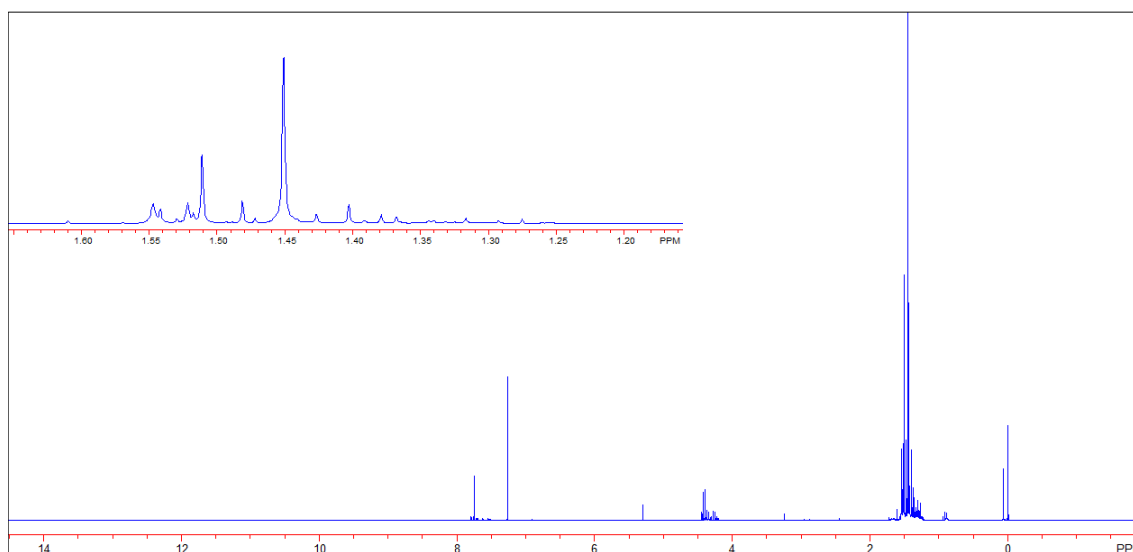
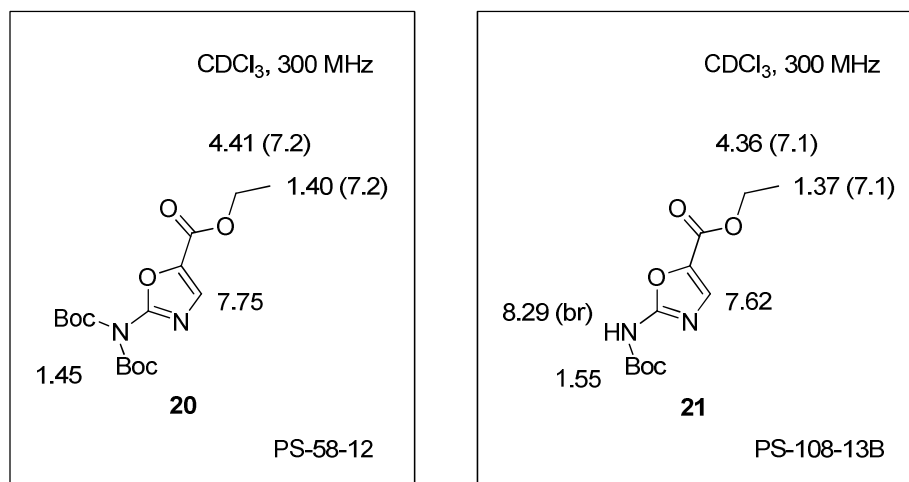
Poznámky: Postup syntézy, na základe ktorého sme reakciu uskutočňovali bol v pôvodnej literatúre aplikovaný na N-regioizomérny analóg látky **5** – etyl 2-aminooxazol-4-karboxylát.

⁴³ McCormic, K. D.; Aslanian, R. G.; Mangiaracina, P.; Berlin, M. Y.; De Lera Ruiz, M.; Boyce, Ch. W.; Chao, J.; Ting, P. C.; Zheng, J.; Rosenblum, S. B. Patent; US2011/166124, **2011**, (A1).

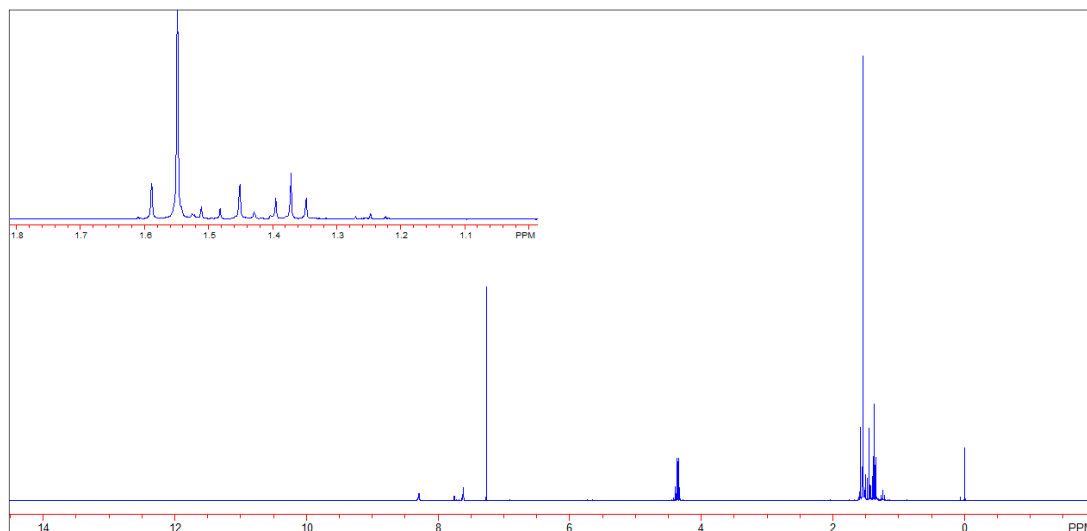
Surový produkt sme použili do ďalšieho reakčného stupňa bez dodatočného čistenia. Výťažok reakcie je preto len orientačný, vypočítaný vzhľadom na molekulovú hmotnosť produktu **20**, ktorý je majoritným produktom reakcie.

TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 3 (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV svetlo, R_f (látka **20**) = 0.63, R_f (látka **21**) = 0.50.

$^1\text{H-NMR}$ analýza: (300 MHz, CDCl_3 , PS-58-12) Látka **20**: 7.75 (s, 1H, H-C(4)), 4.41 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.45 (s, 18H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.40 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) (300 MHz, CDCl_3 , PS-108-13B) Látka **21**: 8.29 (br s, 1H, NH), 7.62 (s, 1H, H-C(4)), 4.36 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.55 (s, 9H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (t, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.1$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)).



Obrázok 7. $^1\text{H-NMR}$ spektrum PS-58-12.



Obrázok 8. ^1H -NMR spektrum PS-108-13B.

^{13}C -NMR analýza: Látka **20**, Látka **21** Vid'. príloha. (Príloha)

FR IR (solid, cm^{-1}): Látka **20**, Látka **21** Vid'. príloha. (Príloha)

MS (ESI, Neg.Mod): Látka **20**, Látka **21** Vid'. príloha. (Príloha)

7.3.2. Syntéza 2-aminoxazolu (**29**)⁴⁴

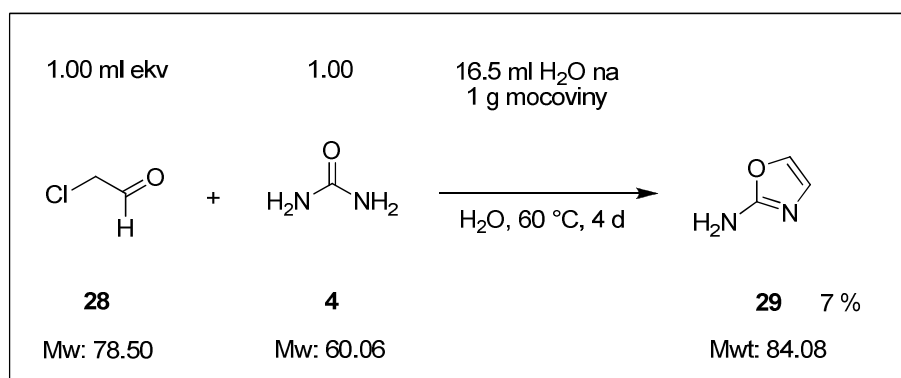


Schéma 24. Syntéza 2-aminoxazolu (**29**).

⁴⁴ Boedeker, J.; Burmester, K. Z. Chem. **1987**, 27, 258 – 259.

Postup syntézy: 3.60 g (59.5 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **4** sme rozpustili v 60 ml vody. Následne sme pridali 7.6 ml 0.5 % (59.5 mmol, 1.00 mol ekv) komerčného vodného roztoku látky **28** a RZ sme miešali pri 60 °C počas 4 d. Po kontrole zreagovania VL pomocou TLC analýzy sme prídavkom primeraného množstva nasýteného vodného roztoku NaHCO₃ upravili pH RZ na hodnotu 8 a extrahovali sme ju s EA (3 x 20 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, odfiltrovali, zahustili pomocou RVO a dosušili na HV. Dostali sme 260.0 mg hustého žltého oleja, ktorého neskoršia ¹H-NMR analýza potvrdila značné znečistenie a len malý obsah cieľovej zlúčeniny **29**. Vodnú vrstvu, ktorá zostala po prvej extrakcii sme opäť extrahovali s väčším objemom EA (3 x 170 ml). Po sušení, filtrácii, zahustení a dosušení sme dostali 350.0 mg (4.2 mmol, 7.0 %) hustého svetložltého oleja, ktorý po umiestnení v chladničke vykryštalizoval. ¹H-NMR analýza potvrdila prítomnosť čistej cieľovej zlúčeniny.

Poznámky: Postup syntézy, na základe ktorého sme reakciu uskutočňovali bol v pôvodnej literatúre aplikovaný pri reakcii analógu látky **28** – 2-brómacetaldehydu s močovinou **4**, ktorá poskytla látku **29** vo výťažku 10 %.

Látka **29** je veľmi dobre rozpustná vo vode, preto sme museli uskutočniť viacnásobnú extrakciu väčším množstvom EA. Využitie kontinuálnej extrakcie by mohlo výťažok reakcie efektívne zväčšiť.

Látku **29** je možné čistiť sublimáciou (40.0 – 60.0 °C, 9 Torr).⁴⁵

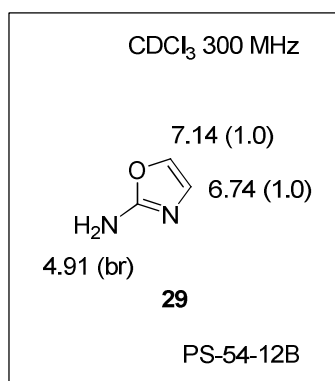
TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 3 (2 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie a pary I₂, R_f = 0.18.

Teplota topenia: 90.0 – 93.0 °C (lit. 91.0 – 94.0 °C).⁴⁶

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-54-12B) 7.14 (d, 1H, *J*(4,5) = 1.0 Hz, H-C(5)), 6.74 (d, 1H, *J*(4,5) = 1.0 Hz, H-C(4)), 4.91 (br s, 2H, NH₂).

⁴⁵ Selva, A.; Traldi, P.; Rapi, G.; Ginneschi, M.; Chelli, M. *Org. Mass Spectrom.* **1979**, *12*, 663 – 667.

⁴⁶ Cockerill, A. F.; Deacon, A.; Harrison, R. G.; Osborne, D. J.; Prime, D. M.; Ross, W. J.; Todd, A.; Verge, J. P. *Synthesis* **1976**, *9*, 591 – 593.



Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi z literatúry.⁴⁷ V literárnych zdrojoch je dostupná aj elementárna, MS, ¹³C-NMR, IR a UV/Vis spektrálna analýza zlúčeniny **29**.^{45,48,49,44}

7.3.3. Syntéza *tert*-butyl 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl (5-(hydroxymetyl) oxazol-2-yl) karbamátu (**35**)⁵⁰

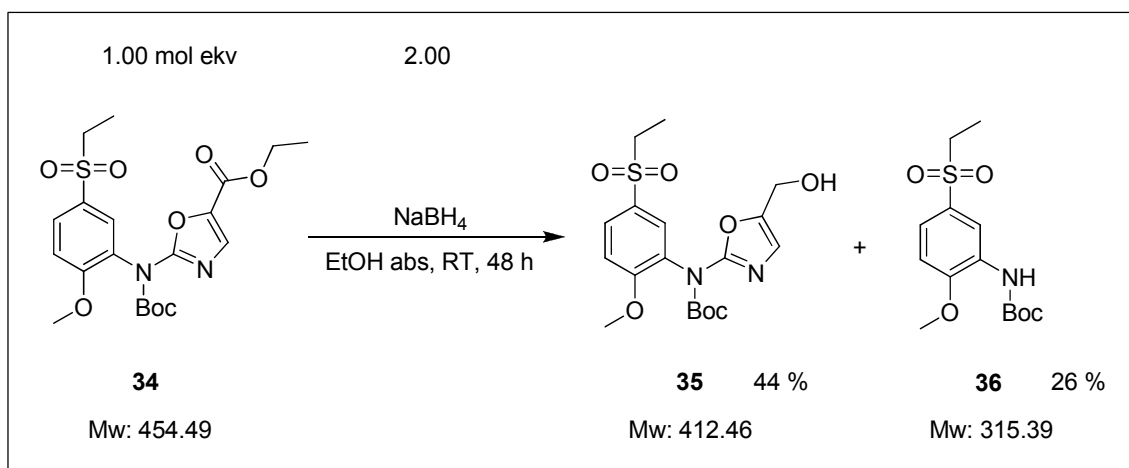


Schéma 25. Syntéza *tert*-butyl 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl (5-(hydroxymetyl) oxazol-2-yl) karbamátu (**35**).

⁴⁷ Lapiere, J. M.; Namdev, N. D.; Ashwell, M. A.; France, D. S.; Wu, H.; Hutchins, P. M.; Tandon, M.; Liu, Y.; Link, J. S.; Ali, S. M.; Brassard, Ch. J.; Nicewonger, R. B.; Filikov, A.; Carazza, R. J. Patent; Arquele Inc. WO2007/123892, **2007**, (A2).

⁴⁸ Anastasi, C.; Crowe, M. A.; Powner, M. W.; Sutherland, J. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6176 – 6179.

⁴⁹ Najer, H. et al. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1960**, 2052 – 2061.

⁵⁰ Webb, M. R.; Donald, C.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 549 – 552.

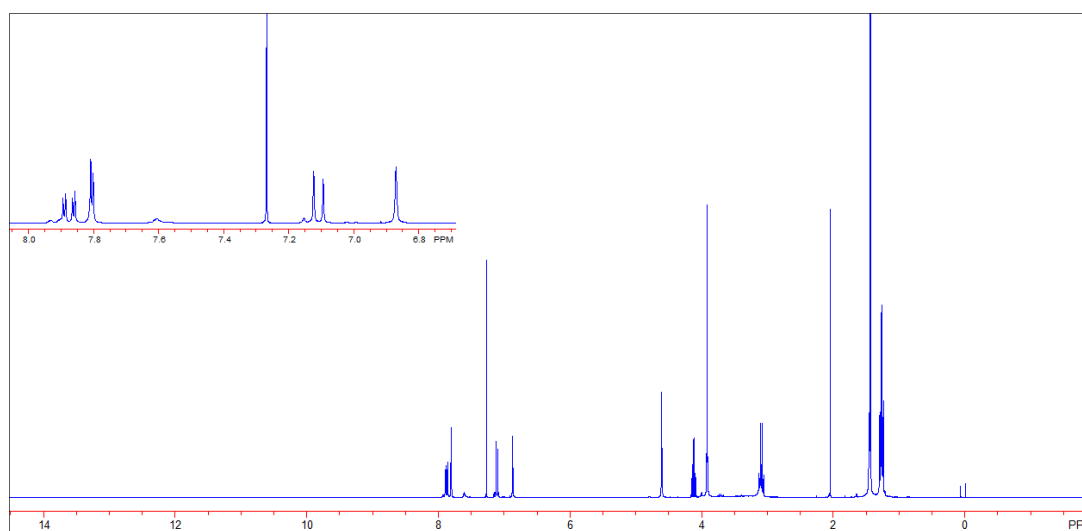
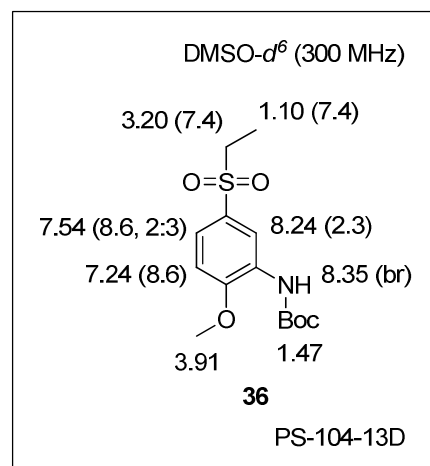
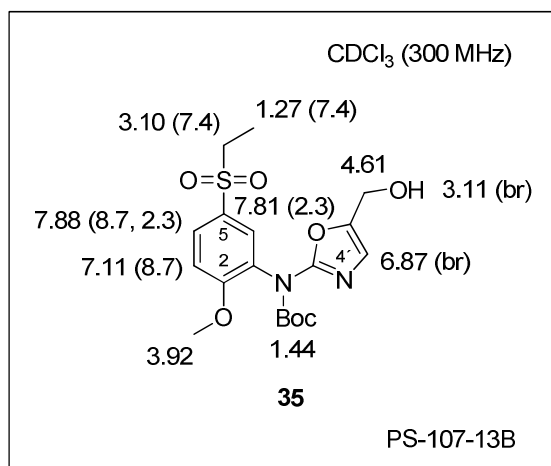
Postup syntézy: 50.0 mg (0.1 mmol, 1.00 mol ekv) látky **34** sme pod Ar atmosférou rozpustili v 2 ml MeOH abs. Do takto pripraveného roztoku sme pomaly prisypali 8.3 mg (0.2 mmol, 2.00 mol ekv) NaBH₄ (rozdelené na 3 dávky v priebehu 15 min) a nechali miešať počas 48 h. Pomocou TLC analýzy sme uskutočnili kontrolu priebehu reakcie. Po vymiznutí VL sme do RZ pridali 2 ml nasýteného roztoku NH₄Cl, extrahovali s EA (3 x 2 ml) a spojené organické vrstvy vysušili nad Na₂SO₄. Sušidlo sme odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a surový produkt dosušili na HV. Dostali sme 43.0 mg žltohnedého tuhnúceho oleja, ktorý sme čistili pomocou FLC (SiO₂, eluent H / EA v pomere 1 : 1). Po čistení sme izolovali 20.0 mg (0.05 mmol, 44.1 %) látky **35** v podobe bezfarebného oleja a 9.0 mg (0.03 mmol, 25.9 %) látky **36** v podobe bieleho kryštálu.

Poznámky: Použitý postup bol v pôvodnej literatúre aplikovaný pri premene etyl oxazol-5-karboxylátu na oxazol-5-ylmetanol s výťažkom 85 %. Reakčný čas sme skrátili z pôvodných 60 h na 48 h vzhľadom na to, že s predĺžovaním reakčného času (prípadne so zvyšovaním ekvivalentov použitého NaBH₄) dochádzalo k nežiaducemu nárastu obsahu rozkladného produktu **36** na úkor očakávaného produktu **35**.

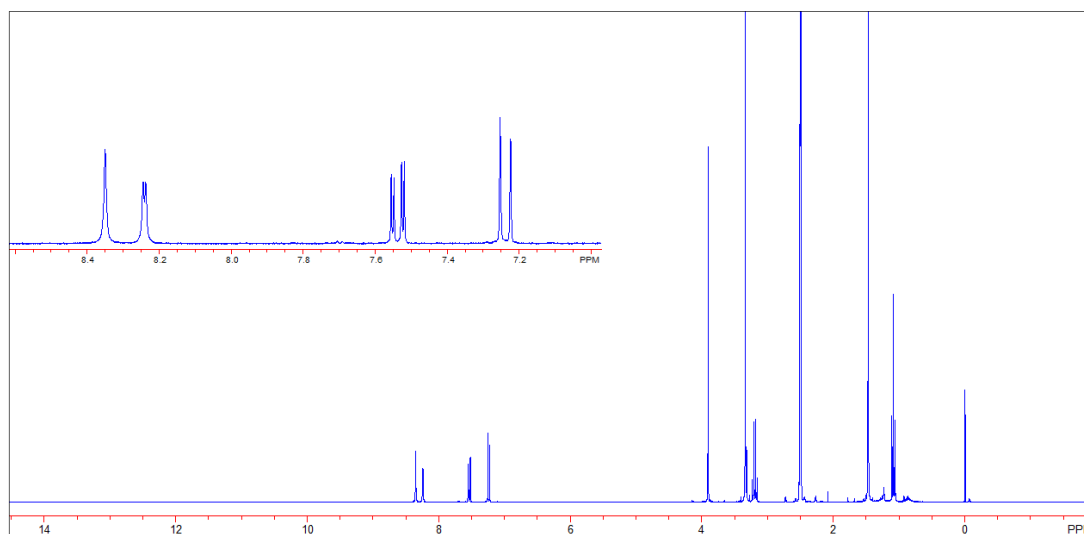
TLC analýza: Ako eluent sme použili zmes H / EA v pomere 1 : 3 (2 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f (látko **35**) = 0.10, R_f (látko **36**) = 0.67.

Teplota topenia: Látka **36**: 127.0 – 129.0 °C [FLC].

¹H-NMR analýza: (300 MHz, CDCl₃, PS-107-13B) Látka **35**: 7.88 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.7 Hz, *J*(4,6) = 2.3 Hz, H-C(4)), 7.81 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.3 Hz, H-C(6)), 7.11 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.7 Hz, H-C(3)), 6.87 (s, 1H, H-C(4')), 4.61 (s, 2H, CH₂OH), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.11 (s, 1H, CH₂OH), 3.10 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.44 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.27 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃) (300 MHz, DMSO-*d*⁶, PS-104-13D) Látka **36**: 8.35 (s, 1H, NH), 8.24 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.3 Hz, H-C(6)), 7.54 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, *J*(4,6) = 2.3 Hz, H-C(4)), 7.24 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃), 1.47 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.10 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃).

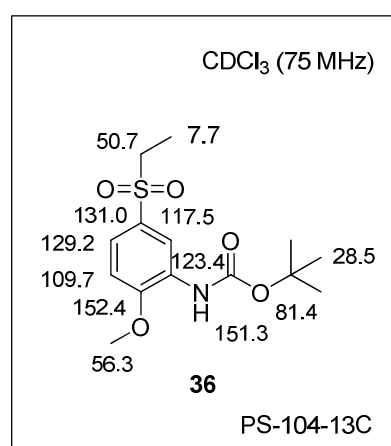
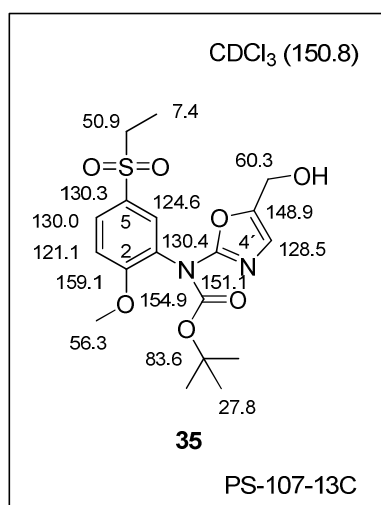


Obrázok 9. ¹H-NMR spektrum PS-107-13B.



Obrázok 10. ¹H-NMR spektrum PS-104-13D.

¹³C-NMR analýza: (150.8 MHz, CDCl₃, PS-107-13C) Látka **35**: 159.1 (C2), 154.9 (COOC(CH₃)₃), 151.1 (C2'), 148.9 (C5'), 130.4 (C1), 130.3 (C5), 130.0 (C4), 128.5 (C4'), 124.6 (C6), 112.1 (C3), 83.6 (COOC(CH₃)₃), 60.3 (CH₂OH), 56.3 (OCH₃), 50.9 (SO₂CH₂CH₃), 27.8 (COOC(CH₃)₃), 7.4 (SO₂CH₂CH₃) (75 MHz, CDCl₃, PS-104-13C) Látka **36**: 152.4 (C2), 151.3 (COOC(CH₃)₃), 131.0 (C5), 129.2 (C4), 123.4 (C1), 117.5 (C6), 109.7 (C3), 81.4 (COOC(CH₃)₃), 56.3 (OCH₃), 50.7 (SO₂CH₂CH₃), 28.5 (COOC(CH₃)₃), 7.7 (SO₂CH₂CH₃).



FR IR (solid, cm⁻¹): Látka **36**: 3431 (m), 3091 (w), 2968 (m), 2932 (m), 1721 (s), 1663 (w), 1596 (m), 1531 (s), 1482 (m), 1423 (m), 1393 (w), 1346 (w), 1305 (m), 1264 (s), 1155 (m), 1126 (s), 1088 (m), 1056 (m), 1021 (m), 899 (w), 867 (m), 808 (m) Látka **35**: Vid'. příloha. (Příloha)

MS (ESI, Pos. Mod) m/z: Látka **36**: 260.1 [M – Boc + 2Na]²⁺ (100 %), 261.1 [M – Boc + 2Na + 1H]³⁺ (9 %), 262.1 [M – Boc + 2Na + 2H]⁴⁺ (5 %), 338.1 [M + Na]⁺ (3 %) Látka **35**: Vid'. příloha. (Příloha)

8. Diskusia

8.1. Syntéza oxazolkarbaldehydu **12**

Na základe informácií z databáz Reaxys, SciFinder Scholar a dostupnej odbornej literatúry sme navrhli a následne uskutočnili syntézu 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehydu (**12**). Aldehyd **12** predstavuje dôležitý intermediát pri zamýšľanej príprave oxazolalkínu **17** vhodného pre vývoj angiogénneho inhibítora **19** s využitím [2+2+2] cykloadičnej reakcie. (Schéma 1)

Syntéza aldehydu **12** začína reakciou komerčne dostupných zlúčenín etyl chlóracetátu (**1**) a etyl formiátu (**2**), ktoré v bázičkom prostredí poskytujú etyl 2-chlór-3-oxopropionát (**3**). (Schéma 14) Z dôvodu nami pozorovanej neželanej substitúcie chlóru za etoxy skupinu v molekule látky **3**, sme postup uvedený v literatúre modifikovali nahradením EtONa stéricky náročnejšou bázou ^tBuOK. Pre lepšiu rozpustnosť ^tBuOK sme namiesto pôvodného toluénu použili zmes ^tBuOH a Et₂O. Surový produkt sme dostali vo forme svetložltého oleja s výťažkom 54 %, ktorý po uskladnení v chladničke vykryštalizoval. ¹H-NMR analýza ukázala prítomnosť cieľovej zlúčeniny (enol : keto forma = 97 % : 3 %) v dostatočnej čistote na to, aby mohla byť použitá do ďalšej reakcie. V prípade potreby je možné látku **3** čistiť destiláciou (90.0 -110.0 °C, 13 Torr), v tomto prípade však hrozia straty kvôli jej menšej termickej stabilite. Napriek tomu, že sme reakciu opakovali viac krát, dosiahnuté výťažky sa pohybovali okolo 50 – 55 %, čo je menej ako uvádza literatúra (88 %).²¹

Druhý stupeň predstavuje reakcia etyl 2-chlór-3-oxopropionátu (**3**) s močovinou **4**, ktorá po zahriatí vo vodnom prostredí poskytuje etyl 2-aminooxazol-5-karboxylát (**5**). (Schéma 15) Výsledný produkt **5** sme získali v 60 % výťažku vo forme žltohnedej tuhej látky. Reakciu sme uskutočnili na základe syntetického postupu z literatúry.²⁵ Výťažok reakcie nebol v literatúre uvedený.

^tBuOH (**6**) sme za prítomnosti NaNO₂ v kyslom prostredí premenili na ^tBuONO (**7**). (Schéma 16) Produkt **7** sme izolovali vo forme bledomodrej kvapaliny (50 % výťažok) v dostatočnej čistote na to, aby mohol byť použitý na uskutočnenie diazotačnej reakcie vedúcej k premene 2-aminooxazol-5-karboxylátu (**5**) na etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylát (**8**). (Schéma 17) Produkt reakcie **8** sme získali vo forme žltozeleného oleja s výťažkom 88

%. Zlúčeninu **8** sme vzhľadom na jej tepelnú nestabilitu a citlivosť na SiO₂ použili do ďalšieho stupňa bez ďalšieho čistenia. Postup, na základe ktorého sme reakciu uskutočnili bol v pôvodnej literatúre aplikovaný pri príprave N-regioizoméru látky **8** – t. j. etyl 2-chlóroxazol-4-karboxylátu s výťažkom 83 %.³³

Ďalším stupňom bola nukleofilná substitučná reakcia etyl 2-chlóroxazol-5-karboxylátu (**8**) s anilínom **9**, prebiehajúca adično-eliminačným mechanizmom. Po spracovaní reakcie sme získali tmavohnedý olej, z ktorého sme cieľový produkt 2-(5-etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylát (**10**) izolovali kryštalizáciou zo zmesi H / EA. Získali sme bledohnedú tuhú látku **10** vo vysokej čistote (65 % výťažok).

Premenu esteru **10** na 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)metanol (**11**) sme uskutočnili redukciou s LiAlH₄. Po spracovaní reakcie sme dostali žltohnedý olej, ktorý po kryštalizácii (H / EA) poskytol svetlú žltohnedú tuhú látku v 63 % výťažku. ¹H-NMR analýza potvrdila štruktúru zlúčeniny **11** a jej vysokú čistotu.

Premenu alkoholu **11** na 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehyd (**12**) sme uskutočnili oxidáciou s Dessovým-Martinovým činidlom (DMP) za chladenia na 0 °C počas 1.5 h. Reakcia po spracovaní poskytla tmavožltý olej, ktorý sme čistili pomocou FLC (SiO₂, eluent H / EA v pomere 1 : 6). Po čistení sme izolovali produkt **12** v podobe žltoranžovej tuhej látky s výťažkom 21 %. Látka **12** nebola doposiaľ v literatúre opísaná.

Syntézu oxazolalkínu **17** z oxazolkarbaldehydu **12**, sme sa pokúsili uskutočniť prostredníctvom Bestmannovej-Ohirovej homologizačnej reakcie. Reakciou 4-metylbenzénsulfonyl chloridu (**13**) s NaN₃ sme pripravili 4-metylbenzénsulfonyl azid (**14**) s výťažkom 94 %. Produkt **14** sme získali vo forme bielej kryštalickej látky. (Schéma 21) Po následnej reakcii látky **14** s dimetyl 2-oxopropylfosfonátom (**15**) sme získali oranžový olej, z ktorého sme po FLC čistení (SiO₂, eluent H / EA v pomere 3 : 7) izolovali dimetyl 1-diazo-2-oxopropylfosfonát (**16**) (Bestmannovo-Ohirovo činidlo) vo forme žltej olejovitej látky s výťažkom 84 %. (Schéma 22) Premenu oxazolkarbaldehydu **12** na oxazolalkín **17**, reakciou s fosfonátom **16**, sa nám napriek viacerým pokusom s rôzne modifikovanými reakčnými podmienkami uskutočniť nepodarilo. V prípade zachovania, v literatúre uvádzaných, štandardných reakčných podmienok Bestmannovej-Ohirovej reakcie aplikovanej na substrátoch podobných aldehydu **12** (rozpušťač MeOH abs, množstvo použitej bázy K₂CO₃ 2.00 až 2.50 mol ekv, množstvo použitého Bestmannovho-Ohirovo činidla 1.50 až 2.00 mol ekv, reakčná teplota 0 °C až RT) sme napriek dlhším reakčným

časom (24 h až 5 d) z reakcie izolovali vždy len východiskové látky.^{51,52,53} V prípade, keď sme štandardné reakčné podmienky modifikovali zvýšením reakčnej teploty (40 až 50 °C), použitím väčšieho množstva bázy K₂CO₃ alebo lepšie rozpustnej bázy Cs₂CO₃ (4.00 až 10.00 mol ekv), prípadne použitím väčšieho množstva Bestmannovo-Ohirovho činidla (3.00 až 5.00 mol ekv), pozorovali sme rozklad východiskovej látky **12**. Dôvodom zlyhania Bestmannovej-Ohirovej reakcie bola pravdepodobne nízka reaktivita aldehydu **12** (zníženie parciálneho kladného náboja na karbonylovom uhlíku v dôsledku elektrónového posunu zo sekundárnej amino skupiny naviazanej na oxazole) ako aj citlivosť látky **12** na bázičné prostredie pri zvýšenej teplote. (Schéma 26)

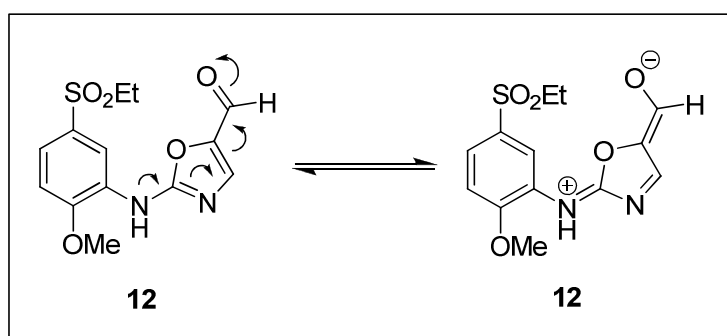


Schéma 26. Mezomérne štruktúry látky **12**.

8.2. Alternatívne syntézy

Vzhľadom na to, že syntéza oxazolalkínu **17** z oxazolkarbaldehydu **12** sa ukázala byť obtiažna, navrhli sme alternatívne postupy na prípravu angiogénneho inhibítora **19** využívajúc [2+2+2] cykloadičnej reakcie. Naším cieľom pri navrhovaní týchto syntéz bolo pripraviť reaktívny a súčasne stabilný aldehydový substrát pre úspešné uskutočnenie Bestmannovej-Ohirovej reakcie vedúcej k oxazolalkínu **17**, prípadne navrhnúť syntézu tak, aby bolo možné sa tejto reakcii vyhnúť.

⁵¹ Haustedt, L. O.; Panicker, S. B.; Kleinert M.; Hartung, I. V.; Eggert, U.; Niess, B.; Hoffmann, H. M. R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6967 – 6977.

⁵² Barbier, J.; Kirschning, A.; Gerth, K.; Jansen, R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8298 – 8307.

⁵³ Buettelmann, B.; Ceccarelli, S. M.; Jaeschke, G.; Kolczewski, S.; Porter, R. H. P.; Vieira, E. Patent; La Roche AG WO2004/80998, **2004**, (A1).

Prvá alternatívna syntéza (Schéma 2) začína, podobne ako pôvodný návrh, reakciou etyl chlóracetátu (**1**) s etyl formiátom (**2**), poskytujúcou etyl 2-chlór-3-oxopropionát (**3**) (Schéma 14) a pokračuje jeho premenou na etyl 2-aminooxazol-5-karboxylát (**5**) prostredníctvom reakcie s močovinou **4**. (Schéma 15)

Tretí stupeň predstavuje reakcia esteru **5** s Boc₂O. Táto reakcia viedla k príprave zmesi bisbokovaného etyl 2-(bis (*terc*-butoxykarbonyl)amino)oxazol-5-karboxylátu (**20**) a monobokovaného derivátu **21** v podobe žltého oleja. ¹H-NMR analýza ukázala zastúpenie látky **20** a látky **21** v pomere 97 : 3. Výťažok reakcie bol 75 % (počítané vzhľadom na majoritný bisbokovaný produkt **20**). Do ďalšej syntézy sme použili surovú zmes látok **20** a **21**. Látky **20** a **21** predstavujú nové, v literatúre neopísané, zlúčeniny.

V nasledujúcom stupni sme sa pokúsili o transformáciu esterovej skupiny východiskových látok **20** a **21** na aldehydovú skupinu s úmyslom pripraviť aminooxazolkarbaldehydový substrát s Boc chránenou aminoskupinou **22**, **23** a takto zabezpečiť vyššiu reaktivitu týchto oxazolkarbaldehydov k Bestmannovmu-Ohirovmu činidlu (prítomnosť elektrónakceptornej Boc skupiny na aminoskupine by sa mala prejaviť zvýšením elektrofilicity karbonylového uhlíka aldehydu). Transformáciu zmesi zlúčenín **20**, **21** na zmes zlúčenín **22**, **23** sme sa pokúsili uskutočniť redukciami s DIBALom v CH₂Cl₂ pri – 78 °C. Počas reakcie však dochádzalo k úplnej deštrukcii východiskových látok. Alternatívnymi spôsobmi redukcie sme sa už nezaoberali. Vzhľadom na to, že sa nám zmes aldehydov **22**, **23** nepodarilo pripraviť, v ďalšej syntéze sme nepokračovali.

Druhá alternatívna syntéza (Schéma 3) vychádza z komerčne dostupných zlúčenín 2-chlóracetaldehydu (**28**) a močoviny **4**, ktoré vo vodnom prostredí po zahriatí poskytujú 2-aminooxazol (**29**). (Schéma 24) Surový produkt sme izolovali vo forme svetložltej kryštalickej látky vo výťažku 7 %. Látku **29** sme do ďalšej syntézy použili bez dodatočného čistenia.

V syntéze sme pokračovali pokusom o premenu zlúčeniny **29** na 2-chlóroxazol (**30**) s úmyslom následnej bromácie látky **30** a prípravy 5-bróm-2-chlóroxazolu (**31**). Nukleofilnou substitučnou reakciou látky **31** s anilínom **9** sme potom chceli pripraviť 5-bróm-*N*-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)oxazol-2-amín (**32**) a tento premeniť pomocou Stilleho *couplingovej* reakcie na kľúčový oxazolalkín **17**. Diazotačnú reakciu, ktorá mala viesť k premene látky **29** na látku **30** sa v dôsledku deštrukcie VL uskutočniť nepodarilo. Pomôcť by mohlo zníženie reakčnej teploty z pôvodných 80 °C na 40 °C alebo RT, túto

možnosť sme však zatiaľ neoverili. Ďalšou modifikáciou tejto syntetickej cesty sme sa nezaoberali.

Tretia alternatívna syntéza začína premenou etyl 2-(*tert*-butoxykarbonyl(5-etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)aminoxazol-5-karboxylátu (**34**)⁵⁴ na *tert*-butyl 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl (5-(hydroxymetyl)oxazol-2-yl)karbamát (**35**) s využitím NaBH₄. Po spracovaní reakcie sme dostali žltohnedý tuhnúci olej, z ktorého sme pomocou FLC (SiO₂, eluent H / EA v pomere 1 : 1) izolovali látku **35** vo forme bezfarebného oleja s výťažkom 44 %. Okrem toho sme izolovali vedľajší rozkladný produkt **36** vo forme bielej kryštalickej látky s výťažkom 26 %. (Schéma 27) Látky **35** a **36** predstavujú nové, doteraz neopísané, zlúčeniny.

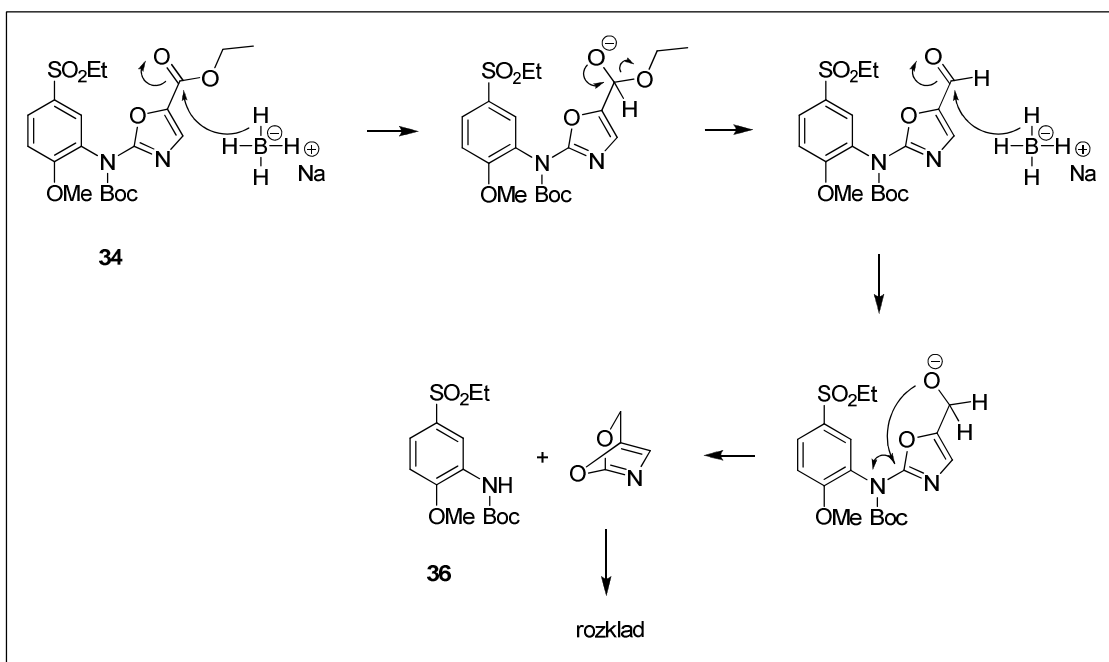


Schéma 27. Mechanizmus vzniku vedľajšieho rozkladného produktu **36** počas reakcie esteru **34** s NaBH₄.

V ďalšom kroku sme sa pokúsili o oxidáciu zlúčeniny **35** na *tert*-butyl 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl(5-formyloxazol-2-yl)karbamát (**37**) pomocou Dessovho-Martinovho činidla. Naším cieľom bolo overiť, či bokom chránený aldehyd **37** bude natoľko reaktívny a stabilný, aby mohol reakciou s Bestmannovým-Ohirovým činidlom poskytnúť oxazolalkínový intermediát **38**, ktorý sme plánovali použiť na prípravu inhibítora **19**.

⁵⁴ Ribar, P. *Diplomová práca* 2013, PRIF UK, Bratislava.

Syntéza látky **37** Dessovou-Martinovou oxidáciou látky **35** však nebola úspešná. Výsledkom reakcie prebiehajúcej počas 5 d pri RT bola izolácia VL. Zvýšenie reakčnej teploty by mohlo priebeh tejto oxidácie umožniť, no túto teóriu sme zatiaľ neoverili. O prípravu látky **37** sme sa pokúsili aj pomocou redukcie esteru **34** DIBALom, no tiež bez pozitívneho výsledku. Po spracovaní reakcie sme izolovali nebokovaný alkohol **11** a vedľajší rozkladný produkt **36**. Ďalšou modifikáciou a optimalizáciou syntézy sme sa z dôvodu nedostatku času už nezaoberali.

9. Záver

V rámci diplomovej práce sa nám podarilo úspešne pripraviť 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karbaldehyd (**12**), predstavujúci dôležitý intermediát pri príprave oxazolalkínu **17** vhodného pre vývoj angiogénneho inhibítora **19** pomocou [2+2+2] cykloadičnej reakcie. Premenu oxazolkarbaldehydu **12** na oxazolalkín **17** pomocou Bestmannovej-Ohirovej reakcie sa nám nepodarilo zrealizovať. (Schéma 1) Dôvodom zlyhania tejto reakcie je pravdepodobne nízka reaktivita karbonylového uhlíka v molekule látky **12**, spôsobená prítomnosťou aminoskupiny naviazanej na oxazolovom jadre. Mezoméry posun elektrónovej hustoty z dusíka aminoskupiny cez oxazolové jadro až na karbonylový uhlík, deaktivuje elektrofilné vlastnosti karbaldehydovej skupiny látky **12**. Pokusom o riešenie tohto problému bol návrh a uskutočnenie prípravy oxazolalkínu **17**, v ktorej by premena aldehydovej skupiny na alkínovú pomocou Bestmannovej-Ohirovej reakcie bola nahradená premenou brómoxazolu **32** na oxazolalkín **17** za podmienok Stilleho *couplingovej* reakcie. (Schéma 3) Syntézu brómoxazolu **32** sa však, kvôli problematickej príprave intermediátu **30**, uskutočniť nepodarilo. Ako najperspektívnejšie riešenie problému nízkej reaktivity karbonylového uhlíka v molekule **12** sme navrhli chránenie problematickej aminoskupiny skupinou Boc, čím by mohlo dôjsť k zníženiu intenzity posunu elektrónov na aldehydovú skupinu a tým pádom k zvýšeniu jej reaktivity. (Schéma 2, Schéma 4) Syntézu navrhnutých aldehydových substrátov s Boc chránenou aminoskupinou **22**, **23** a **37** sa nám zatiaľ nepodarilo uskutočniť. Stále však zostáva viacero možností ako navrhnuté postupy modifikovať a Boc chránené aldehydové substráty pripraviť. Zaujímavou možnosťou je alternatívny spôsob redukcie esterovej skupiny látok **20**, **21** na aldehydovú skupinu s využitím NaBH₄, alebo prípadne na alkoholovú skupinu a jej následnú oxidáciu na aldehydovú napr. pomocou DMP, MnO₂ alebo PCC. Ďalšou možnosťou by mohol byť pokus oxidáciu alkoholu **35** na karbaldehyd **37** napr. pomocou MnO₂ alebo PCC, prípadne priame zavedenie Boc skupiny na pripravený karbaldehyd **12** za vzniku karbaldehydu **37**. Do úvahy prichádza aj modifikácia reaktivity karbaldehydu **12** voči Bestmannovmu-Ohirovmu činidlu chránením jeho aminoskupiny inou, elektrónakceptornejšou, skupinou napr. Ac-, Ts-, či F₃CCO-.

Summary

Within the thesis, we have successfully prepared 2-(5-(ethylsulfonyl)-2-methoxyphenylamino)oxazole-5-carbaldehyde (**12**), representing an important intermediate in the preparation of oxazolealkyne **17**. Compound **17** is proposed to be suitable for the development of angiogenic inhibitor **19** by [2+2+2] cycloaddition reaction. We did not manage to perform the conversion of oxazolecarbaldehyde **12** to oxazolealkyne **17** by means of Bestmann-Ohira reaction. (Scheme 1) The reason for failure of this reaction is probably the low reactivity of carbonyl carbon in the molecule of aldehyde **12**, due to the presence of the amino group bound to the oxazole ring. The mesomeric shift of the electron density from nitrogen the amino group through the oxazole to the carbonyl carbon deactivates the electrophilic properties of the carbaldehyde group of **12**. The attempt to solve this problem was the design and implementation of the preparation of oxazolalkyne **17**, in which the conversion of the aldehyde group to alkyne by Bestmann-Ohira reaction was replaced by converting bromooxazole **32** to oxazolealkyne **17** performed by Stille coupling reaction. (Scheme 3) The synthesis of bromooxazole **32**, however, because of the problematic preparation of intermediate **30** could not be achieved. As the most promising solution to the problem of low reactivity of the carbonyl carbon in the molecule **12**, we have proposed the Boc protection of the problematic amino group, which may reduce the intensity of the electron shift to the aldehyde group and thus to increase its reactivity. (Scheme 2, Scheme 4) We have not yet managed to perform the synthesis of the aldehyde substrates designed with Boc protected amino group **22**, **23** and **37**. In spite of that, there are still several possibilities how to modify designed procedures and to prepare the Boc protected aldehyde substrates. An interesting possibility is an alternative way of reducing the ester group of compounds **20**, **21** to the aldehyde group by using NaBH₄, or directly to the hydroxyl group and its subsequent oxidation to the aldehyde functionality, by e.g. DMP, MnO₂ or PCC. Another option could be an attempt of the oxidation of alcohol **35** to carbaldehyde **37** by means of MnO₂ or PCC, or direct introduction of Boc group to the prepared carbaldehyde **12** resulting in carbaldehyde **37**. Another possibility is the modification of reactivity of the carbaldehyde **12** to Bestmann-Ohira reagent, by protecting his amino group by another, more electron withdrawing group such as Ac-, Ts- or F₃CCO-.

10. Príloha

