

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká Fakulta
Katedra organickej chémie

**Syntéza inhibítora s amidickou skupinou využívajúceho sol'no-môstikové vrecko
VEGFR2 receptoru**

Diplomová práca

Študijný odbor: 4.1.14 Chémia

Študijný program: Organická a bioorganická chémia

Školiace pracovisko: Katedra organickej chémie

Školiteľ: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava, 15.4.2014

Bc. Miroslav Murár



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Bc. Miroslav Murár
Študijný program: organická a bioorganická chémia (Jednoodborové štúdium, magisterský II. st., denná forma)
Študijný odbor: 4.1.14. chémia
Typ záverečnej práce: diplomová
Jazyk záverečnej práce: slovenský
Sekundárny jazyk: anglický

Názov: Syntéza inhibítora s amidickou skupinou využívajúceho soľno-môstikové vrecko VEGFR2 receptoru
A synthesis of amidic group possessing inhibitor exploiting a salt bridge containing pocket of VEGFR2 receptor

Literatúra: odborné databázy Reaxys, SciFinder Scholar, primárna vedecká literatúra

Cieľ: Príprava počítačom navrhnutého inhibítora VEGFR2 receptoru, zabezpečenie biologického testovania

Kľúčové slová: VEGFR2, oxazol, soľno-môstikové vrecko VEGFR2 receptoru

Vedúci: doc. RNDr. Andrej Boháč, CSc.
Oponent: doc. Fridrich Gregáň, CSc.
Katedra: PriF.KOrCh - Katedra organickej chémie
PriF vedúci katedry: doc. RNDr. Martin Putalá, CSc.

Spôsob sprístupnenia elektronickej verzie práce: dočasne neprístupná, po uplynutí bez obmedzenia

Dátum zadania: 12.05.2013

Dátum schválenia: 28.04.2014

doc. RNDr. Martin Putalá, CSc.
vedúci katedry


študent

vedúci práce, oponent

Prehlásenie

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

V Bratislave 2. 5. 2014

Miroslav Murár

PodĎakovanie :

Týmto chcem poďakovať môjmu školiteľovi doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. za odborné vedenie počas diplomovej práce. Vďaka radám sa vysvetleniam teoretických, ale aj praktických skutočností sa mi ozrejmili nie na prvý pohľad zrejmé skutočnosti, čo mi boli nápomocné pri pochopení problematiky. Tiež sa chcem školiteľovi doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. poďakovať za úsilie venované tejto práci pri jej korekcii a formálnych úpravách. Spoločnosti Biomagi ďakujem za poskytnutý koncept soľno - mostikového vrecka (SBCP), ako aj za počítačom predpovedané štruktúry potenciálnych VEGFR2 inhibítorov.

Ďakujem i kolektívu spektrálnych metód, ktorý do tejto práce poskytl zamerané NMR a MS spektrá. Moje poďakovanie chcem vyjadriť aj všetkým osobám, ktoré akokoľvek prispeli k realizácii tejto práce: členovia katedry organickej chémie a mojej rodine.

OBSAH

1	Grafický abstrakt	8
1.1	Prvý návrh syntézy acetamidu TM	8
1.2	Druhý návrh syntézy acetamidu TM	9
1.3	Abstrakt ¹ H-NMR spektier	10
	CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	13
2	ÚVOD	13
3	TEORETICKÁ ČASŤ.....	14
3.1	Proteínová databanka (PDB)	14
3.2	Ľudský kinóm	15
3.3	Tyrozínkinázy	17
3.3.1	VEGFR receptory.....	19
3.3.2	Biologická funkcia VEGFR2	21
3.3.3	Štruktúra SBCP (Salt Bridge Containing Pocket).....	22
3.3.4	NRPs receptory	25
3.4	Oxazolové inhibítory VEGFR2 opísané v literatúre	26
3.4.1	Prehľad štruktúr aktívnych inhibítorov VEGFR2 obsahujúcich oxazol	27
3.5	Predpovedané interakcie VEGFR2 TK ligandu TM	29
3.6	Prvý návrh syntézy acetamidu TM.....	31
3.6.1	Príprava acetofenónu 2 bromáciou substrátu 1	31
3.6.2	Príprava acetofenónu 3 bromáciou substrátu 2	32
3.6.3	Príprava acetonitrilu 4 nukleofilnou substitúciou z 3.....	34
3.6.4	Príprava 5 bromáciou nitrilu 4	35
3.6.5	Príprava azidu 6 z bromidu 5	37
3.6.6	Príprava aminooxazolu 7 reakciou izokyanátu 28 a azidu 6.....	38
3.6.7	Príprava 8 z bróm derivátu 7 couplingovou reakciou	43
3.6.8	Príprava amidu TM kyslou hydrolýzou nitrilu 8.....	45

3.7	Druhý návrh na syntézu acetamidu TM	46
3.7.1	Príprava 2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetamidu (9)	47
3.7.2	Príprava acetamidu 10 bromáciou acetofenónu 9	49
3.7.3	Príprava azidu 11 nukleofilnou substitúciou brómderivátu 10	50
3.7.4	Príprava oxazolu 12 z azidu 11	51
3.7.5	Príprava TM couplingovou reakciou z 12	52
4	Experimentálna časť	53
4.1	Metódy a použitý materiál	53
4.2	Príprava 1-(3-bróm-4-metylfenyl)etanónu (2)	53
4.3	Príprava 1-(3-bróm-4-(brómmetyl)fenyl)etanónu (3)	55
4.4	Príprava 2-(4-acetylphenyl)acetonitrilu (4)	58
4.5	Príprava 2-(2-bróm-4-(2-brómacetyl)fenyl)acetonitrilu (5)	60
4.6	Príprava 2-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetonitrilu (6)	63
4.7	Príprava 2-(2-brómo-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)fenyl)acetonitrilu (7)	64
4.8	Príprava 2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyridín-2-yl)fenyl)acetonitrilu (8)	67
4.9	Príprava 2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetamidu (9)	70
4.10	Príprava 2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenyl)acetamidu (TM)	71
5	Diskusia	72
6	Záver	76

Abstrakt

Miroslav Murár: Syntéza inhibítora s amidickou skupinou využívajúceho soľno-môstikové vrecko VEGFR2 receptoru

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie

Diplomová práca, 77 strán, 2014

V práci sme skúmali prípravu cieľovej molekuly 2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyridin-2-yl)fenyl)acetamidu (**TM**). Syntéza molekuly **TM** nebola doposiaľ opísaná a ani testovaná voči VEGFR2 TK. Počítačové predikcie ukázali **TM** ako molekulu s inhibičnou aktivitou voči VEGFR2 potenciálne využiteľnú pri liečbe nádorových ochorení utlmením nádorovej angiogenézy. Prvý spôsob prípravy obsahuje perspektívny syntetický postup ako získať látku **TM**.

V práci sme sa venovali aj optimalizácii nízkovýťažkovému syntetickému stupňu pri ktorom vzniká oxazolové jadro.

Abstract

Miroslav Murár: Synthesis of amidic group possessing inhibitor exploiting a salt bridge containing pocket of VEGFR2 receptor.

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

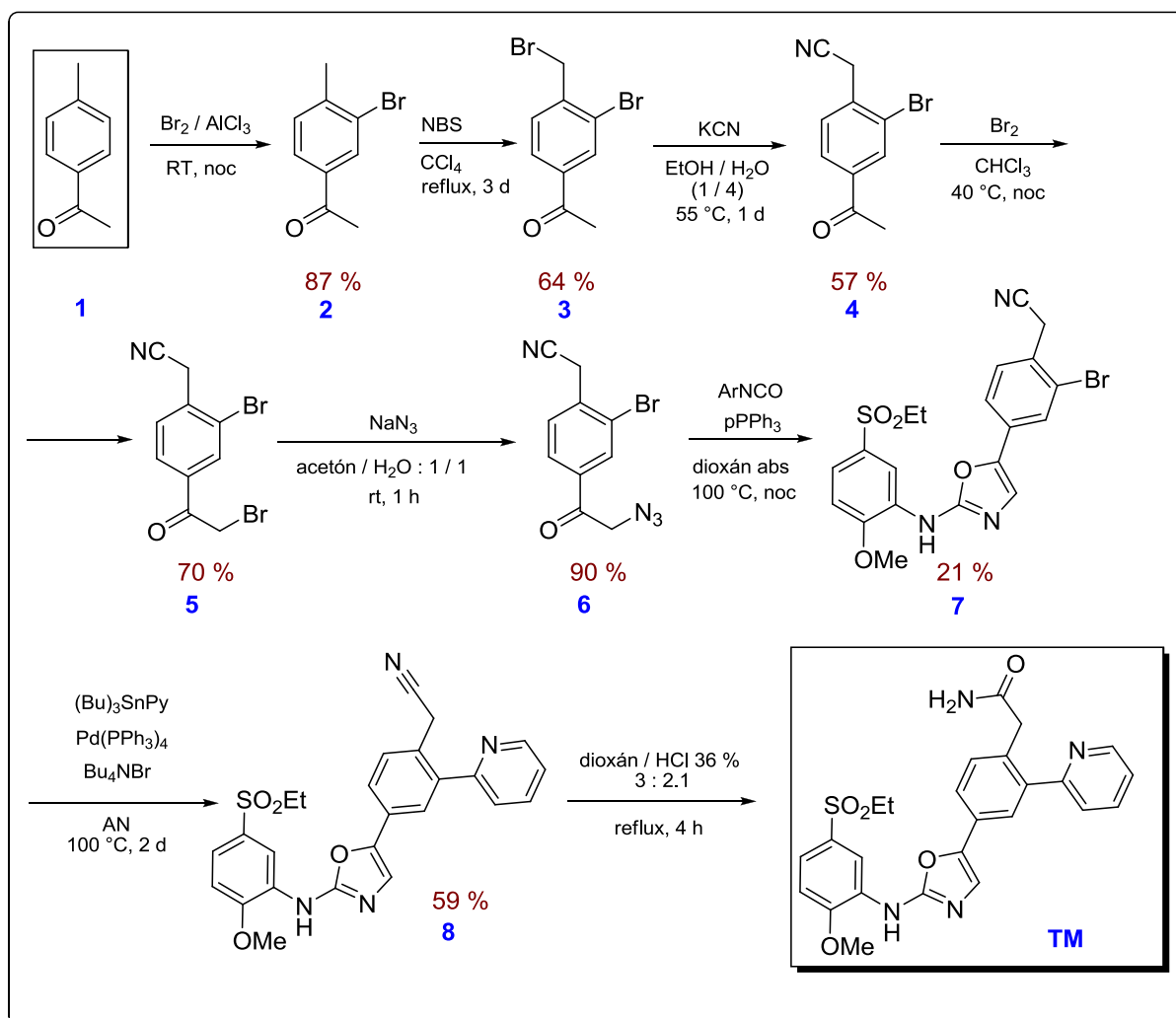
Diploma work, 77 pp., 2014

The diploma work is focused on a preparation of 2-(4-(2-(5-(ethylsulfonyl)-2-methoxyphenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyridin-2-yl)phenyl)acetamide (**TM**). Synthesis of this compound has not been described in the literature or tested on VEGFR2. Computer calculations predicted **TM** as VEGFR2 inhibition and its potential use in the treatment of cancer by inhibition of angiogenesis. The first proposed synthetic pathway describes a prospective procedure to prepare **TM**.

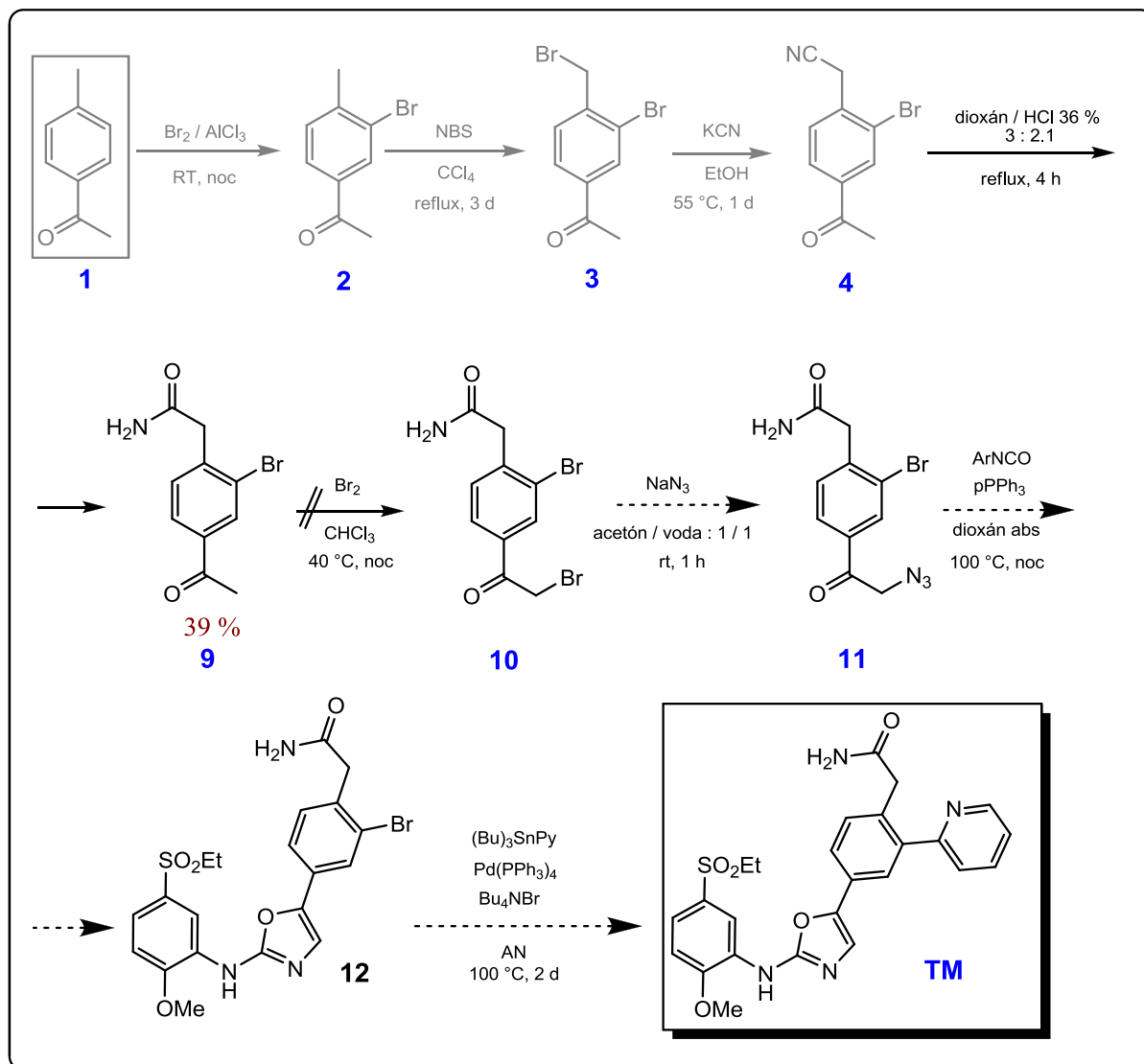
In diploma work, we also investigated optimization of low yielding oxazole formation reaction step by „azaylide method“.

1 Grafický abstrakt

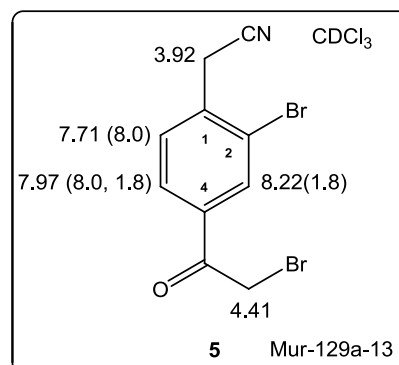
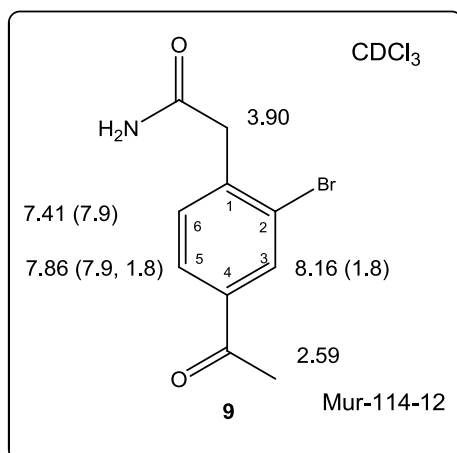
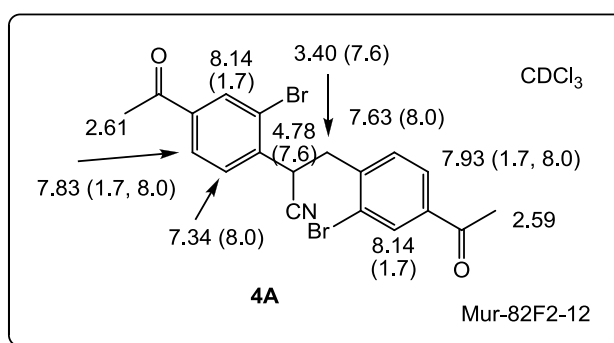
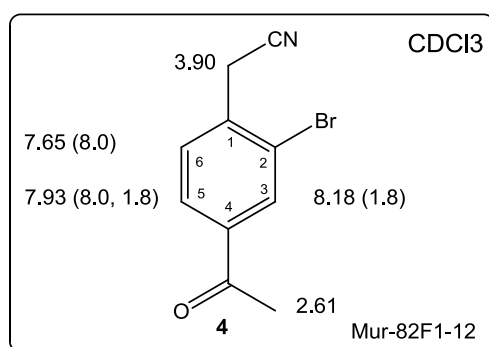
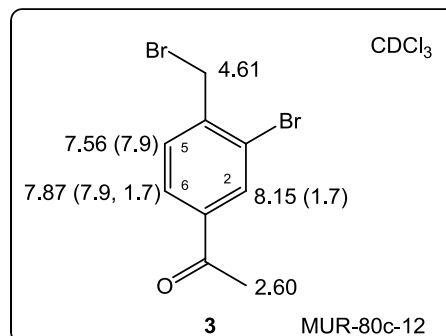
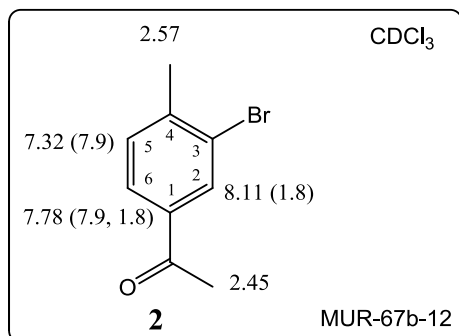
1.1 Prvý návrh syntézy acetamidu TM

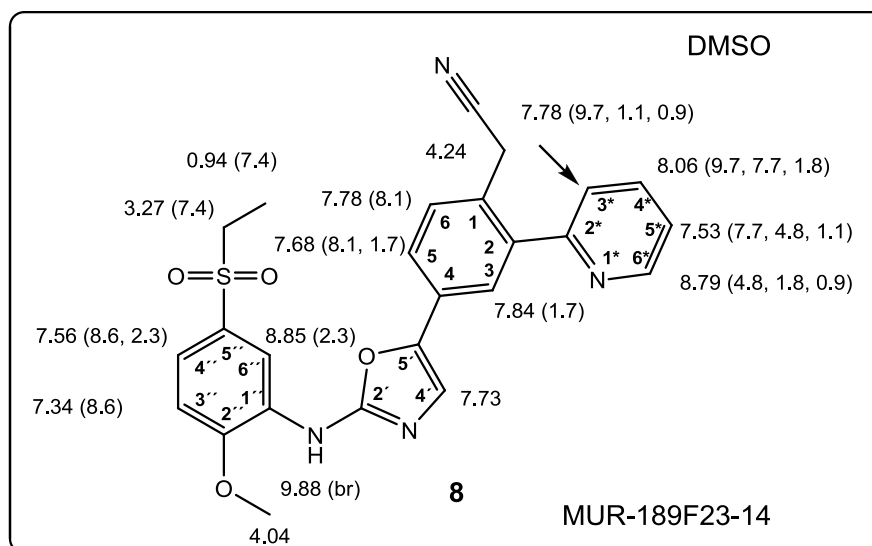
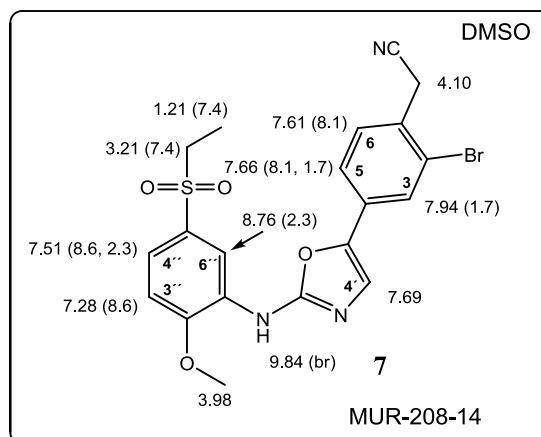
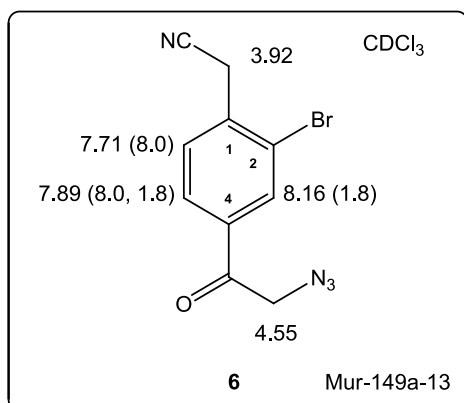


1.2 Druhý návrh syntézy acetamidu TM



1.3 Abstrakt ^1H -NMR spektier





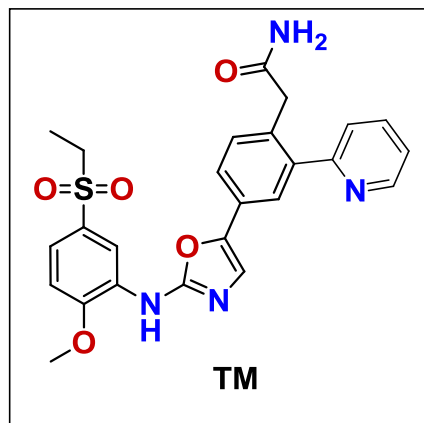
KLÍČOVÉ SLOVÁ

VEGFR2 tyrozín kináza, SBCP doména (solný můstik obsahující vrecko), VEGFR2 inhibitor, oxazol, syntéza

POUŽITÉ SKRATKY

(BzO) ₂	dibenzoylperoxid
1VR2	VEGFR2 tyrozín kináza
1Y6A	VEGFR2 kináza v komplexe s <i>N</i> -[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifynyl]-5-[3-(pyrid-2-yl)fenyl]oxazol-2-amínom
3C7Q	VEGFR2 kináza v komplexe s metyl (<i>E</i>)-3-(2-{4-[<i>N</i> -metyl-3-(4-metylpiperazin-1-yl)propánamido]fenyl}-1-fenyletylidén)-2-oxoindolín-6-karboxylátom
AAZ	ligand VEGFR2 komplexu (PDB: 1Y6A): <i>N</i> -(5-(etylsulfonyl)-2-metoxifynyl)-5-(3-(pyrid-2-yl)fenyl)oxazol-2-amín
ABL1	proteín, ktorý je kódovaný génom ABL1 na chromozóme 9
AIBN	azobis(isobutyronitril)
AN	acetonitril
Asn	asparagín
ATP	adenozíntrifosfát
CSCs	Cancer Stem Cells (rakovinové kmeňové bunky)
DFG	fragment predstavujúci prvé tri aminokyselinové zvyšky aktivačnej slučky kinázy (Asp/Phe/Gly)
EA	etyl acetát
EGF	epidermálny rastový faktor (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	epidermálny rastovo faktorový receptor (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
Fyn	kináza skupiny Src
HBA	akceptorná vodíková väzba (<i>hydrogen bond acceptor</i>)
HBD	donorná vodíková väzba (<i>hydrogen bond donor</i>)
HGF	hepatocytový rastový faktor
IC ₅₀	koncentrácia inhibítora, ktorá je potrebná na polovičné spomalenie enzýmovej aktivity
MEK	proteín signálizačnej cesty Ras-Raf-MEK-ERK
MET	kinázový receptor pre hepatocytový rastový faktor (HGF)
NOS3	syntetáza oxidu dusnatého typ 3
NRPs	Neurofilíny (<i>neuropilins</i>)
PDB	databáza 3D štruktúr biomakromolekúl (<i>Protein Data Bank</i>)
PTK2/FAK	proteín tyrozín kináza 2 alebo aj fokálna adhézna kináza
Ras	proteín signálizačnej cesty Ras-Raf-MEK-ERK
SBCP	Salt Bridge Containing Pocket (vrecko obsahujúce soľný mostík)
TBAF	tetrabutylamónium fluorid
TEBA	benzyltrietylamónium chlorid
TK	tyrozínkináza
VEGFR1 / 2 / 3	vaskulárny endoteliálny rastový faktorový receptor 1 / 2 / 3 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)

objavenú väzobnú oblasť, ktorá bola nazvaná *Salt Bridge Containing Pocket* (SBCP). 2-(4-{2-[5-(Etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-yl}-2-(pyrid-2-yl)fenyl)acetamid (**TM**) predstavuje jednu z takto navrhnutých štruktúr.



Časť diplomovej práce venujeme príprave **TM**, ktorú po jej získaní dáme testovať na VEGFR2 inhibičnú aktivitu.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Proteínová databanka (PDB)

PDB je voľne dostupná databáza sústreďujúca experimentálne 3D štruktúry hlavne proteínov a nukleových kyselín založených na RTG, prípadne NMR štruktúrnych meraniach a ich analýze.¹ V PDB databáze môžeme okrem priestorového usporiadania v komplexoch biomakromolekúl nájsť aj informácie o štruktúre ich ligandov (inhibítorov, alebo promótorov), ich interakciách, aktivite, väzbovom mieste atď. PDB databáza má veľký význam pre medicínsku chémiu, molekulárnu biológiu, farmáciu, medicínu a iné vedné oblasti z oblasti vied o živote „*life sciences*“. Prínos PDB databázy je nezastupiteľný pre štúdium štruktúry proteínov, pri vyhľadávaní vhodných väzbových domén, nosných skeletov budúcich liečiv, posudzovaní vhodných skupín ligandov na interakcie atď.

Aktuálne PDB databáza obsahuje informácie o viac ako 99 775 štruktúrach (údaj k 3.5.2014) a ich počet neustále narastá. Štruktúry v PDB databáze sú voľne prístupné a je možné s nimi pracovať vo viacerých zobrazovacích programoch napr.: VMD, MDL Chime, Pymol, UCSF Chimera, Rasmol, Swiss-PDB Viewer, Discovery Studio...

Vzhľadom na ciele diplomovej práce, PDB databáza bola využitá na komplexnú analýzu všetkých publikovaných 34 VEGFR2 TK štruktúr a na návrh štruktúry inhibítora **TM** využívajúceho interakciu s novou, nedávno objavenou väzobnou oblasťou SBCP. SBCP sa nachádza len v určitých, vzácné opísaných, konformáciách inaktívnej (DFG-out) VEGFR2 tyrozín kinázy ktorá má otvorenú aktivačnú slučku (A-slučka) a obsahuje inhibítor typu I.²

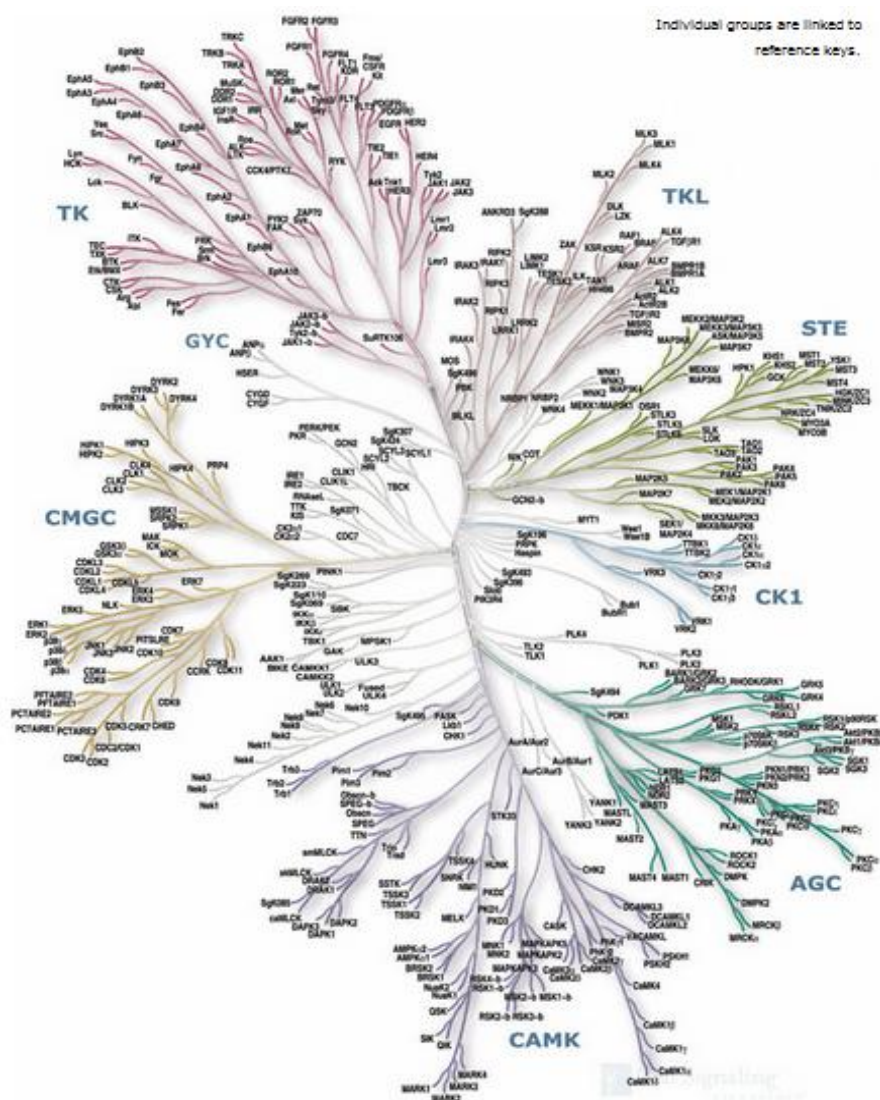
3.2 Ľudský kinóm

Kinóm je grafické vyjadrenie súboru ľudských proteínkináz. Ako príklad zložitosti a komplexnosti kinázovej skupiny enzýmov môžeme uviesť, že zatiaľ čo sa u kvasiniek vyskytuje 50 proteínkináz, v ľudskom kinóme je ich opísaných až 518. Všetky proteín kinázy v ľudskom tele môžeme rozdeliť do skupín, rodín, a podrodín. (Obr. 1) Kinázy v kinóme sú charakterizované ich DNA sekvenčnou príbuznosťou a následne aj podobnosťou primárnej sekvencie aminokyselín v konkrétnej proteín kináze voči ostatným členom kinómu. V praxi možno tieto poznatky využiť, ak vieme proteín kinázu zaradiť do charakteristickej skupiny na ktorú poznáme efektívne inhibítory, potom na základe podobnosti aktívneho, alebo alosterického miesta vieme predpovedať aj štruktúru modulátora k tejto kináze.

Na kinázovom dendrograme (Obr. 1) vidíme niekoľko farebne odlišných skupín, pričom ich vzájomná vzdialenosť je úmerná nepodobnosti primárnej sekvencie aminokyselín. Čím sú od seba kinázy, alebo ich skupiny ďalej, tým sú si menej podobne a naopak. Ako príklad možno uviesť tyrozínkinázy, ktoré tvoria samostatnú skupinu, pretože fosforylujú proteíny na tyrozínových zvyškoch, zatiaľ čo ostatných 6 kinázových domén, uvedených v kinóme, fosforyluje serínové / treonínové aminokyselinové zvyšky. V dendrograme sa nachádza aj 40 atypických kináz, ktoré nemajú sekvenčnú podobnosť s predošlými skupinami, avšak je o nich známe, že majú kinázovú aktivitu.³

² Lintnerová, L.; García-Caballero, M.; Gregáň, F.; Melicherčík, M.; Quesada, A. R.; Dobias, J.; Lác, J.; Sališová, M.; Boháč, A. *Eur J. Med. Chem.* **2014**, 72, 146-159.

³ <http://www.cellsignal.com/reference/kinase/index.html/> (5.1.2014)



Obr. 1. Kinázový dendrogram vyjadruje, pomocou vzájomnej vzdialenosti jednotlivých kináz v grafe, sekvenčnú podobnosť aminokyselinových zvyškov medzi katalytickými doménami.

Proteínkinázy sú vo všeobecnosti enzýmy, ktoré zaradujeme do skupiny transferáz. Katalyzujú prenos fosfátovej skupiny z ATP na molekulu akceptora (proteínu) za vzniku fosfoesterovej väzby. Dôležitým faktom je uvedenie si významu fosfátovej skupiny. Fosfát predstavuje náboje nesúcu skupinu, ktorá po naviazaní sa na proteín môže spôsobiť významnú konformačnú zmenu jeho štruktúry, a teda aj možnú zmenu jeho biologickej funkcie. Preto sú kinázy významnou súčasťou mnohých biologických signálnych dráh, a predstavujú kľúčové regulátory bunkových funkcií.⁴ Keďže kinázy riadia taký zložitý systém ako je bunka, patria medzi jednu z funkčne najviac diverzifikovaných skupín.

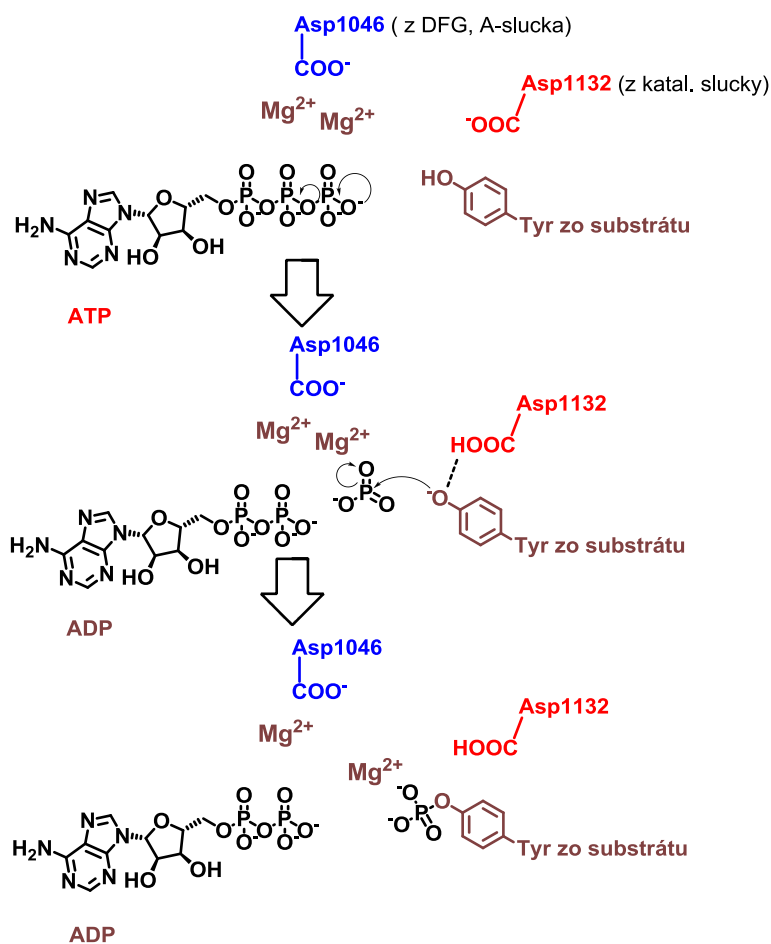
⁴ Hidehisa, I.; Shinichi, I.; Akira, H.; Hixon, M. S.; Hiroyuki, K.; Hiroshi, M. *Biol. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5342-5351.

3.3 Tyrozínkinázy

Tyrozínkinázy (TK) sú enzýmy, ktoré selektívne katalyzujú prenos koncovej fosfátovej skupiny ATP na tyrozínové zvyšky niektorých biomakromolekúl v bunke. (Obr. 2 a 3)



Obr. 2. Komplex PDB: IR3 získaný kokryštalizáciou kinázy (*activated insulin receptor tyrosine kinase*) so stabilným ATP analógom (mostikový kyslík v terminálnej difosfátovej väzbe v ATP bol kvôli stabilite nahradený NH skupinou). Strieborným je na TK vyznačený naviazaný cytosolický proteín ktorý má byť fosforylovaný na jeho tyrozínovom zvyšku (Tyr je vyznačený žltým). Aktívna kináza má A-slučku vyznačenú žltou farbou so štruktúrou DFG-in fragmentu (žlté AA aminokyselinové zvyšky na začiatku A-slučky). Asp1046 zvyšok z DFG: chelatuje dva Mg^{2+} ióny, ktoré napomáhajú prenosu fosfátu. Katalytická slučka obsahuje Asp1132 aminokyselinový zvyšok (vyznačený červenou). Táto aminokyselina je nevyhnutná pre katalytickú aktivitu kinázy. (publikované s dovoľením spoločnosti Biomagi)



Obr. 3. Navrhnutý chemický mechanizmus prenosu fosfátu z ATP na tyrozínový zvyšok substrátu. Aminokyselinové zvyšky sú sekvenčne číslované ako v PPD: 1VR2 (VEGFR2 kináza).⁵ (publikované s dovolením spoločnosti Biomagi)

Normálne o aktivite transmembránových kináz rozhoduje naviazanie sa rastového faktoru na ich extracelulárnu doménu. Následne sa aktivovaný TK receptor konformačne zmení, homodimerizuje a naviaže ATP do jeho intracelulárneho aktívneho miesta s kinázovou aktivitou. Potom dochádza k vzájomnej autofosforylácii oboch kináz v homodimérii a následne aj k prenosu fosfátu na substrát (iný proteín z cytosolu). Fosfátová skupina sa pritom prenáša z ATP pomocou kinázového katalyzátora (kinázy obsiahnutej v receptore) k tyrozínovému aminokyselinovému zvyšku substrátu. Táto fosfátová skupina následne spôsobí zmenu v biologickej funkcii fosforylovaného proteínu. Fosforylácia proteínov ovplyvňuje množstvo ich biologických vlastností napr. zapnutie alebo vypnutie ich katalytickej aktivity, alebo umožňuje interakcie fosforylovaného proteínu s inými

⁵ prevzaté od Biomagi s.r.o., Bratislava, 2013.

biomakromolekulami bunky, či presnosť signálu až do bunkového jadra. V jadre sa takto ovplyvní expresia príslušných génov. Tyrozínkinázy fungujú na princípe prenosu signálu v signalizačnej kaskáde. Informácia pochádzajúca z rastového faktoru sa preniesie z extracelulárnej časti transmembránového kinázového receptora do cytoplazmy bez toho, aby rastový faktor musel prejsť cez membránu do vnútra bunky.

Niektoré mutácie tyrozínkináz môžu znamenať vážne nebezpečenstvo. Kritické sú najmä mutácie, ktoré majú za následok permanentne zapnutú, od rastového faktoru nezávislú aktivitu kináz spojenú s neregulovanou fosforyláciou príslušných proteínov v bunke. Ďalším problémom mutácie kináz je ich získaná rezistencia na liečivo (TK inhibítor), čo následne vedie k necitlivosti na liečbu ochorení. Z tohto dôvodu je dôležitý vývoj rôznych typov PK inhibítorov. Kinázy predstavujú mimoriadne významné biologické ciele pre vývoj liečiv zameraných napr. na nádorové ochorenia.⁴

3.3.1 VEGFR receptory

VEGFR sú receptory, ktoré v organizme plnia rôzne funkcie:

VEGFR1 je dôležitý pri zachytení VEGF, proliferácii buniek a ich diferencovaní

VEGFR2 je dôležitý pre angiogézu a vaskulogézu

VEGFR3 je kľúčový pri lymfangiogéze

Receptory VEGFR sa vyskytujú hlavne na povrchu endotelových buniek. Po čase sa zistilo, že sú prítomné aj na niektorých druhoch nádorových buniek, kde pomáhajú zabezpečiť rast a prežívanie tumoru. VEGFR sú schopné ovplyvniť aj funkciu rakovinových kmeňových buniek kde sa zistilo, že blokovanie VEGFR2 zastavuje autoreplikáciu (*selfrenewal*) rakovinových kmeňových buniek a znižuje množstvo a veľkosť ich kolónií.⁶

Rakovinové bunky používajú VEGFR2 ako signalizačný kanál. Avšak ich odpoveď na VEGF signalizáciu (rastový faktor pre VEGFR) je podľa najnovších štúdií neadekvátne. To znamená, že procesy ktoré sprostredkúva VEGFR musia pochádzať aj z inej interakcie ako s VEGF. VEGFR2 je regulovaný pomocou VEGFR1, ktorý má väčšiu afinitu k VEGF ako jemu príbuzný VEGFR2, avšak VEGFR1 má v porovnaní s ním oveľa menšiu (1/10) schopnosť prenosu signálu (fosfátu z ATP na substrát). Preto VEGFR1 pôsobí hlavne ako

⁶ Goel, H.; Mercurio, A. *Nature Reviews Cancer* **2013**, 13, 871-882.

zásobáreň (pasca) VEGF cytokínu. Pri nedávnych výskumoch regulácie VEGFR sa zistilo, že VEGFR môžu interagovať aj s inými bunkovými receptormi napr. MET. MET je receptor pre hepatocytový rastový faktor vylučovaný mezenchymálnymi bunkami. Miestom jeho výskytu sú endotelové, epiteliálne a krvné kmeňové bunky. Interakcia VEGFR / MET sa pozoruje napr. v glioblastóme, čo je jeden z najzhubnejších nádorov mozgu. VEGFR interagujú aj s integrínmi (transmembránové receptory zabezpečujúce napr. adhéziu a prežívanie buniek), čím aktivujú a zlepšujú signalizáciu v tumore. Pozorovaná bola aj tvorba komplexu VEGFR s NRPs, ktorým venujeme osobitnú časť.⁷

3.3.1.1 Štruktúra VEGFR2

VEGFR2 (KDR, flk1) je transmembránový tyrozínkinázový receptor, ktorý je zložený z 1356 aminokyselín. Receptor pozostáva z extracelulárnej oblasti, ktorá má sedem imunoglobulínových (Ig) domén slučkovitého charakteru, z krátkej transmembránovej domény a z intracelulárnej oblasti obsahujúcej tyrozín kinázu (TK).

Extracelulárna oblasť sa skladá zo 745 aminokyselín. Je miestom kde prichádzajú podnety vo forme rastových faktorov (napr. VEGF z medzibunkového priestoru). Následne sa tieto ligandy aktívne viažu na receptorovú extracelulárnu časť. S VEGFR2 interagujú 4 typy rastových faktorov: VEGF-A, C, D a E. Rastové faktory sú produkované napríklad tumorovými bunkami, doštičkami alebo lymfocytmi.

Transmembránová časť receptoru je relatívne malá, skladá sa z 25 aminokyselín lipofilného charakteru a spája extracelulárnu s intercelulárnou časťou. Zabezpečuje prenos informácie z mimobunkového priestoru do bunky a ukotvuje receptor v membráne.

Intracelulárna oblasť pozostáva z 567 aminokyselín, pričom 329 z nich tvorí tyrozínkinázovú doménu, ktorú môžeme charakterizovať ako miesto, kde prebieha už spomínaná transfosforylácia z ATP na tyrozínové zvyšky substrátu.⁸

Pri zovšeobecnení celého procesu je možno povedať, že prvotne dochádza k naviazaniu rastového faktoru VEGF v extracelulárnej časti. Táto interakcia spôsobí dimerizáciu VEGFR2 receptoru, zmeny jeho konformácie, nárast afinity extracelulárnych častí VEGFR2 receptoru voči extracelulárnej časti v membráne blízkeho druhého VEGFR2 receptoru v dôsledku čoho receptory homodimerizujú. Po dimerizácii je možná väzba ATP na receptor a aktivácia jeho kinázovej aktivity. ATP sa v aktívnom mieste kinázy štiepi, odchádza ADP a fosfát sa viaže

⁷ Shibuya, M.; Claesson-Welsh, L. *Exp. Cell. Res.* **2006**, 312, 549-560.

⁸ Ruch, C.; Skiniotis, G.; Steinmetz, M.O.; Walz, T.; Ballmer-Hofer K. *Struct. Biol.* **2007**, 14, 249-250.

na tyrozínový zvyšok z receptora (autofosforylácia). V dôsledku polárnej fosfátovej skupiny sa receptor konfiguračne zmení. Tu dochádza ku kľúčovému procesu, kedy konformačné zmeny umožnia prístup substrátov (proteínov z cytosolu) do blízkosti aktívneho miesta kinázy, kde dochádza aj k ich fosforylácii.^{7,9} V skutočnosti je proces prípravy receptoru komplikovanejší. Vedci uskutočnili autofosforylačný experiment, kde sa im podarilo nezávisle fosforylovať receptorové tyrozíny 1054 a 1059, ktoré sú súčasťou aktivačnej slučky. Takto vznikli dva rôzne aktívne receptory.⁴

Dlho sa predpokladalo, že práve konformačná zmena aktivačnej slučky v intracelulárnej časti rozhoduje o aktivite receptora. Flexibilný charakter A-slučky však často znemožňoval jej priamu lokalizáciu pomocou X-ray analýzy. Preto sa na určenie aktívnej, alebo inaktívnej konformácie receptora využil rigidný evolučne konzervovaný začiatok aktivačnej slučky DFG fragment predstavujúci prvé tri aminokyselinové zvyšky A-slučky (Asp/Gly/Phe). Podľa jednopísmenkových skratiek aminokyselín bol tento región pomenovaný ako DFG. Pre aktívny receptor sa ustálil pojem DFG-in a pre neaktívny receptor DFG-out. V súčasnosti sa ako najsmereodajnejší ukazovateľ aktívnej resp. neaktívnej formy receptora berie do úvahy poloha fenylalanínu z DFG fragmentu pričom A-slučka môže mať otvorenú konformáciu aj v niektorých prípadoch pri inaktívnej kináze. Tento fakt bol nedávno dokázaný publikovanou prácou našej výskumnej skupiny.²

3.3.2 Biologická funkcia VEGFR2

VEGFR2 je receptorom, ktorého primárna funkcia je zabezpečenie angiogenézy. U dospelých jedincov je najviac zastúpený na endotelových bunkách.¹⁰ VEGFR2 zohráva zásadnú úlohu v regulácii novotvorby ciev a cievnej permeability. VEGFR2 zohráva tiež kľúčovú úlohu vo vývoji embrya, čo dokazuje skutočnosť, že myši, ktoré tento receptor nemajú zomierajú v 8. až 10. dni embryogenézy v dôsledku chybného vývoja krvných ostrovcov z endoteliálnych a hematopoetických buniek.¹¹ VEGFR2 podporuje proliferáciu, prežitie, migráciu a diferenciáciu endoteliálnych buniek. Medzi ďalšie funkcie VEGFR2 patrí napr. fosforylácia Fyn, NOS3, PIK3R1, PTK2/FAK1.¹²

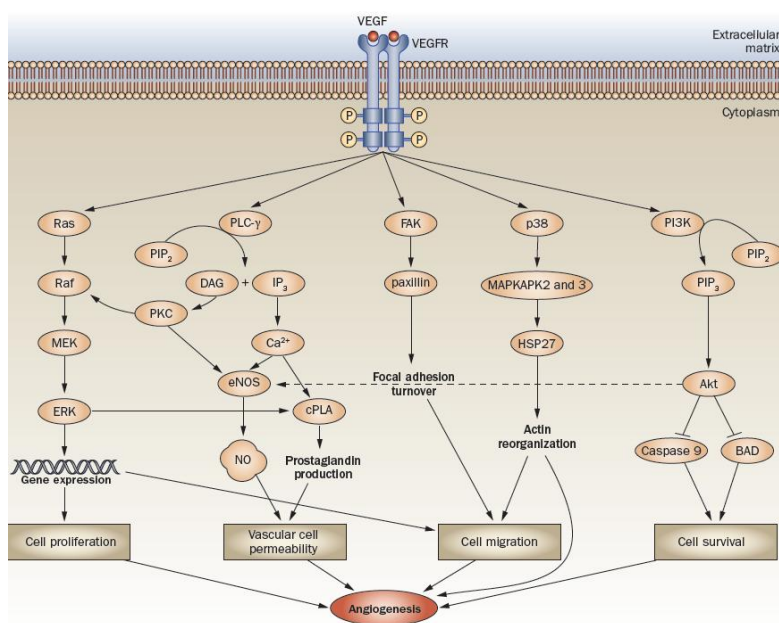
⁹ Dreves, J. *Eur. J. Cancer Supplements* **2008**, 6, 7-13.

¹⁰ Lee, K.; Jeong, K.-W.; Lee, Y.; Song, J. Y.; Kim, M. S.; Lee, G. S.; Kim, Y. E. *J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5420-5427.

¹¹ Holmes, K. *Cell. Signaling* **2007**, 19, 2003-2006.

¹² <http://www.uniprot.org/uniprot/P35968>

Inhibícia VEGFR2 môže spomaliť tumorovú angiogenézu a spolu s chemoterapiou pomôcť liečiť onkologické ochorenia. VEGF signalizácia prostredníctvom VEGFR2 TK predstavuje najdôležitejšiu biochemickú dráhu aktivujúcu už spomínanú angiogenézu podnecovaním proliferácie, prežívania, migrácie a diferenciácie endoteliálnych buniek, a tiež zvyšovaním priepustnosti cievnych stien. Deje sa to prostredníctvom VEGF / VEGFR2 signalizácie pomocou dráhy napr. Ras / MEK / ERK pričom dochádza k expresii génov a následnej bunkovej odpovedi. Deaktivácia VEGFR2 vedie k prerušeniu angiogénnej signálnej kaskády. Výhoda inhibície VEGFR2 receptora je v tom, že je na počiatku prenosu informácie do bunky a naraz sa takto blokujú všetky ním spojené signálne dráhy (doteraz objavených 5. (Obr. 4)

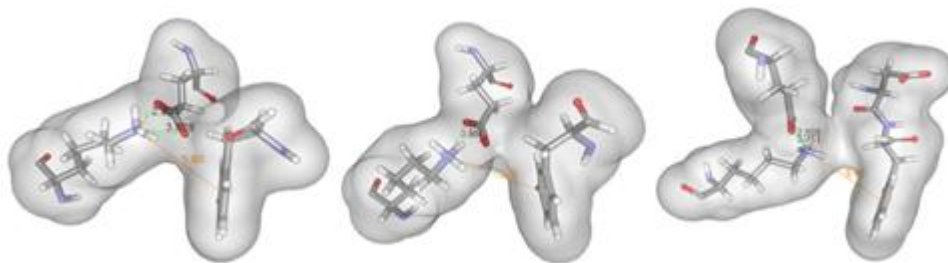


Obr. 4. Zobrazenie úlohy VEGFR2 pri VEGF signalizácii v procese angiogenézy. Aktiváciou VEGFR2 dochádza k proliferácii, zvýšeniu cievnej priepustnosti, bunkovej migrácii a k umožneniu prežívania endoteliálnych buniek.

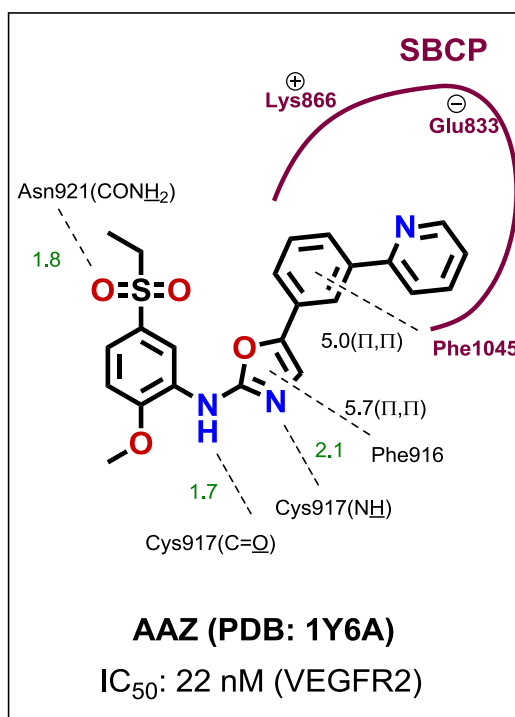
3.3.3 Štruktúra SBCEP (Salt Bridge Containing Pocket)

SBCEP bolo objavené výskumnou spoločnosťou Biomagi. Toto vrecko pozostáva z Lys866, Glu883 and Phe1045 a nachádza sa v blízkosti ATP väzobného miesta VEGFR2 receptora. SBCEP bolo vybrané ako miesto vhodné pre dodatočné interakcie ligandu s receptorom. Bolo objavené nedávno pri analýze komplexu PDB: 1Y6A (AAZ ligand / VEGFR2 TK). SBCEP je stabilizované pomocou soľného mostíka a vodíkovej väzby medzi

Lys866 a Glu883 a tiež indukovaným dipólom medzi Lys866 a polohou blízkym aromatickým kruhom Phe1045, ktorý pochádza z DFG fragmentu. Polárne vrecko je možné nájsť napr. vo VEGFR2 komplexoch PDB: 1Y6A, 1Y6B a 3C7Q. SBCP sa nachádza nad *para*-polohou vnútorného fenylového kruhu **AAZ** ligandu. (Obr. 5 a 6)



Obr. 5. Štruktúra, tvar a intramolekulové interakcie SBCP vreciek zložených z Lys866, Glu883 a Phe1045 v komplexoch PDB: 1Y6A, 1Y6B a 3C7Q, vzťazne. (publikované s dovolením spoločnosti Biomagi)

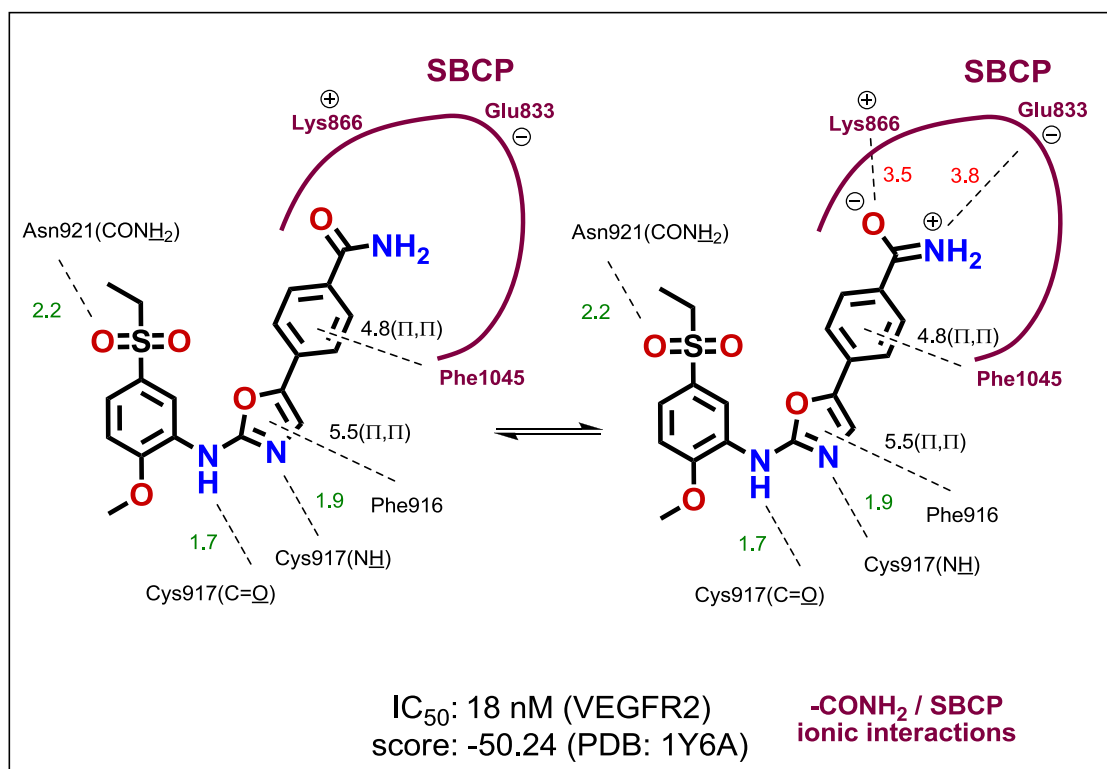


Obr. 6. AAZ ligand (PDB: 1Y6A) z komplexu s VEGFR2 TK a jeho pozícia voči SBCP doméne.

Interakcie AAZ ligandu s VEGFR2 TK sú zobrazené.

Zatiaľ je známych len päť derivátov N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-5-fenyloxazol-2-amínov, ktoré obsahujú *para*-substituenty na arylovej skupine: (4-Cl, 4-CN, **4-CONH₂**, 4-OMe a 4-F; IC₅₀ (VEGFR-2) v tomto poradí: 81, 51, **18**, 87 a 79 nM). Z uvedených aktivít je

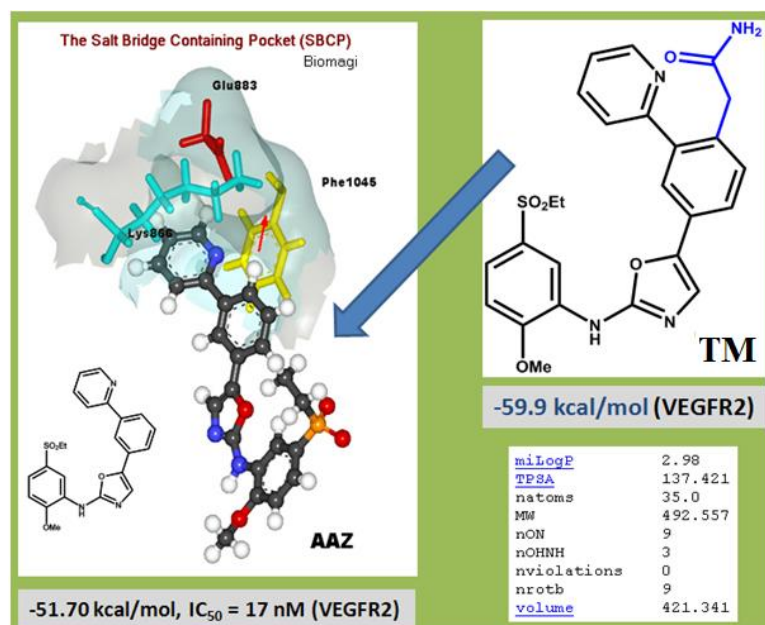
jasné, že amidový substituent (Obr. 7) najlepšie interaguje s VEGFR2 TK pravdepodobne vďaka SBCP pomocou dipólových a iónových interakcií, nakoľko poloha pre CN derivát, podľa dokovacích experimentov, nie je dostatočná na priamu interakciu cez vodíkovú väzbu s Lys v SBCP doméne. Táto diplomová práca je zameraná na syntézu ligandu, ktorý umožní priamu interakciu s SBCP doménou s cieľom získať dodatočné interakcie ligandu k VEGFR2 receptoru.



Obr. 7. Predpovedané interakcie amidovej skupiny inhibítora s SBCP doménou VEGFR2 TK.¹³

Nižšie uvádzame štruktúru SBCP fragmentu z VEGFR2 komplexu s ligandom **AAZ**, ako aj štruktúru navrhnutého inhibítora **TM**, ktorý má potenciál priamej interakcie s SBCP. (Obr. 8)

¹³ prevzaté s dovolením Biomagi, s.r.o.



Obr. 8. Vľavo: štruktúra SBCP (Lys866, Glu883, Phe1045) nájdená v komplexe PDB: 1Y6A (VEGFR2 TK / ligand **AAZ** s vypočítaným skóre a s experimentálne zistenou inhibičnou aktivitou). Vpravo: Štruktúra navrhnutého inhibítora **TM** s predpovedaným interakčným skóre a biodostupnosťou. (publikované s dovolením spoločnosti Biomagi)

3.3.4 NRPs receptory

NRPs (*neuropilins*) sú proteínové receptory, ktoré boli objavené pri rozvoji nervového systému. Sú známe dva typy NRP1 a NRP2 a ich izoformy. NRPs sú transmembránové glykoproteíny so 4 extracelulárnymi doménami, ktoré viažu ligand. NRPs majú tiež jednu intracelulárnu doménu, ktorá však nemá enzymatickú aktivitu a slúži na viazanie iných intracelulárnych proteínov napr. ABL1 (cytosolická nerekceptorová TK). NRPs pôsobia často ako ko-receptory k iným receptorom pričom ovplyvňujú ich funkčnosť a aktivitu. NRPs tvoria s VEGFR dimérne komplexy, čím zvyšujú ich afinitu k VEGF. NRPs sú promiskuitné a majú mnoho interakcií s inými receptormi. Tým, že tvoria komplexy niekedy aj znemožňujú funkciu receptorov, ktoré by mohli brániť rakovinovému bujneniu. NRP1 interaguje aj s MET tyrozínkinázou a zlepšuje jej citlivosť k jej signálnej molekule (hormónu HGF) čím stimuluje inváziu rakovinových buniek (napr. v pankreatickom karcinóme). Bola pozorovaná aj priama interakcia medzi epidermálnym rastovým faktorom EGF a NRP1 čo vedie k aktivácii EGFR signálnej dráhy. Každý takýto vplyv do aktivácie rastového mechanizmu je nebezpečný z hľadiska rozvoja a agresivity nádorových ochorení. Najdôležitejším zistením je, že na rozdiel od endoteliálnych aj nádorové bunky exprimujú VEGFR receptory a že sú tiež

citlivé na VEGF signalizáciu, ktorá tumor ovplyvňuje nezávisle od angiogenézy. VEGF signalizácia v tumorových bunkách prebieha cez interakcie VEGFR2 s NRPs receptormi. NRPs môžu mať dominantný vplyv pri VEGF signalizácii pre tumorové bunky, lebo NRPs ovplyvňujú aktivitu viacerých TK receptorov. VEGF signalizácia môže byť nevyhnutnou pre vznik nádorov nakoľko táto signalizácia reguluje počet a vlastnosti najagresívnejších buniek tumoru - rakovinových kmeňových buniek (CSCs). Liečivá zacielené na NRPs a VEGFRs u tumorových buniek môžu byť užitočné pre regresiu tumorov a potlačenie návratu ochorenia.

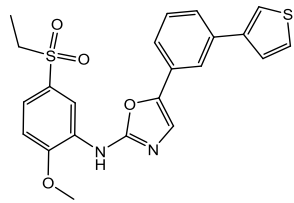
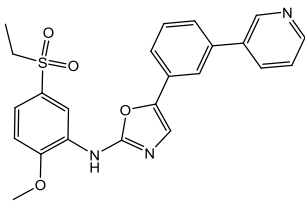
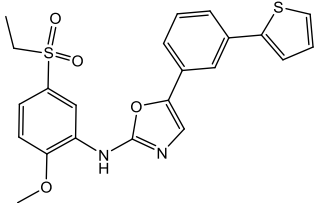
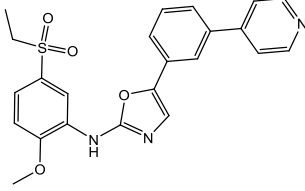
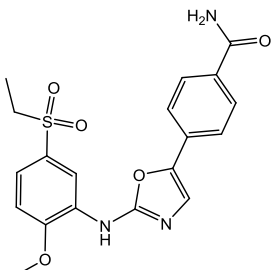
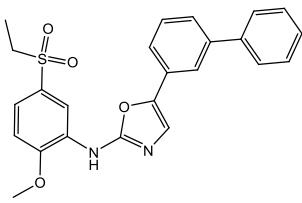
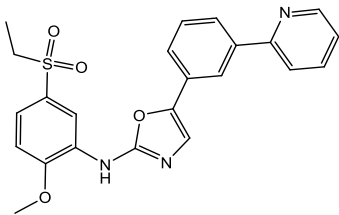
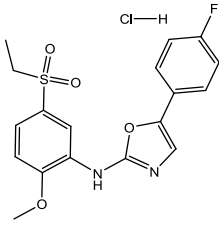
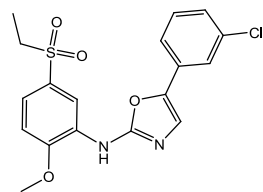
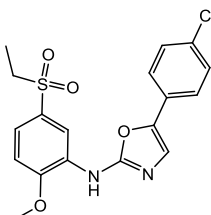
VEGF je trieda rastových hormónov, ktorých je doposiaľ známych päť. Okrem tvorby komplexov s VEGF receptormi, interagujú aj s NRPs a inými receptormi. Nové je zistenie, že VEGF prispieva ku genéze nádoru a ovplyvňuje rakovinové kmeňové bunky. Tento jav je nezávislý od angiogenézy. Genetické odstránenie VEGF-A spôsobilo redukciu a degradáciu, proliferácie rakovinových kmeňových buniek. Odstránenie NRP1 zabránilo VEGF aby podporovalo CSCs a ich autoobnovovanie.⁶

3.4 Oxazolové inhibítory VEGFR2 opísané v literatúre

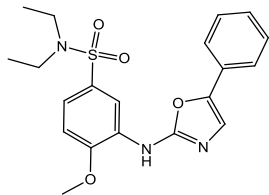
VEGFR2 patrí medzi atraktívny terapeutický cieľ pre liečbu tumorových ochorení. Vzhľadom na objavenú existenciu polárneho vrecka (SBCP) v komplexoch VEGFR2 s ligandami obsahujúcimi oxazolový fragment (PDB: 1Y6A, 1Y6B) sme uskutočnili prehľad známych oxazolových inhibítorov tohto receptora. Kvôli zjednodušeniu sme vybrali len tie z nich, ktoré majú $IC_{50} < 150$ nM. (Tabuľka 1.)

3.4.1 Prehľad štruktúr aktívnych inhibítorov VEGFR2 obsahujúcich oxazol

Tabuľka 1. Prehľad aktívnych inhibítorov VEGFR2 obsahujúcich oxazolový skelet (zdroj databáza Reaxys).

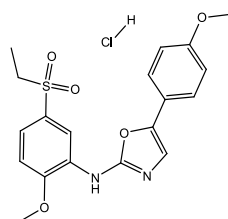
Číslo	Štruktúra	IC ₅₀ [nM] (VEGFR2)	Číslo	Štruktúra	IC ₅₀ [nM] (VEGFR2)
1		15	14		76
2		16	15		78
3		18	16		79
4		22	17		79
5		22	18		81

6



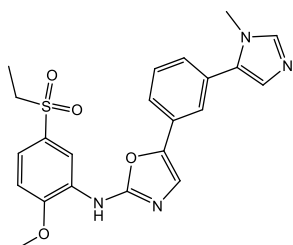
23

19



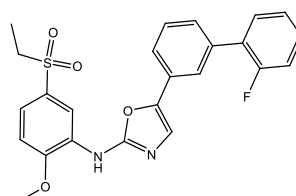
87

7



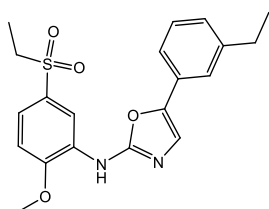
25

20



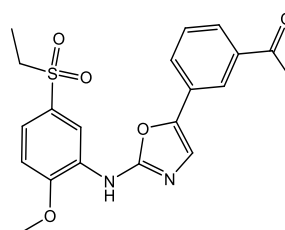
89

8



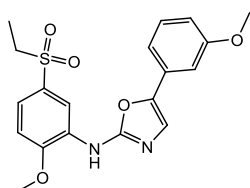
29

21



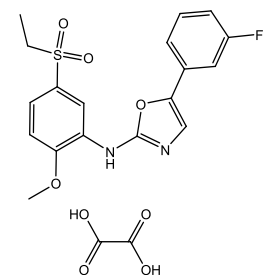
91

9



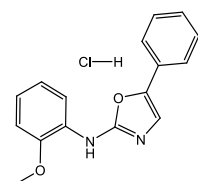
36

22



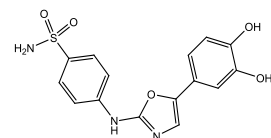
93

10



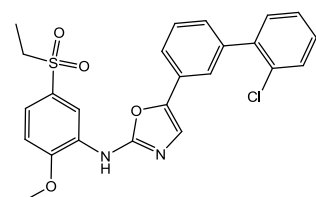
38

23



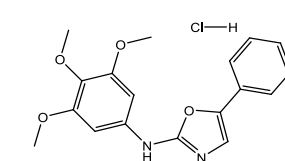
100

11

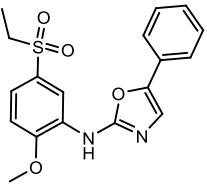
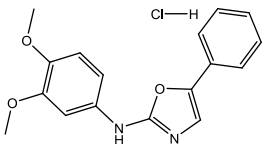
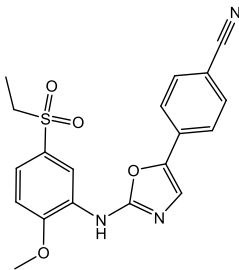
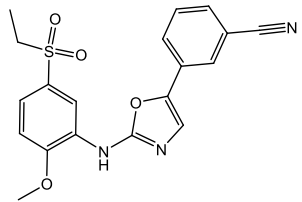


39

24



100

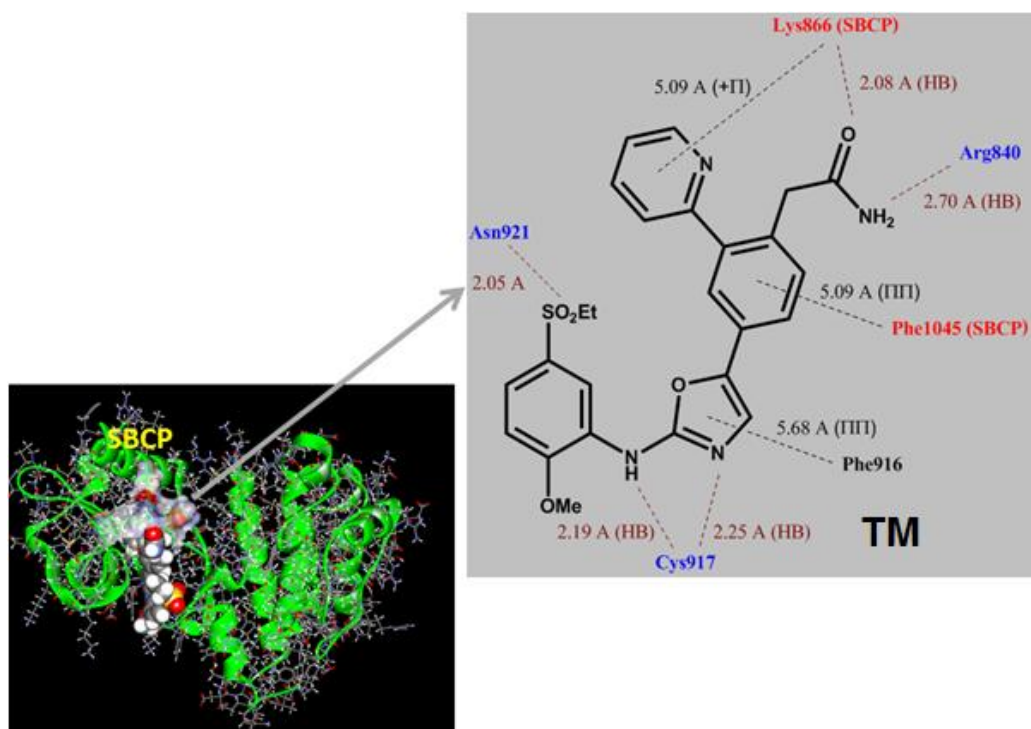
12		50	25		140
13		51	26		141

Z prehľadu je známych iba päť látok ktoré obsahujú *para*-substituovaný fenylový kruh viazaný na oxazolové jadro. Najlepšiu IC₅₀ hodnotu má amidový derivát (18 nM, Tabuľka 1, č. 3). Podľa *in silico* predikcií je možné SBCP efektívnejšie využiť a to pridaním metylénového fragmentu medzi amidovú skupinu a fenylový kruh. N-(5-(Etylsulfonyl)-2-metoxifynyl)-5-fenyloxazol-2-amíny sú vhodné nosné skelety nakoľko v aktívnom mieste VEGFR2 pôsobia ako kotviaci fragment. Dôvodom sú vodíkové väzby, HBA medzi dusíkom oxazolu s Cys917 (NH₂) a HBD NH vodíka Ar-NH-OXAZOL-ovej skupiny s Cys917 (-CO), či HBA EtSO₂- skupiny s Asp921. (Obr. 7) Tieto poznatky možno využiť pri návrhu a optimalizácii nových štruktúr pre zlepšenie VEGFR2 inhibičnej aktivity.

3.5 Predpovedané interakcie VEGFR2 TK ligandu TM

Cieľom praktickej časti je príprava inhibítora VEGFR2 ktorý by okrem známych interakcií využíval tiež interakciu s SBCP doménou. Jedna z molekúl, ktorá by podľa prediktívnych výpočtov efektívne využívala SBCP je **TM**. Látka **TM** by sa mala viazať nasledovnými interakciami s VEGFR2: HBA vodíkovou väzbou medzi Asp921(-NH₃⁺) a kyslíkom etylsulfónovej skupiny z **TM**. Dvomi vodíkovými väzbami medzi dusíkom oxazolu spolu s vodíkom susediacej ArNH skupiny s Cys917 (NH₂) a Cys917 (-CO). MeO-skupina intereaguje lipofilne s Lys918. Aromatické jadrá poskytujú dve σ, π interakcie: oxazol s metylom Leu1033, substituovaný fenyl v polohe 5 na oxazole s izopropylom Val846

(nezobrazené). Štruktúra konforméru **TM** je navyše stabilizovaná intramolekulovou σ , π interakciou etylu z EtSO₂ s pyridínovým jadrom. Tieto interakcie sú známe pre **AAZ** z komplexu PDB: 1Y6A. Vzhľadom na prítomnú SBCP doménu, očakávame prídavné interakcie -CONH₂ amidovej skupiny z **TM** s Arg840 a -CONH₂ z **TM** s Lys866. Na základe konformačných zmien by mohla vzniknúť aj nová $+\pi$ interakcia medzi Lys866 a pyridylovým jadrom z **TM**. (Obr. 9)



Obr. 9. Vľavo: VEGFR2/AAZ komplex (PDB: 1Y6A) so zvýraznenou polohou SBCP vrecka (biely povrch) a vpravo: štruktúra navrhnutého inhibítora **TM** s predpokladanými interakciami v ATP aktívnom mieste s aminokyselinovým zvyškami SBCP domény vo VEGFR2 TK. (publikované s dovolením spoločnosti Biomagi)

3.6 Prvý návrh syntézy acetamidu TM

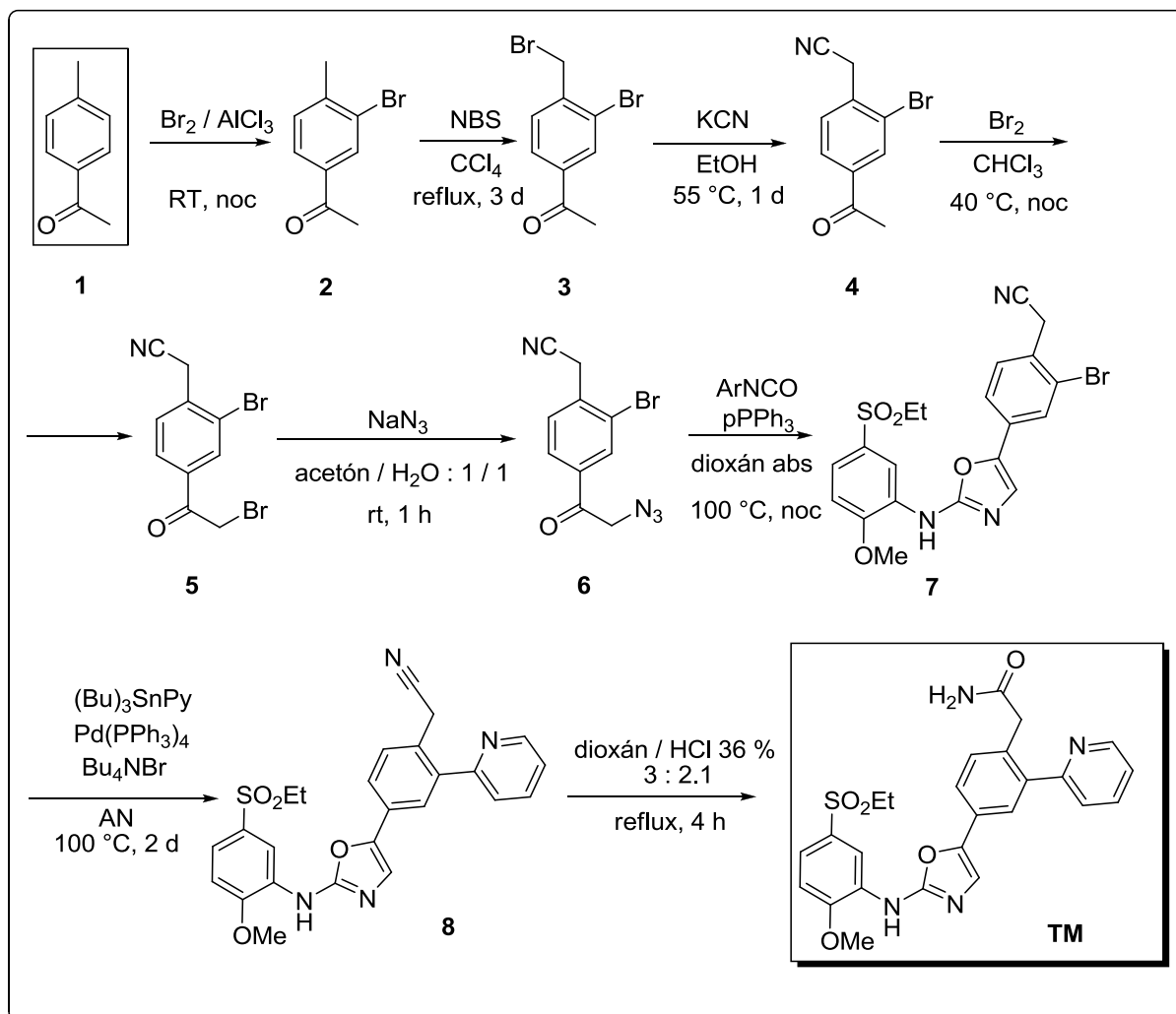


Schéma 1. Prvý návrh na 8 stupňovú syntézu požadovaného acetamidu **TM**.

3.6.1 Príprava acetofenónu 2 bromáciou substrátu 1

Reakcia zo Schémy 1 bola opísaná v literatúre. Autori uskutočnili elektrofilnú aromatickú substitúciu s Br_2 v nadbytku AlCl_3 . Reakčnú zmes nechali miešať cez noc pri laboratórnej teplote a po spracovaní získali 87 % brómovaného acetofenónu **2**.¹⁴

¹⁴ Lin, Ch.; Luo, F.-T. *Tet. Lett.* **2003**, 41, 7565-7568.

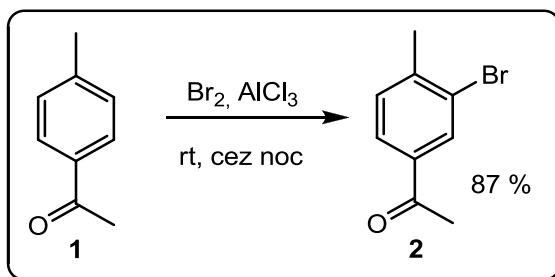


Schéma 2. Príprava acetofenónu **2** bromáciou komerčne dostupného metylacetofenónu **1**.

3.6.2 Príprava acetofenónu **3** bromáciou substrátu **2**

Reakcia uvedená na Schéme 3 nie je v literatúre opísaná. Ako príklad pre radikálové bromácie sme čerpali z literárnych zdrojov, kde autori pripravovali štruktúrne podobné látky.

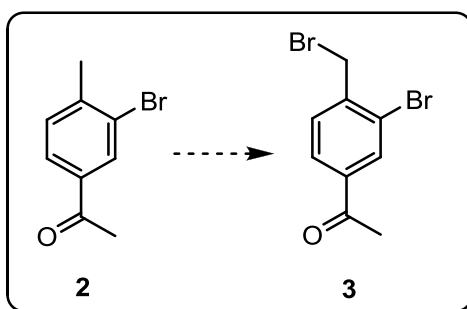


Schéma 3. Predpokladaná príprava látky **3**.

Autori bromáciou toluénu (**13**) pomocou NBS získali 84 % výťažok benzylbromidu (**14**). (Schéma 4) Reakcia prebiehala 40 min pri refluxe v CCl_4 za katalýzy radikálovým iniciátorom $(\text{BzO})_2$. Ako čistiacu metódu využili stĺpcovú chromatografiu.¹⁵

¹⁵ Courtieu, J.; Meddour, A. *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, 11, 3635-3644.

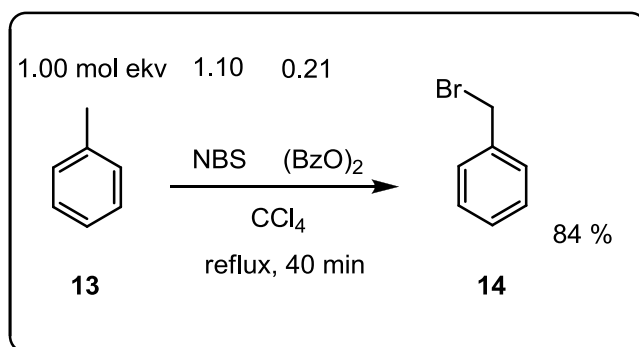


Schéma 4. Reakčné podmienky radikálovej bromácie toluénu (**13**) do benzylovej polohy.

Iní autori uskutočnili podobnú bromáciu na substráte (**15**) uvedenom v Schéme 5. Podarilo sa im uskutočniť bromáciu do benzylovej polohy aj napriek prítomnosti acetylovej skupiny. Ako čistiacu metódu použili flash chromatografiu a získali produkt v 83 % výťažku.¹⁶

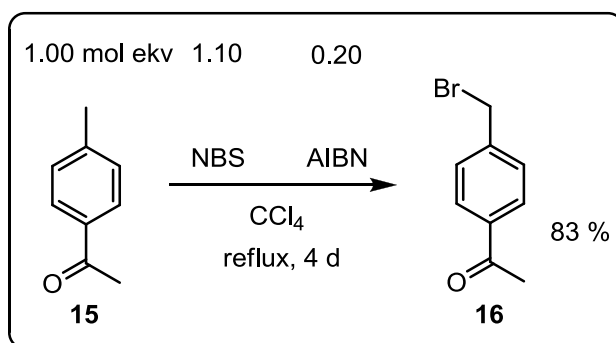


Schéma 5. Príprava látky **16**.

Na radikálovú bromáciu možno použiť aj iné reakčné činidlá napr. Br₂ / UV. Väčšina publikácií týkajúcich sa radikálových bromácií využíva NBS pre jeho dobrú reaktivitu a ľahkú manipulovateľnosť s týmto činidlom.

Vzhľadom na radikálový priebeh reakcie nepredpokladáme vznik neželaného brómacetylového derivátu **17** (Schéma 6), nakoľko o NBS je známe, že obsahuje len malé množstvo voľného Br₂, pričom samotný Br₂ s acetofenónmi reaguje za vzniku α-brómovaných derivátov. Neželaný jav α bromácie by však nastať nemal vzhľadom na pomalé uvoľňovanie Br₂ z NBS a aj kvôli prítomnosti radikálového iniciátora, ktorý urýchli radikálovú reakciu. Nevýhodou našej východiskovej látky je acetylový substituent na aromatickom jadre v *para*

¹⁶ Diniz, A. M.; Parola, A. J.; Petrov, V.; Pina, F.; Pinheiro, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6359-63681.

polohe voči metylu, ktorý chceme brómovat'. Táto skupina bude deaktivovať vznikajúci radikál benzylového typu a preto môžeme očakávať spomalenie reakcie, alebo dosiahnutie nižšieho výťažku.

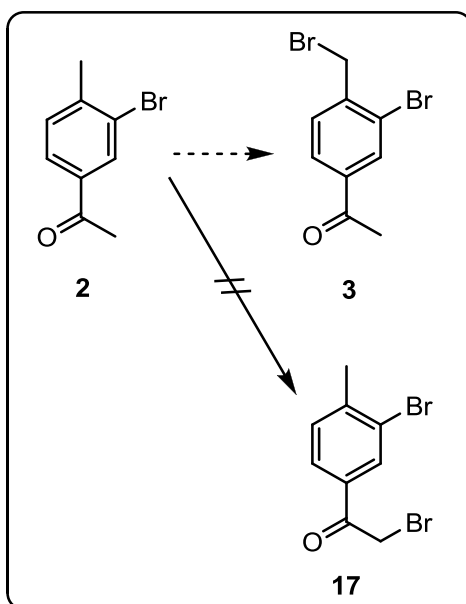


Schéma 6. Štruktúra požadovanej zlúčeniny **3** a neželaného produktu **17**.

3.6.3 Príprava acetonitrilu **4** nukleofilnou substitúciou z **3**

Doteraz nebola publikovaná reakcia uvedená v Schéme 7. Našli sme však príklady z literatúry, kde autori pripravili štruktúrne podobné substráty.

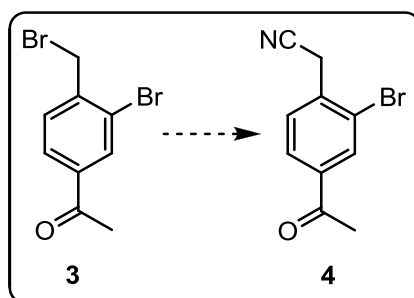


Schéma 7. Zamýšľaná príprava navrhovaného arylacetonitrilu **4**.

Autori v článku na prípravu látky **19** využili NaCN, ktorý rozpustili vo vode a následne pridali k dioxánovému roztoku látky **18**. (Schéma 8) Potom zmes 2 h zahrievali na reflux. Po stĺpcovej chromatografii získali 67 % čistého produktu **19**.¹⁷

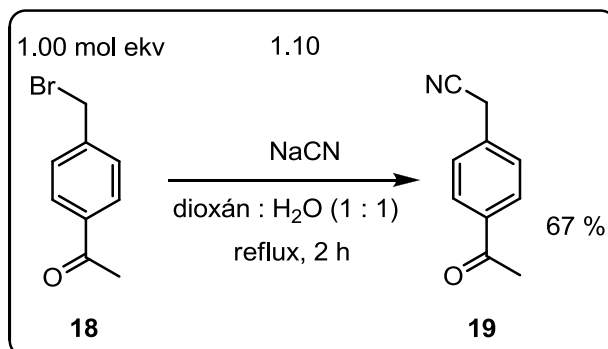


Schéma 8. Podmienky prípravy substrátu **19**.

Počas uskutočnenia reakcie zo Schémy 7 môže dôjsť k niekoľkým komplikáciám z dôvodu dvoch možných reakčných centier. Vzhľadom na štruktúru východiskovej látky **3** môže dôjsť k substitúcii brómu za ⁻CN ako aj k neželanej nukleofilnej adícii ⁻CN na karbonyl. Karbonylový uhlík by však mal byť menej reaktívny vzhľadom na blízkosť aromatického jadra, ktoré svojim mezomérnym efektom znižuje parciálny kladný náboj karbonylového uhlíka a na druhej strane sa zvýši parciálny kladný náboj na benzylovom metyléne nesúcom bróm, ktorý chceme substituovať. Preferovanou by preto mala byť substitúcia brómu za CN.

Experimentálne bude potrebné testovať aké rozpúšťadlo, resp. zmes rozpúšťadiel použiť kvôli rozdielnej rozpustnosti organického a anorganického reaktantu. Možné riešenie je použiť miešateľnú zmes organického rozpúšťadla a vody, alebo katalyzátor fázového prenosu (napr. TEBA).

3.6.4 Príprava 5 bromáciou nitrilu **4**

V literatúre nie je opísaná konkrétna reakcia na substráte **4** uvedenom v Schéme 9. Ako príklad uskutočnených bromácií do α polohy voči karbonylovej skupine uvádzame reakčné podmienky z literatúry.

¹⁷ Carell, T.; Grolle, F.; Haas, C.; Kuch, D.; Linne, U.; Pieck, J. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1404-1405.

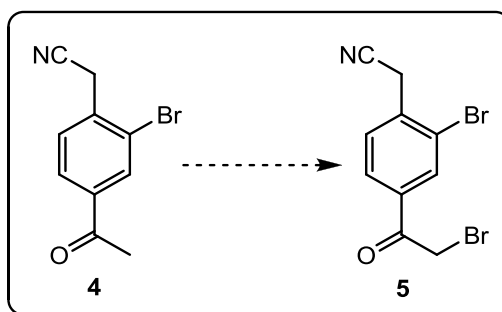


Schéma 9. Zamýšľaná príprava látky 5.

Ako vzor reakčných podmienok sme vybrali prípravu brómacetofenónu **21** pomocou Br_2 v CHCl_3 . (Schéma 10) Autori za uvedených podmienok po 2.5 h pri rt získali 72 % očakávaného produktu **21**.¹⁸

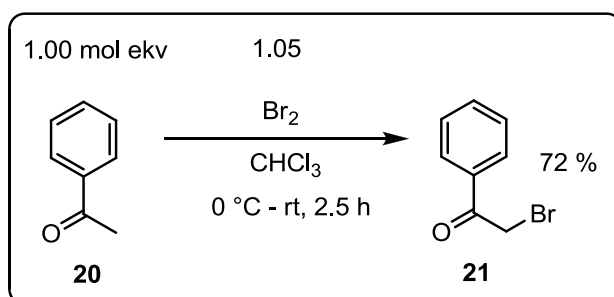


Schéma 10. Opísaný postup prípravy látky **21**.

Ako jemnejšiu bromačnú metódu je možné použiť prípravu látky **23** pomocou CuBr_2 zo Schémy 11. Reakciu sme v našej výskumnej skupine robili v zmesi suchých rozpúšťadiel EA / MeOH (5 / 1) pri rt počas 20 h. Takto sa podarilo získať 57 % brómovaného produktu **23**.¹⁹

¹⁸ Liao, S.; Tang, Y.; Wang, P.; Zhu, J.-B. *Org. Lett.* **2013**, 15, 3606-3609.

¹⁹ Kováčiková, L. Dizertačná práca, **2010**, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave.

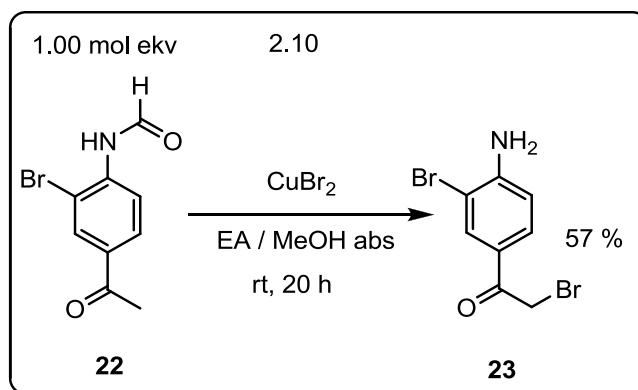


Schéma 11. Spôsob prípravy látky **23**.

3.6.5 Príprava azidu **6** z bromidu **5**

Látka **6** zo Schémy 12 nie je v literatúre opísaná. V literatúre sú známe metódy prípravy štruktúrne podobných produktov, ktoré uvádzame.

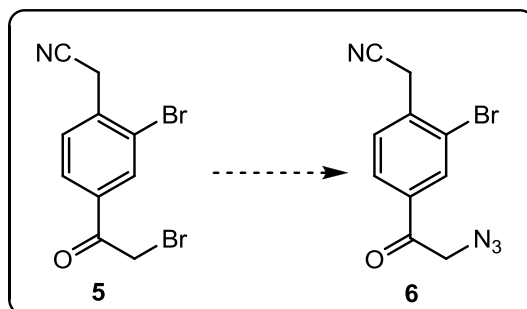


Schéma 12. Navrhnutá príprava azidu **6**.

Príklad prípravy azidu **25** je uvedený v Schéme 13. Autori tu vychádzali z brómderivátu **24**. Substrát **24** nechali reagovať s NaN_3 pri rt počas 10 min. Po spracovaní získali takmer kvantitatívny výťažok očakávaného produktu.²⁰

²⁰ Dos Santos, A.; El Kaim, L.; Grimaud, L.; Ronsseray, C. *Chem. Comm.* **2009**, 26, 3907-3909.

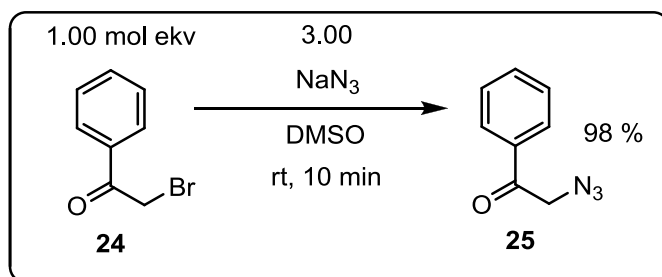


Schéma 13. Publikovaný postup prípravy látky **25**.

Reakciu zo Schémy 12 by bolo možné podľa literatúry uskutočniť s NaN_3 vo viacerých rozpúšťadlách (napr. DMF, DMSO, zmes acetón / H_2O).

Vzhľadom na výťažky uvedené v literatúre, príprava azidu **6** by nemala predstavovať vážnejší problém, pretože autori už pri krátkych reakčných časoch a teplotách dosiahli kvantitatívne výťažky na štruktúrne podobných substrátoch.

3.6.6 Príprava aminooxazolu **7** reakciou izokyanátu **28** a azidu **6**

V literatúre nie je priamo opísaná reakcia uvedená v Schéme 14. Z literárnych zdrojov uvádzame niekoľko možných spôsobov ako pripraviť požadovaný aminooxazolový fragment.

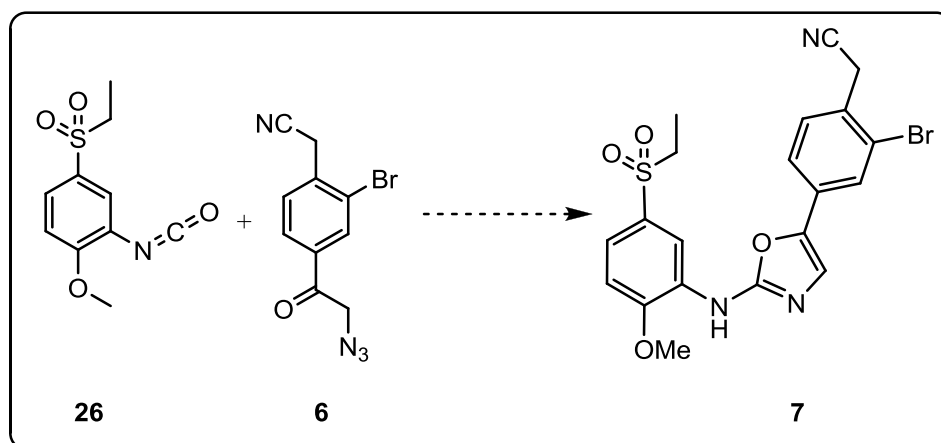


Schéma 14. Navrhnuté podmienky na prípravu látky **7**.

Autori patentu pripravili aminooxazol **29** a **32** za reakčných podmienok uvedených v schémach 15 a 16. Zo schém je zrejmé, že je možné pripraviť aminooxazoly pomocou organického azidu a izokyanátu napr. **28** alebo izotiokyanátu **31**.²¹

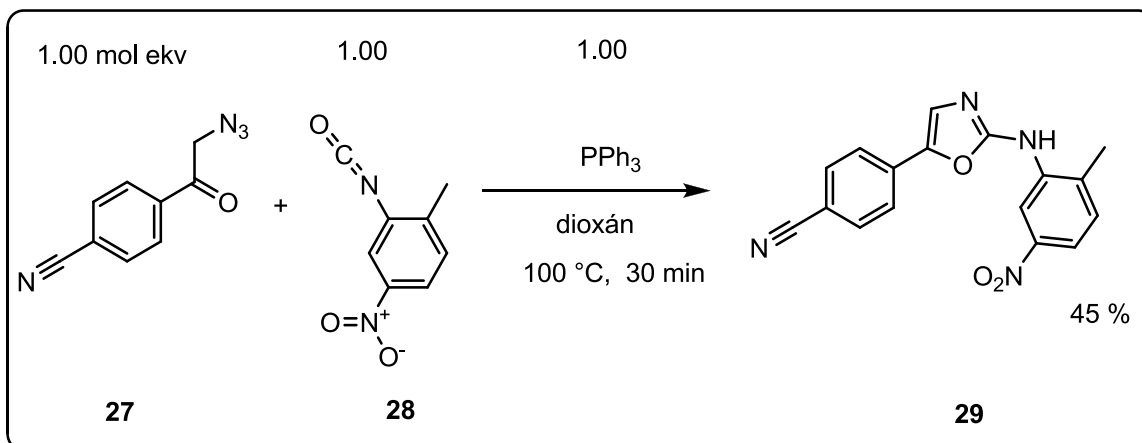


Schéma 15. Podmienky na prípravu oxazolu **29**.

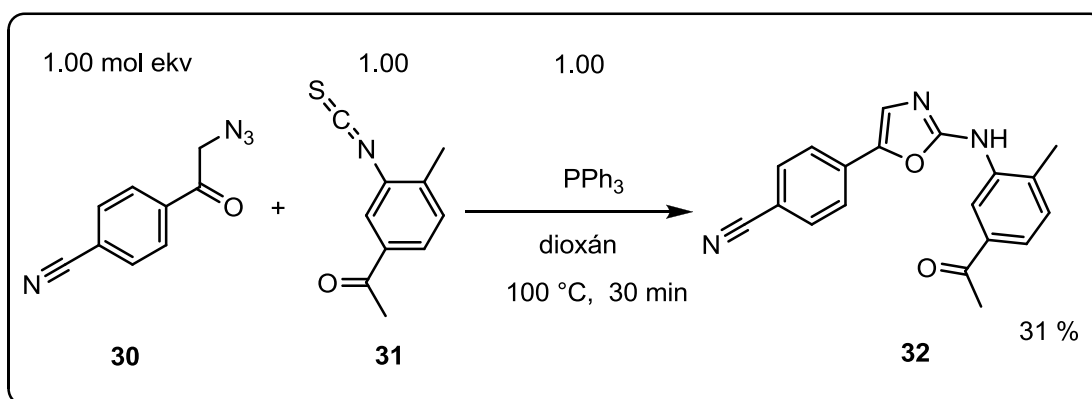


Schéma 16. Spôsob prípravy oxazolu **32**.

V našej výskumnej skupine sme sa už syntézou aminooxazolov touto metódou venovali. Podarilo sa nám pripraviť oxazoly **35** a **36**, ako aj otvorené močovínové deriváty **37** a **38**.¹⁹ (Schéma 17)

²¹ Ab Science; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Institut Curie Patent: WO2006/106437 A2, **2006**.

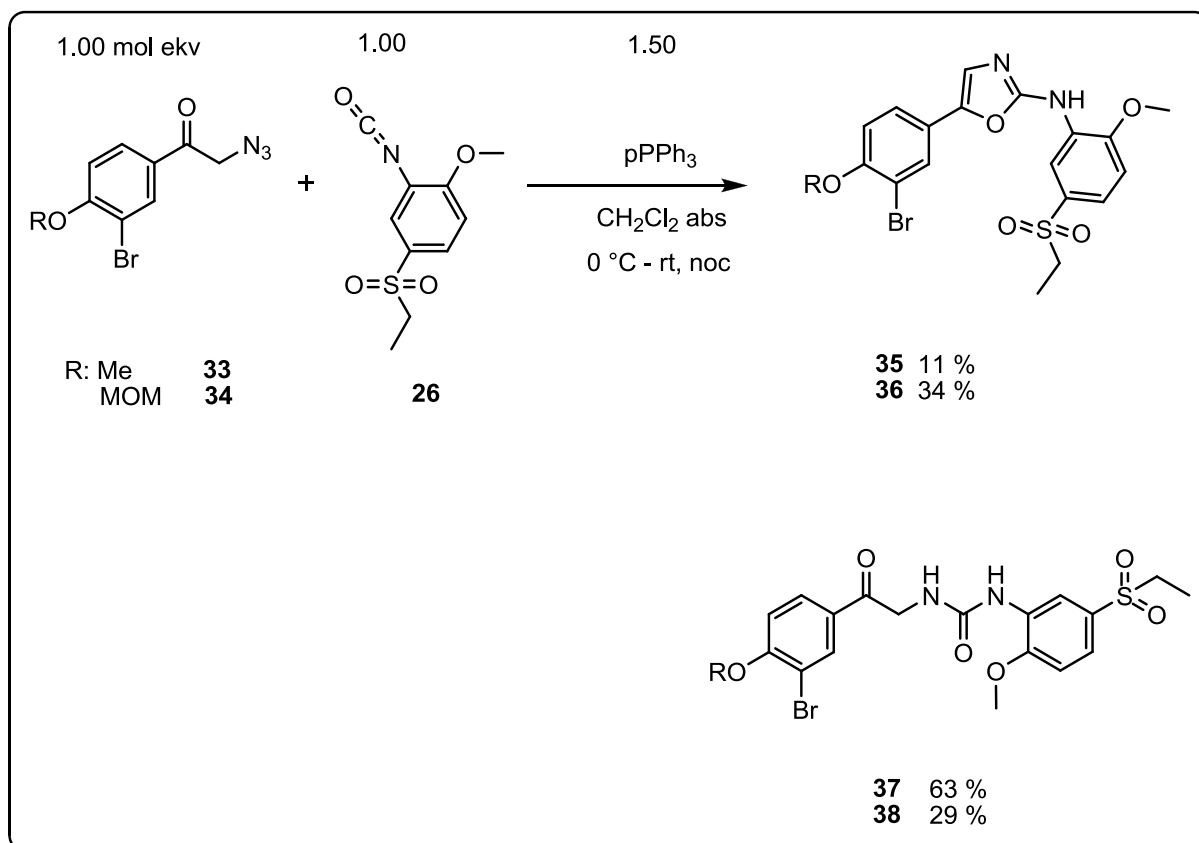
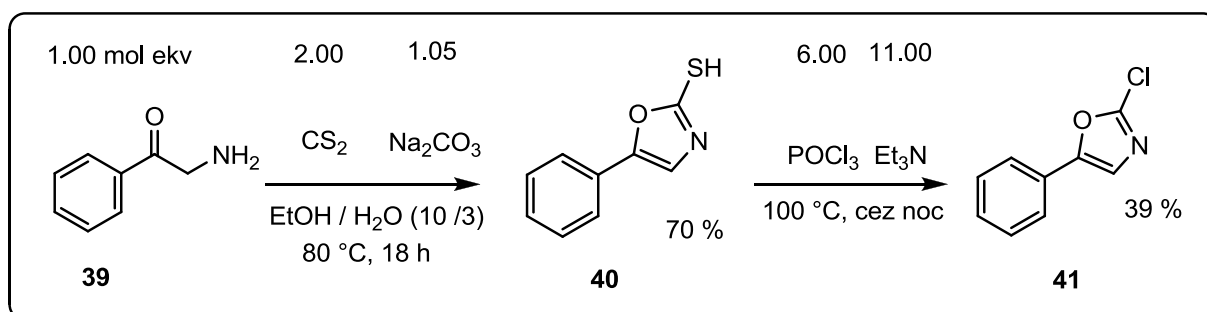


Schéma 17. Podmienky reakcie azidu **33** a **34** s izokyanátom **26**.

Ako alternatíva priamej prípravy aminooxazolového fragmentu je príprava látky **41** z α -aminokarbonylových zlúčenín napr. **39**. (Schéma 18) Reakciou **39** s CS_2 vzniká oxazol-2-tiol **40**, ktorý je možné premeniť na 2-chlóroxazol **41**. Chlóroxazol **41** môže byť vhodná zlúčenina na prípravu cieľovej látky **TM**.²²



²² Harris, P. A.; Cheung, M.; Hunter III, 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.

Schéma 18. Publikovaný postup prípravy oxazolu **41**.

Vo výťažku 36 % sa podarilo pripraviť diaryloxazol **44** reakciou azidu **42** s chloridom kyseliny **43**. (Schéma 19) Ako čistiacu metódu autori použili stĺpcovú chromatografiu.²⁰

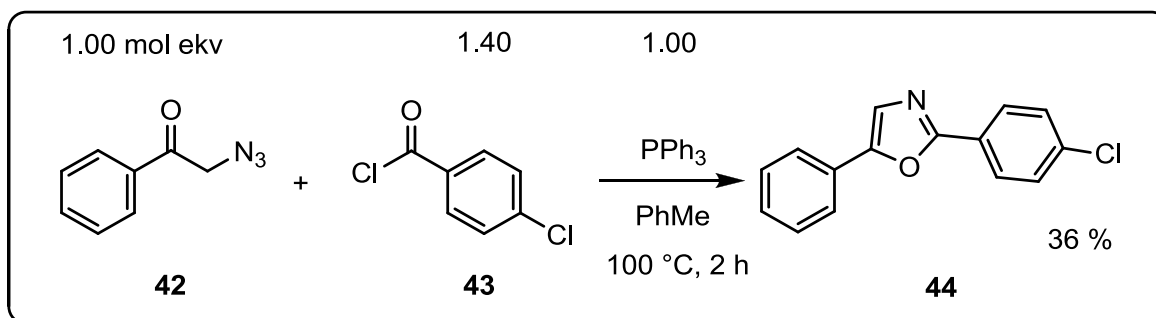
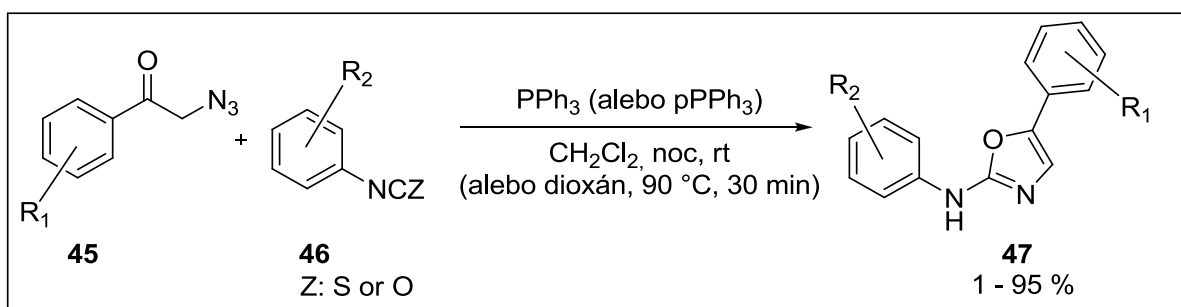


Schéma 19. Príprava oxazolu **44**.

Vznik aminooxazolového jadra je možné uskutočniť podľa článku publikovaného našou výskumnou skupinou štyrmi metodikami.²³ Vzhľadom na prípravu látky **TM** je vhodná príprava pomocou „azaylidovej“ metódy, pri ktorej reaguje azid s PPh_3 za vzniku azaylidu a tento vytvára s izokyanátom intermediárny ketokarbodiimid. Tautomérna forma ketónu, ketokarbodiimidu následne atakuje elektrofilný karbodiimidový uhlík za vzniku päťčlankového heterocyklického kruhu, ktorý po tautomerizácii vodíka produkuje požadovaný aminooxazolový fragment. Výťažky reakcie závisia od elektrónových vplyvov substituentov na aromatických kruhoch reaktantov. Zdá sa, že s elektrónodonnými substituentmi sa dosahujú lepšie výťažky. (Tabuľka 2)



²³ Lintnerová, L.; Kovačiková, L.; Hanquet, G.; Boháč, A. *J. Het. Chem.* (v tlači)

Tabuľka 2. Prehľad výťažkov reakcii pri príprave oxazolov pomocou „azaylidovej metódy“.

	R ¹ z 45	R ² z 46	reakčné podmienky	% výťažok 47
1	2-Cl	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	25
2	3-Cl	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	3
3	4-Cl	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	10
4	3-F	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	27
5	4-F	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	19
6	3-MeO	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	49
7	4-MeO	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	58
8	3-Br	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	36
9	3-CN	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	1
10	4-CN	5-SO ₂ Et, 2-OMe	PPh ₃ , A	6
11	2-N(Me)COCH ₂ OAc	3-MeO, 4-(oxazol-4-yl)	pPPh ₃ , B	95
12	2-NO ₂	3-MeO, 4-(oxazol-4-yl)	pPPh ₃ , B	70
13	2-COOEt	3-MeO, 4-(oxazol-4-yl)	pPPh ₃ , B	50
14	H	3-MeO, 4-CN	pPPh ₃ , B	67
15	H	3-MeO, 4-COOEt	pPPh ₃ , B	69
16	H	3-CF ₃ , 4-CN	pPPh ₃ , B	50

Výtťažnosť reakcie ovplyvňuje aj rozpúšťadlo a teplota. V lepšom výťažku sa autorom podarilo pripraviť oxazoly v prípade, že použil suchý dioxán pri teplote 90 °C na rozdiel od dlhodobej reakcie v CH₂Cl₂ pri rt. V Schéme 20 uvádzame mechanizmus prípravy oxazolov pomocou „azaylidovej“ metódy.

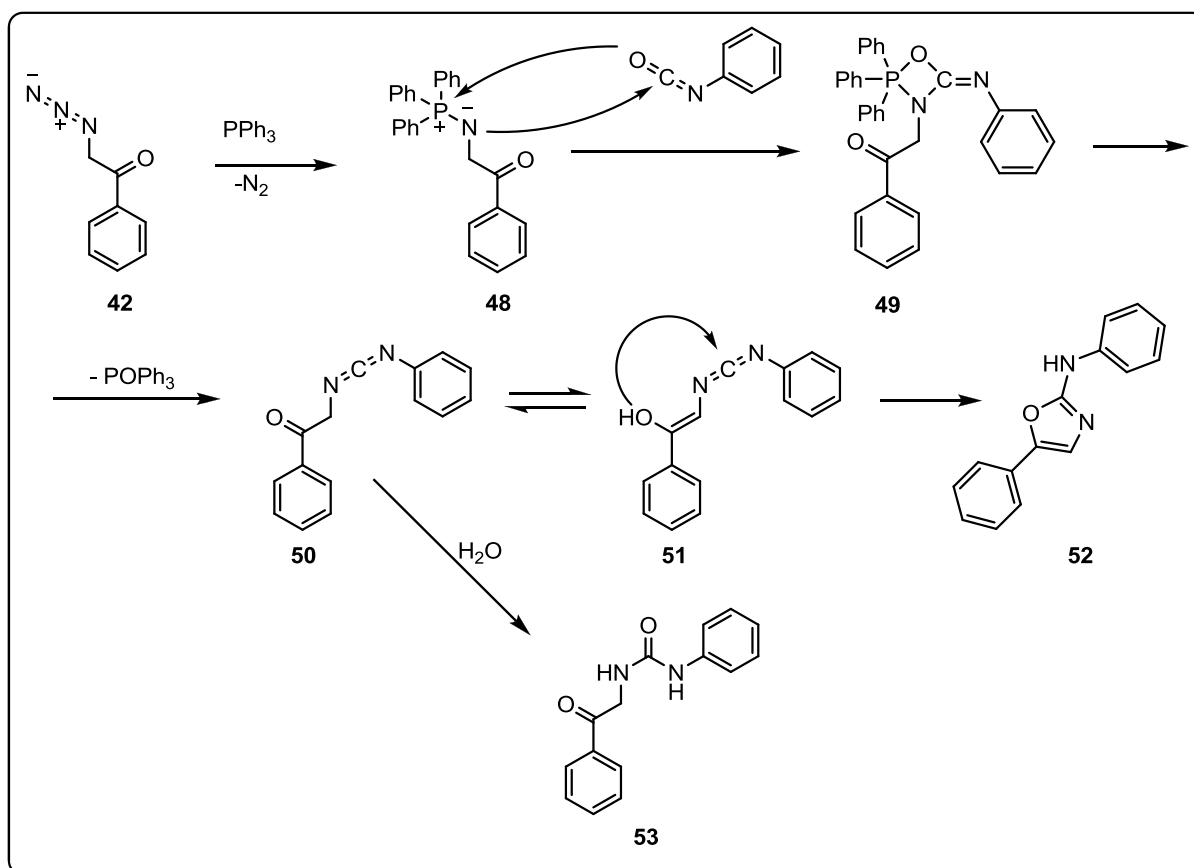


Schéma 20. Mechanizmus vzniku aminooxazolového fragmentu „azaylidovou“ metódou.

3.6.7 Príprava 8 z bróm derivátu 7 couplingovou reakciou

Reakcia v Schéme 21 nebola publikovaná. Uvádzame príklady z literatúry, kde autori pripravili štruktúrne podobné deriváty.

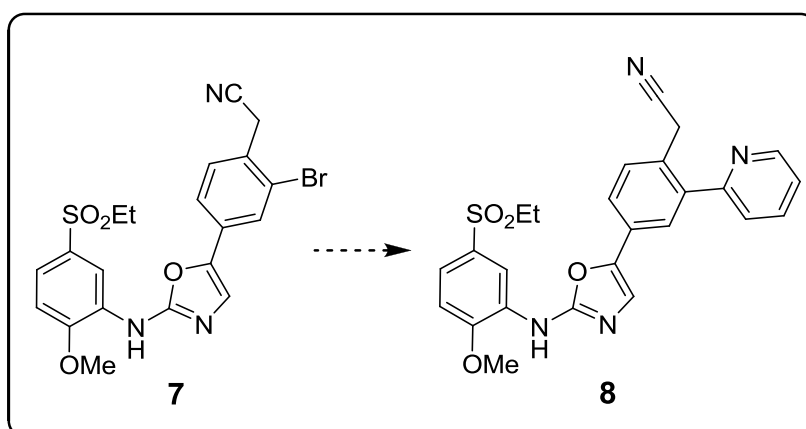


Schéma 21. Zamýšľaná príprava produktu 8.

Reakcia zo Schémy 22 opisuje prípravu analógu **55**. V prípade prípravy látky **55** získali 73 % produktu.²²

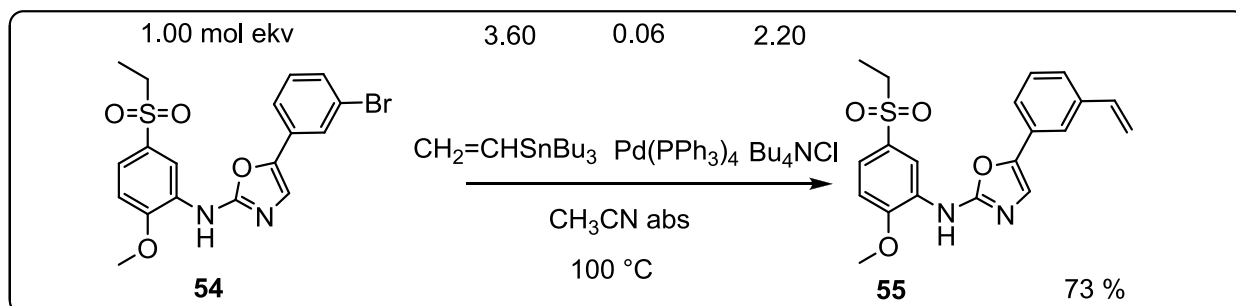


Schéma 22. Príprava vinylarylu **55** za podmienok Stilleho couplingu.

Využitie Suzukiho couplingu je alternatívnou reakciou pri príprave cieľovej molekuly **TM**. Brómderivátu **56** s aromatickou borónovou kyselinou **57** poskytuje produkt **58** vo vysokom 90 % výťažku.²⁴ (Schéma 23)

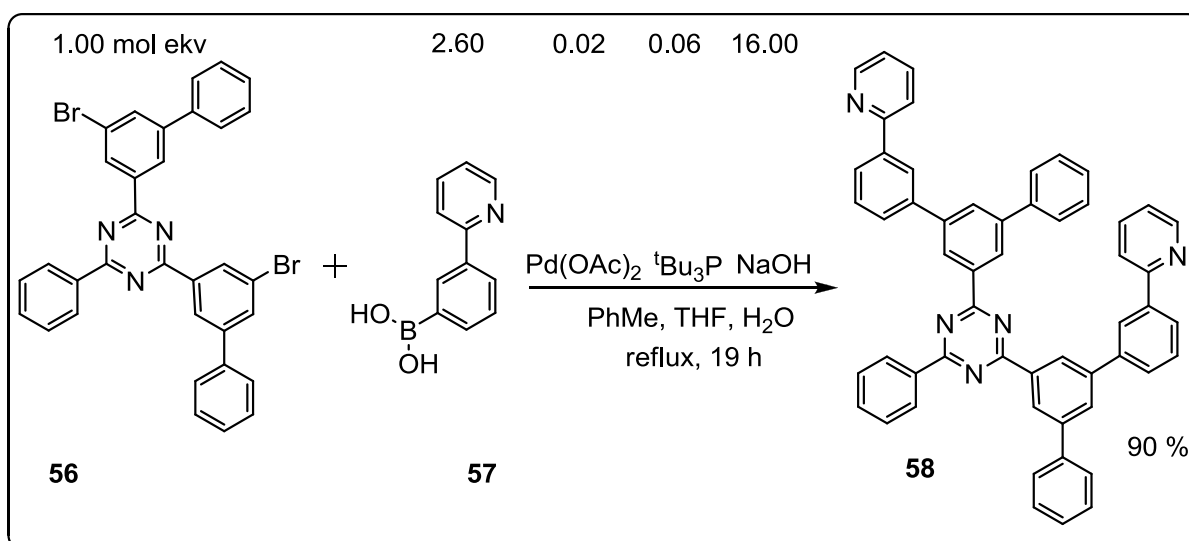


Schéma 23. Spôsob prípravy **58**.

Veľa odborných zdrojov opisuje couplingové reakcie na arylhalogenidoch. Stilleho coupling je reakcia, ktorou zamýšľame pripraviť látku **8** nakoľko v našej výskumnej skupine máme zvládnutú metodiku prípravy obdobných substrátov.

²⁴ Tosoh Corporation, Sagami Chemical Research Institute, Patent: EP/2361909 A1, **2011**.

3.6.8 Príprava amidu **TM** kyslou hydrolýzou nitrilu **8**

Konkrétna príprava produktu **TM** nie je dosiaľ známa. (Schéma 24) Z literatúry uvádzame príklady kyslo katalyzovanej hydrolýzy nitrilov.

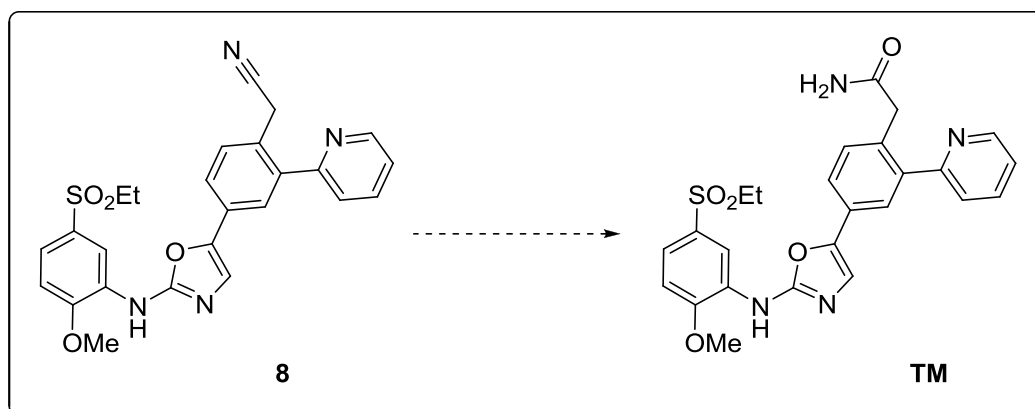
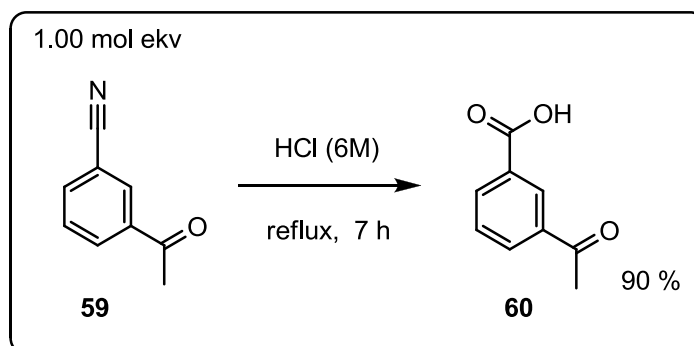


Schéma 24. Zamýšľaná príprava produktu **8**.

Vzhľadom na funkčné skupiny prítomné na substráte **8** a naše predošlé skúsenosti s týmto typom zlúčenín vieme, že bázičná hydrolýza môže spôsobiť rozklad oxazolových derivátov. Našli sme reakciu, kde autori patentu uskutočnili kyslú hydrolýzu karbonitrilu **59** na kyselinu **60**. Vzhľadom na dlhý reakčný čas a tvrdé reakčné podmienky predpokladáme zachytenie amidového intermediátu po zmiernení podmienok. Autori získali 90 % látky **60** ako je uvedené v Schéme 25.²⁵



²⁵ Kalindjian, S. B.; Buck, I. M.; Steel, K. I. M. Wright, P. T.; Tozer, M. J.; Pether, M. J.; Low, C. M. R. Patent: US2003/199565 A1, 2003.

V literatúre je veľa príkladov hydrolýzy nitrilov. Na bážickú hydrolýzu nitrilov sa využíva H_2O_2 a alkalický hydroxid. Mechanizmus reakcie spočíva v acidobázickej reakcii medzi hydroxidom a H_2O_2 , čím vzniká anión HO_2^- , ktorý je nukleofilnejší ako HO^- . Výhodou sú miernejšie podmienky a teploty, ako v prípade kyslej hydrolýzy (7 h reflux v konc HCl). V našom prípade sme však vylúčili postupy využívajúce bážickú hydrolýzu z dôvodu na ňu citlivej aminooxazolovej skupiny. V literatúre sa kyslá hydrolýza nitrilov používa v prípade, že želaný výsledný produkt je kyselina. Reakčným intermediátom je amid, ktorý by sme mohli zachytiť použitím optimalizovaných reakčných podmienok.

3.7 Druhý návrh na syntézu acetamidu TM

Prvé syntetické stupne uvedené v Schéme 26 sú totožné s prvým navrhnutým postupom. (Schéma 1) Druhá syntéza sa líši od prvej hydrolýzou substrátu **4** na amid **9**. Budovanie oxazolového fragmentu sa potom ďalej uskutočňuje s látkou obsahujúcou amidový substituent. Uprednostňujeme však prvý syntetický postup (Schéma 1) z dôvodu možnej reaktívnosti substrátu **10** s Br v α polohe voči karbonylovej skupine, ktorý môže počas reakcie poskytovať vedľajšie produkty (polyméry) reakciou s amidovou skupinou látky **9** ale aj **10**. (Schéma 26)

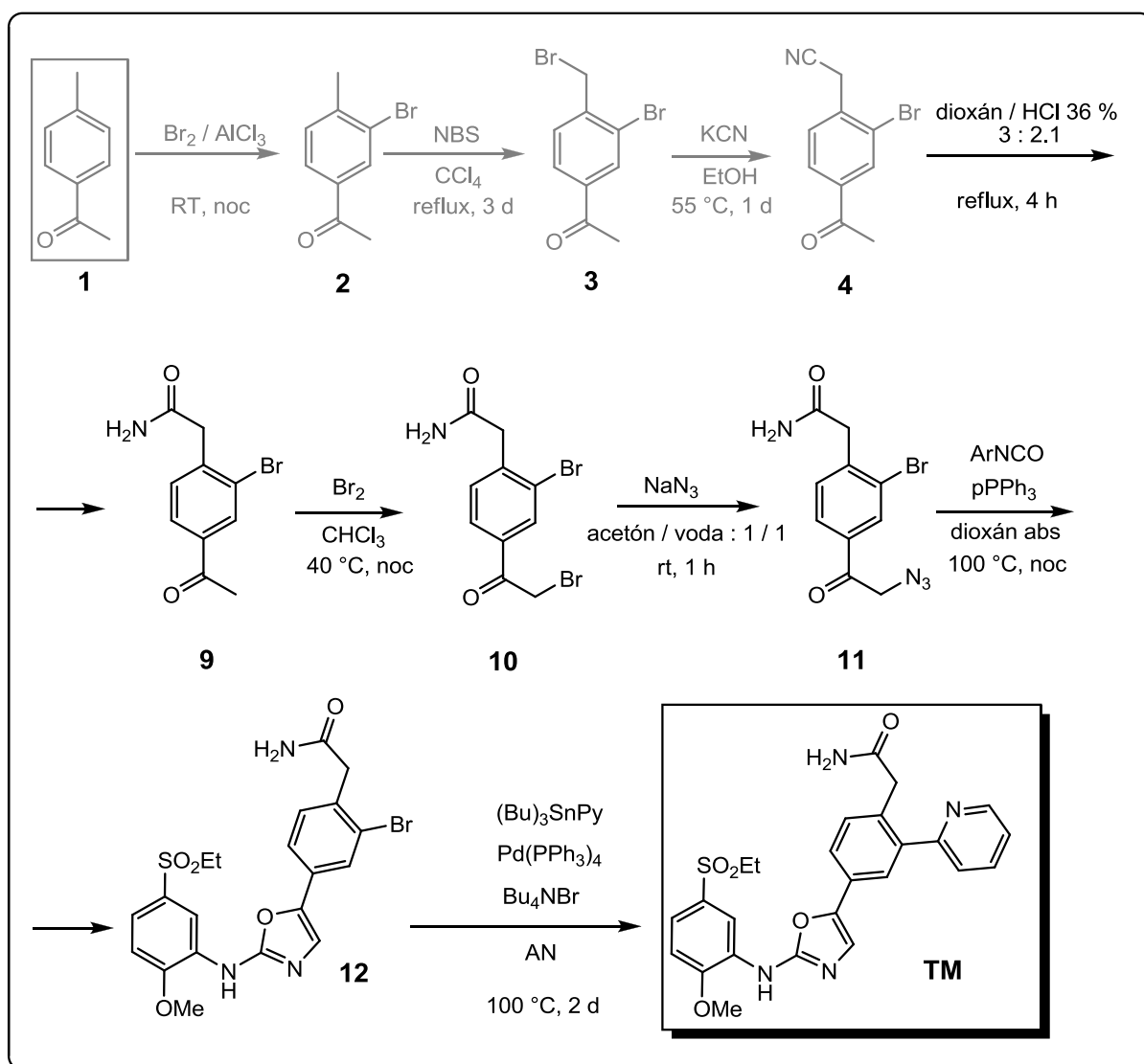


Schéma 26. Druhý návrh na syntézu cieleného acetamidu **TM**.

3.7.1 Príprava 2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetamidu (9)

Reakcia zo Schémy 27 nebola opísaná v literatúre. Uvádzame príklady reakcií z literatúry na štruktúrne podobných substrátoch.

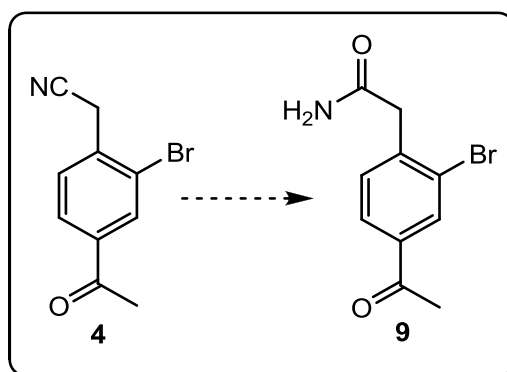


Schéma 27. Zamýšľaná príprava acetamidu **9**.

Autori reakciou v Schéme 28 pripravili amid **62** vo vysokom výťažku. Použili 30 % peroxid vodíka a K_2CO_3 v DMSO. DMSO, okrem funkcie rozpúšťadla, zabezpečovalo zvýšenie bázicity uhličitanu a následnú generáciu nukleofilného peroxidového aniónu. Kvantitatívny výťažok sa dosiahol už pri 20 °C počas 30 minút.²⁶

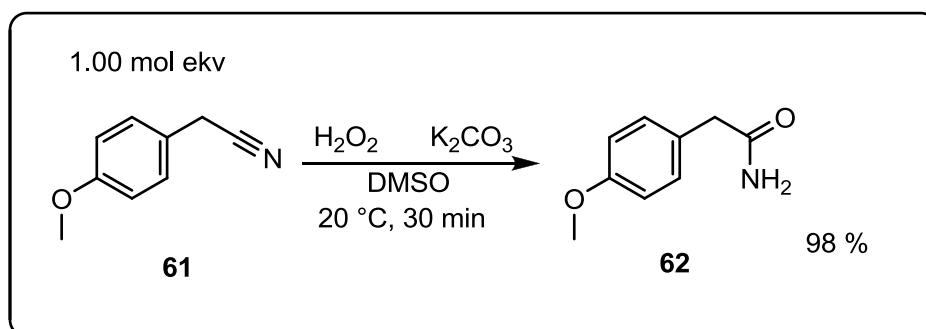


Schéma 28. Príprava amidu **62** hydrolyzou nitrilu **61** s peroxidom vodíka.

Na štruktúrne podobnom substráte **63** v Schéme 29 autori patentu pripravili amid **64** pomocou kyslej hydrolyzy. Ako činidlo používali koncentrovanú HCl v zmesi s THF kvôli zlepšeniu rozpustnosti. Podarilo sa im získať 70 % požadovaného amidu **64**.²⁷

²⁶ Katritzky, A. R.; Pilarski, B.; Urogdi, L. *Synthesis* **1989**, 12, 949-951.

²⁷ AstraZeneca, Patent: WO2007/30061 A1, **2007**.

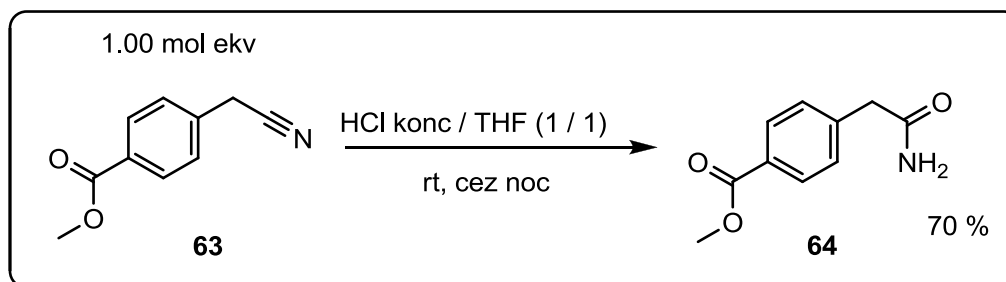


Schéma 29. Postup prípravy amidu kyslou hydrolýzou **63**.

Vzhľadom na náš substrát **4** by sme mohli využiť ako kyslé, tak aj bázické podmienky, pretože sa v tomto skelete nenachádza na bázu citlivý aminooxazolový fragment. Bázické podmienky však môžu robiť problém, nakoľko látka **4** má vplyvom CN skupiny kyslé metylénové vodíky a zároveň v molekule elektrofilný karbonyl.

3.7.2 Príprava acetamidu **10** bromáciou acetofenónu **9**

Bromácia substrátu **9** zo Schémy 30 doposiaľ nebola publikovaná. Uvádzame literárne zdroje obdobných reakcií na príbuzných substrátoch.

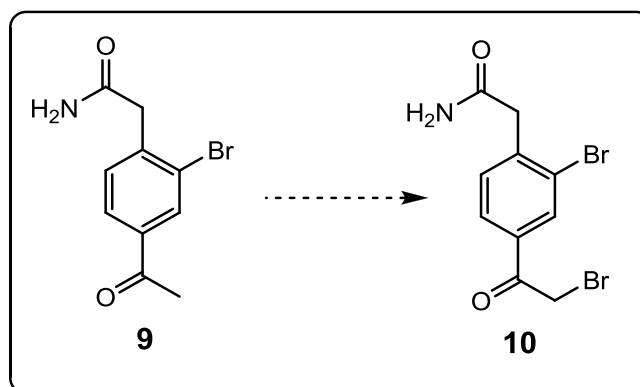


Schéma 30. Zamýšľaná príprava intermediátu **10**.

Všeobecne sú známe bromácie do α polohy voči karbonylovej skupine. Reakčným činidlom je obyčajne Br_2 v neutrálnom alebo kyslom prostredí. V našom prípade (Schéma 30), vzhľadom na reaktivitu brómacetofenónového fragmentu v produkte **10** sa obávame jeho následnej reakcie s amidovou skupinou v **9**, alebo aj **10** (možná polymerizácia).

3.7.3 Príprava azidu **11** nukleofilnou substitúciou brómderivátu **10**

Reakcia zo Schémy 31 nie je známa. Uvádzame však prehľad literatúry aj so substrátmi, kde boli uskutočnené substitúcie bromidovej skupiny za azid.

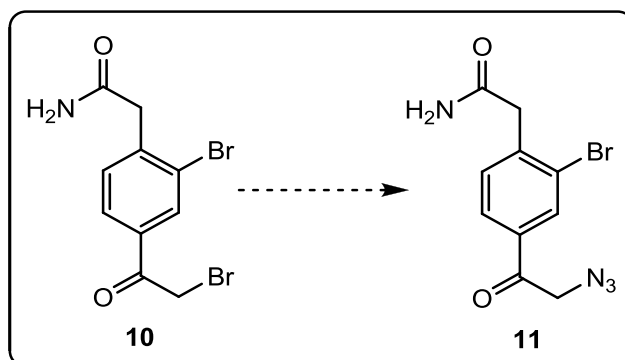


Schéma 31. Predpokladaná príprava navrhnutého azidu **11**.

Ako je uvedené v Schéme 32 autorom sa v článku podarilo pripraviť z brómderivátu imidu **65** azidový derivát **66**. V prvom kroku pripravili bromid **65** a následne do reakčnej zmesi prisypali tuhý NaN₃ pričom získali 79 % výťažok produktu **66**.²⁸

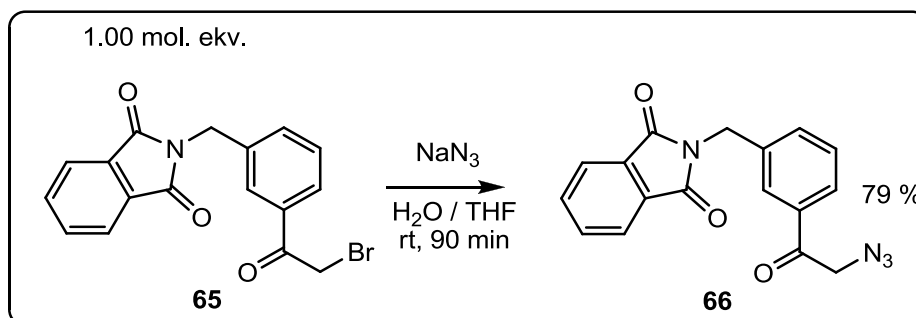


Schéma 32. Príprava azidu **66**.

Podarilo sa nám v literatúre nájsť aj prípravu azidu na substráte s aminosulfónovou skupinou. (Schéma 33) Pri reakcii však reagoval vicinálny dibrómoderivát **67** za vzniku produktu **68**. Autoroi článku ponechali zmes reagovať počas 24 h pri rôznych teplotách.²⁹

²⁸ Ballentine, S. K.; Barrish, J. C.; Chen, P.; Dhar, T. G. M.; Fleener, C. A.; Gu, H. H.; Hollenbaugh, D. L.; Iwanowicz, E. J.; Norris, D.; Rouleau, K. A.; Shen, Z.; Townsend, R.; Watterson, S. H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3557-35601.

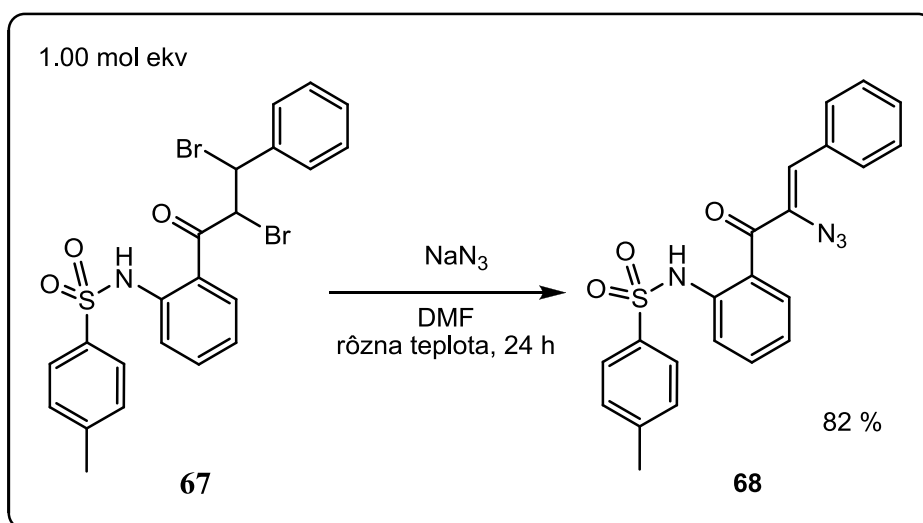


Schéma 33. Spôsob prípravy azidu **68**.

3.7.4 Príprava oxazolu **12** z azidu **11**

Reakcia zo Schémy 34 nebola v literatúre opísaná. Podrobnej analýze príprave oxazolov sme sa venovali v prvom syntetickom postupe. Napríklad postup zo Schémy 15 opisuje prípravu oxazolového fragmentu zo štruktúrne podobných východiskových látok ako uvádzame v Schéme 34.

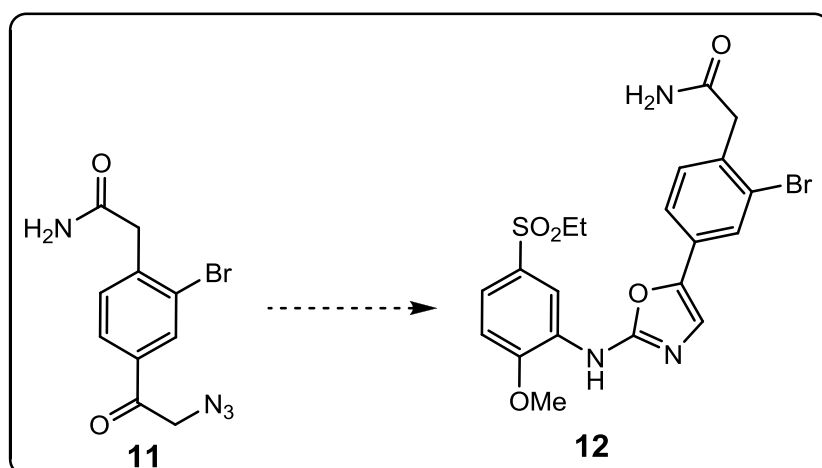


Schéma 34. Predpokladaná príprava oxazolového derivátu **12**.

²⁹ Litkei, G.; Szilágyi, L.; Tökés, A. L. *Synthetic Commun.* **1992**, 22, 2433-2445.

3.7.5 Príprava TM couplingovou reakciou z 12

Reakcia zo Schémy 35 nie je opísaná. Uvádzame príklad z literatúry, ktorý publikovala naša výskumná skupina na príbuznom substráte.

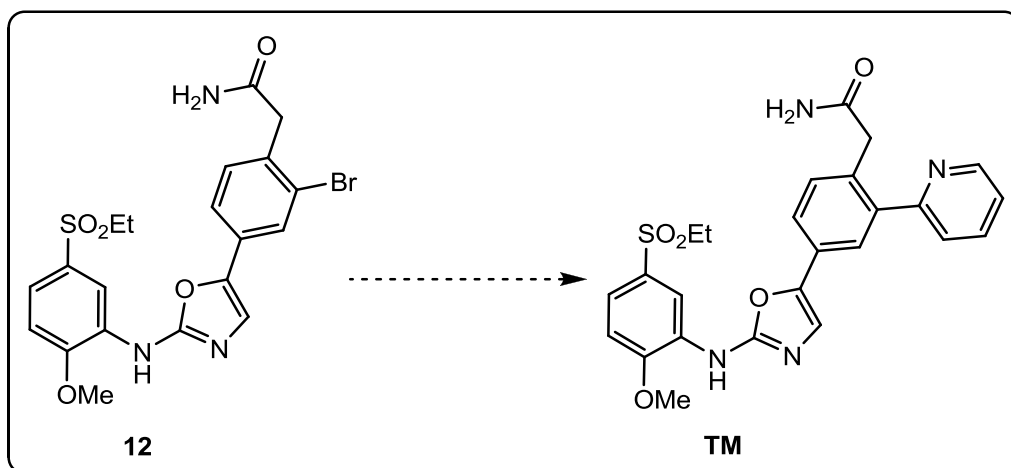


Schéma 35. Zamýšľaná príprava TM.

Na prípravu látky **70** autori využili Stilleho coupling a reakciu uskutočnili v zatavenej ampuli pri teplote 100 °C v acetonitrile počas 2 dní. Reakcia viedla k požadovanému produktu **70** vo výťažku 52 %.² (Schéma 36)

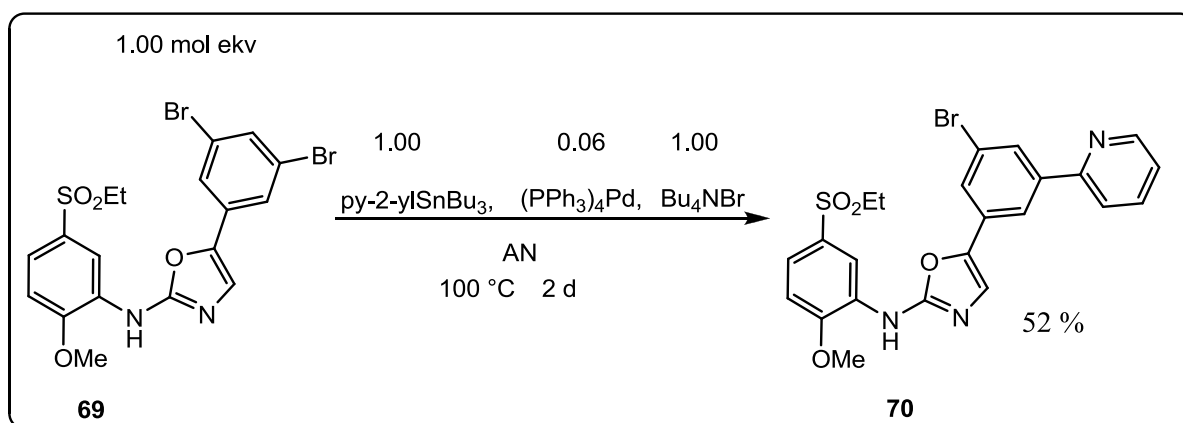


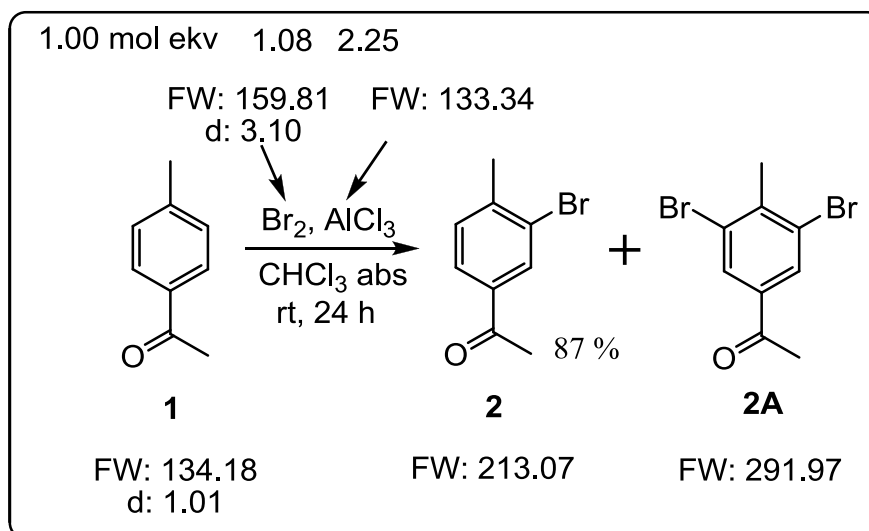
Schéma 36. Podmienky pre prípravu **70**.

4 Experimentálna časť

4.1 Metódy a použitý materiál

Potrebné chemikálie a činidlá sa kupovali od firiem Sigma Aldrich, Merck, Fluka, alebo Acros. Rozpúšťadlá sme sušili pomocou CaH_2 , alebo sodíku (nie halogenované) a na skladovanie takýchto rozpúšťadiel sme použili molekulové sitá 4Å. Reakcie vyžadujúce suché podmienky sa uskutočnili pod atmosférou argónu. Na TLC analýzu sa používali produkty Merck F₂₅₄ s vrstvou SiO_2 na hliníkovej platni. Na detekciu škvrn sme použili UV lampu (254 nm) alebo jódové pary. Na stĺpcovú chromatografiu sme používali SiO_2 Silica, Merck 60 (40 - 63 μm). Teploty topenia boli stanovované na Koflerovom aparáte a neboli korigované. IČ spektrá boli merané na prístroji FT-IR-ART REACT IR 1000 (ASI Applied Systems) v oblasti 650 - 4002 cm^{-1} na diamantovom detektore bez rozpúšťadiel referenčne oproti vzduchu. Elementovné analýzy (C, H, N) sa získali pomocou prístroja Carlo Erba Strumentazione Model 1106. ^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektrá boli merané na Varian Gemini spektrometri (300 MHz pre ^1H , alebo 75.4 MHz pre ^{13}C) v CDCl_3 alebo $\text{DMSO}-d_6$. Chemické posuny udávame v ppm vzhľadom na zvolený štandard TMS a interakčné konštanty J v Hz.

4.2 Príprava 1-(3-bróm-4-metylfenyl)etanónu (2)



Experiment:³⁰

Do 50 ml CHCl_3 abs sme pridali 22.2 g (166.5 mmol, 2.20 mol ekv) AlCl_3 . Za miešania sme do zmesi v priebehu 5 min pridali 10.0 ml (10.13 g, 75.50 mmol, 1.00 mol ekv) acetofenónu **1**. Počas prikvapkávania acetofenónu **1** sa reakčná zmes samovoľne zahriala. Po jej ochladení na rt sme do reakcie pridávali 4.2 ml (13.02 g, 81.47 mmol, 1.08 mol ekv) Br_2 počas 10 min a zmes sme potom nechali miešať pri rt cez noc. Nasledujúci deň sme pomocou TLC analýzy už nepozorovali východiskovú látku **1** a preto sme reakčnú zmes spracovali. Obsah banky sme naliali do 250 ml roztoku 1 M HCl a vodnú fázu sme extrahovali s CHCl_3 (3 x 50 ml). Spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a oddelenú organickú fázu sme sušili pomocou Na_2SO_4 . Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili pomocou RVO a dosušili prostredníctvom HV. Získaný surový produkt sme destilovali na Büchi KGR a pri 125 °C / 3 Torr pričom sme vydestilovali 13.93 g (65.38 mmol, 86.6 %) produktu **2**. Ako minoritný vedľajší produkt sme v ^1H NMR surového produktu identifikovali aj signály vodíkov pre 1-(3,5-dibróm-4-metylfenyl)etanón (**2A**) v 9 mol % zastúpení voči látke **2**.

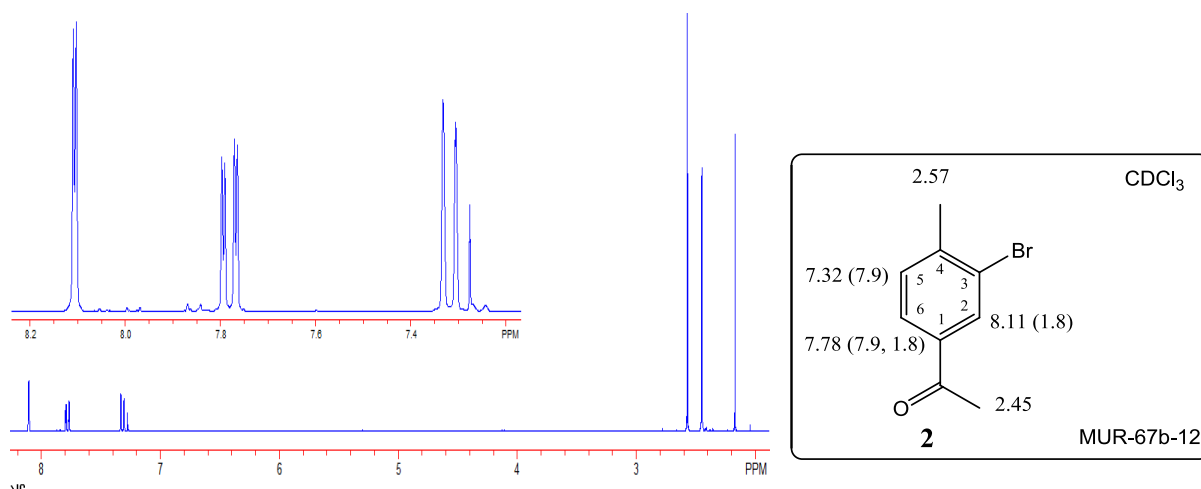
1-(3-bróm-4-metylfenyl)etanón (2). Látka **2** má v literatúre opísanú T.t.: 43 °C [aq. etanol],³¹ ako aj ^1H , ^{13}C -NMR, IR a MS spektrá.³⁰

T.t.: 39.7 - 41.0 °C [po destilácii, biela kryštalická látka].

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , MUR-67b-12): δ 8.11 (d, 1H, $J(2,6) = 1.8$ Hz, H-C(2)), 7.78 (dd, 1H, $J(5,6) = 7.9$ Hz, $J(2,6) = 1.8$ Hz, H-C(6)), 7.32 (d, 1H, $J(5,6) = 7.9$ Hz, H-C(5)), 2.57 (s, 3H, Ar CH_3), 2.45 (s, 3H, CO CH_3).

³⁰ Luo, Fen-Tair,; Patent;US2006/4216; **2006**. (*identická VL aj postup až na to, že sme pri spracovaní reakcie použili 1 M HCl, na rozdiel od patentovaného postupu s 3 M HCl*).

³¹ Lutz, R. E.; Allison, K. R.; Ashburn, G.; Bailey, S. P.; Clark, T. M.; Codington F. J.; Freek, A. J.; Jordan, H. R.; Leake, H. N.; Martin, A. T.; Nicodemus, C. K.; Rowlett, J. R.; Shearer, H. N.; Smith, D. J.; Wilson, W. J. *J. Org. Chem.* **1947**, 12, 617-680.



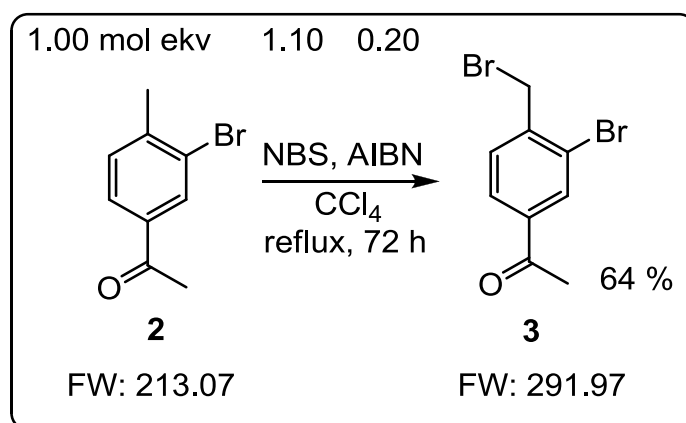
*2.13 ppm, patrí chemickému posunu acetónu, ktorý zostal po umývaní NMR kyvety

FT IR (solid, cm⁻¹): 3333 (w), 2949 (w), 2920 (w), 1909 (w), 1677 (s, C=O), 1597 (m), 1555 (m), 1422 (w), 1380 (m), 1352 (m), 1282 (m), 1247 (s), 1210 (w), 1035 (m), 1006 (w), 966 (w), 890 (w), 818 (m).

1-(3,5-dibrom-4-metylphenyl)etanón (2A)

O látke **2A** je z databázy Reaxys známa len jej T.t. 94 - 98 °C [ⁱPrOH] a IR spektrum.³² Charakteristikou látky **2A** sme sa vzhľadom na primárny cieľ diplomovej práce ďalej nezaoberali.

4.3 Príprava 1-(3-bróm-4-(brómmetyl)fenyl)etanónu (3)



Experiment:³³

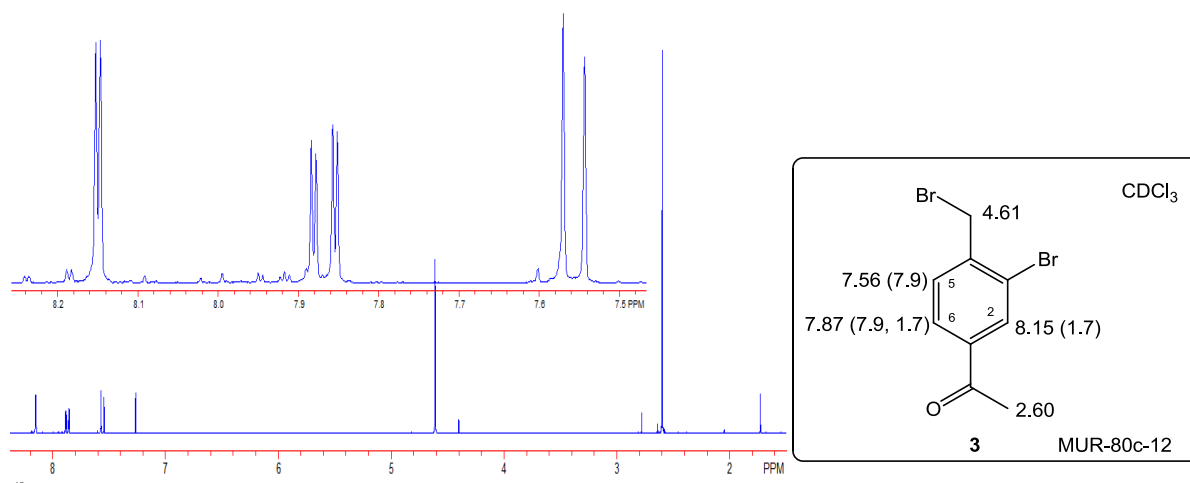
³² Boehringer Ingelheim Pharma GmbH and Co. KG Patent: US7230001 B1, **2007**.

Zmes 2.65 g (12.5 mmol, 1.00 mol ekv) **2**, 2.40 g (13.5 mmol, 1.10 mol ekv) NBS a 0.41 g (2.4 mmol, 0.20 mol ekv) AIBN sme rozpustili v 10 ml CCl₄ a zahrievali na reflux počas 3 dní, kedy sme pomocou TLC už nepozorovali východiskovú látku **2**. Potom sme reakčnú zmes ochladili na rt a vzniknutý tuhý podiel odfiltrovali. Filtrát sme odparili pomocou RVO a HV. Získaný žltý olej kryštalizovali zo zmesi H / EA a získali sme 2.32 g (8.00 mmol, 64 %) bielej kryštalickej látky **3**.

1-(3-bróm-4-(brómmetyl)fenyl)etanón (3). Látka **3** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

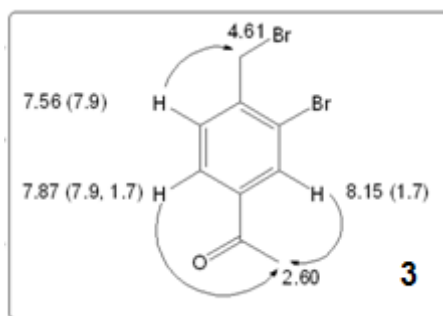
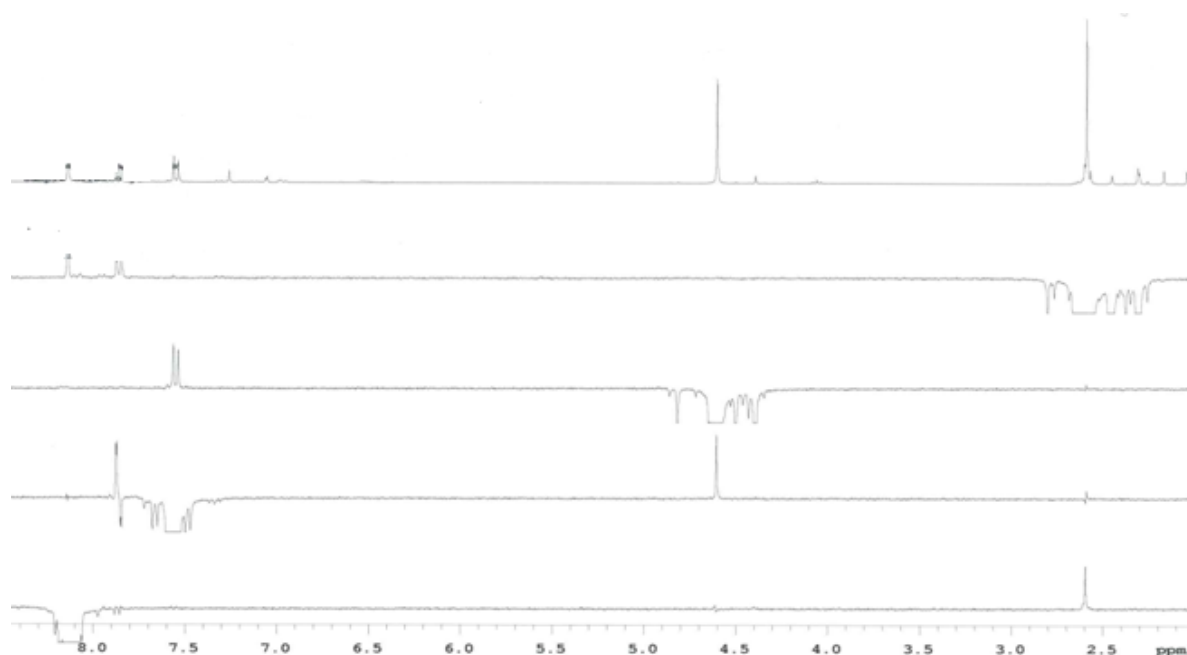
Biela kryštalická látka, **T.t.**: 67.1 - 68.4 °C [H / EA].

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, MUR-80c-12): δ 8.15 (d, 1H, $J(2,6) = 1.7$ Hz, H-C(2)), 7.87 (dd, 1H, $J(5,6) = 7.9$ Hz, $J(2,6) = 1.7$ Hz, H-C(6)), 7.56 (d, 1H, $J(5,6) = 7.9$ Hz, H-C(5)), 4.61 (s, 2H, ArCH₂Br), 2.60 (s, 3H, COCH₃).



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, MUR-67b-12): uskutočnili sme aj **NOE** experiment ako dôkaz pozície Br na aromatickom jadre látky **2**.

³³ Gugel, H.; Zeller, K-P.; Wentrup, C. *Chem. Berichte* **1983**, *116*, 2775-2784. (v literatúre je opísaná reakcia toluénu s NBS a AIBN za vzniku benzylbromidu v 64 % výťažku).

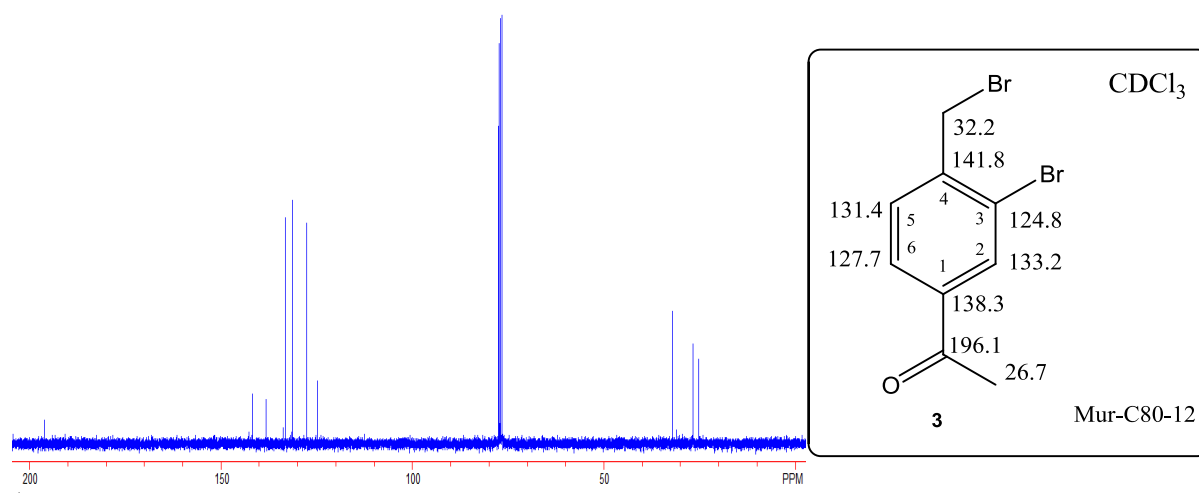


V spektre je zobrazených päť po sebe idúcich ^1H NMR spektier. Prvé z nich (horné) je štandardne namerané vodíkové spektrum látky **3** kvôli určeniu posunu jednotlivých vodíkov v skúmanej molekule **3**. Druhé spektrum je výsledkom experimentu Nukleárneho Overhauserovho Efektu (NOE), kde sa počas merania vyžiarili tri vodíky metylu s chemickým posunom 2.60 ppm. V spektre sme identifikovali signály s chemickými posunmi 8.15 a 7.87 ppm, ktoré z prvého vodíkového spektra na základe interakčného štiepenie prislúchajú vodíkom nachádzajúcim sa v orto polohe vzhľadom COCH_3 . Pri vyžiarení aromatických vodíkov s chemickými posunmi 8.15 a 7.87 ppm, sa objavil signál troch vodíkov s chemickým posunom 2.60 (piate spektrum).

Tretie spektrum je výsledkom NOE experimentu, kde boli vyžiarené metylénové vodíky s chemickým posunom 4.61 ppm. V spektre sme následne identifikovali predpokladaný aromatický signál vodíka s chemickým posunom 7.56 ppm. Štvrté spektrum je overením výsledku tretieho spektra, kde bol vyžiarovaný aromatický vodík s chemickým posunom 7.56 ppm. Podľa očakávania sme pozorovali signál pre aromatický vodík s chemickým posunom 7.56 ppm.

Na základe experimentu NOE, ktorý využíva interakcie cez priestor sme potvrdili predpokladanú štruktúru látky **3**.

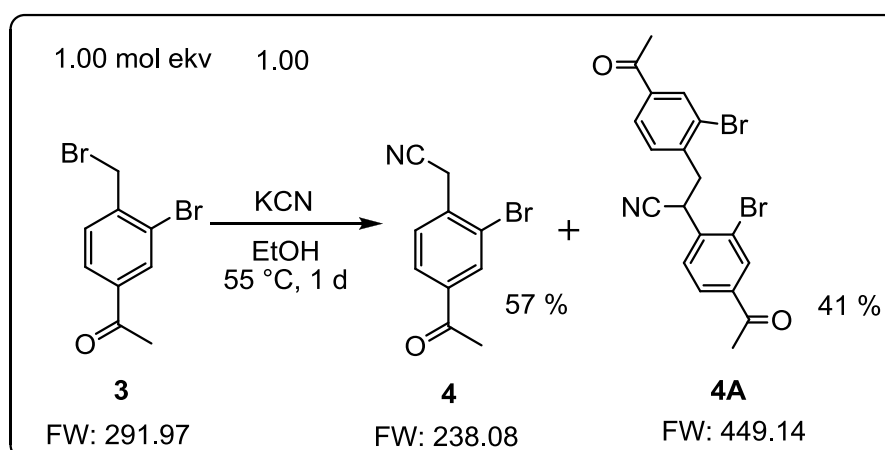
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , MUR-80C-12): δ 196.1 (s, C=O), 141.8 (s, C(4)), 138.3 (s, C(1)), 133.2 (d, C(2)), 131.4 (d, C(5)), 127.7 (d, C(6)), 124.8 (s, C(3)), 32.2 (t, CH_2Br), 26.7 (q, CH_3CO).



FT IR (solid, cm^{-1}): 3352 (w), 3098 (w), 3062 (m), 2998 (w), 2854 (w), 1681 (s, C=O), 1600 (w), 1555 (m), 1487 (w), 1435 (m), 1416 (w), 1383 (m), 1357 (m), 1280 (m), 1253 (s), 1226 (m), 1203 (m), 1142 (w), 1084 (m), 1040 (m), 963 (m), 912 (m), 876 (w), 838 (m).

MS (ESI m/z): 292.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.4 Příprava 2-(4-acetylphenyl)acetonitrilu (**4**)



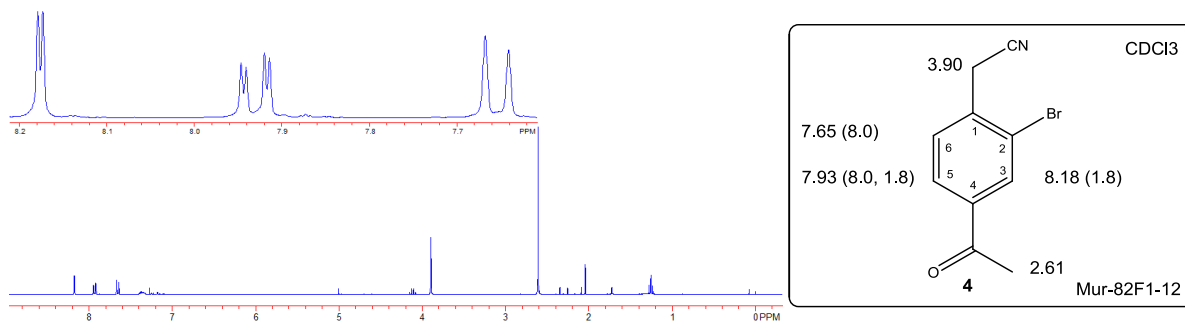
Experiment:³⁴

Látku **3** 200.0 mg (0.69 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v 2.0 ml EtOH. Následne sme do reakčnej zmesi pridali 44.0 mg (0.69 mmol, 1.00 mol ekv) KCN a zmes sme za miešania zahrievali na teplotu 55 °C počas 1 d. Na druhý deň sme na základe TLC už nepozorovali východiskovú látku **3**. Potom sme reakčnú zmes nechali ochladiť na rt a prchavé podiely z nej sme odparili pomocou RVO. K zahustenej zmesi sme pridali EA a vzniknutý roztok sme extrahovali s vodou. Organické vrstvy sme spojili a vysušili pomocou Na₂SO₄. Po filtrácii sme organickú vrstvu zahustili na RVO a následne dosušili pomocou HV. Získali sme hnedú olejovitú látku, ktorú sme čistili pomocou FLC na SiO₂ v zmesi (H / EA, 2 / 1). Získali sme 64.0 mg (0.39 mmol, 56.5 %) produktu **4** v podobe bielej kryštalickej látky a 123.4 mg (0.28 mmol, 40.6 %) vedľajšieho produktu látky **4A**.

2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetonitril (4). Látka **4** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

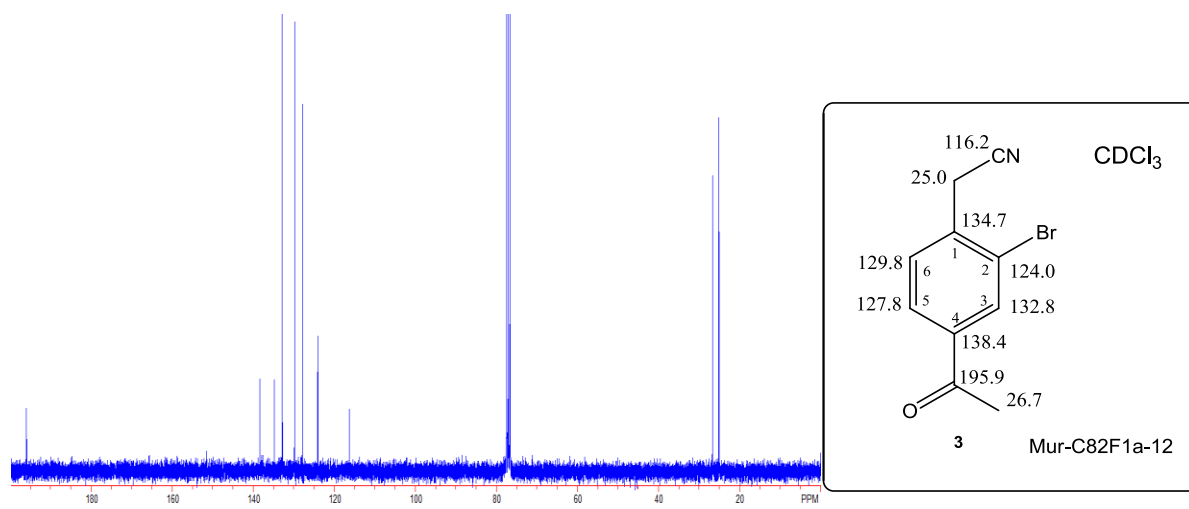
Biela kryštalická látka, **T.t.:** 62.0 - 63.7 °C [MeOH]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, MUR-82F1-12): δ 8.18 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(3)), 7.93 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.0 Hz, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(5)), 7.65 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.0 Hz, H-C(6)), 3.90 (s, 2H, ArCH₂CN), 2.61 (s, 3H, COCH₃).



³⁴ Pieck, J. C.; Kuch, D.; Grolle, F.; Linne, U.; Haas, C.; Carell, T. *J. A. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1404-1405. (v literatúre opisujú reakciu KCN so štruktúrne podobným substrátom (1-(4-(brómmetyl)fenyl)etanónom) za vzniku požadovaného produktu v 67 % výťažku).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , MUR-C82F1a-12): δ 195.9 (s, C=O), 138.4 (s, C(4)), 134.7 (s, C(1)), 132.8 (d, C(3)), 129.8 (d, C(6)), 127.8 (d, C(5)), 124.0 (s, C(2)), 116.2 (s, CN), 26.7 (q, CH_3CO), 25.0 (t, CH_2CN).

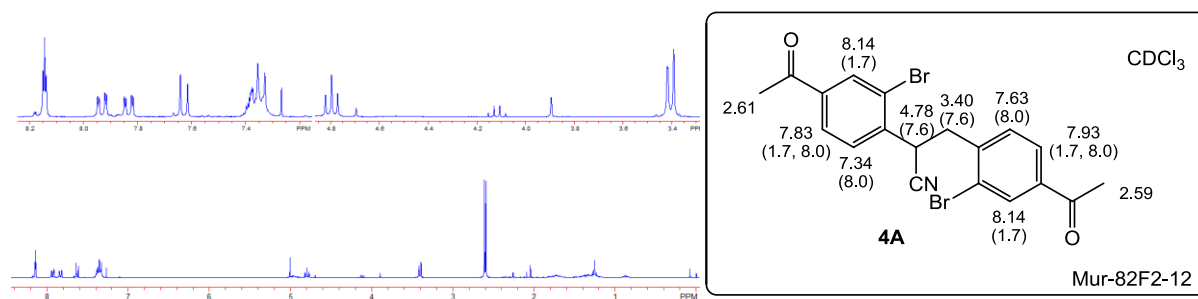


FT IR (solid, cm^{-1}): 3334 (w), 3080 (w), 3002 (w), 2922 (s), 2901 (w), 2250 (m, CN), 2096 (w), 1970 (w), 1737 (m), 1671 (s, C=O), 1599 (m), 1558 (m), 1431 (m), 1397 (m), 1384 (m), 1357 (m), 1284 (m), 1248 (s), 1141 (m), 1085 (m), 1037 (m), 962 (m), 926 (m), 880 (m), 834 (m).

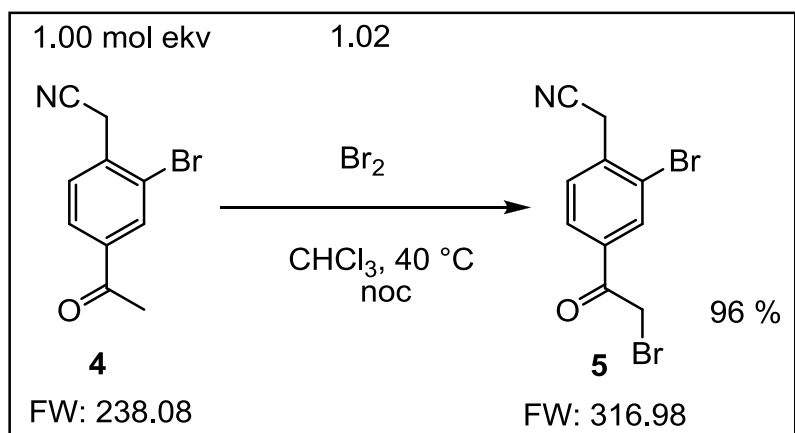
MS (ESI m/z): 238.1 $[\text{M}]^-$

2,3-bis(4-acetyl-2-brómfenyl)propánnitril (4A)

Látka **4A** nie je zatiaľ v literatúre opísaná. Látkou **4A** sme sa z hľadiska ďalších fyzikálnych charakteristík nezaoberali, vzhľadom na čas a primárny cieľ diplomovej práce. Uvádzame ^1H NMR spektrum a priradené posuny vodíkov pre **4A**.



4.5 Príprava 2-(2-bróm-4-(2-brómacetyl)fenyl)acetonitrilu (5)



Experiment:³⁵

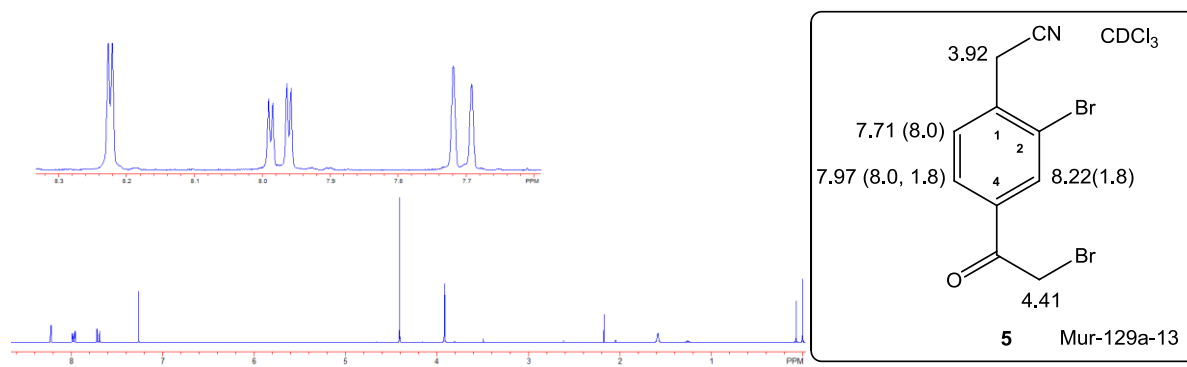
Nitril **4** 800 mg (3.36 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v 30 ml CHCl₃. Následne sme do zmesi pridali 0.17 ml (0.54 g, 3.42 mmol, 1.02 mol ekv) Br₂ a zmes sme nechali miešať cez noc pri 40 °C. Na druhý deň sme na základe TLC analýzy už nepozorovali žiadnu východiskovú látku **4** a preto sme reakčnú zmes spracovali odparením prchavých zložiek na RVO a následne na HV. Zo zahusteného roztoku sme získali žltú tuhú látku, ktorú sme čistili trituráciou z CHCl₃ acetónom. Získali sme 980 mg (3.23 mmol, 96 %) produktu **5** v podobe bielej tuhej látky.

2-(2-brómo-4-(2-brómoacetyl)fenyl)acetonitril (5). Látka **5** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

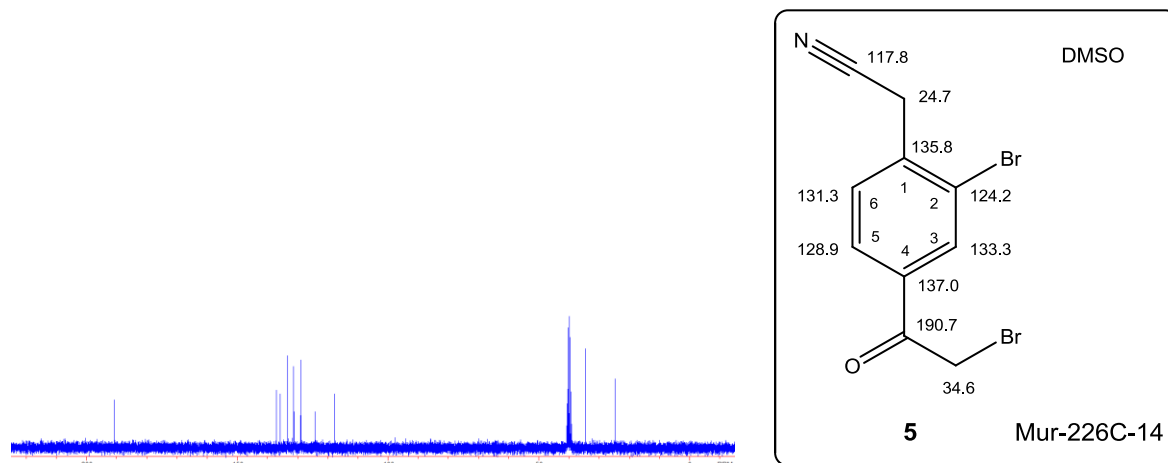
Biela tuhá látka, **T.t.:** 134.7 - 135.8 °C [CDCl₃].

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, MUR-129a-13): δ 8.22 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(3)), 7.97 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.0 Hz, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(5)), 7.71 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.0 Hz, H-C(6)), 4.41 (s, 2H, COCH₂Br), 3.92 (s, 2H, -CH₂CN).

³⁵ Liao, S.; Tang, Y.; Wang, P.; Zhu, J.-B. *Org. Lett.* **2013**, 15, 3606-3609. (Autori v literatúre opisujú bromáciu acetofenónu v CHCl₃ s Br₂ počas 2.5 h pri teplote 20 °C. Po čistení získali 72 % produktu.)

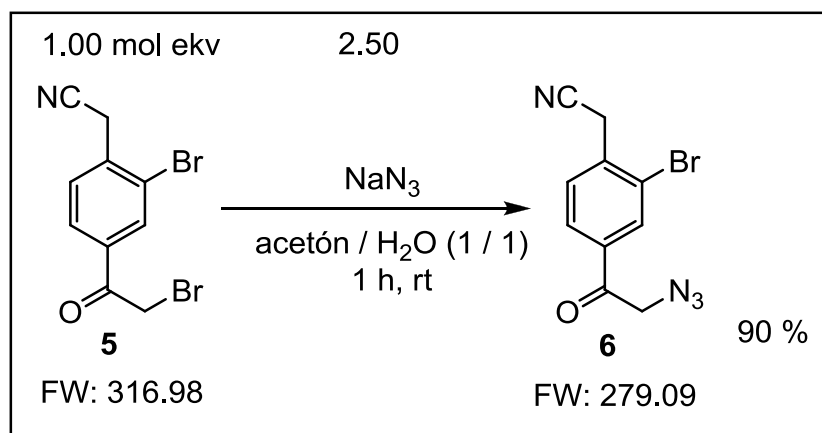


¹³C NMR (75 MHz, DMSO, MUR-226C-14): δ 190.7 (s, C=O), 137.0 (s, C(4)), 135.8 (s, C(1)), 133.3 (d, C(3)), 131.3 (d, C(6)), 128.9 (d, C(5)), 124.2 (s, C(2)), 117.8 (s, CN) 34.6 (t, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}_3$), 24.7 (t, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$).



MS (ESI m/z): 315.9 [M-H]⁻

4.6 Príprava 2-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetonitrilu (6)



Experiment:³⁶

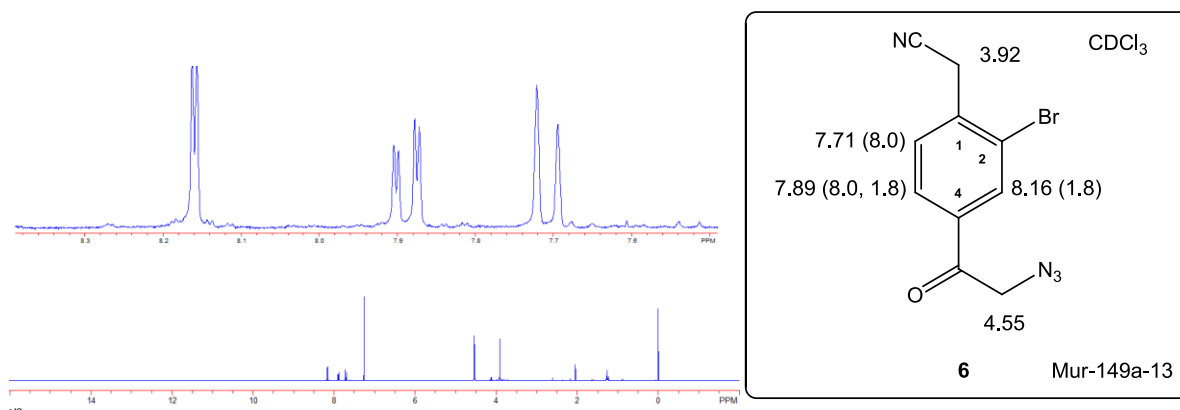
Látku **6** 100 mg (0.27 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v 7 ml acetónu. Následne sme rozpustili 53 mg (0.81 mmol, 2.50 mol ekv) NaN_3 v 7 ml H_2O . Potom sme organickú a vodnú zmes zliali a miešali počas 1 h pri rt. Následne sme zmes zahustili pomocou RVO a extrahovali s EA (2 x 25 ml). Organické vrstvy sme spojili a vysušili nad Na_2SO_4 . Po odfiltrovaní sušidla sme roztok odparili pomocou RVO a HV. Získali sme 67.82 mg (0.22 mmol, 90 %) látky **6** v podobe žltej kryštalickej látky.

2-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetonitril (6). Látka **6** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

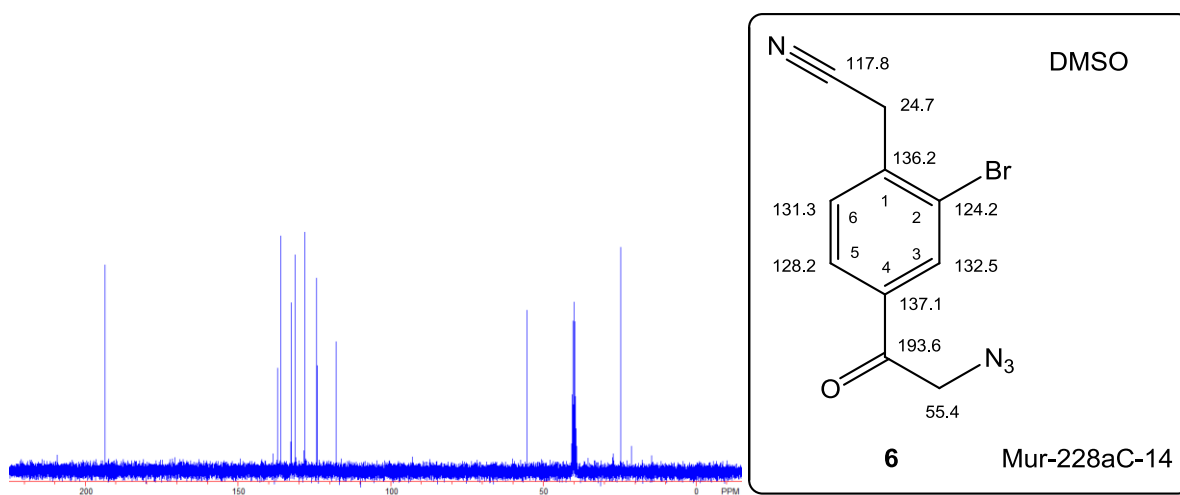
Svetložltá kryštalická látka, T.t.: 102.7 - 103.6 °C [H / EA, 1 / 2].

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , MUR-149a-13): δ 8.16 (d, 1H, $J(3,5) = 1.8$ Hz, H-C(3)), 7.89 (dd, 1H, $J(5,6) = 8.0$ Hz, $J(3,5) = 1.8$ Hz, H-C(5)), 7.71 (d, 1H, $J(5,6) = 8.0$ Hz, H-C(6)), 4.55 (s, 2H, COCH_2N_3), 3.92 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CN}$).

³⁶ Dos Santos, A.; El Kaim, L.; Grimaud, L.; Ronsseray, C. *Chem. Comm.* **2009**, 26, 3907-3909. (Literatúra opisuje prípravu azidu z (brómmetyl)benzénu v kvantitatívnom výťažku počas 10 min pri rt).



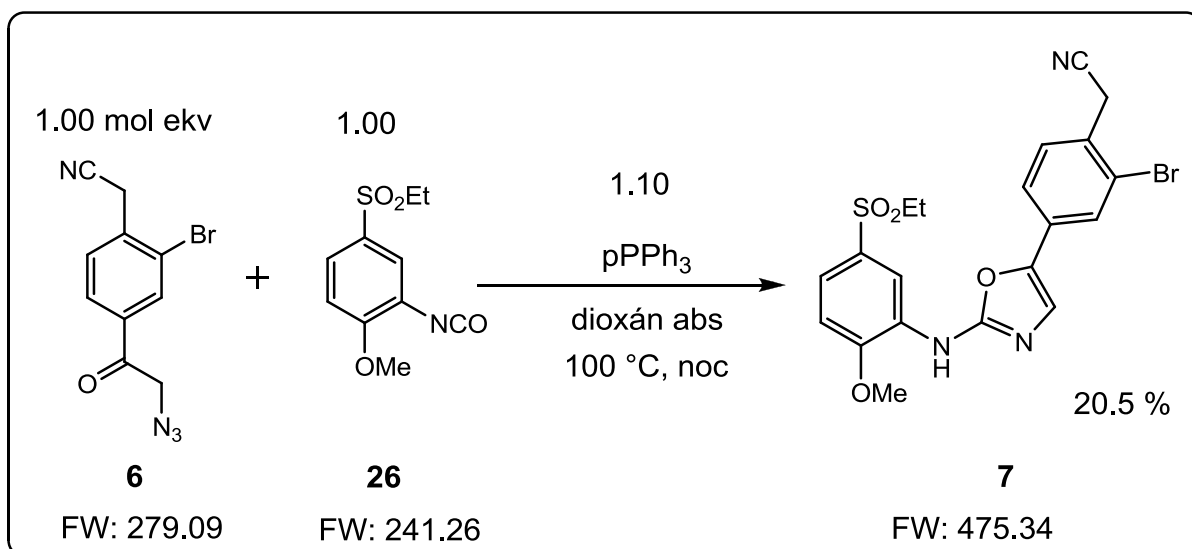
¹³C NMR (75 MHz, DMSO, MUR-228aC-14): δ 193.6 (s, C=O), 137.1 (s, C(4)), 136.2 (s, C(1)), 132.5 (d, C(3)), 131.3 (d, C(6)), 128.2 (d, C(5)), 124.2 (s, C(2)), 117.8 (s, CN), 55.4 (t, COCH₂N₃), 24.7 (t, CH₂CN).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3066 (w), 2934 (w), 2914 (w), 2254 (w), 2197 (w), 2107 (s, N₃), 1697 (s), 1598 (m), 1557 (w), 1480 (w), 1407 (m), 1393 (m), 1346 (m), 1283 (m), 1236 (m), 1207 (s), 1153 (w), 1135 (w), 1037 (m), 916 (m), 898 (m), 813 (m).

MS (ESI m/z): 279.0 [M]⁻

4.7 Příprava 2-(2-brómo-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)fenyl)acetonitrilu (7)



Experiment:³⁷

Do vysušenej aparatury sme navážili 710 mg (2.56 mmol, 1.00 mol ekv) azidu **6**, 610 mg (2.56 mmol, 1.00 mol ekv) izokyanátu **26** spolu s 1.76 g (2.82 mmol, 1.10 mol ekv) pPPh₃ (1.6 mM / g, Sigma-Aldrich) a k zmesi sme pridali 25 ml suchého dioxánu. Následne sme reakčnú zmes nechali miešať v kúpeli pri teplote 100 °C cez noc. Na druhý deň sme na základe TLC zistili, že žiadne viditeľné zmeny v porovnaní s TLC po 30 min priebehu reakcie nenastali. Tuhé podiely reakčnej zmesi sme odfiltrovali a z filtrátu sme odparili prchavé zložky pomocou RVO a HV. Získanú hnedú olejovitú zmes sme čistili pomocou FLC (H / EA, 1 / 3). Získali sme 250 mg (0.52 mmol, 20.5 %) **7** v podobe bielej kryštalickej látky.

2-(2-brómo-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)fenyl)-acetonitril (**7**).

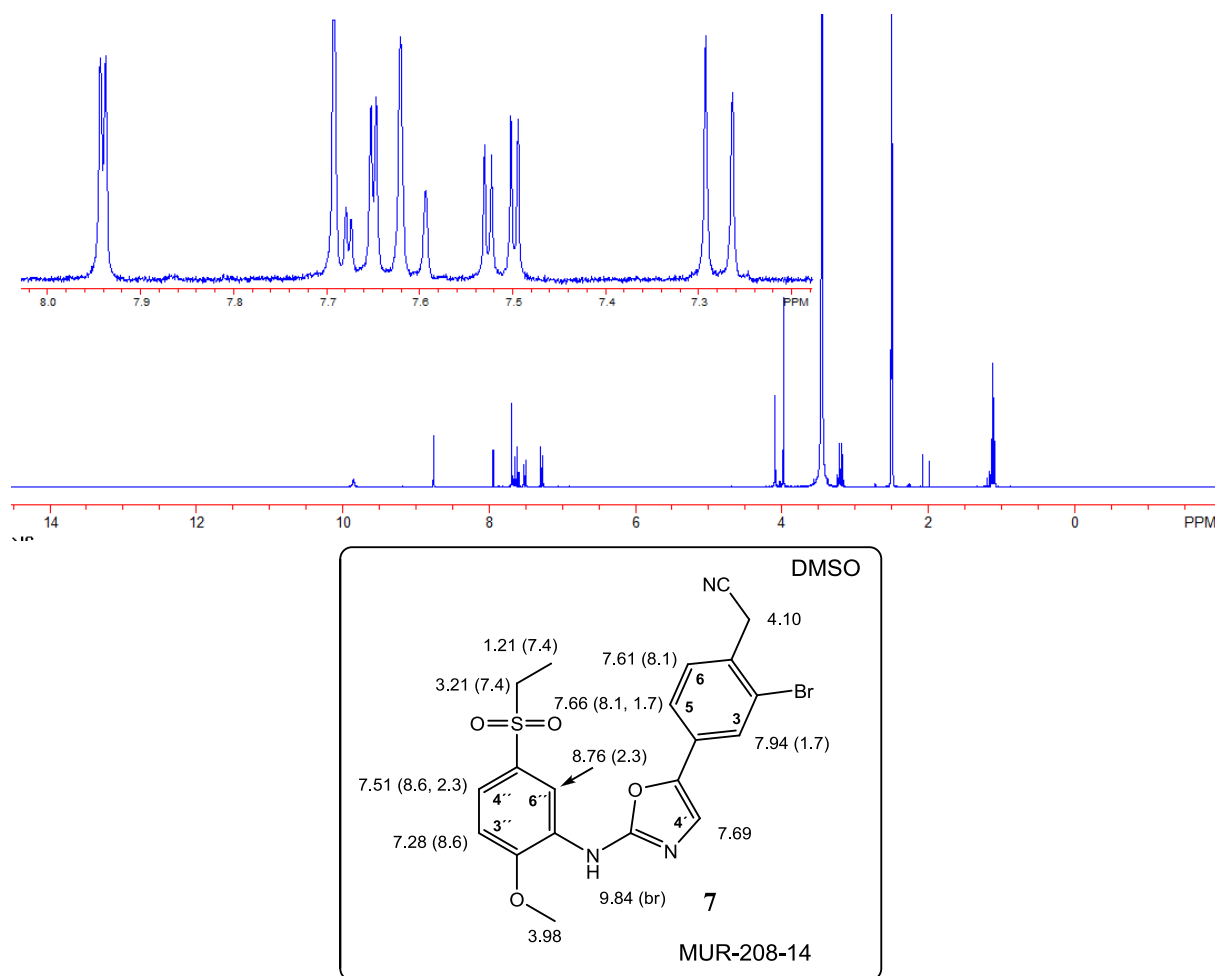
Látka **7** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

Biela kryštaliclá látka, **T.t.:** 210.4 - 212.0 °C [H / EA].

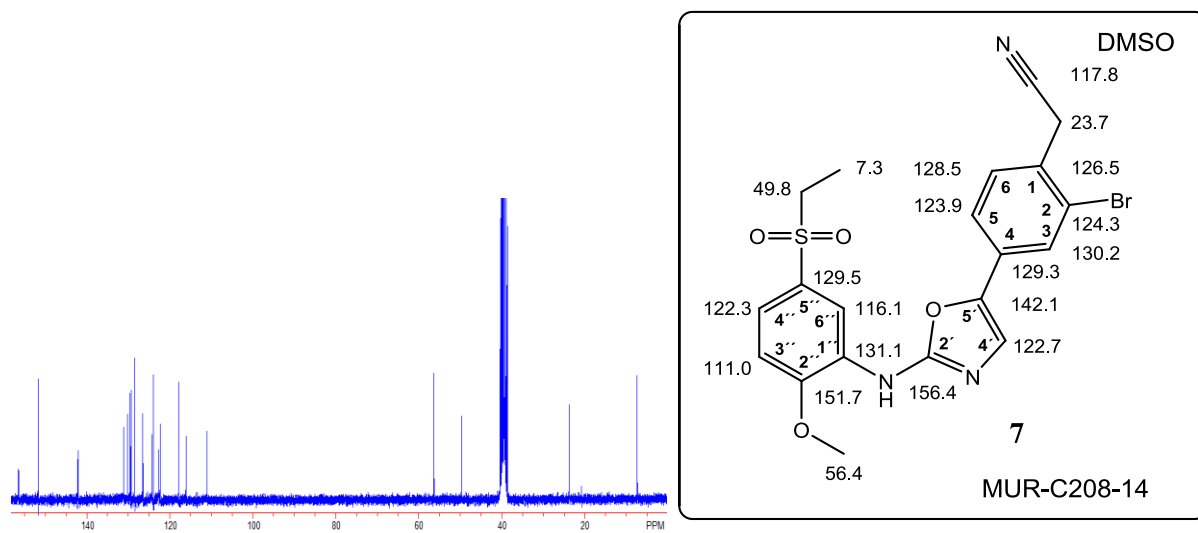
¹H NMR (300 MHz, DMSO, MUR-208-14): δ 9.84 (br s, 1H, NH), 8.76 (d, 1H, $J(4'',6'') = 2.3$ Hz, H-C(6'')), 7.94 (d, 1H, $J(3,5) = 1.7$ Hz, H-C(3)), 7.69 (s, 1H, CH_{oxazol}, H-C(4')), 7.66 (dd, 1H, $J(5,6) = 8.1$ Hz, $J(5,3) = 1.7$ Hz, H-C(5)), 7.61 (d, 1H, $J(5,6) = 8.1$ Hz, H-C(6)), 7.51 (dd, 1H, $J(3'',4'') = 8.6$ Hz, $J(4'',6'') = 2.3$ Hz, H-C(4'')), 7.28 (d, 1H, $J(3'',4'') = 8.6$ Hz,

³⁷ Ab Science; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Institut Curie Patent: WO2006/106437 A2, **2006**. (Na rozdiel od autorov patentu sme predĺžili reakčný čas z 30 min na noc, použili sme namiesto 1.00 1.10 mol ekv pPPh₃, a znížili sme reakčnú teplotu z pôvodných 100 °C na 90 °C)

H-C(3'')), 4.10 (s, 2H, -CH₂CN), 3.98 (s, 3H, -OMe), 3.21 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃)= 7.4 Hz, SO₂CH₂), 1.21 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃).



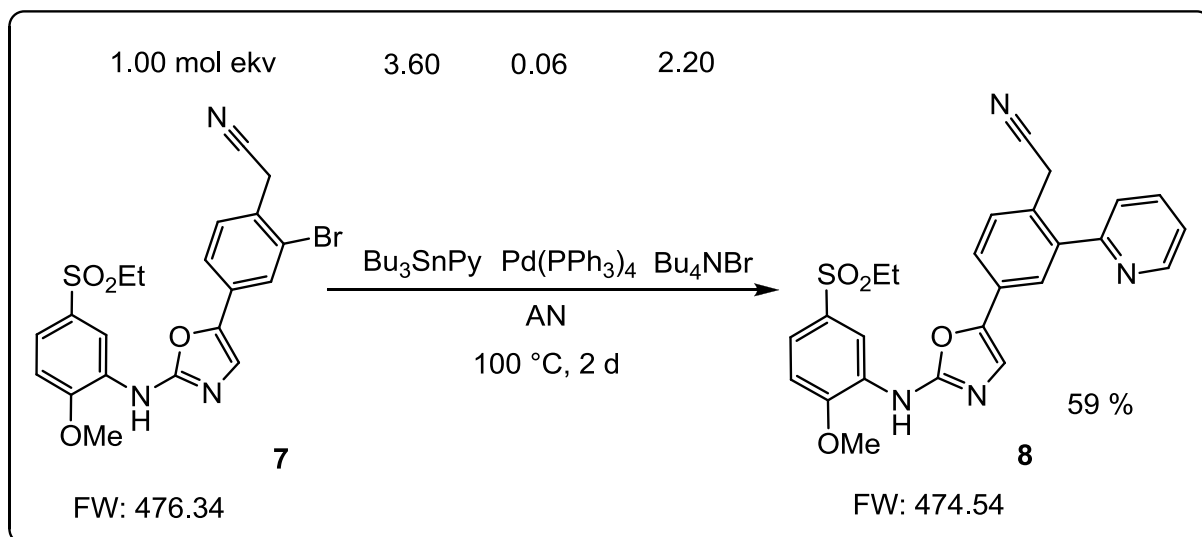
¹³C NMR (75 MHz, DMSO, MUR-C208-14): δ 156.4 (s, (C2')), 151.7(s, (C2'')), 142.1 (s, (C5')), 131.1 (s, (C1'')), 130.2 (d, (C3)), 129.5 (s, (C5'')), 129.3 (s, (C4)), 128.5 (d, (C6)), 126.5 (s, (C1)), 124.3 (s, (C2)), 123.9 (d, (C5)), 122.7 (d, (C4')), 122.3 (d, (C4'')), 117.8 (s, (CN)), 116.1 (d, (C6'')), 111.0 (d, (C3'')), 56.4 (q, (OCH₃)), 49.8 (t, (CH₂CH₃)), 23.7 (t, (CH₂CN)), 7.3 (q, (CH₂CH₃)).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3217 (m), 3127 (m), 2919 (m), 2255 (w), 1735 (w), 1687 (s), 1605 (s), 1573 (s), 1528 (m), 1506 (m), 1486 (m), 1459 (m), 1425 (m), 1405 (m), 1343 (m), 1299 (s), 1268 (s), 1227 (m), 1145 (s), 1123 (s), 1082 (m), 1020 (s), 948 (m), 916 (m), 871 (m), 816 (s), 734 (m), 720 (m).

MS (ESI m/z): 474.1 [M-H]⁻

4.8 Příprava 2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyridín-2-yl)fenyl) acetonitrilu (**8**)



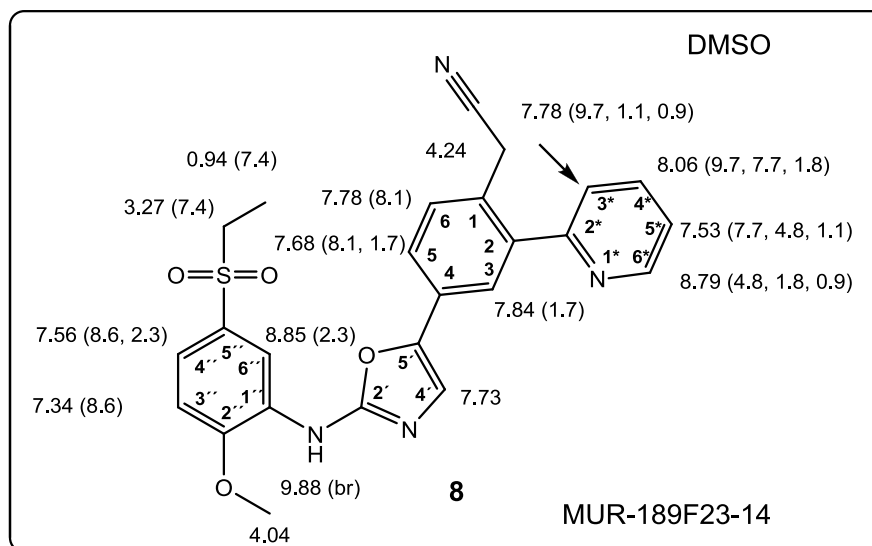
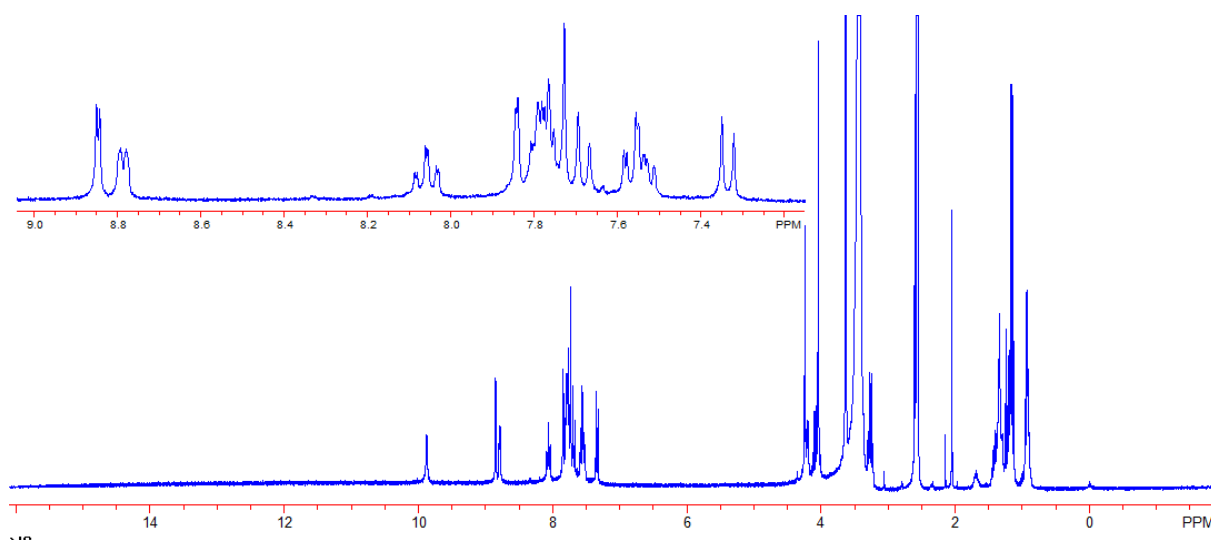
Experiment:¹⁹

Do vysušenej sklenej ampule sme navážili 30.0 mg (0.06 mmol, 1.00 mol ekv) **7**, 45.0 mg (0.14 mmol, 2.20 mol ekv) Bu₄NBr, 4.6 mg (0.004 mmol, 0.06 mol ekv) Pd(PPh₃)₄ a 82 uL (0.23 mmol, 3.20 mol ekv) Bu₃SnPy. Následne sme pridali 1 ml AN abs. Potom sme ampulku zatavili pod Ar atmosferou a ponorili do 100 °C predhriateho olejového kúpeľa. Reakciu sme uskutočnili pri danej teplote počas 2 d. Po ochladení a otvorení ampule sme reakčnú zmes vyliali do 15 ml EA, pridali 15 ml 1 M vodného roztoku KF a zmes nechali miešať 3 h. Organickú vrstvu sme oddelili a vodný roztok extrahovali EA (2 x 15 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným vodným roztokom NaCl (2 x 15 ml). Organickú fázu sme sušili nad Na₂SO₄. Zmes sme prefiltrovali a prchavé podiely odstránili pomocou RVO a HV. Zahustený produkt sme čistili pomocou stĺpcovej chromatografie (H / EA, 1 / 2). Získali sme 18 mg (0.04 mmol, 59 %) tuhej bledožltej látky.

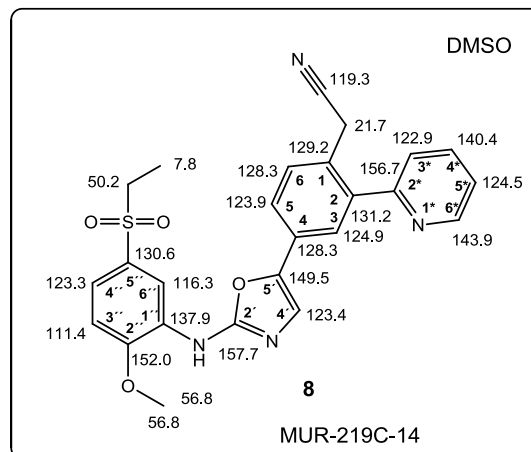
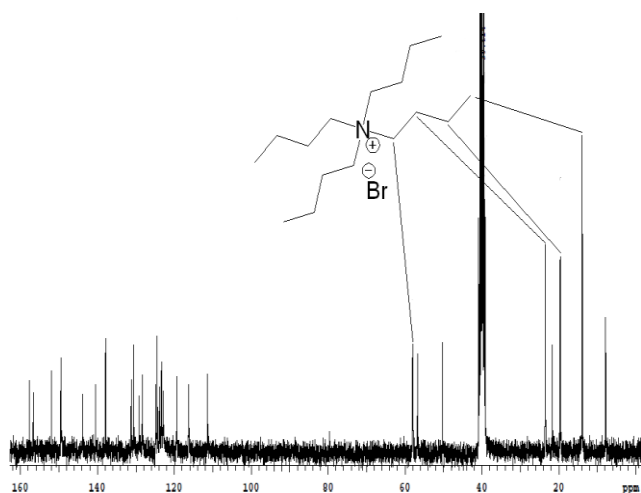
2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenyl) acetonitril (**8**). Látka **8** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

T.t.: 225.7 - 228.8 °C [H / CHCl₃, 2 / 1]

¹H NMR (300 MHz, DMSO, MUR-198F23-14): δ 9.88 (br s, 1H, NH), 8.85 (d, 1H, $J(4'',6'') = 2.3$ Hz, H-C(6'')), 8.79 (ddd, 1H, $J(5^*,6^*) = 4.8$ Hz, $J(4^*,6^*) = 1.8$ Hz, $J(3^*,6^*) = 0.9$ Hz, H-C(6*)), 8.06 (ddd, 1H, $J(3^*,4^*) = 9.7$ Hz, $J(4^*,5^*) = 7.7$ Hz, $J(4^*,6^*) = 1.8$ Hz, H-C(4*)), 7.84 (d, 1H, $J(3,5) = 1.7$ Hz, H-C(3)), 7.78 (d, 1H, $J(5,6) = 8.1$ Hz, H-C(6)), 7.68 (dd, 1H, $J(3^*,4^*) = 9.7$ Hz, $J(3^*,5^*) = 1.1$ Hz, $J(3^*,6^*) = 0.9$ Hz, H-C(3*)), 7.73 (s, 1H, H-C(4')_{oxazol}), 7.68 (dd, 1H, $J(5,6) = 8.1$ Hz, $J(3,5) = 1.7$ Hz, H-C(5)), 7.53 (ddd, 1H, $J(4^*,5^*) = 7.7$ Hz, $J(5^*,6^*) = 4.8$ Hz, $J(3^*,5^*) = 1.1$ Hz, H-C(5*)), 7.56 (dd, 1H, $J(3'',4'') = 8.6$ Hz, $J(4'',6'') = 2.3$ Hz, H-C(4'')), 4.24 (s, 2H, -CH₂-CN), 4.04 (s, 3H, -OMe), 3.27 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 0.94 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂CH₃).



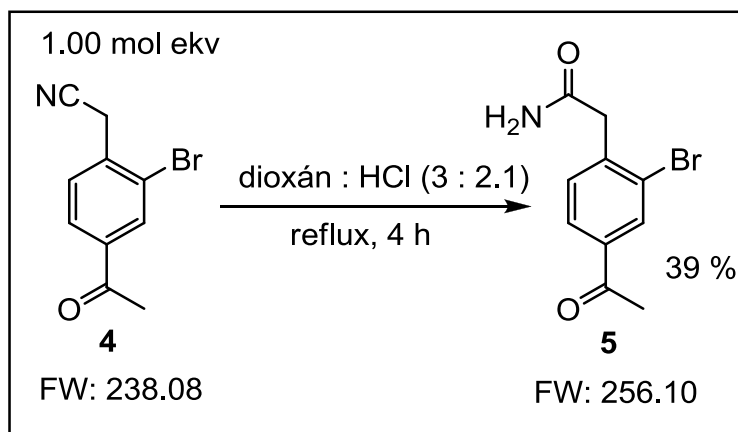
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, MUR-219C-14): δ 157.7 (s, (C2')), 156.7 (s, (C2*)), 152.0 (s, (C2'')), 149.5 (s, (C5')), 143.9 (d, (C6*)), 140.4 (d, (C4*)), 137.9 (s, (C1')), 131.2 (s, (C2)), 130.6 (s, (C5')), 129.2 (s, (C1)), 2 x 128.3 (s, (C4)) and (d, (C6)), 124.9 (d, (C3)), 124.5 (d, (C5*)), 123.9 (d, (C5)), 123.3 and 123.4 (2 x d, (C4' and C4')), 122.9 (d, (C3*)), 119.3 (s, (CN)), 116.3 (d, (C6'')), 111.4 (d, (C3')), 56.8 (s, (OMe)), 50.2 (t, ($\underline{\text{CH}_2}$ -CH₃)), 21.7 (t, ($\underline{\text{CH}_2}$ -CN)), 7.8 (q, (CH₂-CH₃)).



FT IR (solid, cm^{-1}): 2957 (m), 2927 (m), 2247 (w), 1612 (s), 1573 (s), 1491 (m), 1471(m), 1427 (m), 1308 (s), 1264 (s), 1235 (m), 1144 (s), 1122 (s), 1086 (m), 1050 (m), 1009 (s), 890 (s), 810 (m), 794 (m), 757 (m), 734 (m), 710 (m), 658 (m).

MS (ESI m/z): 473.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$

4.9 Príprava 2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetamidu (9)



Experiment:³⁸

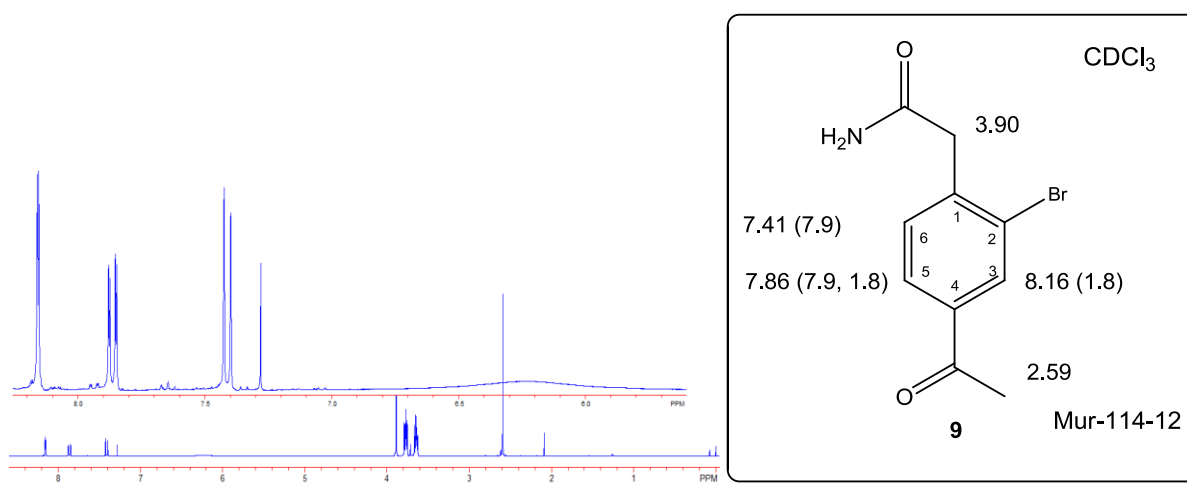
Látku **4** 1.00 g (4.22 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v 25.5 ml zmesi dioxán : konc HCl (3 : 2.1). Zmes sme za miešania refluxovali 4 h. Potom sme reakčnú zmes naliali na podrvený

³⁸ Astrazeneca, Patent:WO2007/30061 A1, 2007. (Patent opisuje reakciu na štruktúrne podobnom substráte ako nitril **4**. Reakčné podmienky sme upravili pridaním dioxánu kvôli rozpustnosti, zvýšením teploty a dlhším reakčným časom).

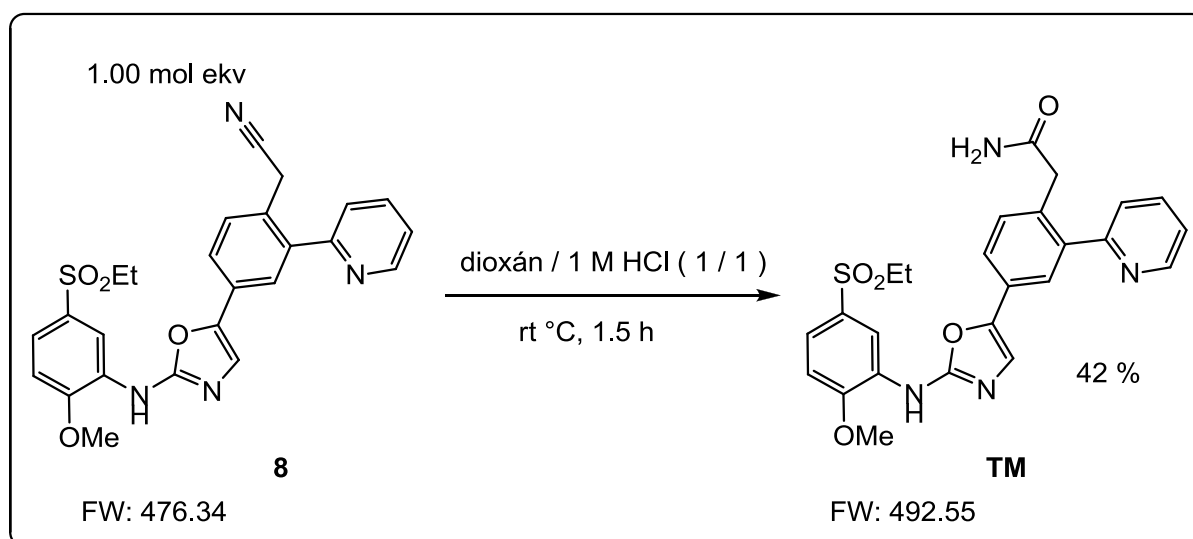
ľad a extrahovali EA (3 x 40 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli s H₂O (2 x 50 ml). Organickú vrstvu sme vysušili nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní sušidla sme zmes odparili na RVO a HV. Získali sme 860 mg žltej olejovitej látky, z ktorej sa nám podarilo vytriturovať (zmesou H / EA) 420 mg (1.65 mmol, 39 %) bledožltej tuhej látky.

2-(4-acetyl-2-brómfenyl)acetamidu (9). Látka **9** nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, MUR-114-12): δ 8.16 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(3)), 7.86 (dd, 1H, *J*(5,6) = 7.9 Hz, *J*(3,5) = 1.8 Hz, H-C(5)), 7.41 (d, 1H, *J*(5,6) = 7.9 Hz, H-C(6)), 3.90 (s, 2H, ArCH₂CONH₂), 2.59 (s, 3H, COCH₃).



4.10 Príprava 2-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenyl)acetamidu (TM)



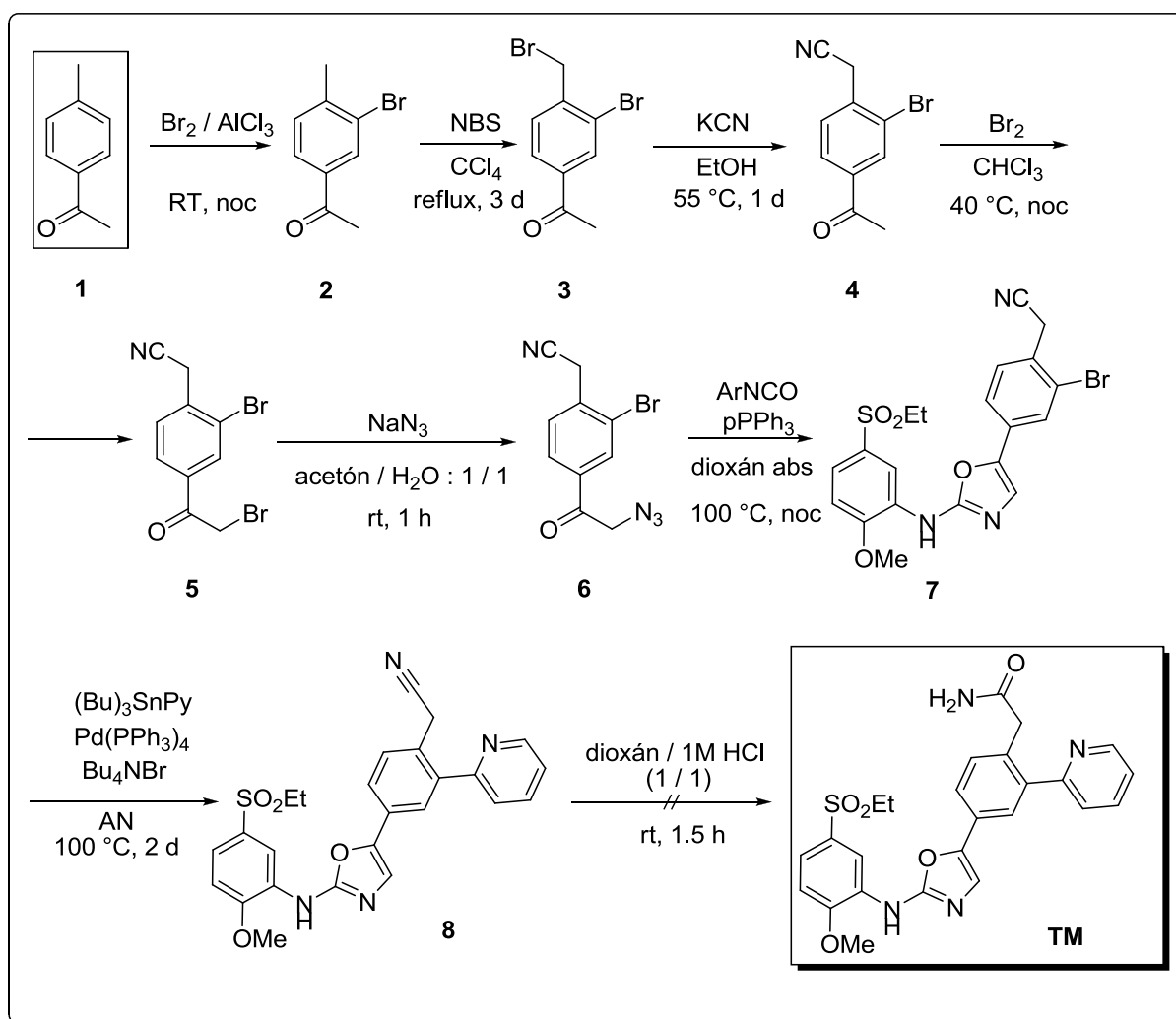
Experiment:

Do banky sme navážili 50 mg (0.11 mmol, 1.00 mol ekv) látky **8** do ktorej sme pridali 5 ml dioxánu a za miešania látku **8** rozpustili. Následne sme do zmesi prikvapávali 5 ml 1 M HCl. Potom sme reakčnú zmes ponechali miešať pri rt počas 1.5 h. Následne sme odobrali vzorku, ktorú sme neutralizoval, extrahovali s EA. Pomocou TLC analýzy sa nám nepodarilo sledovať priebeh reakcie. Preto sme vzorku odparili na RVO a následne na HV. Tuhú látku sme podrobili IČ analýze kde sme pozorovali vibrácie pre amidickú skupinu. Následne sme reakčnú zmes neutralizovali nasýteným roztokom NaHCO₃ a extrahovali s EA (4x 10 ml). Do vodnej fázy sme potom pridali 10 ml 4 M roztoku NaOH pričom sa z roztoku vyzrážala tuhá čierna látka, ktorú sme odsali pomocou vodnej vývevy. Filtračný koláč sme triturovali s CHCl₃ (3x 7 ml) pričom sme získali 22 mg (0.04 mmol, 42 %) hnedej tuhej látky. Spektrálna ¹H NMR nepotvrdila prítomnosť cieľenej molekuly **TM**, ale zmes rozkladných produktov.

5 Diskusia

V diplomovej práci sme sa zamerali na prípravu cieľovej zlúčeniny **TM**, ktorá bola počítačom navrhnutá tak, aby slúžila ako inhibítor VEGFR2 receptoru. Zaoberali sme sa aj optimalizáciou problematických reakčných krokov ako aj reakcii, pri ktorej vzniká oxazolové jadro. Boli navrhnuté dva postupy ako pripraviť cieľový produkt **TM**. Druhý syntetický postup (Schéma 26) bol navrhnutý tak, aby sme sa vyhli pôsobeniu báz resp. kyselín na citlivý oxazolový fragment počas hydrolýzy nitrilu. Zistili sme, že problematickou bola už reakcia premeny acetamidu **9** na jeho brómovaný derivát **10** z dôvodu vzniku reaktívneho centra (α -brómmetylkarbonylu) ktoré mohlo reagovať s dusíkom amidu, resp. pravdepodobnejšie amidický dusík mohol reagovať s brómovým činidlom. Pri príprave látky **10** došlo k degradácii produktov v zmesi a preto sme druhý navrhnutý postup prípravy látky **TM** zastavili.

Zlúčeninu **TM** sme sa pokúsili pripraviť podľa prvého návrhu. (Schéma 1)



V prvom kroku sme pomocou S_E premenili substrát **1** na produkt **2** v 87 % výťažku už pri rt. Ani pri dvojnásobnej navážke nebol pozorovaný odlišný priebeh reakcie.

Druhý krok pozostával z radikálovej bromácie alifatického reťazca substrátu **2** pomocou NBS v CCl_4 . Reakcia bola pomalá a neprebiehala pri rt ani počas niekoľkých dní. Pri zahrievaní na reflux bolo treba nechať reakciu prebiehať 3 dni. Za týchto podmienok sme získali 64 % výťažok produktu **3**. Pri 5 násobnom zvýšení navážky nebol pozorovaný odlišný priebeh reakcie.

Tretí krok pozostával z nukleofilnej substitúcie brómu z **3** s KCN. Reakcia je citlivá na zmeny reakčných podmienok. Zistili sme, že vhodným reakčným prostredím bola zmes dioxán / voda. Zistili sme že, pri vyšších teplotách prebieha prednostne substitúcia za vzniku požadovaného produktu **4**, pri nižšej teplote je pozorovaný aj vznik kondenzačného produktu **4a**. Pri väčšej navážke sme sa snažili optimalizovať reakčné podmienky, nahradili sme dioxán etanolom z dôvodu jednoduchšieho spracovania (odparenie) a finančnej dostupnosti. Reakciu sme uskutočnili v zmesi EtOH / voda (1 / 4). Použili sme nadbytok KCN (5.00 mol ekv). Pri

čistení látky **4** kryštalizáciou sme v rôznych zmesiach pozitých rozpúšťadiel pozorovali tvorbu kryštálov až po 3-4 dňoch. Z tohto dôvodu je veľmi vhodné naočkovať zmes kryštálom produktu, kedy látka následne kryštalizovala cez noc. Látka **4** neochotne kryštalizuje a preto je ako alternatíva čistiacej metódy vhodná aj FLC.

Pri štvrtom kroku sme sa pokúsili pripraviť z látky **4** jej alfa bróm derivát **5**. Reakciu sme uskutočňovali najskôr pomocou CuBr_2 zahrievaním v MeOH s EA. Požadovaný produkt **5** sa nám nepodarilo získať. Preto sme vyskúšali aj bromáciu **4** s Br_2 v CHCl_3 , ako aj HOAc, pričom sme v oboch prípadoch pozorovali jednoznačný priebeh reakcie za vzniku brómderivátu **5**. Rozhodli sme sa vylúčiť HOAc, pretože toto spôsobovalo zbytočné komplikácie pri čistení. Pri reakcii vo väčšej navážke (10 násobok) sme pozorovali znižovanie výťažku v dôsledku vzniku vedľajších zrejme polymérnych produktov. Tento problém sme sa rozhodli obísť paralelnou prípravou látky **5** prostredníctvom viacerých menších reakcií pri 2 g navážkach východiskovej látky **4**. Podarilo sa nám získať požadovaný brómderivát **5** v zníženom 70 % výťažku.

Následne sme sa pokúsili nukleofilnou substitúciou transformovať brómderivát **5** na azid **6**. Zistili sme, že najvhodnejšie je do roztoku NaN_3 vo vode pridávať bromid **5** v acetóne. Pri reakcii vo väčšom sme pozorovali aj vznik vedľajších produktov. Možnou alternatívou by bolo vyskúšanie reakcie v dvojfázovej sústave nemiešateľných rozpúšťadiel s katalyzátorom fázového prenosu.

Kľúčovým krokom zvolenej syntetickej cesty bola tvorba oxazolového fragmentu v intermediáte **7**. Z literatúry je známe, že substituenty s elektrónodonnými vlastnosťami na aromatickom jadre azidu preferujú vznik oxazolového kruhu a naopak akceptorné substituenty výťažky oxazolácie znižujú. V našom prípade máme $-\text{CN}$ skupinu viazanú na $-\text{CH}_2\text{Ar}$ a nie priamo na aromatické jadro. Táto skupina by mala preto mať menšie deaktivujúce účinky kvôli znemožnenej mezomérskej interakcii s aromatickým kruhom. Reakciu sme uskutočnili v dioxáne za zvýšenej teploty. Tieto podmienky, ako je známe z literatúry, poskytujú lepšie výťažky v porovnaní s reakciami uskutočnenými v DCM pri rt. Zo spektier surovej zmesi získanej z pokusu v dioxáne sme identifikovali požadovaný oxazol **7** ako majoritný produkt. Pokiaľ reakcia prebiehala v dioxáne pri rt, vznik oxazolu **7** sme nepozorovali, pričom došlo k spotrebovaniu východiskových látok na iné produkty. V prípade uskutočnenia reakcie pri RT v DCM sme tiež vznik oxazolu **7** nepozorovali, ale pozorovali sme vznik močovínového derivátu obdobného ako je uvedené v Schémach 17 a 20. Potom sme sa snažili reakciu prípravy oxazolového derivátu uskutočniť pri RT aj za refluxu v dioxáne pridaním DMAP bázy po 5 min, 30 min a 1 h od počiatku reakcie. Pridaná báza

mala zvýšiť podiel enol formy oxometylkarbodiimidového intermediátu **51** (Schéma 20) nevyhnutného pre vznik oxazolového cykloaduktu. Zlepšenie reakcie s prídavkom DMAP sme však nepozorovali, ale došlo k vzniku väčšieho množstva vedľajších produktov, ktoré znížili celkový výťažok oxazolu **7**. V literatúre¹⁹ prikvapkávali roztok azidu do roztoku zmesi izokyanátu s PPh_3 . Z tohto dôvodu sme aj my vyskúšali všetky kombinácie usporiadania reakcie v dioxáne pri rt, 60, 100 °C (pridávanie azidu **6** do zmesi suspenzie pPPh_3 s izokyanátom **26**, pridávanie izokyanátu **26** do suspenzie pPPh_3 s azidom **6**, pridávanie pPP_3 do zmesi izokyanátu **6** a azidu **26**), avšak najvhodnejšia vzhľadom na výťažok reakcie sa ukázal postup opísaný v našej experimentálnej časti (t.j. zmiešanie reaktantov v dioxáne a rýchle ponorenie banky s r. zmesou do horúceho kúpeľa a následné zahrievanie 4 h na 100 °C). Sledovali sme tiež stabilitu azidu **6** a nezávisle aj izokyanátu **26** v prostredí pPPh_3 pomocou TLC a $^1\text{H-NMR}$ analýzou. Zistili sme, že obe látky sa v prítomnosti pPPh_3 menia už pri RT. Pozorovali sme vznik neznámych produktov, ktorých minoritné zastúpenie sme pozorovali aj v spektre surových reakčných zmesí uskutočnených reakcii prípravy oxazolov. Z experimentov je jasné, že východiskové látky **6** a **26** reagujú v priebehu 2 h až 1 d s pPPh_3 pri rt za vzniku neželaných vedľajších produktov, ktoré znižujú výťažok požadovanej reakcie. Následne sme reakciu vyskúšali aj s Bu_3P , ktorý by mal byť reaktívnejší ako pPPh_3 . Niektoré imínofosforany, vznikajúce z PPh_3 sú dostatočne stabilné, aby sa dali izolovať chromatografiou. Stabilita molekuly je možná kvôli delokalizácii náboja na troch aromatických systémoch. Napriek reaktívnejšiemu činidlu Bu_3P sme na TLC nepozorovali vznik oxazolu **7**. Vzhľadom na uvedené optimalizačné reakcie možno uzavrieť, že reakcia organického azidu a izokyanátu zostáva aj naďalej problematická a najlepšie výťažky tejto reakcie sme získali v dioxáne za refluxu tak, ako ich opisujeme v experimentálnej časti.

Stilleho coupling sme uskutočňovali v zatavenej ampuli na substráte **7** pri teplotách kúpeľa od 100 °C v AN. Reakcia prebieha s výťažkom 59 %. Pri väčších navážkach (3x, 150 mg) sa nám podarilo získať výťažok až 78 % látky **8**. Ako vhodná čistiaca metóda je okrem flash chromatografie aj tritúrácia a kryštalizácia, kvôli tendencii látky **8** vytvárať kryštály.

Hydrolýzu substrátu **8** sme uskutočňovali v báziických aj kyslých podmienkach.

V báziických podmienkach sme robili reakciu pomocou NaHCO_3 (8.00 mol ekv) a 30 % roztoku H_2O_2 (8.00 mol ekv) v 500 μL DMSO na 10 mg látky **8**. TLC po 3 h pri rt neukázalo žiadne zmeny a preto sme reakčnú zmes postupne zahrievali na teplotu 85 °C. Po 5 h sme v zmesi pozorovali vznik novej látky a po 20 h sa pozorovali len novú látku. Vodíkové

spektrum však ukázalo neznáme rozkladné produkty. Pri priebehu reakcie pri rt počas 20 h ostala v reakčnej zmesi prítomná len východisková látka **8**.

V kyslých podmienkach sme uskutočňovali hydrolýzu s 1M HCl. Ako organickú prímies kvôli zlepšeniu rozpustnosti sme použili dioxán. Pri kyslej hydrolýze za rt a 85 °C sme pozorovali pomocou TLC vznik troch nových látok. HPLC MS nepotvrdil vznik želaného produktu. V ¹H NMR sme pozorovali zmes rozkladných produktov.

Dôvodom neúspešnej hydrolýzy je zrejme citlivosť substrátu **8** na bázičné a kyslé prostredie. Navrhované riešenie môže byť vo využití jemnejších činidiel, alebo uskutočnenie hydrolýzy na menej komplikovanom substráte **7**, ktorý sa v prostredí koncentrovanej HCl (36 %) počas 2 d nerozkladá a až následne uskutočnenie Stilleho couplingu.

Činidlá	Reakčné podmienky	Výstup
NaHCO ₃ / H ₂ O ₂	rt, 3 h	východisková látka
NaHCO ₃ / H ₂ O ₂	rt, 20 h	východisková látka
NaHCO ₃ / H ₂ O ₂	85 °C, 20 h	degradačné produkty
1 M HCl	rt, 1.5 h	degradačné produkty
1M HCl	rt, 14 h	degradačné produkty
1M HCl	85 °C, 5 h	degradačné produkty

6 Záver

V teoretickej časti diplomovej práce sme opísali vlastnosti a biologické funkcie VEGFR2 a NRPs receptorov. Navrhli sme aj dva spôsoby syntézy počítačom predpovedaného inhibítora VEGFR2 kinázy **TM**. Pri navrhovaní syntetických postupov sme využili dostupné databázy Reaxys a SciFinder ako aj odbornú literatúru.

V experimentálnej časti diplomovej práce sme sa venovali príprave cieľovej molekuly **TM** a optimalizácii jednotlivých stupňov, ako aj reakčného problémového kroku prípravy aminooxazolov „azaylidovou metódou“. Druhý navrhnutý syntetický spôsob prípravy **TM**, pomocou ktorého by sme sa vyhli pôsobeniu kyselín, resp. báz na vzácny oxazolový intermediát sa ukázal byť experimentálne neschodný. Preto sme sa zamerali na prvý navrhnutý syntetický postup. Zlepšenie syntézy pripraveného oxazolu sa nám aj napriek množstvu uskutočnených experimentov nepodarilo dosiahnuť z dôvodu komplexnosti odohrávajúcich sa chemických procesov. Prvým navrhnutým spôsobom syntézy cieľového produktu sa nám sedemstupňovou syntézou podarilo pripraviť všetky intermediáty až po

oxazolovú zlúčeninu **8**, ktorá je prekurzorom **TM**. Všetkých sedem novo pripravených zlúčenín (**3-8, 9**) sme charakterizovali pomocou ich fyzikálnych vlastností a spektier. Cieľový amid **TM** sa nám zatiaľ nepodarilo pripraviť, pretože s uvedenými činidlami na látke **8** prebiehajú degradačné reakcie, substrát **7** je však v kyslom prostredí stabilný, ktorý možno hydrolyzovať a následne pripraviť látku **TM** Stilleho couplingom.