

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta

**Syntéza prekursorov a N-arylaminooxazolkarboxamidových inhibítorov
VEGFR2 TK**

Bakalárska práca

Študijný program:	Biochémia
Študijný odbor:	4.1.14. Chémia
Školiace pracovisko:	Katedra organickej chémie, PRIF UK
Školiteľ:	Mgr. Juraj Dobiáš
Konzultant:	doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava 2014

Marek Ondruš



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Marek Ondruš
Študijný program: biochémia (Jednoodborové štúdium, bakalársky I. st., denná forma)
Študijný odbor: 4.1.14. chémia
Typ záverečnej práce: bakalárska
Jazyk záverečnej práce: slovenský
Sekundárny jazyk: anglický

Názov: Syntéza prekursorov a N-arylaminooxazolkarboxamidových inhibítorov VEGFR2 TK

Literatúra: aktuálna odborná časopisecká literatúra; najmä časopisy: J. Org. Chem., J. Am. Chem. Soc., J. Med. Chem., Org. Lett., Angew. Chem., Int. Ed., Tetrahedron

Cieľ: Práca je zameraná na vyhľadanie najnovších informácií o biologickej funkcii TAM TK receptorov a vývoja ich inhibítorov, ako aj na syntézu intermediátov N-arylaminooxazolkarboxamidových VEGFR2 TK inhibítorov

Kľúčové slová: VEGFR2 receptor, furopyrol, chromenón, syntéza

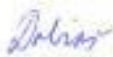
Vedúci: Mgr. Juraj Dobias
Katedra: PriF.KOrCh - Katedra organickej chémie
PriF vedúci katedry: doc. RNDr. Martin Putala, CSc.

Dátum zadania: 14.03.2013

Dátum schválenia: 14.05.2014


doc. RNDr. Martin Putala, CSc.
vedúci katedry


študent


vedúci práce

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

V Bratislave 21.5.2014

.....

podpis autora práce

Chcel by som sa poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri vypracovaní tejto bakalárskej diplomovej práce. Moje poďakovanie patrí najmä vedúcemu diplomovej práce Mgr. Jurajovi Dobiášovi za jeho neoceniteľnú odbornú, metodickú pomoc a usmerňovanie pri experimentálnej práci. Ďakujem doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. za odborné konzultácie a spoločnosti Biomagi za koncept práce a štruktúry predpovedaných prekursorov VEGFR2 inhibítorov.

Za vytvorenie príjemnej pracovnej atmosféry ďakujem kolegom Kristíne, Matúšovi a Ivanovi. Rodine ďakujem za ich psychickú podporu, motiváciu a ohľaduplnosť pri mojom štúdiu.

OBSAH

Abstrakt	- 7 -
Abstract	- 8 -
Grafický abstrakt	- 9 -
Grafický abstrakt ¹H-NMR spektier	- 11 -
Použité skratky	- 14 -
ÚVOD	- 17 -
1 Ciele bakalárskej diplomovej práce	- 17 -
2 Teoretická časť k medicínskej chémii	- 18 -
2.1. Vlastnosti a biologická funkcia TAM receptorov	- 18 -
2.1.1. Enzým tyrozín kináza	- 18 -
2.1.2. Nomenklatura TAM receptorov	- 20 -
2.1.3. Expresia TAM receptorov	- 21 -
2.1.4. Ligandy TAM receptorov	- 23 -
2.1.5. Signalizácia a signálna transdukcia	- 25 -
2.1.6. Angiogenéza a clearance apoptických buniek	- 27 -
2.1.7. Homeostatická fagocytóza	- 33 -
2.1.8. Ďalšie clearance mechanizmy	- 34 -
2.2. Vývoj vybraných TK inhibítorov	- 34 -
2.2.1. Všeobecná štruktúra tyrozín kináz a typy inhibítorov	- 35 -
2.2.2. Syntéza TK inhibítorov pre HGFR/TAM receptory	- 36 -
3 Experimentálna časť	- 50 -
3.1. Syntéza potenciálneho inhibítora (7) VEGRF2 TK	- 50 -
3.1.1. Syntéza di-terc-butyl (2-metoxi-5-nitrofenyl) imidodikarbonátu (2)	- 50 -
3.1.2. Syntéza di-terc-butyl (5-amino-2-metoxifyenyl) imidodikarbonátu (3)	- 52 -
3.1.3. Syntéza N-[3-(di-terc-butyl imidodikarbonát)-4-metoxifyenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifyenylamino]oxazol-5-karboxamidu (5)	- 55 -
3.1.4. Syntéza N-[3-amino-4-metoxifyenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifyenylamino]-oxazol-5-karboxamidu (6)	- 57 -
3.1.5. Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifyenylamino]-N-(4-metoxi-3-ureido-fenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)	- 59 -
3.1.6. Syntéza 5-nitro-1, 10-fenantrolínu (11)	- 61 -

3.1.7.	Syntéza 1, 10-fenantrolín-5-amínu (12).....	- 64 -
3.1.8.	Syntéza 1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)močoviny (15)	- 66 -
3.1.9.	Syntéza 1-(5-amino-2-hydroxyfenyl)močoviny (16).....	- 68 -
3.1.10.	Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (17)	- 70 -
4.	DISKUSIA.....	- 73 -
4.1.	Príprava potenciálneho inhibítora receptorov VEGFR2 tyrozín kináz 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-metoxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)	- 75 -
4.1.1.	Syntéza di-terc-butyl (2-metoxy-5-nitrofenyl) imidodikarbonátu (2)	- 76 -
4.1.2.	Syntéza di-terc-butyl (5-amino-2-metoxyfenyl) imidodikarbonátu (3)....	- 77 -
4.1.3.	Syntéza N-[3-(di-terc-butyl imidodikarbonát)-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-karboxamidu (5)	- 78 -
4.1.4.	Syntéza N-[3-amino-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-karboxamidu (6)	- 79 -
4.1.5.	Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-metoxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)	- 79 -
4.2.	Syntéza potenciálneho inhibítora 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(1, 10-fenantrolín-5-yl)oxazol-5-karboxamidu (13).....	- 81 -
4.2.1.	Syntéza 5-nitro-1, 10-fenantrolínu (12)	- 81 -
4.2.2.	Syntéza 1,10-fenantrolín-5-amínu (12).....	- 82 -
4.2.3.	Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(1, 10-fenantrolín-5-yl)oxazol-5-karboxamidu (13).....	- 82 -
4.3.	Syntéza potenciálneho inhibítora 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (17)	- 84 -
4.3.1.	Syntéza 1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)močoviny (15)	- 84 -
4.3.2.	Syntéza 1-(5-amino-2-hydroxyfenyl)močoviny (16).....	- 84 -
4.3.3.	Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (17)	- 85 -
5.	ZÁVER	- 85 -

Abstrakt

Marek Ondruš: Syntéza prekursorov a N-arylaminooxazolkarboxamidových inhibítorov VEGFR2 TK

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie

Bakalárska diplomová práca, 85 strán, 2014

Tyrozín kinázové receptory (RTK) sú trans-membránové proteíny, ktorých inhibícia je významná pri liečbe nádorových ochorení. Rodina TAM je jedna z 20 rodín TK receptorov, ktorej signálne dráhy sprostredkovávajú rôzne bunkové funkcie, vrátane angiogenézy, bez ktorej nie je progres nádorového tkaniva možný. Na rozdiel od tradičných, vysoko cytotoxických chemoterapeutík, ktoré nešpecificky zabíjajú všetky aktívne sa deliace bunky, inhibítory TK receptorov predstavujú selektívne riešenie likvidácie nádorového tkaniva. V rámci teoretickej časti je vypracovaná rešerš vlastností TK receptorov, ich výskyt v rôznych tkanivách a vplyv inhibítorov na ich aktivitu. Nadmerná expresia génov kódujúcich receptory TK je priamo spojená s patogenézou a vznikom nádorových ochorení. Z toho dôvodu sme aj my v rámci praktickej časti uskutočnili syntézu potenciálnych inhibítorov rodiny VEGFR2 TK.

Kľúčové slová: tyrozín kináza, TAM rodina, Axl, Mer, Tyro3, angiogenéza, fagocytóza, oxazol, amid, pyrimidín

Abstract

Marek Ondruš: Synthesis of precursors and N-arylaminooxazolcarboxamid VEGFR2 TK inhibitors

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

Bachelor diploma work, 85 pages, 2014

Tyrosine kinase receptors (RTKs) are trans-membrane proteins, whose inhibition is an important goal in a treatment of cancer. TAM family belongs to one of 20 families of TK receptors, whose signalling pathways mediate diverse cellular functions including angiogenesis, without which a progress of tumour tissue is not possible. Unlike traditional high cytotoxic chemotherapeutics, that non-specifically kill all actively dividing cells, inhibitors of TAM receptors represent selective solution of cancer treatment. Within diploma work theoretical part we described TK receptors properties, their occurrence in various tissues and the effect of inhibitors on their activity. Over-expression of genes encoding TK receptors is directly linked with pathogenesis and cancer development. Within the practical part of the diploma work we performed synthesis of some potential inhibitors of VEGFR2 TK.

Key words: tyrosine kinase, TAM family, Axl, Mer, Tyro3, angiogenesis, phagocytosis, oxazole, amide, pyrimidine

Grafický abstrakt

Syntéza prekursorov a N-arylaminooxazolkarboxamidových inhibítorov VEGFR2 TK

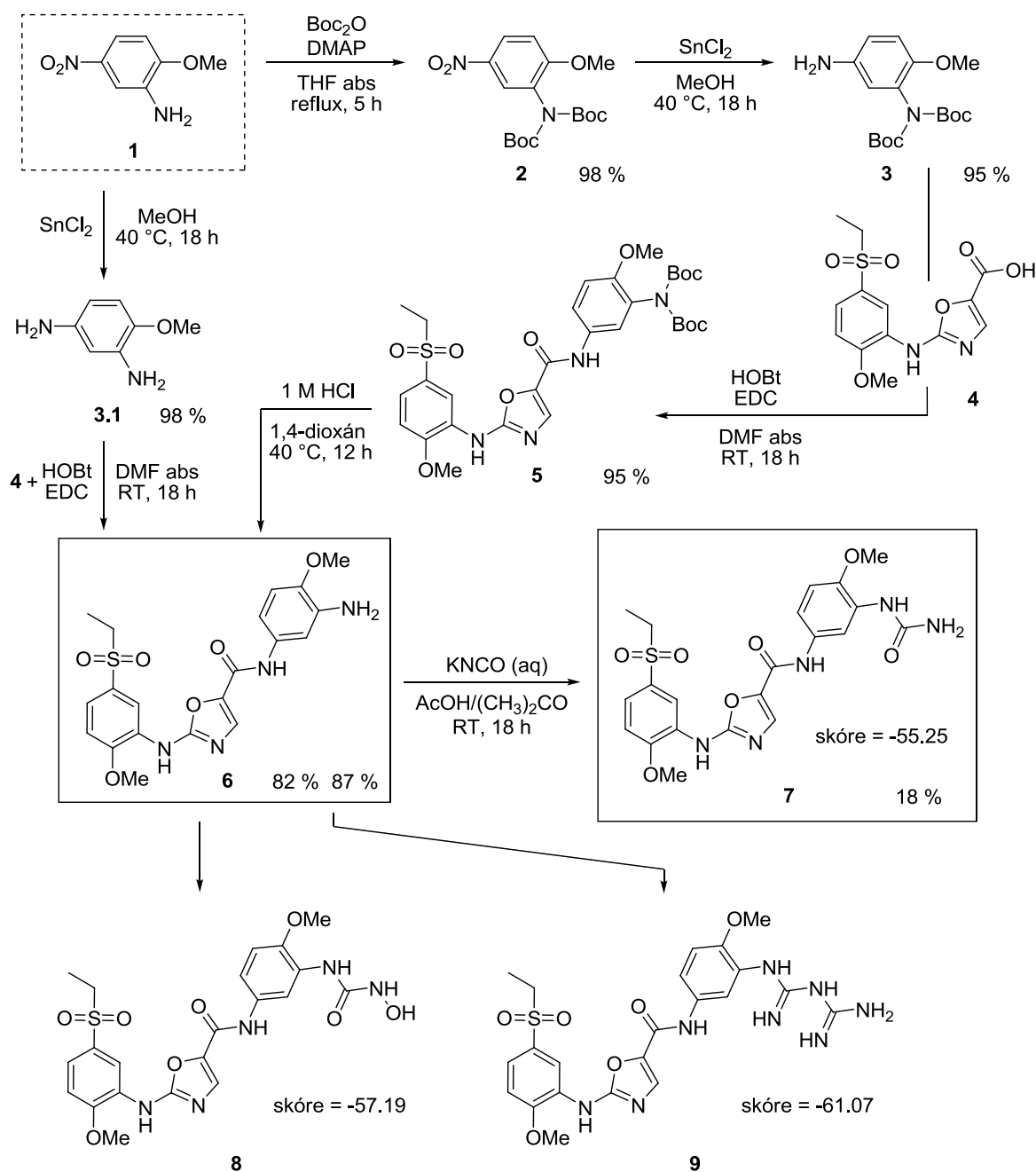


Schéma 1. Syntetický návrh a príprava prekursoru **6**, ako aj niektorých z predpovedaných VEGFR2 TK inhibítorov **7**, **8** a **9**.

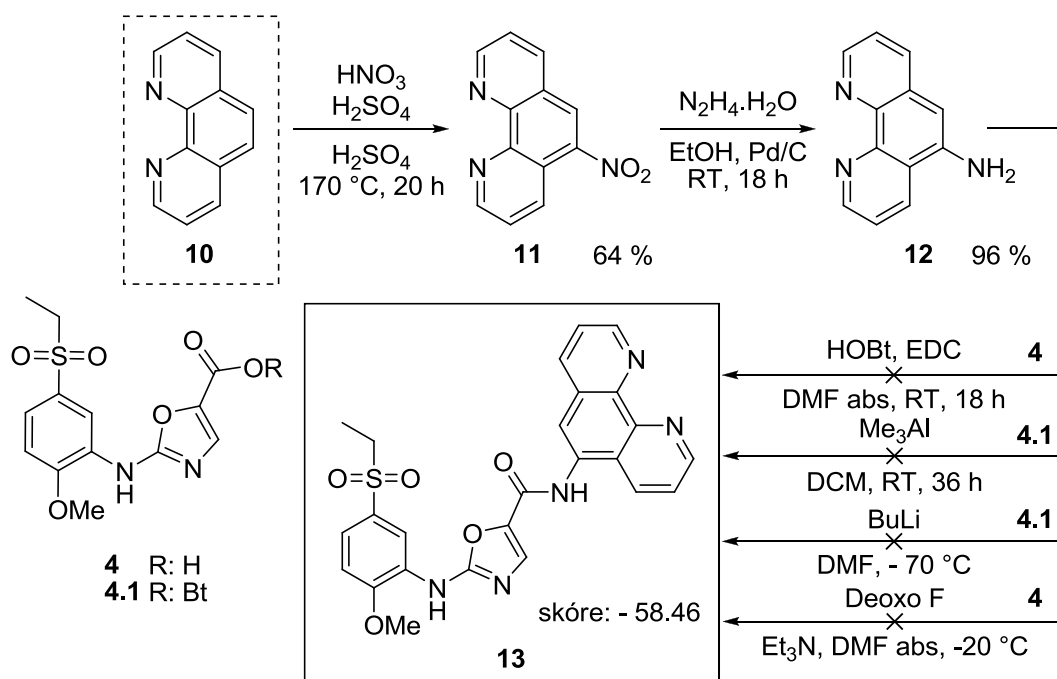


Schéma 2. Návrh a realizácia syntézy predpovedaného VEGFR2 TK inhibítora **13**.

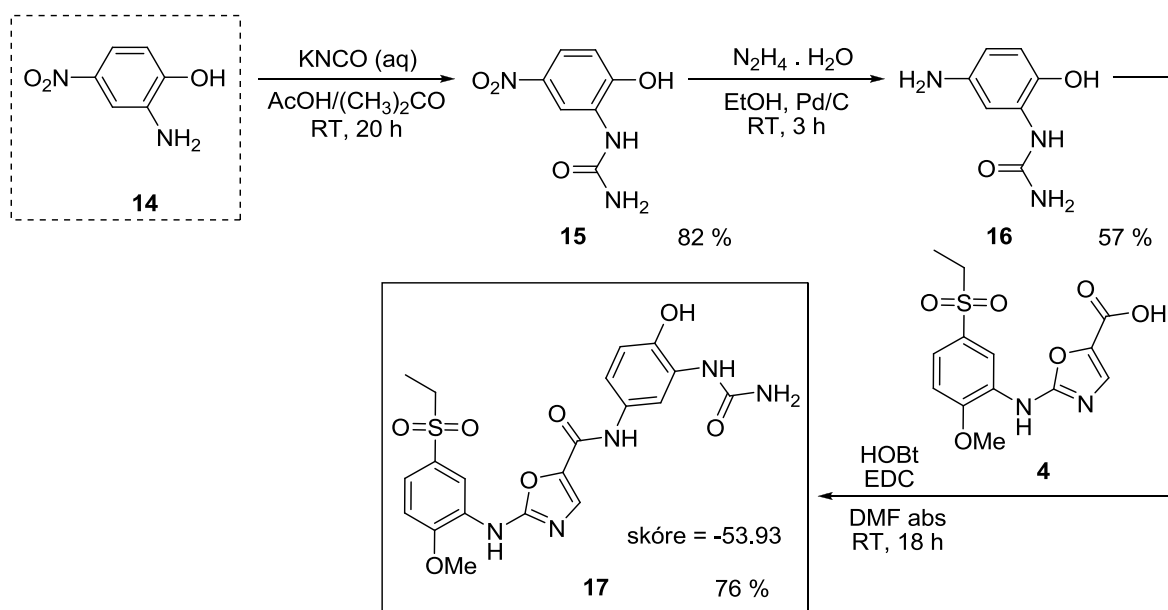
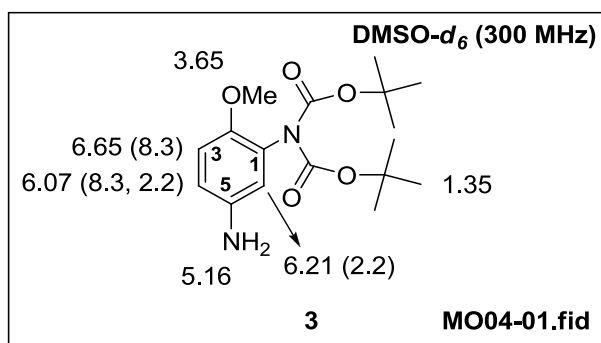
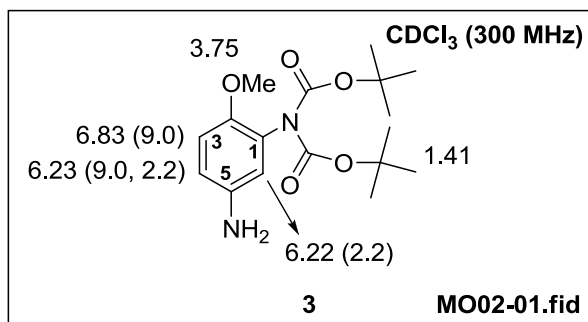
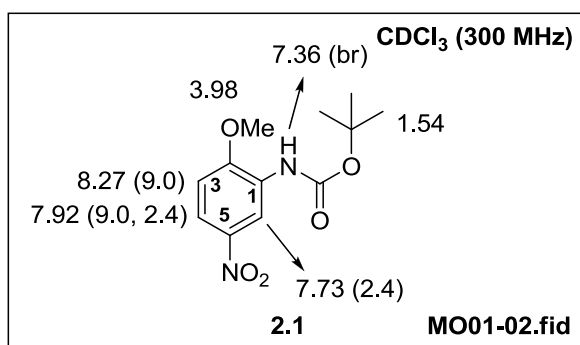
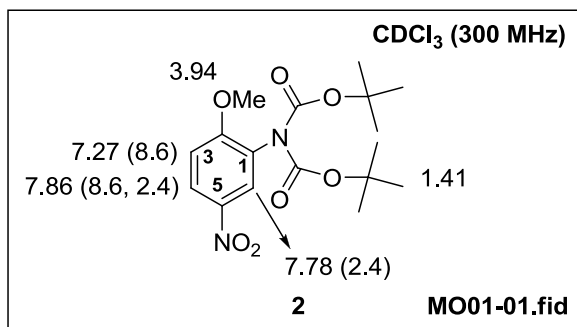
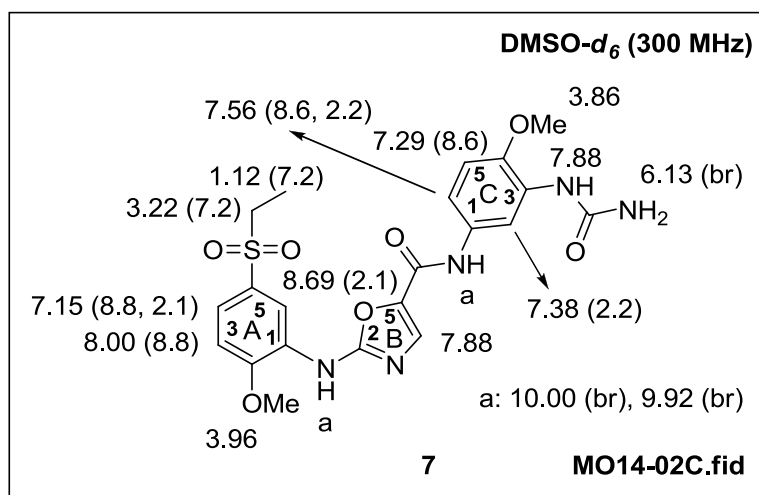
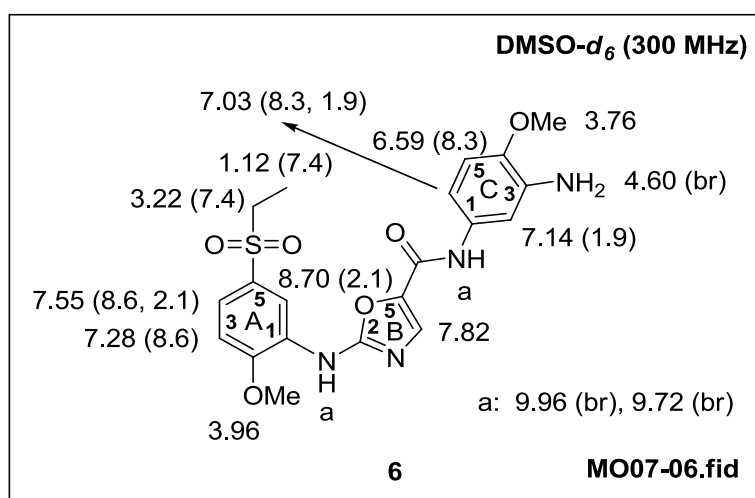
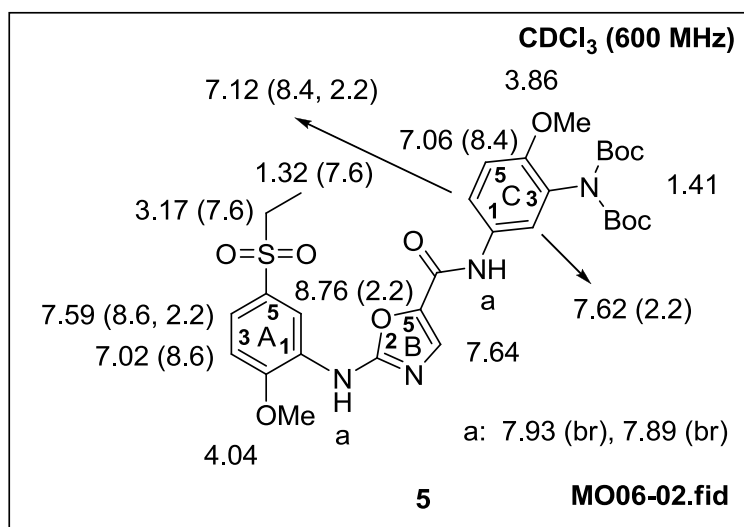
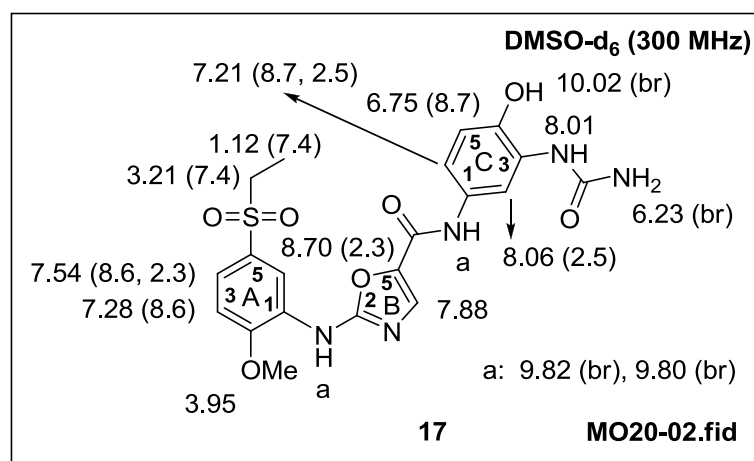
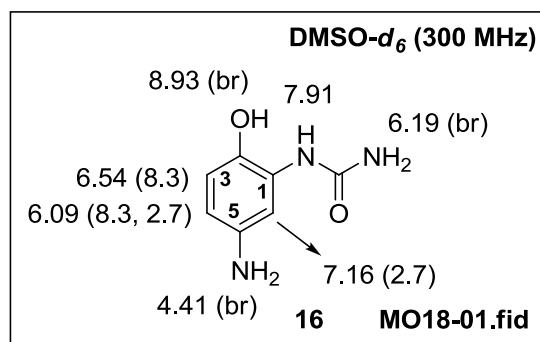
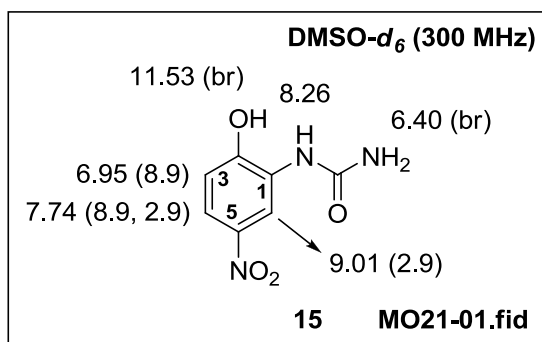
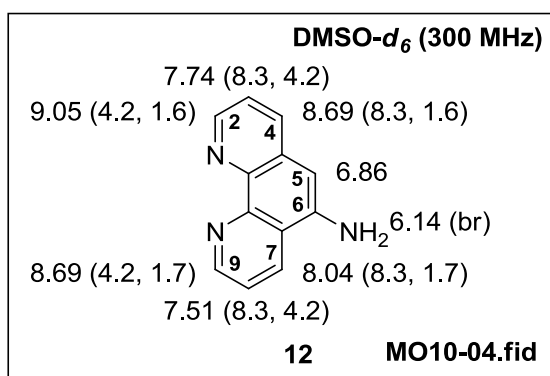
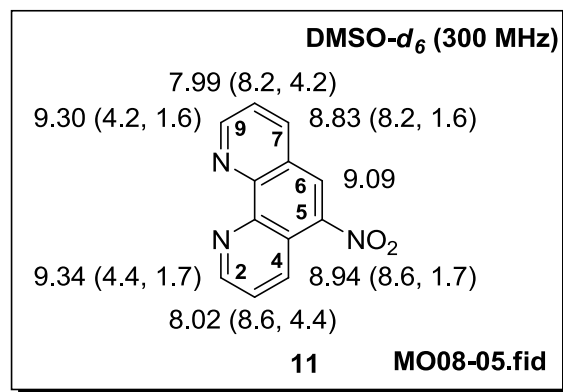
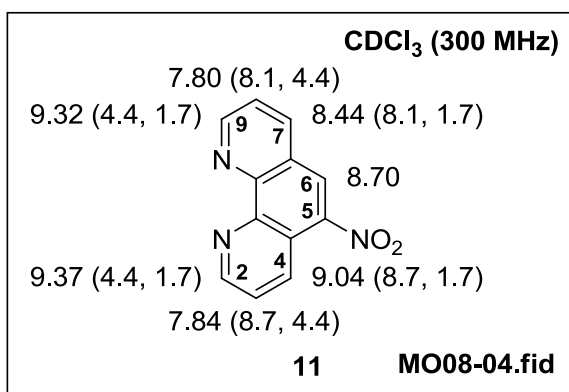


Schéma 3. Návrh a realizácia syntézy predpovedaného inhibítora VEGFR2 TK **17**.

Grafický abstrakt ^1H -NMR spektier







Použité skratky

A	alanín
AcOH	kyselina octová
ALL	akútna lymfoblastická leukémia
AMK	aminokyselina
AML	akútna myeloidná leukémia
ATP	adenozíntrifosfát
Boc₂O	di-terc-butyl dikarbonát
CML	chronická myeloidná leukémia
E	kyselina glutámová
EA	etyl acetát
ECD	extracelulárna doména („Extracellular Domain“)
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylamino)propylkarbodiimid
EGF	epidermálny rastový faktor („Epidermal Growth Factor“)
DC	dendrická bunka („Dendric Cell“)
DCM	dichlórmétán
DFG	„aspartát-fenylalanín-glycín“
DIPEA	N,N-diizopropyletylamín
DMAP	4-N,N-dimetylamino)pyridín
DME	1,2-dimetoxetán
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid

EC	endoteliálna bunka („Endothelial Cell“)
EtOH	etanol
FDA	úrad pre kontrolu potravín a liečiv („Food and Drug Administration Office“)
FLC	strednetlaká kvapalinová chromatografia („Flash Liquid Chromatography“)
FN	fibronektín
H	hexán
HATU	(1-[bis(dimetylamino)metylén]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]pyridínium 3-oxid hexafluorofosfát
HGFR	rodina receptorov tyrozín kinázy („Hepatocyte Growth Factor Receptor“)
HOBt	hydroxybenzotriazol
HUVEC	ľudské pupočníkové endoteliálne bunky („Human Umbilical Vein Endothelial Cell“)
HV	vákuum vytvorené olejovou vývevou, olejová výveva („High Vacuum“)
I	izoleucín
IČ	infračervená spektroskopia
Ig	imunoglobulín
K	lyzín
L	leucín
LDA	diizopropylamid lítny
MeOH	metanol
M.p.	teplota topenia („Melting Point“)
MS	hmotnostná spektrometria („Mass Spectrometry“)
NCAM	adhézna molekula nervovej bunky („Neural Cell Adhesion Molecule“)
NK	nukleová kyselina („Nucleic Acid“)

NRTK	nereceptorové tyrozín kinázy
PCR	polymerázová reťazová reakcia („Polymerase Chain Reaction“)
PR	fotoreceptor („Photoreceptor“)
RD	retinálna dystrofia („Retinal Distrophy“)
RF	retenčný faktor
RT	laboratórna teplota („Room Temperature“)
RPE	sietnicový pigmentový epitel („Retinal Pigment Epithelium“)
RTK	receptorové tyrozín kinázy
RVO	rotačná vákuová odparka
S	serín
SHBG	pohlavný hormón viažuci globulín („Sex Hormone-Binding Globulin“)
SLE	systemový lupus erythematosus („Systemic Lupus Erythematosus“)
TAM	rodina receptorov tyrozín kinázy („Tyro3-Axl-Mer“)
TBTU	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametylurónium tetrafluoroborát
^tBuOH	terc-butanol
TFA	kyselina trifluoroctová („Trifluoroacetic Acid“)
THF	tetrahydrofurán
TK	tyrozín kináza
TLC	chromatografia na tenkej vrstve („Thin Layer Chromatography“)
UV	ultrafialové žiarenie („Ultraviolet“)
VSMC	bunky hladnej svaloviny ciev („Vascular Smooth Muscle Cells“)
W	tryptofán

ÚVOD

Vývoj nádorového tkaniva je spojený s celou radou biochemických procesov v tele ľudského organizmu. Súčasťou týchto procesov sú aj signálne dráhy enzýmov tyrozín kináz. Každá signálna dráha vyúsťuje v rôznu biologickú odpoveď, pričom jednotlivé dráhy môžu pôsobiť paralelne. Nadmerná expresia receptorových tyrozín kináz je priamo spojená s patogenézou a vznikom nádorových ochorení. Tento fakt z nich robí zaujímavé terapeutické ciele, a predmety záujmu mnohých výskumných prác. Ich aktivitu je možné ovplyvniť prostredníctvom inhibítorov, ktoré pôsobia na molekulu enzýmu. Nedostatkom týchto inhibítorov je ich selektivita či toxicita. V súčasnej dobe sa na základe počítačovej predikcie, samotnej syntézy a ďalších postupov pripravujú a testujú inhibítory, ktoré sa viažu do menej konzervovaných miest týchto proteínov. Vývoj takýchto selektívnych inhibítorov predstavuje možnosť účinnejšej liečby rôznych foriem rakovinových ochorení.

1 Ciele bakalárskej diplomovej práce

- a) Spracovať vybranú literatúru ohľadom vlastností a biologickej funkcie TAM TK receptorov.
- b) Spracovať vybranú literatúru týkajúcu sa vývoja TAM tyrozín kinázových inhibítorov.
- c) Navrhnuť metodiku syntézy a pripraviť intermediáty **2, 3, 5, 6, 11, 12, 15 a 16**, ako aj niektoré z predpovedaných inhibítorov **7, 8, 9, 13 a 17**.

2 Teoretická časť k medicínskej chémii

2.1. Vlastnosti a biologická funkcia TAM receptorov

2.1.1. Enzým tyrozín kináza

Tyrozín kinázy (TKs) sú enzýmy, ktoré selektívne katalyzujú fosforyláciu tyrozínových zvyškov cieľových proteínov využívajúc energiu uloženú v makroergických väzbách adenosíntrifosfátu (ATP). Takáto modifikácia proteínov je súčasťou bunkovej komunikácie a tkanivovej homeostázy. Okrem toho je nadmerná aktivita TKs niekedy spojená s vývinom rakovinových ochorení. TK reprezentujú hlavnú časť onkoproteínov a sú esenciálnymi mediátormi procesu signálnej transdukcie, čím zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovej diferenciácii, migrácii, proliferácii, apoptóze a metabolizme organizmu. Ich aktivita ovláda proliferáciu buniek a prispieva tiež k ich citlivosti pre programovanú bunkovú smrť (apoptózu).¹

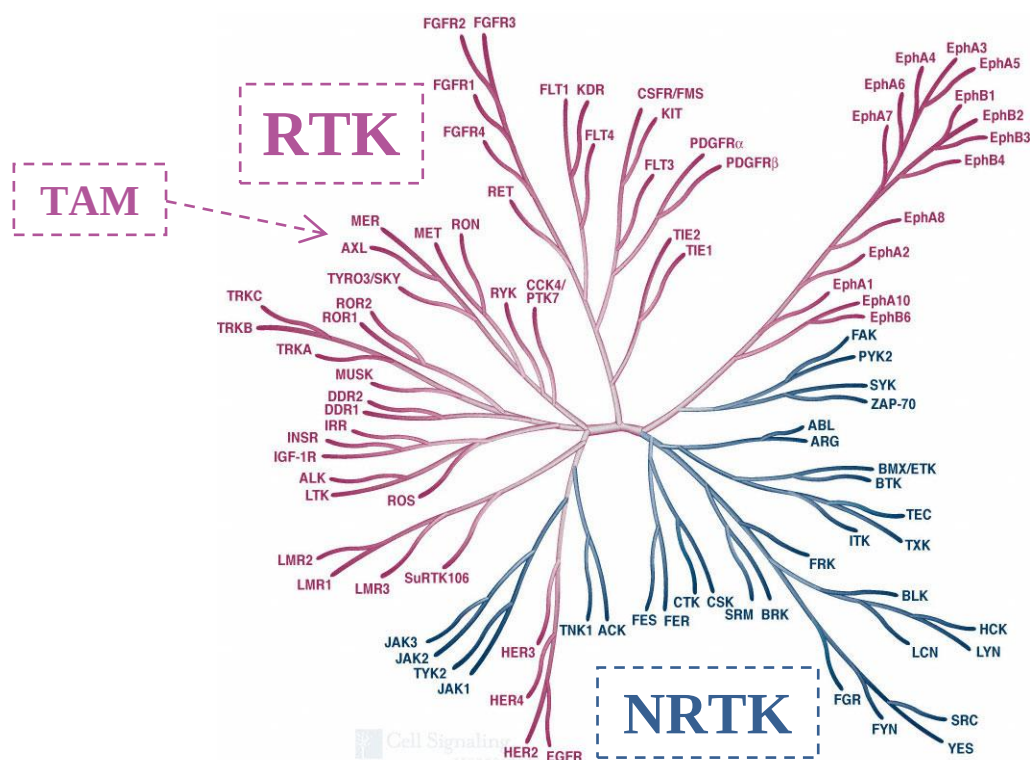
TK pozostávajú z dvoch hlavných skupín:

- i. **Nereceptorové tyrozín kinázy** (NRTKs) sú cytoplazmatické proteíny so štruktúrnou variabilitou, ktorú zabezpečuje samotná kináza a jej proteín-proteínové interakčné domény (SH₂, SH₃, PH).¹
- ii. **Receptorové tyrozín kinázy** (RTKs) predstavujú trans-membránové proteíny aktivované naviazaním ligandu na ich extracelulárnu doménu. Ligandy sú signálne molekuly, ktoré indukujú dimerizáciu TK, ktorá vedie k autofosforylácii intracelulárnych tyrozín kinázových domén. Takto vzniknutá aktívna forma kinázy je schopná fosforylovať ďalšie cytoplazmatické proteíny, a tým spúšťať kaskádu biochemických signálov vyúsťujúcich do aktivácie resp. represie cieľových génov a nakoniec do celkovej bunkovej biologickej odpovedi.^{1,2}

¹ Paccez, J. D.; Vogelsang, M.; Parker, M. I.; Zerbini, L. F. *Int J Cancer* **2013**, 134, 1024-1033.

² Linger, R. M. A.; Keating, A. K.; Earp, H. S.; Graham, D. K. *Adv Cancer Res* **2008**, 100, 35-83.

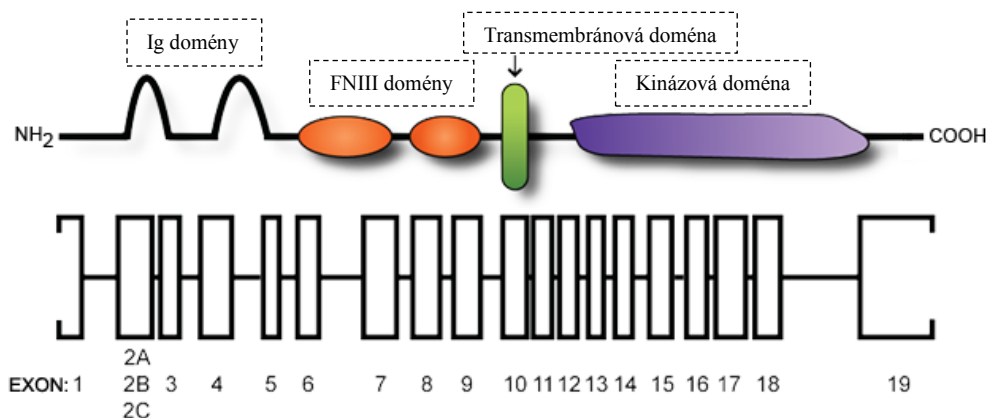
RTKs predstavujú širokú triedu trans-membránových proteínov, ktoré sú kategorizované podľa rôznych kritérií. Na základe sekvenčnej podobnosti aminokyselín (AMKs) v rámci kinázových domén a štruktúrnej podobnosti v rámci extracelulárnych domén ich rozdeľujeme do 20 tzv. „rodín“ RTKs, pričom členovia TKs rodín viažu podobné ligandy. Všetky receptory RTKs pozostávajú z extracelulárnej (ECD), trans-membránovej a intracelulárnej (ICD) kinázovej domény. V tejto diplomovej práci sa zameriame konkrétne na TAM rodinu RTKs, ktorá sa od ostatných rodín líši sekvenciou KW (I/L) A (I/L) ES v rámci intracelulárnej kinázovej domény a adhéziou molekuly v rámci extracelulárnej domény.² Sekvenciou AMKs kinázovej domény sa TAM rodina najviac podobá rodine MET RTK. **(Obrázok 1) TAM rodina**, spomedzi 58 ľudských RTK, **pozostáva z troch jednotlivých TK receptorov: Axl, Mer a Tyro3. Každý člen tejto rodiny obsahuje 2 imunoglobulínové (Ig) a 2 fibronektínové (typu III) (FNIII) domény**, ktoré zohrávajú esenciálnu úlohu pri regulácii bunkových procesov a pri zabezpečení kontaktov medzi bunkami. Extracelulárne domény TAM TKs sa svojou štruktúrou podobajú adhézne molekule nervovej bunky (NCAM), ktorá obsahuje 5 Ig a 2 FNIII.²



Obrázok 1. Fylogenetický strom TKs vyplývajúci zo sekvenčnej analýzy AMKs.³

³ <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases> (naposledy navštívené 20.5.2014).

V rámci rodiny TAM majú najväčšiu podobnosť genomickej štruktúry receptory Axl a Tyro3 na základe počtu a veľkosti exónov, ktoré kódujú signálny peptid. Rôzne varianty exónov môžu ovplyvniť post-transkripčné procesy, lokalizáciu a funkciu receptora. Axl a Tyro3 sú kódované 20 exónmi, pričom tretí receptor, Mer je kódovaný 19 exónmi.² (Obrázok 2) **Axl disponuje 2 variantmi vyplývajúcimi z alternatívneho splicingu** exónu 10, ktorý kóduje časť druhej FNIII domény. Výsledkom alternatívneho splicingu receptora **Tyro3 sú 3 rozličné varianty** obsahujúce exón 2A, 2B alebo 2C. Splicing receptora Mer nebol zatiaľ dostatočne charakterizovaný. Na rozdiel od podobnosti genomických štruktúr **Axl a Mer majú najviac podobnú sekvenciu AMKs tyrozín kinázovej domény (54-59 % sekvenčnej identity)**, zatiaľ čo **extracelulárne domény** majú **31-36 %** sekvenčne rovnakých AMKs. Proteíny **Axl, Mer a Tyro3** obsahujú jednotlivo 894, 890 a 999 AMKs a ich **molekulové hmotnosti sú v rozmedzí 100-140 kDa** pre Axl, Tyro3, a 165-205 kDa pre Mer, pričom 1 Da = 1 g/mol.²



Obrázok 2. Organizácia domén receptora Tyro3.⁴

2.1.2. Nomenklatúra TAM receptorov

Celá rodina TAM receptorov bola objavená v rámci 3 rokov. Každý gén receptora bol klonovaný viacerými nezávislými skupinami, čoho výsledkom bola metúca nomenklatúra. **Axl bol prvýkrát identifikovaný v roku 1988** ako transformujúci gén u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou (CML). Vedecká skupina O'Bryana ho v roku 1991 pomenovala gréckym slovom **anexelekto**, v preklade **nekontrolovateľný**. Janssenova vedecká skupina ho pomenovala **Ufo** gén, názov **naznačujúci neznámu**

⁴ Migdall, J.; Graham, D. K. *Atlas Genet Oncol Haematol* **2010**, 14, 1065-1069.

funkciu jeho proteínového produktu. **Ďalším** nezávislým **pomenovaním** skupinou Rescigna bolo **Ark (adhesion related protein)**. V rovnakom čase Lai a Lemke vyizolovali 13 nových PCR fragmentov z potkanieho mozgu, ktoré dostali označenie Tyro1 až Tyro13, pričom Tyro3, Tyro7 a Tyro12 boli zoskupené do jednej rodiny na základe unikátnej AMKs sekvencie. Neskôr sa zistilo, že **Tyro7** je rovnaký gén ako Axl, Tyro12 ako Mer, a Tyro3 predstavoval tretieho člena tejto rodiny. Zatiaľ čo **na začiatku** výskumu **bolo** v literatúre používaných **mnoho** z týchto **názvov**, pre zvyšok skúmania sú najčastejšie zverejňované a **doteraz používané pomenovania Axl, Mer a Tyro3.**² Ďalšie pomenovania týchto proteínov zobrazuje (**Tabuľka 1**).

Tabuľka 1. Nomenklatura TAM receptorov.

kináza	synonymá	Zdroje
Axl	Ark (m), Ufo, Tyro7 (r)	Resigno (1991); Janssen (1991); Lai a Lemke (1991)
Mer	Eyk (ch), MerTK, Nyk, Tyro12 (r)	Jia a Hanafusa (1994); Weier (1999); Link a Kung (1995); Lai a Lemke (1991)
Tyro3	Brk (m), Dtk (m), Rse, Sky, Tif, Etk2 (m), Rek (ch)	Fujimoto a Yamamoto (1994); Crosier (1994); Mark (1994); Ohashi (1994); Dai (1994); Biesecker (1993); Biscardi (1996)

ch – kura, m – myš, r – potkan

2.1.3. Expresia TAM receptorov

Axl je pôvodne izolovaný od pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou (CML) a je identifikovaný vo viacerých bunkách a orgánoch, vrátane tkanív epiteliálneho, mezenchýmového a hematopoetického pôvodu, ako aj v nediferencovaných bunkách. Nadmerná expresia receptora je pozorovaná v mnohých typoch nádorových buniek, vrátane nádoru žalúdka, hrubého čreva, štítnej žľazy, prsníka, semenníkov, vaječníkov, pečene, pľúc, pankreasu, prostaty, obličiek a hypofýzy.² Z tohto dôvodu je Axl považovaný za potenciálny terapeutický cieľ pre liečbu rakoviny. Onkogénny (nádorový) potenciál receptora Axl je uložený v tyrozín kinázovej doméne, ktorej činnosť je niekedy možná aj bez stimulácie extracelulárnej domény tohto receptora.^{2,4}

Mer je izolovaný od pacientov s akútnou lymfoblastickou leukémiou (ALL), pričom v ľudských T a B lymfocytoch v akomkoľvek štádiu vývoja rakoviny identifikovaný nie je. Je pomenovaný podľa miesta svojho pôsobenia – **monocytes**,

epithelial and reproductive tissue. Testy ukázali expresiu receptora Mer v nezhubných nádoroch (adenómoch) a monocytických bunkových líniiach. Jeho transformujúca schopnosť ho istým spôsobom odlišuje od ostatných receptorov. **Je potrebný pre pohltenie apoptických buniek fagocyty a je schopný vyvolať reorganizáciu cytoskeletu, ktorá je pre fagocytózu apoptických buniek potrebná.** Jeho funkcia bola testovaná na myšiach, ktoré obsahovali mutácie všetkých 3 receptorov rodiny TAM („triple knockout“). Preukázal sa nárast apoptických buniek a zvýšená hladina protilátok, z čoho vyplýva zasiahnutie procesov fagocytózy a autoimunitnej odpovede. V skutočnosti, mutácia receptora Mer spôsobí taký fenotypový prejav, ktorý zdôrazní jeho dôležitosť v imunitnej homeostáze. Nadmerná expresia tohto receptora bola pozorovaná v tkanivách rakoviny žalúdka, prostaty, prsníka, mozgu a pri melanóme.^{2,4}

Tyro3 je najmenej preštudovaným receptorom rodiny TAM, pričom jeho genomická štruktúra je podobná receptoru Axl. Nachádza sa v osteoklastoch kostí, kde plní funkciu pri resorpcii kostného tkaniva. Taktiež bol identifikovaný v bunkových líniiach akútnej myeloidnej leukémie (AML).

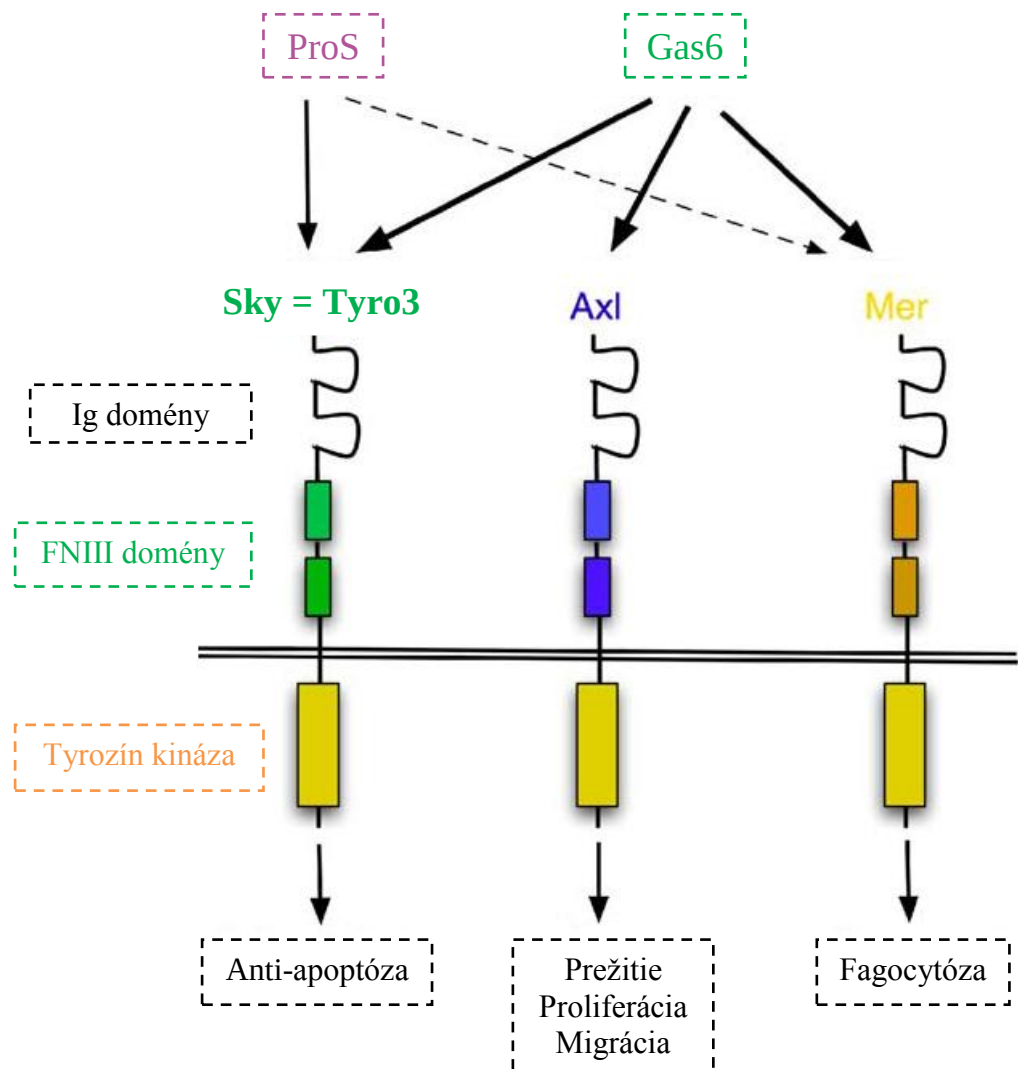
Tabuľka 2. Nadmerná expresia receptorov TAM pozorovaná v niektorých ľudských nádoroch.

nádor	Axl	Mer	Tyro3
Myeloidná leukémia (CML, AML)	+		+
Lymfoblastická leukémia (ALL)		+	
Myelóm			+
Maternica	+		
Hrubé črevo	+		
Prostata	+	+	
Pľúca	+		
Prsníky	+	+	
Melanóm	+	+	

(+) nadmerná expresia

2.1.4. Ligandy TAM receptorov

Pre rodinu receptorov TAM TK sú charakteristické dva podobné, na vitamíne K závislé biologické ligandy, Gas6 (Growth Arrest Specific gene 6) a Proteín S (ProS). **Gas6** bol prvýkrát identifikovaný ako ligand pre Axl, ProS ako ligand pre Tyro3. Mnohé štúdie však potvrdzujú, že Gas6 **viaže a aktivuje všetkých troch členov rodiny TAM**, zatiaľ čo **ProS** ako ligand len Tyro3 (Sky) a Mer. (**Obrázok 3**) Doposiaľ neexistuje žiaden dôkaz, že by ProS aktivoval aj receptor Axl. Axl a Tyro3 viažu ligand Gas6 približne rovnakou afinitou, pričom afinita receptora Mer na ligand Gas6 je v porovnaní 3-10 krát menšia.²



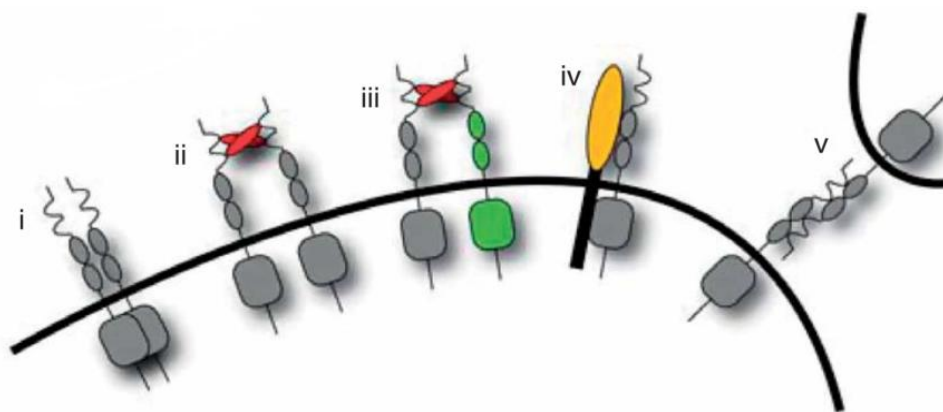
Obrázok 3. Interakcie ligandov Gas6, ProS s členmi TAM rodiny a biologická signalizácia jednotlivých TKs.⁷

Gas6 a ProS zdieľajú 43 % rovnakej sekvencie AMKs a majú tú istú štruktúru domén s výnimkou miesta trombínovej štrbiny v slučkovej oblasti, ktorá je prítomná len v ProS. N-terminálne oblasti oboch proteínov obsahujú 60 post-translačne modifikovaných AMKs zvyškov kyseliny γ -glutamovej (Gla doména). Za doménou kyseliny γ -glutamovej sa nachádza slučková oblasť („Loop Region“) a štyri epidermálne rastové faktory (EGF). C-terminálne oblasti proteínov obsahujú guľovitý pohlavný hormón viažuci globulín (SHBG doména), ktorá pozostáva z 2 domén laminínov G (LG1 a LG2).² (**Obrázok 4**)

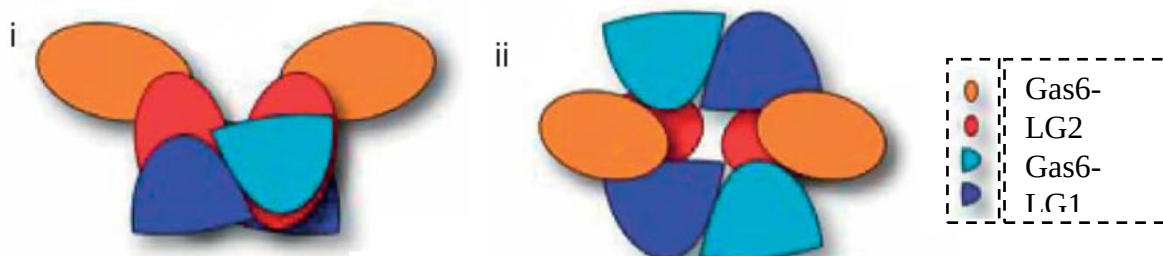


Obrázok 4. Organizácia domén ligandov Gas6 a ProS.

Ligandy pôsobia ako molekuly, v ktorých **Gla doména sprostredkováva väzbu ligandu na negatívne nabitú fosfolipidovú membránu apoptických buniek za spoluúčasti vápenatých iónov. Slučková oblasť je citlivá na trombínové štiepenia zohrávajúce dôležitú úlohu v zrážanlivosti krvi.** Táto schopnosť ligandu Gas6 chýba. LG domény (SHBG doména) sa viažu do štruktúry v tvare písmena V, ktorá je stabilizovaná viažucim sa Ca^{2+} iónom. (**Obrázok 9**) Naviazaním sprostredkovávajú interakciu s receptorom, pričom vzniknutá väzba je nevyhnutná pre samotnú aktiváciu receptora. Fischer v roku 2005 objavil, že iba LG1 doména ligandu Gas6 sa viaže na receptor Axl, tzn., že LG2 doména receptor neaktivuje. Jedna molekula ligandu Gas6 viaže jednu molekulu receptora Axl vysokou afinitou medzi doménami LG1-Ig1 a nižšou afinitou medzi doménami LG1-Ig2. (**Obrázok 6**) Vzniká tzv. 2:2 izoméria bez interakcií ligand-ligand alebo receptor-receptor. Každý kontakt je charakterizovaný antiparalelným zoskupením β -vlákien tak, že spojené β -listy vytvárajú molekulové spojenie. Aktivácia receptorov TAM je spojená s viacerými mechanizmami. (**Obrázok 5**) Vedci ukázali, že **Gas6/Axl väzbový systém má jednoznačný vplyv na bunkové prežitie, proliferáciu, migráciu a adhéziu.**²



Obrázok 5. Spôsoby aktivácie TAM receptorov: (i) ligandovo nezávislá dimerizácia, (ii) ligandovo závislá dimerizácia, (iii) heterodimerizácia 2 rôznych receptorov rodiny TAM, (iv) heterodimerizácia s receptorom inej rodiny TK (v) trans-bunková väzba extracelulárnych domén.



Obrázok 6. 2:2 izoméria Gas6/Axl systému zobrazená (i) z boku a (ii) z vrchu.

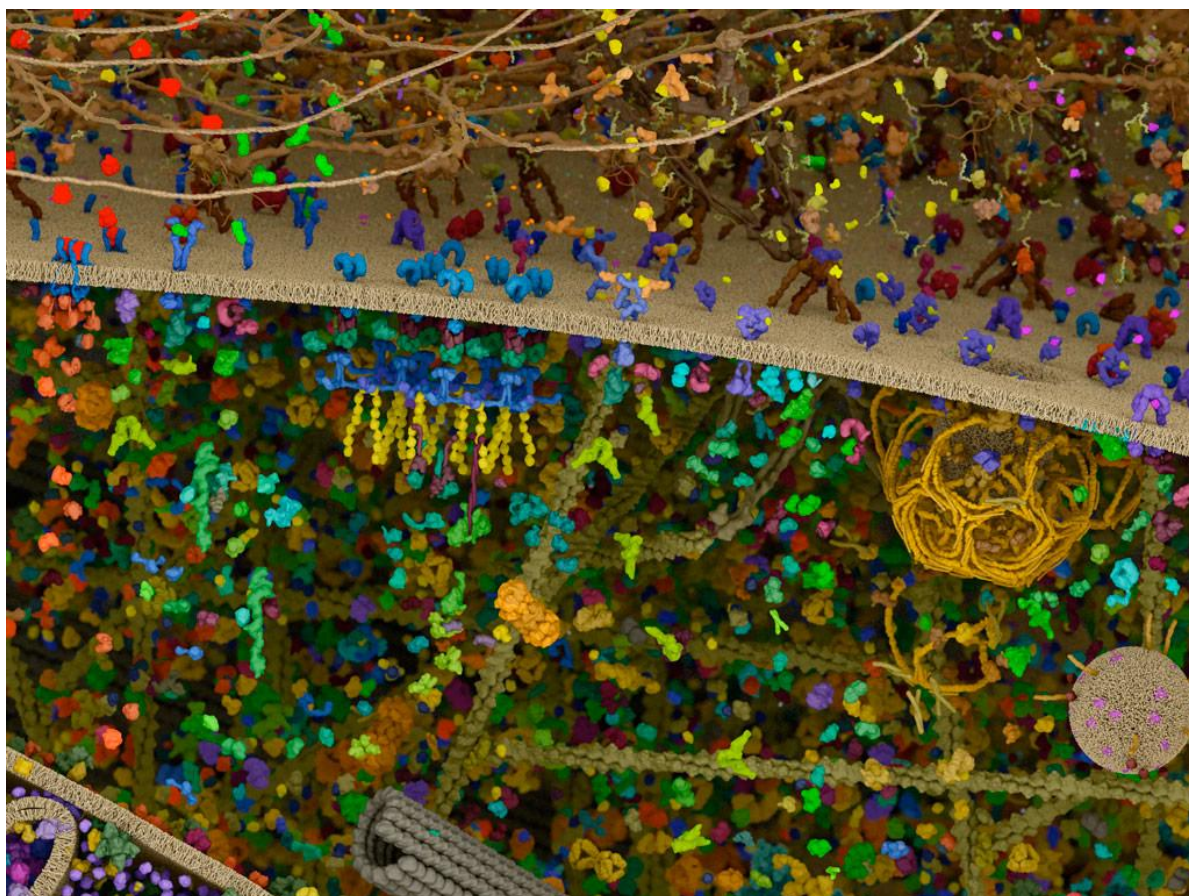
2.1.5. Signalizácia a signálna transdukcia

Väzba ligandu s monomérom receptora RTK indukuje konformačnú zmenu, ktorá vedie k dimerizácii receptora a aktivácii intracelulárnej kinázy. Aktivovaná kináza transfosforyluje tyrozínové zvyšky na susednej monoméromnej jednotke z homodiméru, pričom výsledkom takejto autofosforylácie je:

- (i) Zvýšená katalytická účinnosť vedúca k fosforylácii ďalších substrátov.
- (ii) Tvorba dokovacích miest, ktoré viažu signálne molekuly obsahujúce SH2 („Src-homology 2“) a PTB („Phosphotyrosine Binding“) domény umožňujúce receptorom RTKs a ďalším proteínom vytvárať makromolekulové signálne komplexy.

Pre **receptor Mer** boli identifikované 3 tyrozínové zvyšky (**Y-749, Y-754 a Y-753**) v rámci kinázovej domény ako **primárne miesta autofosforylácie**, pričom Y-749 je označované ako prednostné miesto autofosforylácie. Mutácie v tyrozínoch 749, 754 a 753

na fenylalanín (Phe) znižujú kinázovú aktivitu receptora Mer jednotlivo na 39, 6 a 10 %. Kinázová aktivita receptora Mer vyžaduje fosforyláciu všetkých troch tyrozínov, ktoré zodpovedajú za kompletne funkčnú aktivitu kinázy. Takéto tyrozínové trio má stálu pozíciu medzi TAM receptormi. **Pre Axl** je korešpondujúce trio **Y-703, Y-702 a Y-698**, pre **receptor Tyro 3** **Y-686, Y-685 a Y-681**. Experimenty preukázali, že niektoré signálne molekuly sa spájajú s fosforylovaným tyrozínom Y-872 prostredníctvom ich SH2 domény. Signálne dráhy receptora **Mer** vedú k **agregácii krvných doštičiek, prežitiu bunky, regulácii produkcie prozapaľových cytokínov a aktínového cytoskeletu**. Finálne ciele signálnych dráh sa môžu líšiť v závislosti od rôznych faktorov, vrátane typu bunky a mikroprostredia (tkaniva), pričom v niektorých bunkách môžu jednotlivé signálne dráhy pôsobiť paralelne.² (Obrázok 7)



Obrázok 7. Molekulárna „krajina“ signálnych dráh TK receptorov.⁵

⁵ Hornbeck, P. V.; Kornhauser, J. M.; Tkachev, S.; Zhang, B.; Skrzypek, E.; Murray, B.; Latham, V.; Sullivan, M. *Nuclei Acids Res* **2012**, *40*, 261-270.

Pre **Axl** boli navrhnuté 3 alternatívne tyrozínové zvyšky (Y-866, Y-821 a Y-779) ako potenciálne miesta autofosforylácie. **Y-821 predstavuje multisubstrátové dokovacie miesto**, ktoré sprostredkováva interakciu receptora Axl so signálnymi molekulami PLC- γ , PI3K, Grb2 a Src. Tyrozín **Y-779 vykazuje afinitu k PI3K** a **Y-866 predstavuje dokovacie miesto pre PLC- γ** . Signálne dráhy receptora Axl vedú k **agregácii krvných doštičiek, bunkovému prežitiu, proliferácii, regulácii produkcie prozápalových cytokínov a regulácii aktínového bunkového cytoskeletu**.^{2,4}

Tyro3 predstavuje ligandovo nezávislý receptor, **je schopný samostatne sa autofosforylovať** za vzniku konštitutívneho diméru. Pre Tyro3 je charakteristická varianta, ktorá je schopná fungovať ako dimérna tyrozín kináza aj v prípade absencie extracelulárneho spojenia. Ako väzboví partneri pre tento receptor boli identifikované proteíny PI3K, Src a RanBPM. Rovnako ako Axl, aj Tyro3 aktivujú ligandy Gas6 a ProS. Signálne dráhy receptora **Tyro3** sú spomedzi všetkých TAM receptorov najmenej preštudované. **Sprostredkovávajú agregáciu krvných doštičiek, bunkovú transformáciu a resorpciu kostných osteoklastov**.²

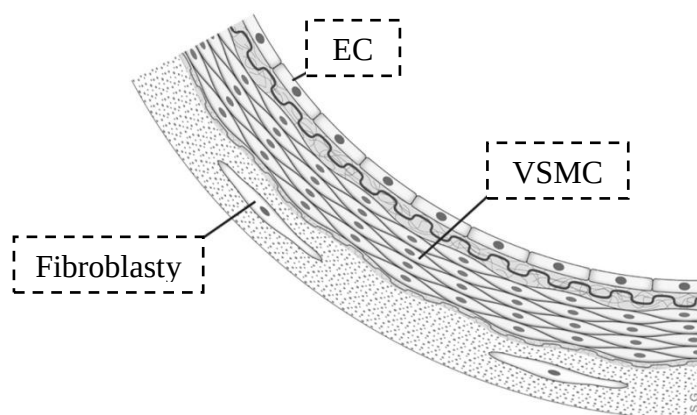
Mnohé tyrozín kinázy sú deaktivované fosforyláciou inhibičného tyrozínového zvyšku Y-527, ktorý po jeho fosforylácii mechanicky bráni väzbe na aktívne miesto kinázy. Druhým spôsobom inhibície je receptorová defosforylácia proteínom tyrozín fosfatázou C1-TEN. Pri nadmernej expresii tohto proteínu bola pozorovaná znížená schopnosť prežitia, proliferácie a migrácie buniek.²

2.1.6. Angiogenéza a clearance apoptických buniek

Angiogenéza predstavuje proces tvorby nových ciev, ktorý je dôležitý počas vývoja a hojenia rán. Okrem toho podporuje rast nádorov a zhubné transformácie buniek. Počas angiogenézy sú kľúčovými procesmi proliferácia (bujnenie) a migrácia buniek hladkej svaloviny ciev (VSMC). Proliferácia je ovplyvnená aktivitou receptora Axl, jeho nadmernou expresiou je migrácia VSMC buniek zvýšená o 2-5 %.⁶ Receptor Axl reguláciou apoptózy VSMC buniek zohráva značnú úlohu v cievnej remodelácii, a tiež v regulácii rastu endoteliálnych buniek (EC), ktoré tvoria súčasť cievneho tkaniva. **(Obrázok 8)** Na štúdium funkcií a patológie endoteliálnych buniek sa používajú bunky HUVEC. Ide o ľudské endoteliálne bunky získané z pupočnej šnúry matky po narodení

⁶ Fridell, Y. W.; Villa, J. R.; Attar, E. C.; Liu, E. T. *J Biol Chem* **1998**, 273, 7123-7126.

plodu. Nadmerná expresia receptora Axl zvyšuje rast HUVEC buniek a tvorbu ciev⁷. Hoci Mer a Tyro3 sú taktiež zapojené do procesu angiogenézy, ich vplyv v tomto procese zatiaľ nebol preskúmaný.



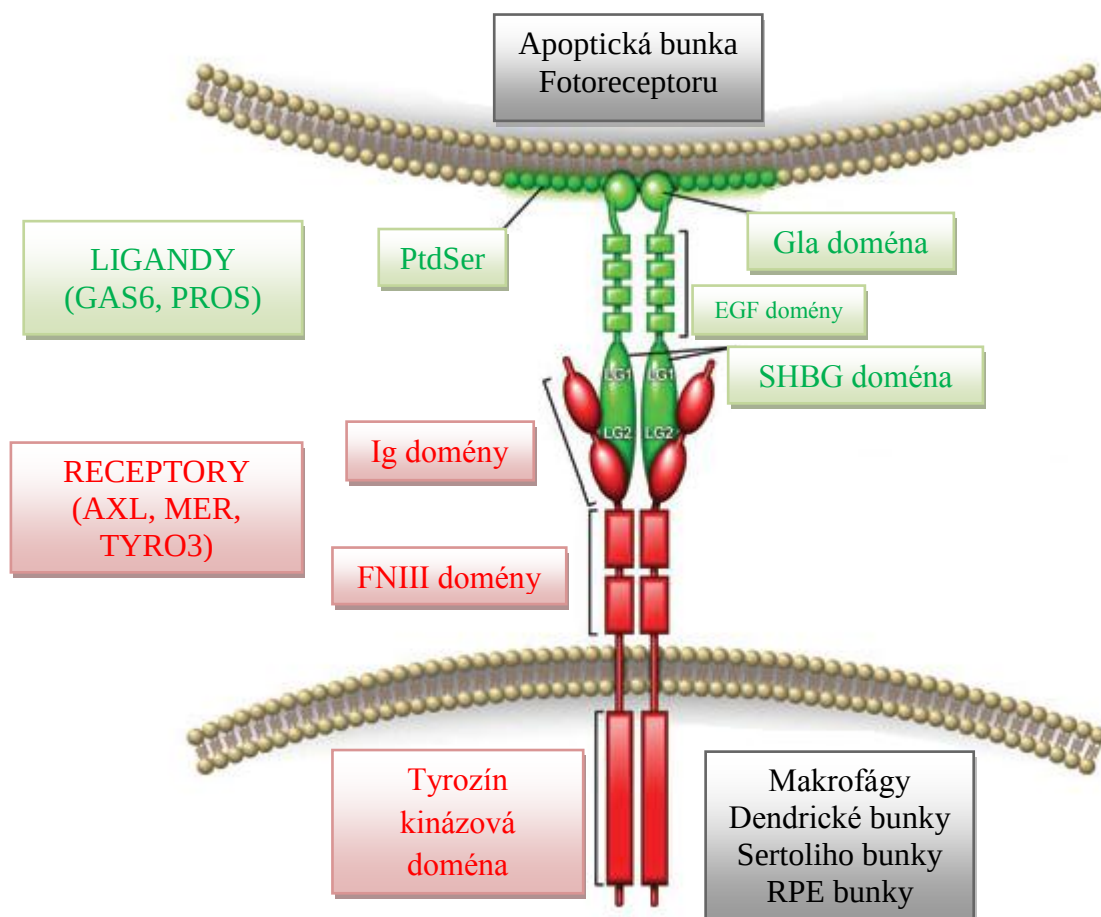
Obrázok 8. Základné zloženie ciev krvného riečišťa.⁸

Clearance (odstraňovanie) predstavuje posledný krok fagocytózy apoptických buniek, ktorá zohráva dôležitú úlohu v biologických procesoch, vrátane vývoja tkanív, udržiavania tkanivovej homeostázy a taktiež pri vzniku patologických stavov. Pre optimálnu fagocytózu apoptických buniek v imunitnom, nervovom a reprodukčnom systéme dospelých jedincov je potrebná optimálna hladina aktivity TAM receptorov. Receptory rodiny TAM sú majoritne obsiahnuté v makrofágoch, v minoritnej miere v dendrických, NK („Natural Killing“) bunkách imunitného systému, Sertoliho bunkách, v bunkách sietnicového pigmentového epitelu (RPE) a v endoteliálnych bunkách (EC). Rozpoznanie apoptickej bunky receptorom je sprostredkované interakciou Gla domény ligandov (Gas6 a/alebo ProS) s fosfatidylserínom (PS/PtdSer) vonkajších membrán apoptických buniek. **(Obrázok 9)** PtdSer slúži ako tzv. „zjedz ma signál“. Je dôležitým rozpoznávacím znakom počas fagocytózy apoptických buniek, pri ktorej nedochádza k uvoľňovaniu vlastných imunogénnych antigénov. Dochádza však k uvoľňovaniu protizápalových cytokínov (IL-10 a TGF- β), ktoré zabezpečia odolnosť makrofágov a dendrických buniek voči ďalšej stimulácii.⁹

⁷ Holland, S. J.; Powell, M. J.; Franci, C.; Chan, E. W.; Frieri, A. M.; Atchinson, R. E. *Cancer Res* **2005**, 65, 9294-9303.

⁸ http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d0/Endotelijalna_%C4%87elija.jpg (naposledy navštívené 20.5.2014).

⁹ Lemke, G.; Burstyn-Cohen, T. *Ann Ny Acad Sci* **2010**, 46, 23-29.



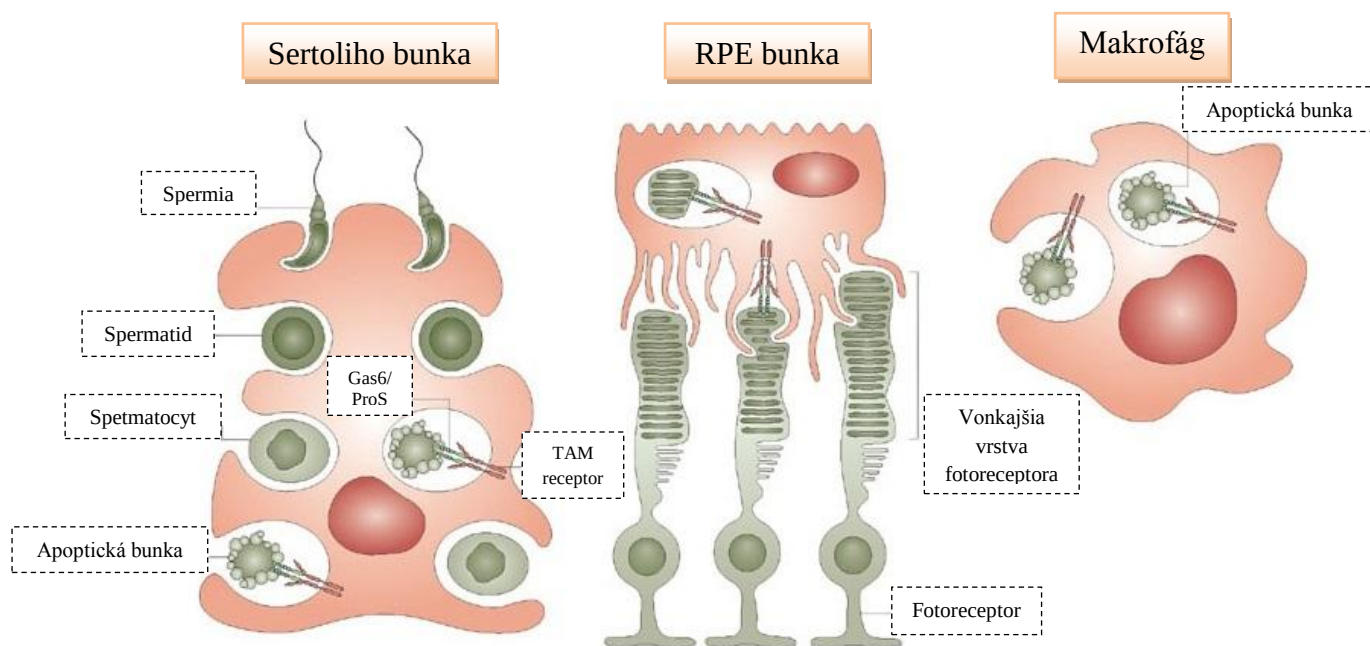
Obrázok 9. Funkcia ligand/receptorového systému.

Udržanie symetrie membránovej distribúcie fosfolipidu fosfatidylserínu zdravých buniek vyžaduje zložité enzymatické mechanizmy. Flipázy sú enzýmy zabezpečujúce, že PS sa nachádza výhradne len na vnútornej strane fosfolipidovej dvojvrstvy plazmatickej membrány buniek. Počas apoptózy sú flipázy blokované. Nefunkčnosť týchto enzýmov zabezpečí, že PS sa budú nachádzať aj na vonkajšej membráne bunky, kde budú účinným rozpoznávacím prvkom apoptických buniek. TAM receptory rozpoznávajú PS prostredníctvom svojich ligandov Gas6 a ProS, ktoré zabezpečia premostenie fagocytu s cieľovou apoptickou bunkou.

Pre udržanie tkanivovej homeostázy je rozhodujúca efektívna fagocytóza apoptických buniek (**eferocytóza**). Tkanivová homeostáza si vyžaduje vznik nových a smrť netypických, starých alebo infikovaných buniek a ich následné odstránenie („Clearance“) z tkaniva. Systém TAM receptorov TK a ich ligandov je vyvinutý a špecializovaný pre pravidelné odstraňovanie apoptických buniek z plne diferencovaných tkanív a orgánov. Všetky receptory TAM sú veľmi dynamické a podliehajú regulácii

extracelulárnym stresom a cytokínom (interleukínom). Cytokíny predstavujú signálne mediátory, ktoré plnia funkciu sprostredkovania informácií medzi bunkami imunitného systému. Aktivita intracelulárnych tyrozín kináz TAM receptorov je v ustálenom stave nízka. Aktiváciu týchto kináz zabezpečuje väzba ligandov Gas6/ProS a následná homo alebo hetero dimerizácia receptora. Vzhľadom k ich štruktúre a pôsobeniu počas fagocytózy sú ligandy **Gas6 a ProS** označované ako **spojovacie molekuly (opsoníny) medzi fagocytom a apoptickou bunkou**, ktoré uľahčujú a urýchľujú fagocytózu. Ligandy sa v rovnakom čase viažu na fosfatidylserín vonkajšej membrány apoptickej bunky a na receptor fagocyticky aktívnej bunky, čím dochádza k aktivácii intracelulárnej tyrozín kinázy. **(Obrázok 9)** V makrofágoch a dendrických bunkách (DC) sú najviac zastúpené receptory Axl a Mer. Ich aktivácia spúšťa signálnu transdukčnú kaskádu, ktorá mobilizuje a mení konfiguráciu aktínových komponentov cytoskeletu. Takáto transformácia je nevyhnutná pre pohltenie apoptickej bunky. V prípade, že nedôjde k aktivácii tyrozín kinázy a následnej signálnej transdukcii, nedôjde ani k procesu efektívnej fagocytózy.⁹

Nedostatky v rozlišovaní, signalizácii a clearance, môžu mať za následok chronické ochorenia, ako napr. ľudská retinálna dystrofia (RD), ateroskleróza, diabetes, systémový lupus erythematosus (SLE), vznik nádorov a ďalších autoimunitných ochorení. Takéto fenotypové prejavy sú výsledkom hromadenia apoptických buniek a následnej nekrózy tkanív. Ide o dôsledok straty funkcie TAM receptorov fagocytických buniek. Makrofágy izolované zo SLE pacientov prejavujú defektný clearance. Ich signálne dráhy obsahujú viac než 40 receptorov, vrátane rozpustných spájajúcich proteínov, vnútrobunkových adaptorov a signálnych proteínov. U pacientov so SLE bola pozorovaná znížená expresia ProS, pričom expresia ligandu Gas6 nebola ovplyvnená.⁹



Obrázok 10. Fagocyticky aktívne bunky so schopnosťou pohlcovať apoptické bunky prostredníctvom TAM receptorov.¹⁰

Úlohy, ktoré TAM receptory a ich ligandy zohrávajú vo fagocytóze apoptických buniek boli preukázané genetickými testami na myšiach. Myši s tlmiacimi mutáciami vo všetkých troch génoch kódujúcich TAM receptory („Triple Knockout“) sú prvé 2-3 týždne od narodenia nerozoznateľné od nemutantných jedincov, pretože gény TAM receptorov nemajú vplyv na embryonálny vývin. Táto charakteristická vlastnosť je v kontraste s mnohými ostatnými receptormi TK, ktoré zohrávajú esenciálne úlohy práve v embryonálnom vývine. Na začiatku 3. týždňa sa však objavuje rad degeneratívnych fenotypov sietnice, reprodukčného systému samcov, hematopoetického a imunitného systému. Takéto mutanty sú schopné dožiť sa viac než jedného roka života z toho dôvodu, že fenotypové prejavy sú časom utlmené. Približne v 5. týždni od narodenia mutanta, jeden týždeň po začiatku produkcie spermií, sa v kanálikoch semenníka produkujúceho semeno, nahromadia zvyšky mŕtvych apoptických buniek. Zoskupením takýchto zvyškov dochádza k smrti takmer všetkých zárodočných buniek, ktoré boli určené pre vznik spermie. U dospelých mutantných samcov sa to prejaví neplodnosťou a približne 1/3 veľkosti normálnych semenníkov. Takýto degeneratívny fenotypový prejav je bunkovo neautonómny a je spôsobený stratou funkcie TAM receptorov v Sertoliho bunkách. Ide o

¹⁰ Lemke, G.; Rothlin, C. V. *Nat Rev Immunol* **2008**, 8, 327-336.

bunky vyskytujúce sa v semenotvorných kanálikoch, okolo ktorých prebieha samotný proces tvorby spermatu. **(Obrázok 10)** Funkciou týchto somatických podporných buniek je chrániť, vyživovať spermatické bunky, odstraňovať približne 10^8 nepotrebných zvyškov apoptických buniek vyvíjajúcich sa spermií denne. Odhaduje sa, že viac ako polovica spermatogenetickej populácie podlieha apoptóze ešte počas spermatogenézy.⁹

Veľmi podobný degeneratívny fenotypový prejav TAM receptorov je pozorovaný na myšiach v sietnici. V tomto prípade vytvára hlavný podiel receptor Mer, ktorého genetická mutácia spôsobí slepotu myši kvôli úplnej neprítomnosti fotoreceptorov (PR). Po 2 týždňoch od narodenia je sietnica v mutantnom a nemutantnom type od seba nerozlíšiteľná. Začiatkom 3. týždňa dochádza k výskytu apoptických buniek vo fotoreceptorovej vrstve, ktoré po 10 týždňoch odumrú a dôjde k ich hromadeniu. Ide opäť o neautonómny efekt vzhľadom k fotoreceptorom. Tak, ako Sertoliho bunky v semenníkoch, aj bunky sietnicového pigmentového epitelu (RPE) sú vysoko fagocytické, s tým rozdielom, že sa nepohlcujú apoptické bunky, ale sa „len“ metabolizujú živé distálne konce fotoreceptorov obsahujúce rodopsín. **(Obrázok 10)** V týchto rodopsín obsahujúcich koncoch dochádza k detekcii svetla. Fotoreceptory vytvárajú každý deň novú rodopsínovú membránu, pričom staré časti týchto membrán sú RPE bunkami fagocytované v dennom cykle pre zachovanie konštantnej dĺžky distálnych koncov fotoreceptora. RPE fagocytóza sa od ostatných clearance systémov líši v tom, že membránové časti fotoreceptorov, ktoré sa odstraňujú, sú časti živých buniek. Mutácia v gène Mer receptora spôsobí, že RPE bunky nevykonávajú dennú fagocytózu distálnych koncov fotoreceptora, čo má za následok neautonómnú apoptickú smrť všetkých fotoreceptorov v sietnici. Strata všetkých fotoreceptorov je príčinou slepoty. **Mutácia v ľudskom Mer gène** sa fenotypovo prejaví ako vzácna forma dedičného zápalu sietnice – **retinálna pigmentóza (RP)**. RP predstavuje degeneratívne ochorenie očí, ktoré vážne poškodzuje zrak a **často vedie k slepote**. Je spôsobená abnormalitami fotoreceptorov (tyčínok a čapíkov) alebo buniek sietnicového pigmentového epitelu (RPE). Toto ochorenie môžeme prirovnať k obrazovke, ktorá obsahuje vypálené pixely. **(Obrázok 11)** Na toto degeneratívne a progresívne ochorenie **neexistuje žiaden známy liek**.¹¹

¹¹ Nguyen, K-Q.; Tsou, W.; Kotenko, S.; Birge, R. B. *Autoimmunity* **2013**, 46, 294-297.



Obrázok 11. Fenotypový prejav retinálnej pigmentózy (vpravo).¹²

Jednotlivé fagocyticky aktívne bunky obsahujú rôzne kombinácie TAM receptorov. **V Sertoliho bunkách sa vyskytujú všetky 3 receptory TAM, v RPE bunkách receptory Mer a Tyro3.** Vo väčšine **dendrických buniek a makrofágoch sú obsiahnuté receptory Axl a Mer.** Intravenóznym podaním toxického množstva Dexamatazonu, steroidu so základnými protizápalovými účinkami, alebo priamym podaním apoptických buniek, bola pozorovaná znížená rýchlosť odstraňovania apoptických buniek makrofágmi. Tento proces je závislý na aktivácii Mer kinázy, ktorá vyžaduje prítomnosť ligandov ProS/Gas6. Mutantné makrofágy, ktoré nie sú závislé na fosfatidylserínom označených apoptických bunkách, nevykazujú žiadne poškodenia vo fagocytických procesoch. V tomto prípade fagocytóza nie je ohrozená stratou signalizácie TAM receptorov.¹¹

2.1.7. Homeostatická fagocytóza

Fagocytóza apoptických buniek závislá od signalizácie TAM receptorov je špecializovaný proces vyhradený pre plne diferencované tkanivá a orgány dospelých jedincov, nie pre obrovský počet apoptických buniek vytvorených počas embryonálneho vývinu. V štádiu embryonálneho vývinu sa prejavuje iba mierna expresia TAM receptorov. Samotný proces fagocytózy predstavuje pohltenie a spracovanie baktérií a mŕtvych buniek do membránových včkov nazývaných fagozómy. **(Obrázok 10)** Za fagocyt považujeme akúkoľvek bunku schopnú priameho pôsobenia, vrátane „profesionálnych“ fagocytov, ako sú makrofágy a dendrické bunky. Signálna transdukcia, ktorá sa spúšťa aktiváciou receptorov rodiny TAM, zohráva teda esenciálnu úlohu vo väčšine fagocytických clearance mechanizmov apoptických buniek.

¹² <http://guidedogsofthedesert.org/education.html> (naposledy navštívené 20.5.2014).

Stimulácia expresie TAM receptorov u myší nastáva iba po narodení, medzi prvým a druhým post-natálnym týždňom. Potom je expresia TAM receptorov počas celého života jedinca udržiavaná na vysokej úrovni. Plne diferencované tkanivá podliehajú fagocytóze sú predmetom neustálej remodelácie a obnovy. Rovnako je tomu aj v prípade spermatogenézy a rastu fotoreceptorov, ktorých remodelizačné procesy sú často vykonávané v cyklickom obeh, často cirkadiálnom (24-hodinový cyklus). Takáto forma remodelácie je pomenovaná pojmom „homeostatická fagocytóza“, ktorá je priamou súčasťou usporiadaných procesov tkanivovej rovnováhy. Pozoruhodným prípadom je každodenná generácia nových červených krviniek, kde počas posledného stupňa diferenciácie erytrocytov sú jadrá zrejúcich erytrocytov pohltené špeciálnymi makrofágmi kostnej drene. Odhaduje sa, že u ľudí je každý deň generovaných $2 \cdot 10^{11}$ nových červených krviniek.⁹

2.1.8. Ďalšie clearance mechanizmy

Chordáty a predstavovce, napr. *Ciona intestinalis*, majú priamo spojenú intracelulárnu kinázu a trans-membránovú doménu s Gla oblasťou. Tento zmiešaný proteín kombinuje TAM receptor a ligandové domény v jednej molekule, ktorá funguje ako priamy fosfatidylserínový receptor. Rozsiahlou analýzou sa zistili nové rozpoznávajúce („Find Me“) a pohlcujúce („Eat Me“) systémy apoptických buniek, z ktorých niektoré nezávisia od naviazania PS. Ide napr. o rodinu TIM proteínov (Tim-1, Tim-3 a Tim-4) a MFG-E8 spojovací proteín, ktorý viaže tieto TIM proteíny na fosfatidylserín.⁹

2.2. Vývoj vybraných TK inhibítorov

Signálne dráhy receptorov **rodiny TAM** sprostredkovávajú rôzne bunkové funkcie, vrátane **makrofágovej fagocytózy apoptických buniek, zhlukovania krvných doštičiek (aglutinácia) a prirodzeného likvidovania infikovaných a nádorových buniek**. TAM receptory sa označujú ako potenciálne onkologické ciele, vzhľadom k tomu, že **ich nadmerná expresia bola identifikovaná v mnohých typoch nádorov**.²

Zvýšená expresia a/alebo aktivita RTK je priamo zapojená v patogenéze vzniku ľudských nádorov, čo vedie k intenzívnemu záujmu o vývoj a testovanie inhibítorov tyrozín kináz, ako formy liečby rakoviny.¹³

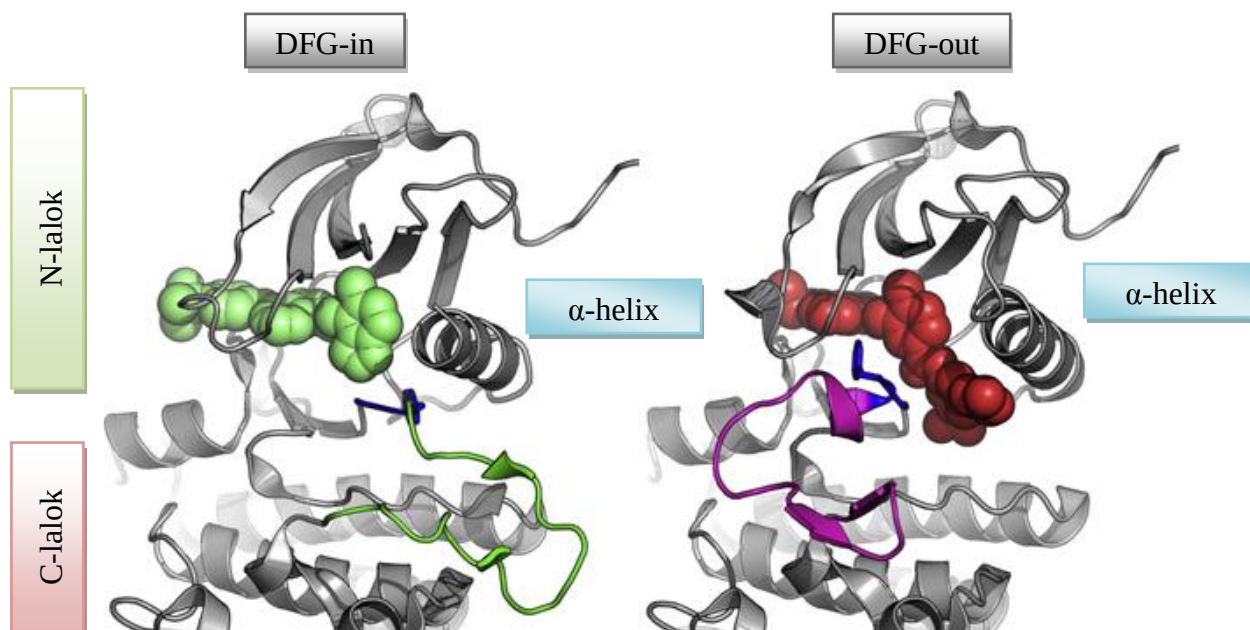
2.2.1. Všeobecná štruktúra tyrozín kináz a typy inhibítorov

Kinázy sú vo všeobecnosti enzýmy katalyzujúce fosforyláciu proteínov, pričom zdrojom fosfátu je ATP. Štrukturálne pozostávajú z menšieho N-koncového laloku s prevahou štruktúry β -skladaného listu, zo závesného regiónu a väčšieho C-koncového laloku s charakteristickými α -helixami. (**Obrázok 12**) Medzi jednotlivými lalokmi sa nachádza ATP väzbové miesto (v blízkosti závesného regiónu). Neaktívna konformácia kinázy sa nazýva aj DFG-out (podľa konzervovanej sekvencie AMKS: aspartát, fenylalanín, glycín), ktorá sa aktivuje, najčastejšie autofosforyláciou, na aktívnu DFG-in konformáciu. V tejto aktívnej konformácii sa aspartát (D) orientuje k ATP väzbovému miestu enzýmu, kde chelatuje Mg^{2+} ión. Fenylalanínový (F) zvyšok smeruje naopak von z aktívneho miesta pod α -helix tak, aby priestorovo nezavadzal.

ATP kompetitívne inhibítory, ktoré atakujú aktívnu formu kinázy (DFG-in konformáciu), označujeme ako inhibítory typu I, pre ktoré je charakteristická tvorba 1-3 vodíkových väzieb s aminokyselinovými zvyškami závesného regiónu a tvorba hydrofóbných interakcií v hydrofóbnom vrecku. Vysoko konzervatívna povaha ATP väzbovej oblasti v rámci kinómu má často za následok zlú kinázovú selektivitu, a s tým spojenú toxicitu inhibítorov typu I.¹³

Druhou skupinou kinázových inhibítorov, ktoré atakujú inaktívnu formu kinázy (DFG-out konformáciu), sú inhibítory typu II. Tieto inhibítory sa viažu aj do hydrofóbného vrecka sprístupneného konformačnou zmenou DFG motívu (ktorý je začiatkom aktivačnej slučky). Zmena polohy A-slučky (zatvorená konformácia bežne známa pri DFG-out kinázach) bráni naviazaniu ATP do väzbového miesta kinázy. Okrem hydrofóbných interakcií vytvára väčšina inhibítorov typu II aj 2 páry vodíkových väzieb. Jeden pár vytvára s AMKS závesnej oblasti (rovnako ako inhibítory typu I), druhý pár vodíkových väzieb vytvára s bočným reťazcom glutamátu a hlavným reťazcom aspartátu alosterického miesta.¹³

¹³ Suárez, R. M.; Chevot, F.; Cavagnino, A.; Saettel, N.; Radvanyi, F.; Piquel, S.; Bernard-Pierrot, I.; Stoven, V.; Legraverend, M. *Eur J Med Chem* **2013**, 61, 2-25.



Obrázok 12. DFG-in/DFG-out konformácia tyrozín kinázy. Aktivačné slučky (zelená, fialová), fenylalanín (modrá), ATP-kompetitívny inhibítor SRC-ABL typ I (zelená), ATP-kompetitívny inhibítor SRC-ABL typ II (červená).

2.2.2. Syntéza TK inhibítorov pre HGFR/TAM receptory

Existuje niekoľko známych inhibítorov, ktoré ovplyvňujú aktivitu receptorov TAM. **Sunitinib** predstavuje inhibítor typu I, ktorý inhibuje viaceré receptory TK, vrátane rodiny TAM. Aj napriek jeho nižšej špecificite bol administráciou FDA schválený pre liečbu rakoviny obličiek a žalúdočno-črevného väzivového tkaniva. **Vandetanib**, inhibítor schopný viazať všetky 3 receptory TAM, bol schválený pre liečbu rakoviny štítnej žľazy. Inhibítor s označením C-52 má slabú afinitu voči receptoru Mer, svojou štruktúrou však predstavuje vhodnú východiskovú zlúčeninu pre dizajn inhibítorov typu I. (Schéma 4) Nedávno patentovaný Diaminopyrimidín predstavuje špecifický inhibítor receptora Axl,¹³ Spiroindolín selektívny inhibítor receptora Tyro3.¹³

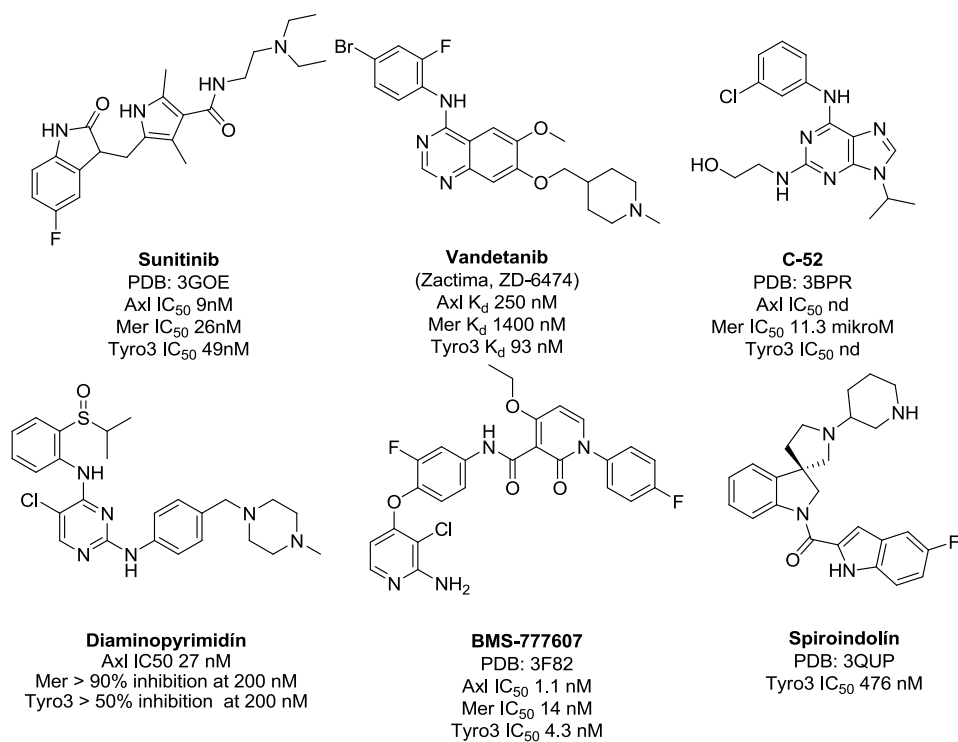
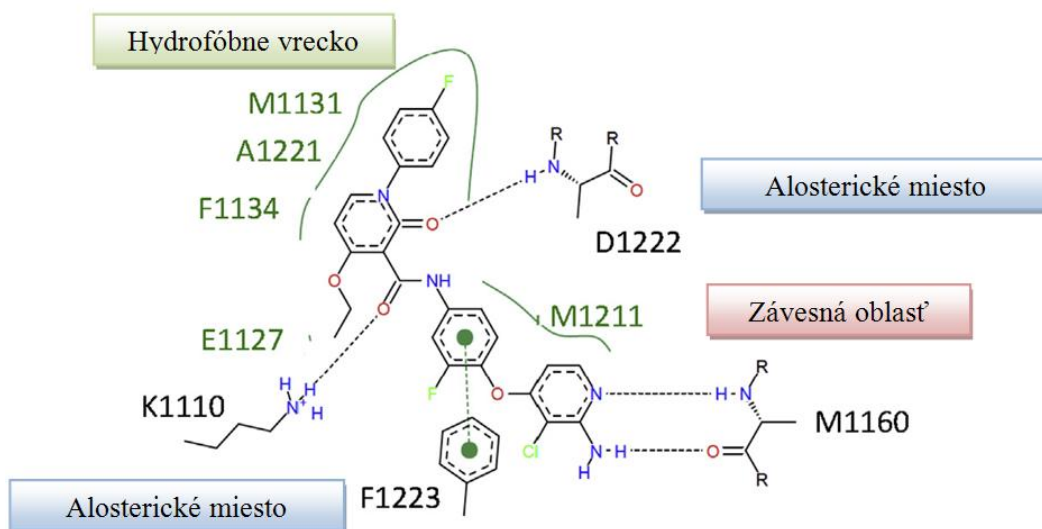


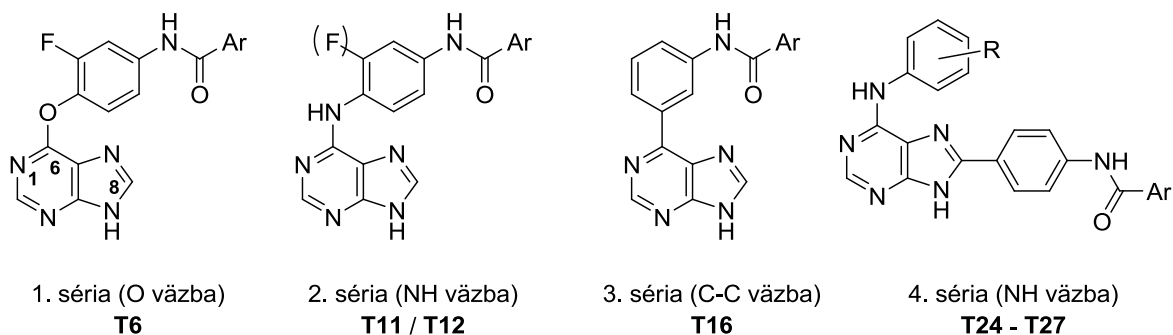
Schéma 4. Štruktúry a aktivity známych inhibítorov ovplyvňujúce aktivitu TAM receptorov.

Ako inšpiráciu pre vývoj nového inhibítora typu II tyrozín kinázy použil Suárez a jeho skupina zlúčeninu **BMS-777607**, ktorá sa do aktívneho miesta kinázy viaže cez viaceré interakcie charakteristické pre inhibítory typu II. Zlúčenina **BMS-777607** vytvára hydrofóbne interakcie s hydrofóbnym vreckom, pyridínový postranný reťazec zlúčeniny interaguje s alosterickým miestom, aminopyridínové jadro vytvára 2 vodíkové väzby so závesnou oblasťou a centrálné benzénové jadro vytvára π - π interakciu.¹³ (**Obrázok 13**)



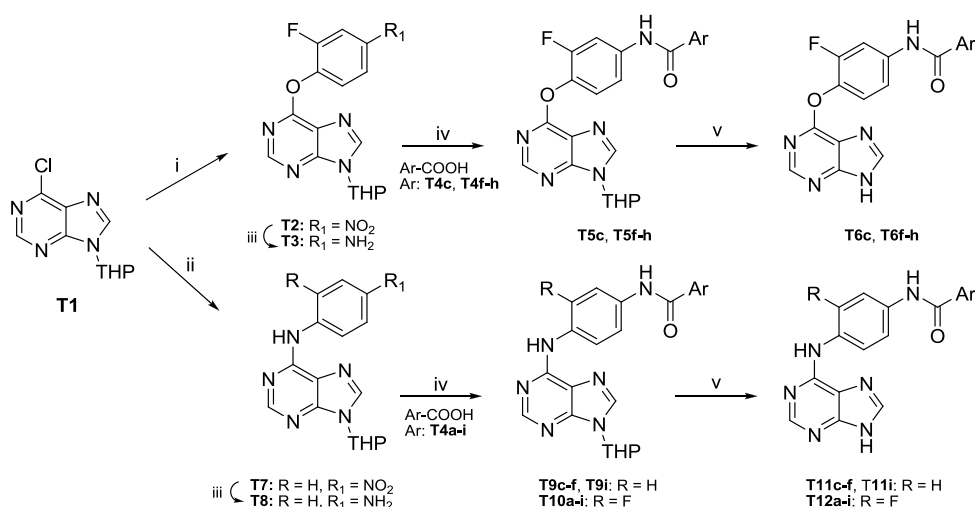
Obrázok 13. Štruktúra zlúčeniny **BMS-777607** a jeho interakcie s jednotlivými oblasťami enzýmu.

Suárez a kolegovia pripravili a testovali 4 série zlúčenín, ktoré sa líšia vo väzbe na 6. pozícii purínu. V prvej sérii je purínové jadro spojené so zvyškom štruktúry cez éterický mostík (zlúčenina **T6**), v druhej a štvrtej cez amínový mostík (zlúčeniny **T13/T14** a **T26-T29**) a v tretej sérii sú jadrá spojené napriamo (**T18**).¹³ (**Obrázok 14**)



Obrázok 14. Štyri základné série zlúčenín s rôznym typom väzby na 6. pozícii purínu.

Analógy **T6** a **T12** obsahujú v orto polohe na fenylovej časti štruktúry atóm fluóru, ktorého prítomnosť predošlé štúdie uznali za opodstatnenú pre interakcie s tyrozín kinázovými receptormi. (**Schéma 5**) Štvrtá séria inhibítorov je charakteristická analógmi **T24 - T27**, ktoré obsahujú v pozícii 6 na puríne aminoarylovú skupinu a v pozícii 8 majú viazaný aroylamid. (**Schéma 7**) Syntéza týchto analógov vychádzala z rôznych aromatických karboxylových kyselín a aminofenylpurínových medziproduktov, ktoré boli pripravené zo spoločného prekursoru 6-chloro-9-THP-purínu (**T1**).¹³



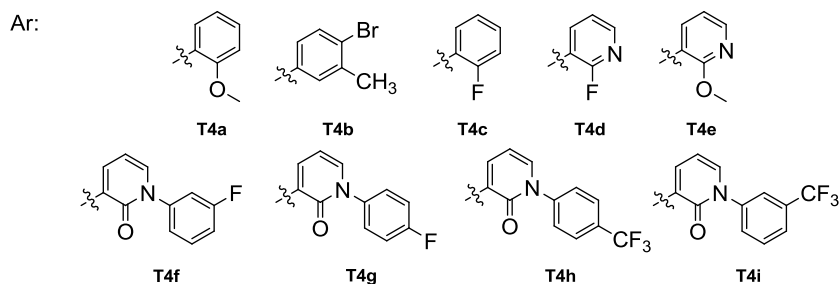


Schéma 5. Syntéza analógov **T6**, **T11** a **T12**. Reakčné podmienky: (i) 2-fluór-4-nitrofenol, K_2CO_3 , DMF, 100 °C, 12 h (58 %), ii) $Pd(OAc)_2$, X-fos, 4-nitroanilín alebo 2-fluóro-4-nitroanilín, t-BuOH/ H_2O , 110 °C, 15 h (91 alebo 94 %), iii) Fe prášok, NH_4Cl , EtOH/ H_2O , 90 °C, (65-89 %), 2 h, iv) karboxylová kyselina, HATU, CH_2Cl_2 , DIPEA, RT, 3 h (71-99 %), v) TFA, CH_3CN/H_2O , RT, 4 h (65-98 %).

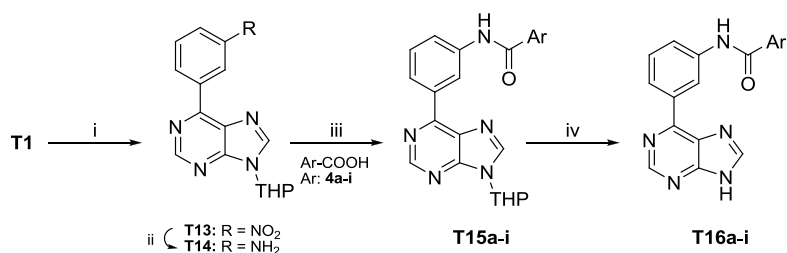


Schéma 6. Syntéza analógov **T16**. Reakčné podmienky: i) $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , 3-nitrofenyl borová kyselina, dioxán / H_2O , 100 °C, 15 h (73 %), ii) Fe prášok, NH_4Cl , EtOH/ H_2O , 90 °C, 2 h (65-89 %), iii) karboxylová kyselina, HATU, CH_2Cl_2 , DIPEA, RT, 3 h (71-99 %), v) TFA, CH_3CN/H_2O , RT, 4 h (65-98 %).

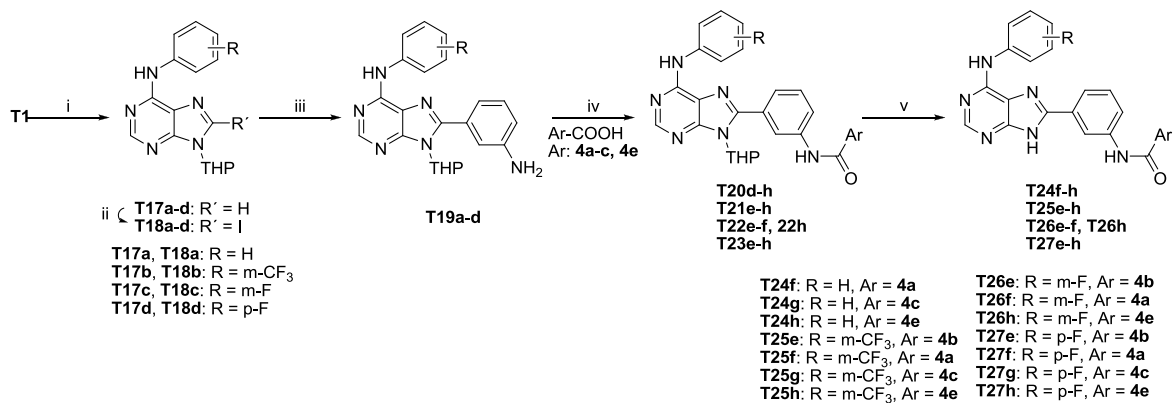
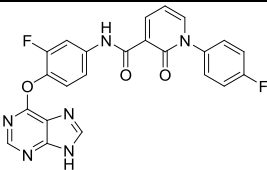
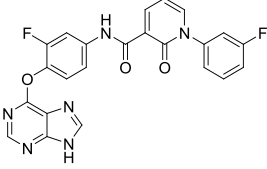
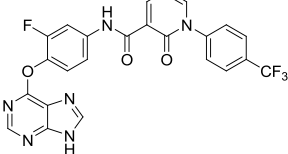


Schéma 7. Syntéza analógov **T24-T27**. Reakčné podmienky: i) $Pd(OAc)_2$, X-fos, t-BuOH/ H_2O , 100 °C, 1 min, potom (**T1**), anilínovú zlúčeninu, K_2CO_3 , 110 °C, 15 h, (84-97 %) ii) LDA, THF, -78 °C, 1 h, potom I_2 , -78 °C (48-84 %), iii) $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , dioxán/ H_2O /(1), 85 °C, 5 min, potom 3-aminofenylborová kyselina, 100 °C 3 h, (71-84 %) iv) HATU, DIPEA, CH_2Cl_2 , 0 °C do RT, 12 h, (29-92 %) v) TFA, CH_3CN/H_2O , RT, 3 h (39-99 %).

Pripravené deriváty boli testované voči 5 tyrozín kinázam, všetkým trom z rodiny TAM, ako aj Met (kvôli príbuznosti s TAM rodinou) a Abl1 (kvôli dostupnosti biologických testov pre aktívnu aj neaktívnu formu kinázy).

Analýzou inhibičných profilov chceli autori stanoviť selektivitu inhibítorov pre TAM rodinu receptorov. Dve formy receptora Abl1 použili na stanovenie typu inhibítora (I alebo II). Vysoká afinita inhibítora voči nefosforylovanej kináze (DFG-out) a nízka afinita voči fosforylovanej (DFG-in) kináze Abl1 bola dôkazom toho, že pripravené analógy sú inhibítory TK typu II. Takéto prejavy vykazovali deriváty **T6g** a **T6f**. Výsledky testov ukázali, že prítomnosť 3-fluórmetylovej skupiny v para polohe v zlúčeninách **T6h** a **T12h** silno znižuje inhibíciu nefosforylovaného Abl1 a Tyro3, zatiaľ čo rovnaká skupina v meta polohe **T12i** poskytuje silnú inhibíciu, rovnako ako ďalšie analógy: **T6g**, **T6f**, **T12f** a **T11f**. Analýza inhibičných aktivít v rámci rodiny receptorov TAM preukázala, že receptor Tyro3 je inhibovaný iba zlúčeninami **T6g**, **T6f** a **T6h**, ktoré majú v 6. polohe purínu éterový substituent. Derivát **T6c** neinhibuje receptory rodiny TAM, napriek tomu vykazuje vysokú selektivitu pre receptor Met TK. Pre najaktívnejšie inhibítory **T6g**, **T6f** a **T6h** kináz receptorov TAM boli stanovené percentuálne hodnoty disociačnej konštanty K_d . (**Tabuľka 4**) Zlúčeniny **T16a-i** zo série s C-C väzbou viazaných substituentov boli voči receptorom rodine TAM inaktívne.¹³

Tabuľka 3. Hodnoty afinity (%) najaktívnejších inhibítorov k TKs pri koncentráciách 1 a 75 μ M.

zlúčenina	štruktúra	Abl1		Abl1		Axl		Mer		Met		Tyro3	
		Typ II		Typ I									
		1	75	1	75	1	75	1	75	1	75	1	75
T6g		40	80	0	35	99	99	99	99	96	99	83	100
T6f		75	73	4	18	93	99	89	97	51	98	20	94
T6h		0	35	0	0	88	99	84	99	92	99	0	92

Typ I je fosforylovaná TK (DFG-in) a Typ II je TK nefosforylovaná (DFG-out).

Tabuľka 4. Hodnoty K_d (nM) pre najaktívnejšie inhibítory.

Kináza	T6g	T6f	T6h
Abl1 – nefosforylovaná	6 600	320	nd
Abl1 – fosforylovaná	40 000	3 300	nd
Axl	39	210	170
Mer	42	190	260
Met	65	440	150
Tyro3	200	900	2 900

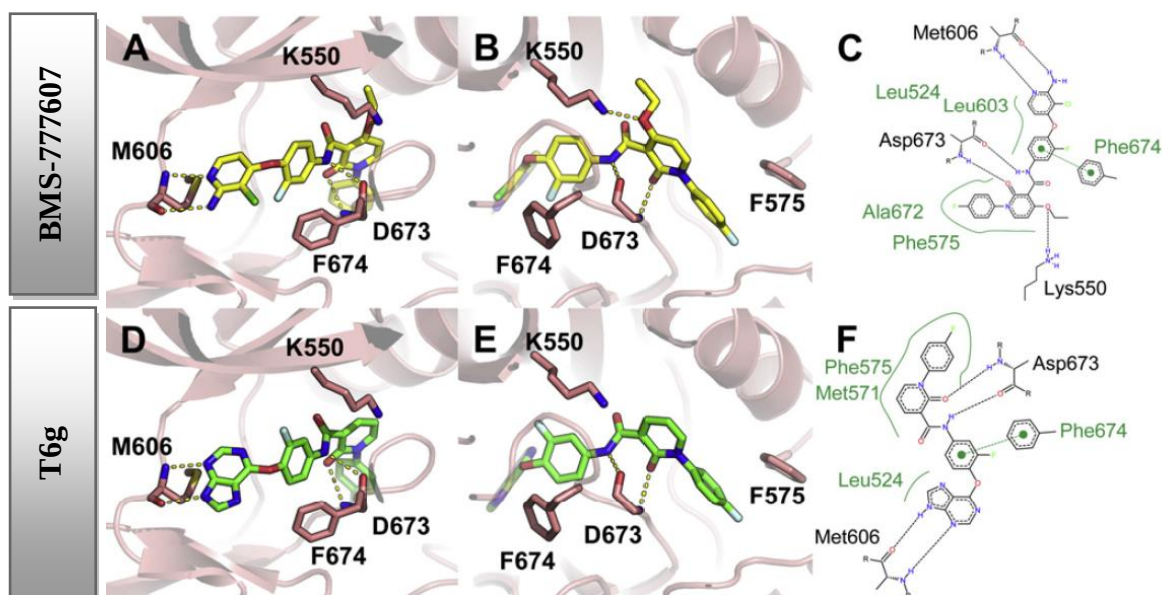
nd – nezistený

Aktivity inhibítorov **T6g**, **T6f** a **T6h** boli hodnotené voči štyrom ľudským tumorovým líniam: nádoru úst (KB), čreva (HT29), prsníka (MCF7), prostaty (PC3) a proti jednej netumorovej línii (obličky, Vero bunky). Pre všetky analógy nebola pri koncentrácii 10 μ M identifikovaná žiadna toxicita, rýchlosť rastu tumoru sa znížila menej ako 10 %.

Pre ďalšiu optimalizáciu navrhnutých inhibítorov a hlbšiu SAR interpretáciu použili kryštalovú štruktúru Met TK v komplexe s **BMS-777607** (PDB: 3F82), do ktorej dokovali zlúčeninu **T6g**. Obe štruktúry vytvárajú vodíkové väzby s M1160 a hydrofóbne interakcie s M1211. Okrem týchto interakcií charakteristických pre inhibítory typu I, zlúčeniny vytvárajú aj vodíkovú väzbu s D1222, „ π - π stacking“ interakciu s F1223, hydrofóbne interakcie v alosterickom mieste definované pomocou M1131, A1221, F1134, a vodíkovú väzbu s bočným reťazcom alosterického miesta K1110. (**Obrázok 15**)

Na základe komplexu 3F82 vytvorili homologický DFG-out model receptora Tyro3, do ktorého dokovali pôvodný inhibítor BMS-777607 z 3F82, pričom väzbový spôsob a interakcie zostali podobné, ako v štruktúre receptora Met. (**Obrázok 15**) V aktívnom mieste receptora Tyro3 vytvára inhibítor BMS-777607 vodíkové väzby s M606 a hydrofóbne interakcie s L524 a L603. Taktiež zostávajú zachované interakcie charakteristické pre inhibítory typu II. Ide o vodíkové väzby v alosterickom vrecku s D673, „ π - π stacking“ interakcia s F674 a hydrofóbne interakcie s F575 a A672. Interakcie pozorované medzi receptorom Tyro3 a inhibítorm **T6g** sú veľmi podobné interakciám, ktoré vytvára s receptorom Tyro3 inhibítorm **BMS-777607**. Inhibítorm **T6g** vytvára v aktívnom mieste receptora Tyro3 dve vodíkové väzby s M606 a hydrofóbne interakcie s L524. Vytvára tiež interakcie typické pre inhibítory typu II. Ide o interakcie

v alosterickom vrecku, tj. „ π - π stacking“ interakcia s F674, dve vodíkové väzby s D673 a hydrofóbne interakcie v alosterickom mieste s F575 a M571.¹³ (**Obrázok 15**)



Obrázok 15. DFG-out model receptora Tyro3 s naviazaným inhibítorom **BMS-777607** (PDB: 3F82) a inhibítorom **T6g**. ATP väzbové miesto receptora Tyro3 (panel A,D), detail na alosterické miesto receptora Tyro3 (B,E), interakčná mapa komplexov receptora Tyro3 s inhibítorom **BMS-777607** / **T6g** (C,F).

Potenciálne inhibítory DFG-out štruktúry receptora Tyro3 analyzovali dokovaním do modelu receptora Tyro3, pričom najlepšie skóre dosiahol analóg **T6g**. (**Tabuľka 5**) Najlepšou štruktúrou spomedzi všetkých štyroch sérií bol purínový derivát **T6g**, ktorý preukazuje zo všetkých derivátov najsilnejšiu a najselektívnejšiu inhibíciu TAM RTK. Najväčšiu inhibičnú aktivitu prejavuje voči receptorom Axl a Mer, o niečo menšiu voči testovanému Tyro3. Jeho TKs selektivitu dokazuje rádovo nižšia afinita k receptoru Abl1. Inhibítor **T6g** predstavuje inhibítor typu II, čo dokazuje viac než 30 krát väčšia afinita k nefosforylovanej kináze v porovnaní s fosforylovanou. Takýto inhibítor viaže DFG-out konformáciu kinázy, ktorá umožňuje prístup k hlbokému, menej konzervovanému hydrofóbnemu vrecku, čo predstavuje hlavný dôvod selektivity. Nízka cytotoxicita robí tento inhibítor vhodným kandidátom pre *in vivo* inhibíciu rastu nádorových buniek.¹³

Tabuľka 5. Hodnoty dokovacích skóre najaktívnejších analógov.

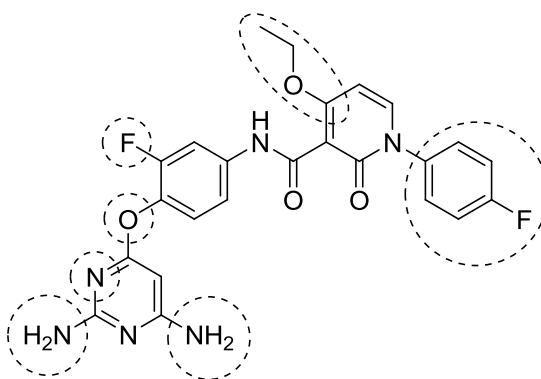
názov	dokovacie skóre
T6g	-133.6
BMS-777607	-130.1
T6f	-129.4
T6h	-121.0

Rovnako ako Suárezová skupina, aj skupina Traorého sa zaoberala syntézou aminopyrimidínových inhibítorov typu II vychádzajúc z **BMS-777607**, ktoré majú pôsobiť ako účinné a selektívne inhibítory tyrozín kináz receptorov Met a Tyro3 s cieľom liečby rakoviny močového mechúra. Vedcov motivoval fakt, že do dnešného dňa nie je na trhu schválený selektívny inhibítor tyrozín kináz rodiny HGFR/TAM. Ich cieľom bolo zavedenie substituentov zvyšujúcich selektivitu inhibítorov.¹⁴

Dôkazom, že molekuly kinázových inhibítorov môžu byť účinnými liekmi nádorových tkanív bolo schválenie Imatinibu pre liečbu chronickej myeloidnej leukémie (CML) a Erlotinibu pre liečbu rakoviny pľúc (NSCLC). Medzi terapeutické ciele rôznych typov nádorov patria aj receptory rodiny HGFR/TAM, pričom rodinu HGFR zastupuje receptor Met. Selektivita inhibítora je veľmi dôležitý aspekt pre jednotlivé onkogénne dráhy špecifických nádorov, na rozdiel od tradičných vysoko cytotoxických chemoterapeutík, ktoré nešpecificky zabíjajú všetky aktívne deliace sa bunky.¹⁴

Zlúčenina **BMS-777607** predstavuje inhibítor receptora Met TK. V súčasnej dobe sa nachádza v 2. fáze klinických štúdií, a zároveň predstavuje vhodnú východiskovú látku pre výskum selektívnych inhibítorov. (**Schéma 4**) Predošlé biochemické a dokovacie štúdie ukázali, že prítomnosť amidopyridónového systému a éterický typ väzby substituenta je smerodajný pre aktivitu takéhoto typu inhibítora. (**Obrázok 16**) Traoré chcel selektivitu inhibítorov docieľiť zmenou pyridínového skeletu za pyrimidínový, substitúciou terminálneho fenylu a prítomnosťou NH₂ skupín, ktoré majú slúžiť ako donorové skupiny vodíkových väzieb potrebných v proteín-ligandových interakciách.

¹⁴ Traoré, T.; Cavagnino, A.; Saettel, N.; Radvanyi, F.; Piguel, S.; Bernard-Pierrot, I.; Stoven, V. *Eur J Med Chem* **2013**, 70, 789-801.



Obrázok 16. Inhibitor **BMS-777607** so zakrúžkovanými návrhmi pre zvýšenie selektivity inhibítorov na TK receptory.

V práci sa autori zaoberali náhradou terminálneho p-fluórfenyly kvôli čomu pripravili deriváty **T30** nukleofilnou substitúciou 4,6-dichlopyrimidínu **T28** so 4-nitrofenolom. Následnou redukciou NO₂ skupiny získali intermediát **T29**. (**Schéma 8**)

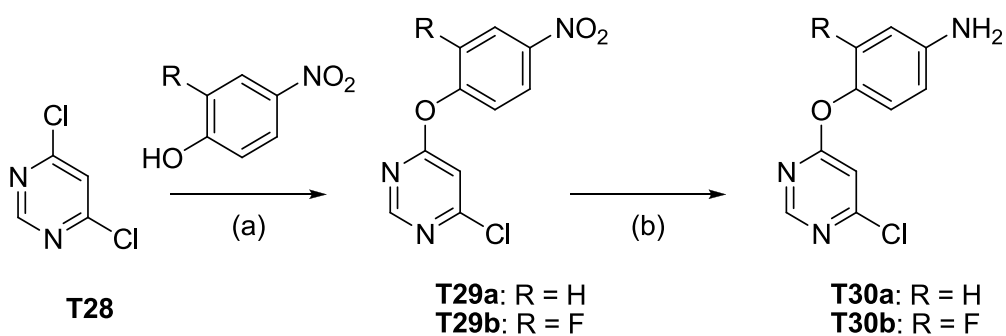


Schéma 8. Syntéza analógov **T30**. Činidlá a podmienky: (a) K₂CO₃, DMF, 80 °C, 3 h, 87 % (**T29a**), 93 % (**T29b**). (b) Raneyov Ni, H₂, MeOH, RT, 5 h, 47 % (**T30a**), 75 % (**T30b**).

Reakcia anilínov **T31a-e** s pyranónkarboxylátom poskytla fenyl-2-pyridónové estery **T32a-e**. Tie boli následne hydrolyzované na pyridónkarboxylové kyseliny **T33a-e**. (**Schéma 9**)

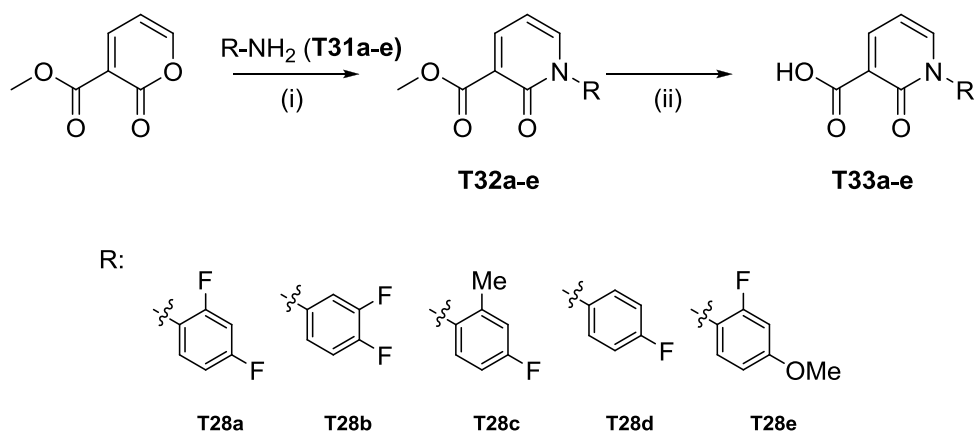


Schéma 9. Syntéza pyridónových karboxylových kyselín **T33a-e**. Činidlá a podmienky: (i) 1) DMF, 7 h, 0 °C 2), EDC, DMAP, 12 h, RT, výťažky: **T32a-e** (30, 34, 27, 52 a 21 %), (ii) LiOH, THF, 3 h, RT. výťažky: **T33a-e** (98, 96, 90, 96 a 92 %).

Reakcia zlúčeniny **T30b** s pyridónkarboxylovými kyselinami **T33a-e** viedla pri 0 °C k želanému 6-chlórpyrimidinovému derivátu **T34d** a pri teplote 60 °C k benzotriazolyl pyrimidínovým derivátom **T35a-e**, ktoré vznikli substitúciou chlóru za HOBt uvoľneného z TBTU. Ďalším krokom bola substitúcia chlóru p-metoxybenzylamínom, ktorá v zlúčenine **T34d** neprebehla a želané produkty **T36a-e**, **T38** a **T39** boli pripravené z HOBt analógov **T35a-e** využitím benzotriazolylu ako dobre odstupujúcej skupiny. Hydrolýza zlúčenín **T36a-e** s TFA viedla k aminoderivátom **T37a-e**.¹⁴ (**Schéma 10**)

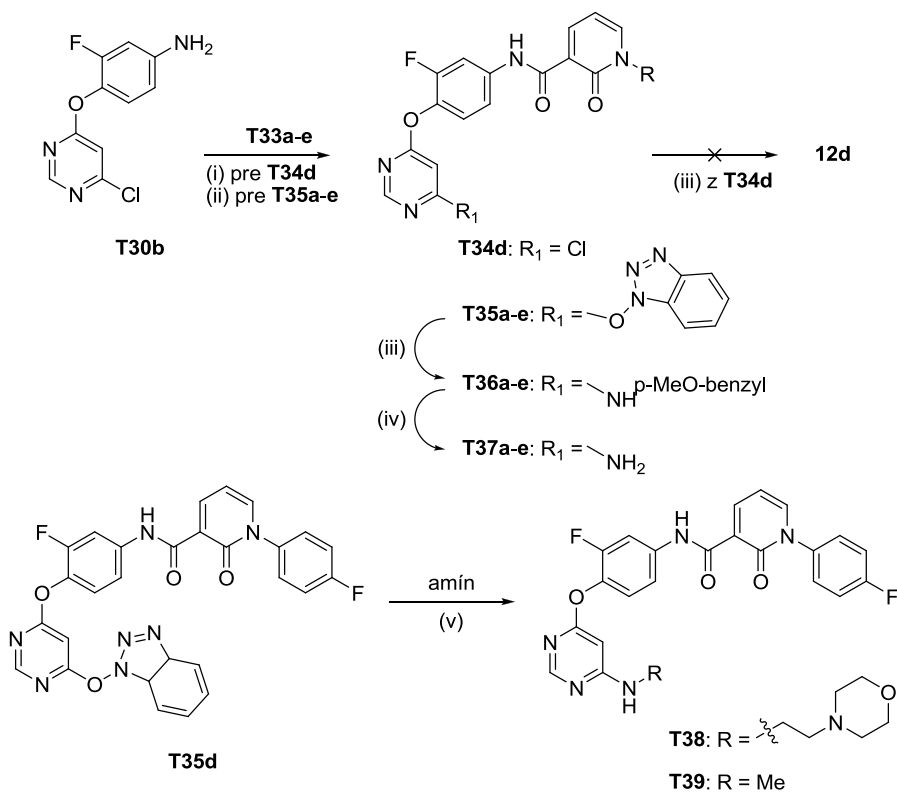


Schéma 10. Reakcia karboxylových kyselín **T33a-e** s anilínom **T30b** a syntéza **T34d**, **T35**, **T36**, **T37**, **T38** a **T39**. Činidlá a podmienky: (i) TBTU, DIPEA, DMF, 0 °C, 4 h; (ii) TBTU, DIPEA, DMF, 60 °C, 4 h, výtťažky: **T35a-e** (82, 82, 84, 88 a 84 %); (iii) p-MeO-benzylamín, Cs₂CO₃, DME, reflux, 6 h, výtťažky: **T36a-e** (85, 90, 77, 94, 83 %); (iv) TFA, DCM, reflux, 6 h, výtťažky: **T37a-e** (74, 55, 83, 68 a 91 %); (v) Cs₂CO₃, DME, reflux, 2 h, amín: 4-(2-aminoetyl)morfolín alebo metylamín, výtťažky 76 % (**T38**) a 55 % (**T39**).

Na preskúmanie vhodnej polohy NH₂ skupiny v pyrimidínoch boli syntetizované aminofenoxypyrimidíny **T43a,b** reakciou 2,4-dichlórpymidínu **T40** s 2-fluor-4-nitrofenolom, následnou substitúciou ďalšieho chlóru 4-metoxybenzylamínom za vzniku medziproduktov **T42a,b**, ktorých redukcia nitro skupiny viedla k analógom **T43a,b**. (**Schéma 11**)

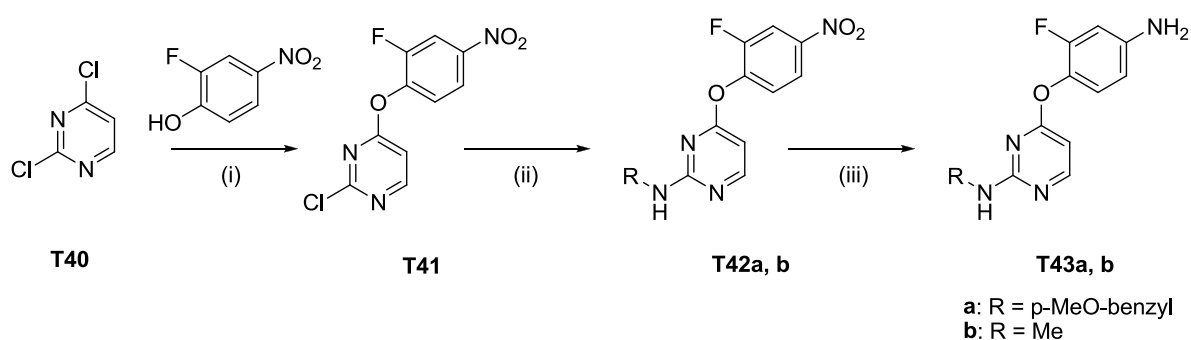


Schéma 11. Syntéza 4-amino-2-fluorfenoxypyrimidínových intermediátov **T43a** a **T43b**. Činidlá a podmienky: (i) K₂CO₃, DMF, 80 °C, 3 h. Výtťažky: 58 % (**T41**); (ii) K₂CO₃, DMF, 60 °C, 30 min, p-MeO-benzyl-NH₂. Výtťažky: 26 % (**T42a**) alebo MeNH₂, výtťažok: 16 % (**T42b**); (iii) Zn, NH₄Cl, MeOH/THF 1/1, RT, 1 h. Výtťažky: 96 % (**T43a**), 99 % (**T43b**).

Reakcia zlúčenín **T43a** a **T43b** s kyselinou **T33d** viedla k analógom **T44a** a **T44b**. Hydrolyzou **T44a** s kyselinou TFA autori pripravili 2-aminopyrimidínovú zlúčeninu **T45**, ktorá má v porovnaní s inhibítorom **BMS-777607** nahradený pyridínový kruh pyrimidínovým. (**Schéma 12**) Analóg **T47** bol pripravený na porovnanie s **T37d**, aby bolo možné vyhodnotiť dôležitosť orto substituovaného fluóru na fenylétere.¹⁴ (**Schéma 13**)

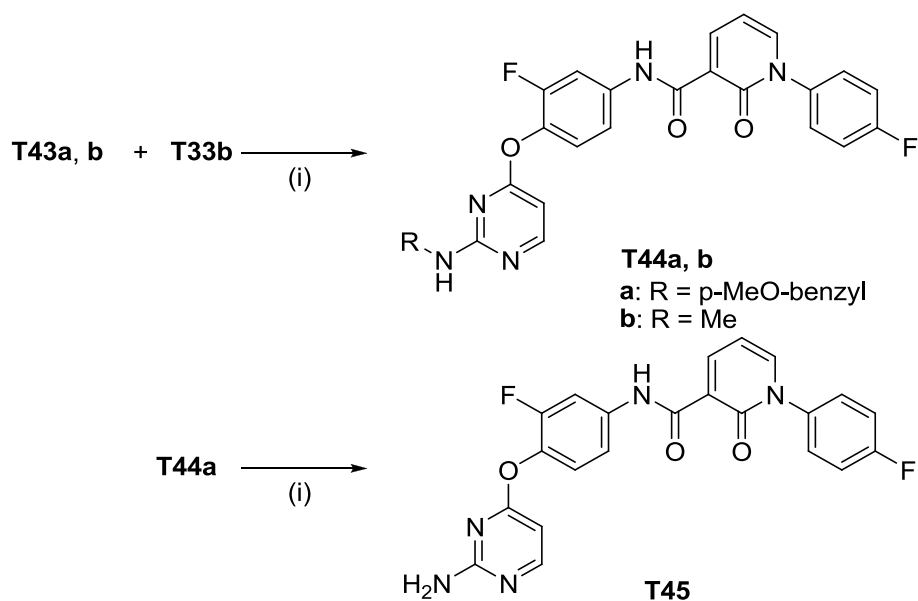


Schéma 12. Syntéza 2-amino derivátu **T45**. Činidlá a podmienky: (i) TBTU, DIPEA, DMF, 0 °C, 4 h. Výťažky: 85 % (**T44a**), 40 % (**T44b**); (ii) TFA, DCM, reflux, 12 h, Výťažok: 85 % (**T45**).

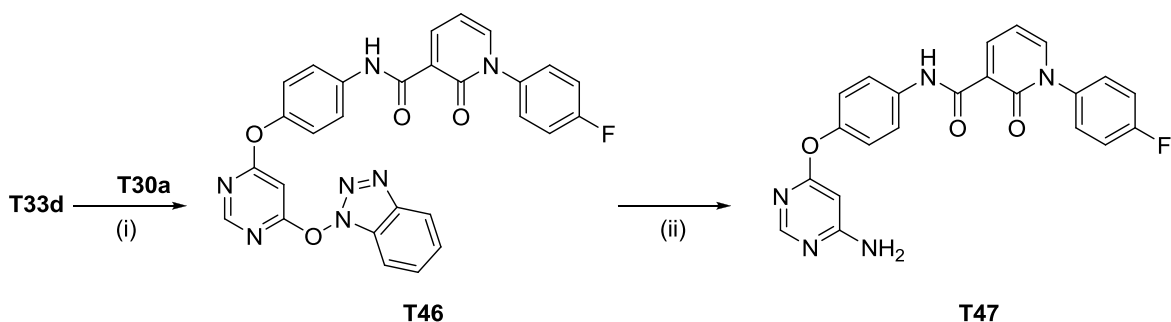


Schéma 13. Syntéza 6-aminopyrimidínového derivátu **T47**. Činidlá a podmienky: (i) TBTU, DIPEA, DMF, 0 °C, 4 h, potom 60 °C, 12 h. Výťažok: 72 % (**T46**); (ii) 1) p-MeOebenzyl-NH₂, DME, reflux, 6 h. 2) TFA, DCM, reflux, 12 h. Výťažok pre 2 kroky: 69 % (**T47**).

Prvé testy ukázali, že analógy **T34d**, **T35a-e**, **T36d**, **T37b**, **T37e**, **T39**, **T44a** a **T44b** sú pri testovaní do 50 μM inaktívne. Do ďalšieho kola optimalizácie bolo vybraných 6 zlúčenín **T37a**, **T37c**, **T37d**, **T38**, **T45** a **T47**, ktoré vykazujú aktivitu voči všetkým receptorom rodiny HGFR a TAM. (Tabuľka 6) Testy odhalili, že prítomnosť etoxy substituenta na pyridónovom kruhu v **BMS-777607** nie je pre inhibičnú aktivitu receptorov potrebná. Zlúčeniny **T37d** a **T45** majú veľmi podobné selektívne profily. Pri vysokej koncentrácii sú oba v porovnaní s **BMS-777607** menej aktívne voči receptorom Braf a EGFR, čo je dôkazom toho, že substitúcia pyridínového kruhu pyrimidínovým

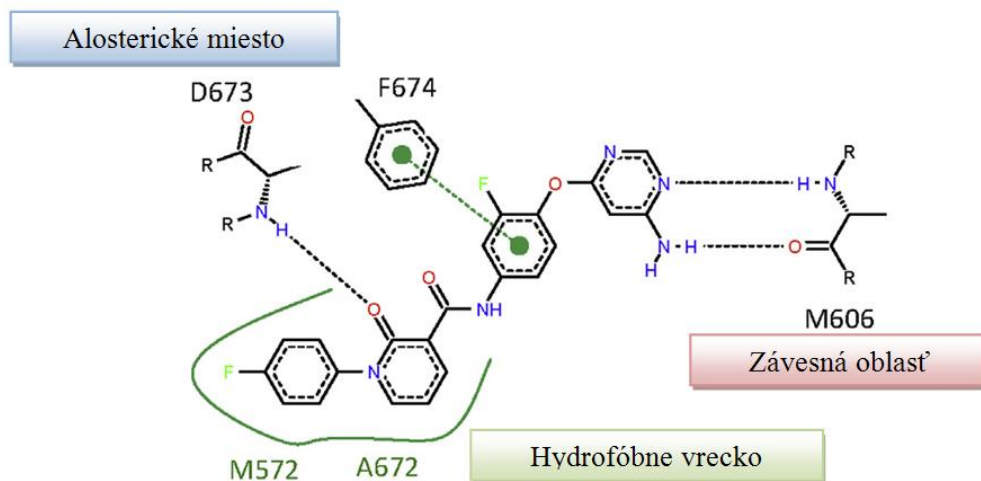
zvyšuje špecifitu inhibítorov voči receptorom rodiny HGFR a TAM. Zlúčeniny **T47** a **T37d**, ktoré sa od seba líšia prítomnosťou fluorového atómu na fenylovej skupine, majú veľmi podobné aktivity, čo naznačuje nevhodnosť tejto funkcionality. Zámena fluóru metoxy alebo CF₃ skupinou viedla k strate inhibičnej aktivity. Pridanie ďalšieho substituentu do polohy orto terminálneho fenylu (**T37a** –F, **T37c** –CH₃) nemá na účinnosť inhibítorov voči receptorom Axl a Met vplyv, ale aktivita voči Tyro3 a Mer bola zrušená. Pridanie rovnakých substituentov do polohy meta **T37b** vedie k úplnej strate aktivity voči receptoru Tyro3. Všetky zlúčeniny bez donorovej skupiny vodíkovej väzby **T35a**, **T34d** vrátane zlúčenín, ktoré nesú –NH skupinu **T36d**, **T39**, **T44a** a **T44b** na pyrimidínovom kruhu (namiesto NH₂ skupiny) sú neaktívne. Jedinou výnimkou je zlúčenina **T38**.¹⁴

Tabuľka 6. Hodnoty afinity (%) najaktívnejších analógov voči vybraným TKs pri koncentráciách 0.5 a 75 μM

zlúčenina	štruktúra	Tyro3	Axl	Mer	Met	Braf	EGFR
		0.5 75	0.5 75	0.5 75	0.5 75	0.5 75	0.5 75
T37c		48 100	93 100	53 99	99 99	0 29	4 19
T37d		77 100	97 100	89 83	98 98	4 21	5 14
T38		50 75	95 100	90 49	98 99	6 11	9 8
T45		41 81	85 100	73 100	95 97	0 0	0 9

Pre rozsiahlejšiu analýzu boli jednotlivé analógy dokované do Met proteínu z komplexu 3F82 (PDB) a homologickej DFG-out štruktúry Tyro3 TK. Všetky analógy s NH₂ skupinou vytvárali vodíkové väzby s M606. (**Obrázok 17**) Nižšia aktivita derivátov so substituovanou NH₂ skupinou bola vysvetlená obmedzením vodíkových väzieb v ATP

väzbovom mieste. Záměna F v para polohe terminálneho fenylu metoxy skupinou vedie k posunu dokovacej pozície, stratám hydrofóbných interakcií v alosterickom vrecku a následne k strate aktivity.¹⁴



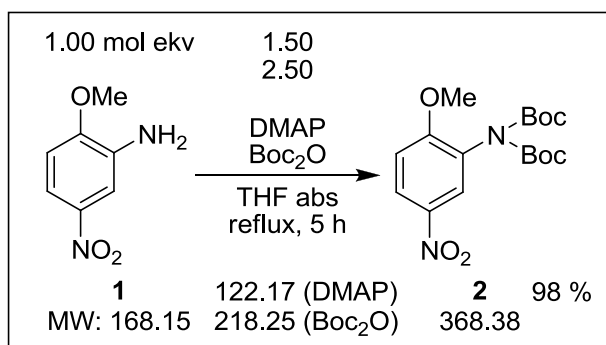
Obrázok 17. Proteín-ligandové interakcie medzi inhibítorom **T37d** a TK receptorom Tyro3.

Cieľom vedeckej práce Traorého skupiny bolo upraviť, pomocou pripravených analógov, selektivitu inhibítora **BMS-777607** voči receptoru Tyro3. Autori identifikovali analógy **T37c**, **T37d**, **T38** a **T45**, ktoré sú inaktívne voči všetkým iným kinázam, okrem kináz receptorov Axl a Met. Ďalším dôležitým zistením tejto štúdie bolo, že prítomnosť voľnej NH_2 skupiny je pre inhibíciu, nevyhnutná.¹⁴

3 Experimentálna časť

3.1. Syntéza potenciálneho inhibítora (7) VEGRF2 TK

3.1.1. Syntéza di-terc-butyl (2-metoxy-5-nitrofenyl) imidodikarbonátu (2)



Literatúra:¹⁵ Postup prevzatý z literatúry príbuznej VL aplikovaný na našom substráte **1**.

Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.59 mmol, 1.00 mol ekv) 2-metoxy-5-nitroanilínu (**1**) rozpusteného v 10 ml THF abs, sme pridali 109.0 mg (0.89 mmol, 1.50 mol ekv) **DMAP** a zmes sme refluxovali 1 h. Reakčnú zmes sme ochladili na RT, pridali 324.5 mg (1.49 mmol, 2.50 mol ekv) **Boc₂O** a opäť zahriali na reflux po dobu 4 h. Po ochladení zmesi na RT sme pridali 5 ml H₂O a upravili pH pridaním 2 ml 1 M roztoku HCl na pH = 4. Zmes sme extrahovali 3 x 20 ml EA, spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl, vysušili státím nad bezvodým Na₂SO₄, zmes prefiltrovali, filtrát zahustili na RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 215.0 mg (0.58 mmol, 98.1 %) produktu **2** vo forme žltej kryštalickej látky.

TLC (produkt 2): (SiO₂, H / EA (2 / 1), 1 x vyvolané), R_F = 0.63 (UV₂₅₄).

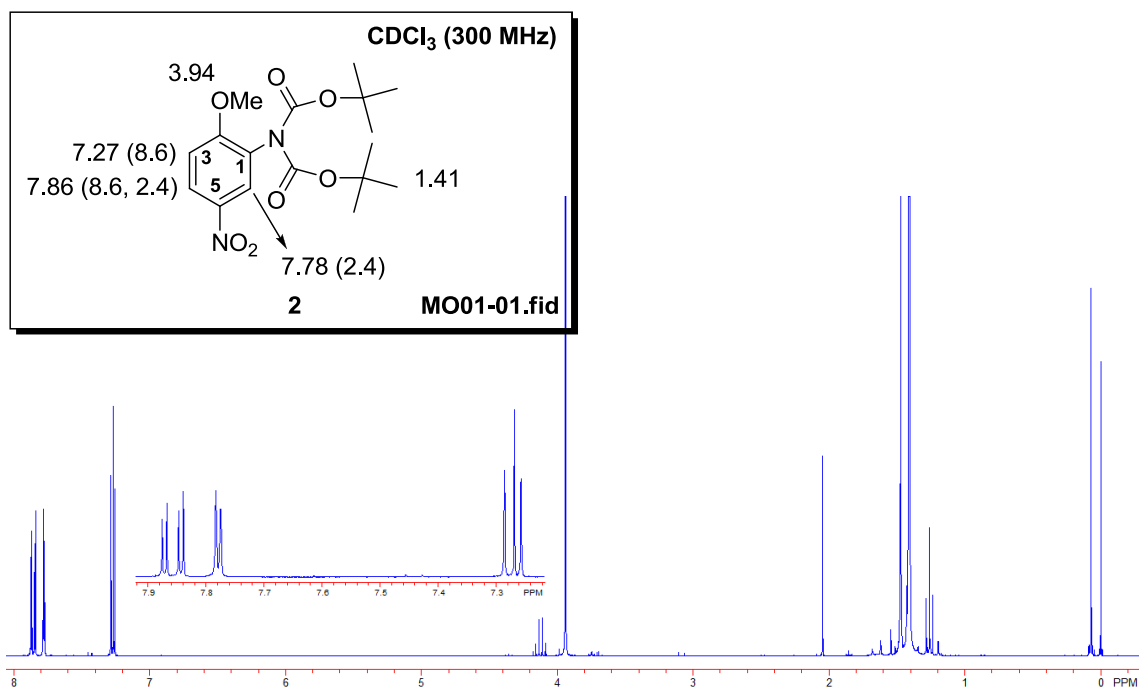
TLC (produkt 2.1): (SiO₂, H / EA (1 / 1), 1 x vyvolané), R_F = 0.19 (UV₂₅₄).

Poznámka: V niektorých prípadoch sme v surovej zmesi identifikovali aj vedľajší (monoBoc) produkt reakcie **2.1**. Po predĺžení reakčného času na 48 h sa produkt **2** rozpadáva.

¹⁵ Schnuerch, M.; Khan, A. F.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. *Eur J Org Chem* **2009**, 19, 3228-3236.

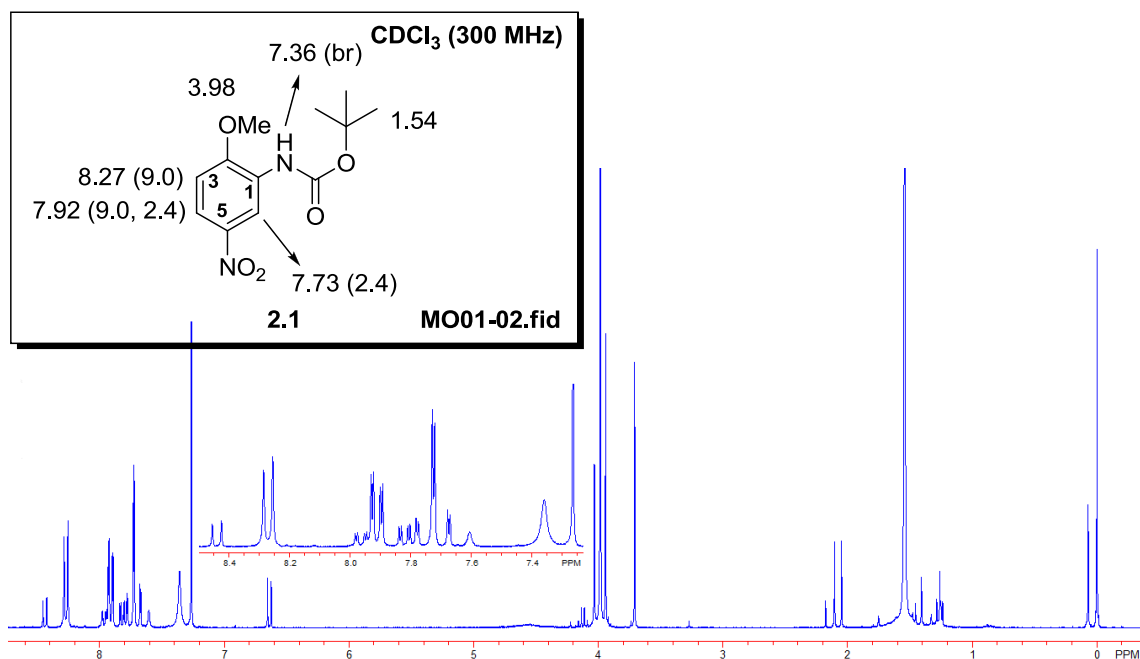
Zlúčenina 2 nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 115.1-119.8 °C [EA], žltá kryštalická látka.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, MO01-01.fid): δ 7.86 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, *J*(4,6) = 2.4 Hz, H-C(4)), 7.78 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.4 Hz, H-C(6)), 7.27 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 1.41 (s, 18H, (-COO^tBu)₂).

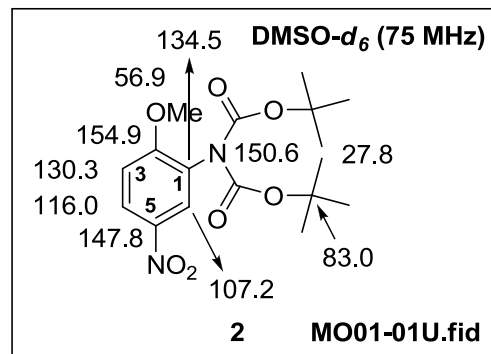
Posuny rozpúšťadiel: CHCl₃ (7.27), EA (4.12, 2.05, 1.26).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, MO01-02.fid): δ 8.27 (d, 1H, $J(3,4) = 9.0$ Hz, H-C(3)), 7.92 (dd, 1H, $J(3,4) = 9.0$ Hz, $J(4,6) = 2.4$ Hz, H-C(4)), 7.73 (d, 1H, $J(4,6) = 2.4$ Hz, H-C(6)), 7.36 (br s, 1H, -NHCOO-), 3.98 (s, 3H, -OCH₃), 1.54 (s, 9H, -COO^tBu).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: CHCl₃ (7.27), EA (4.12, 2.05, 1.26).

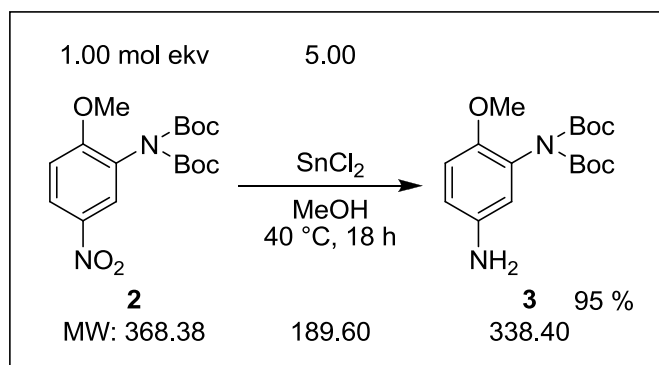
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, MO01-01U.fid): δ 154.9 (s, C(2)), 150.6 (2 x s, -NH-COO-), 147.8 (s, C(5)), 134.5 (s, C(1)), 130.3 (d, C(3)), 116.0 (d, C(4)), 107.2 (d, C(6)), 83.0 (2 x s, -OC(CH₃)₃), 56.9 (q, -OCH₃), 27.8 (6 x q, -OC(CH₃)₃).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3457 (m), 2973 (s), 1755 (s), 1593 (w), 1519 (m), 1280 (s), 1153 (s), 1025 (m), 870 (w), 802 (w).

MS (ESI+): 391.1 ([M+Na]⁺).

3.1.2. Syntéza di-terc-butyl (5-amino-2-metoxyfenyl) imidodikarbonátu (3)



Literatúra:¹⁶ Postup prevzatý z literatúry aplikovaný na náš substrát 2.

Experimentálny postup: Do roztoku 50.0 mg (0.14 mmol, 1.00 mol ekv) látky 2 rozpustenej v 5 ml MeOH sme pridali 128.7 mg (0.68 mmol, 5.00 mol ekv) SnCl₂ a zmes sme miešali 18 h pri teplote 40 °C. Po ochladení zmesi na RT sme upravili pH pridaním 5 ml 1 M roztoku NaHCO₃ na pH = 10. Zmes sme extrahovali 3 x 15 ml EA, spojené

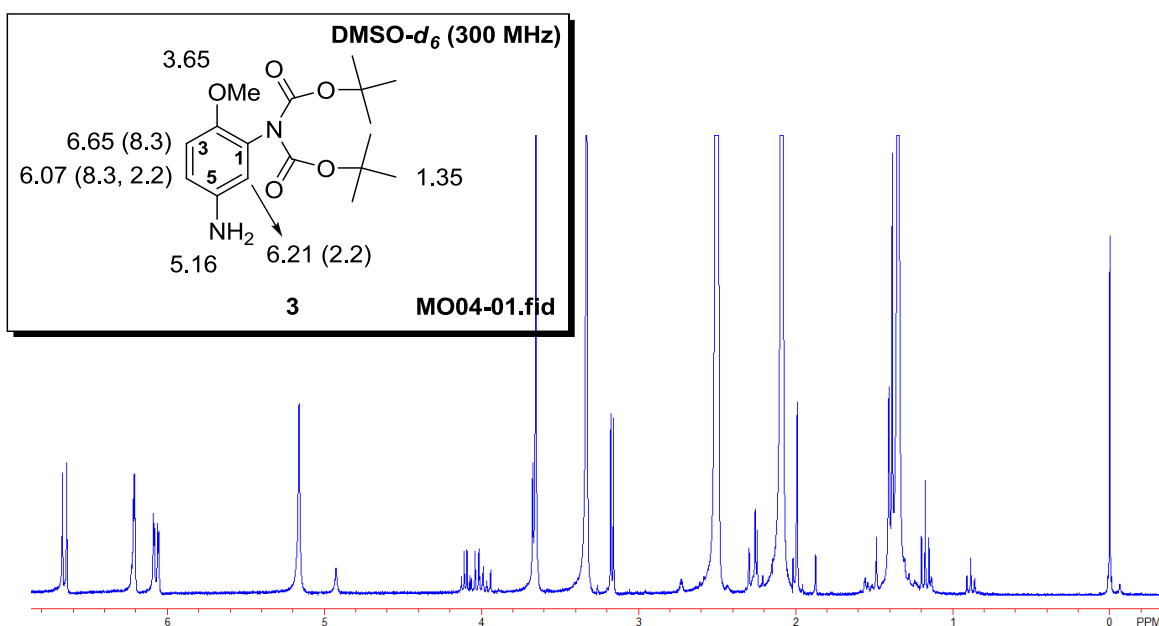
¹⁶ Satoh, T.; Mitsuo, N.; Nishiki, M.; Inoue, Y.; Ooi, Y. *Chem Pharm Bull* **1987**, 29, 1443-1445.

organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a vysušili nad bezvodým Na₂SO₄, zmes sme prefiltrovali, filtrát zahustili na RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 43.7 mg (0.13 mmol, 95.1 %) produktu **3** vo forme hnedého oleja, ktorý v chladničke poskytol hnedú tuhú látku.

TLC (produkt **3):** (SiO₂, H / EA (1 / 3), 1 x vyvolané), R_F = 0.70 (UV₂₅₄).

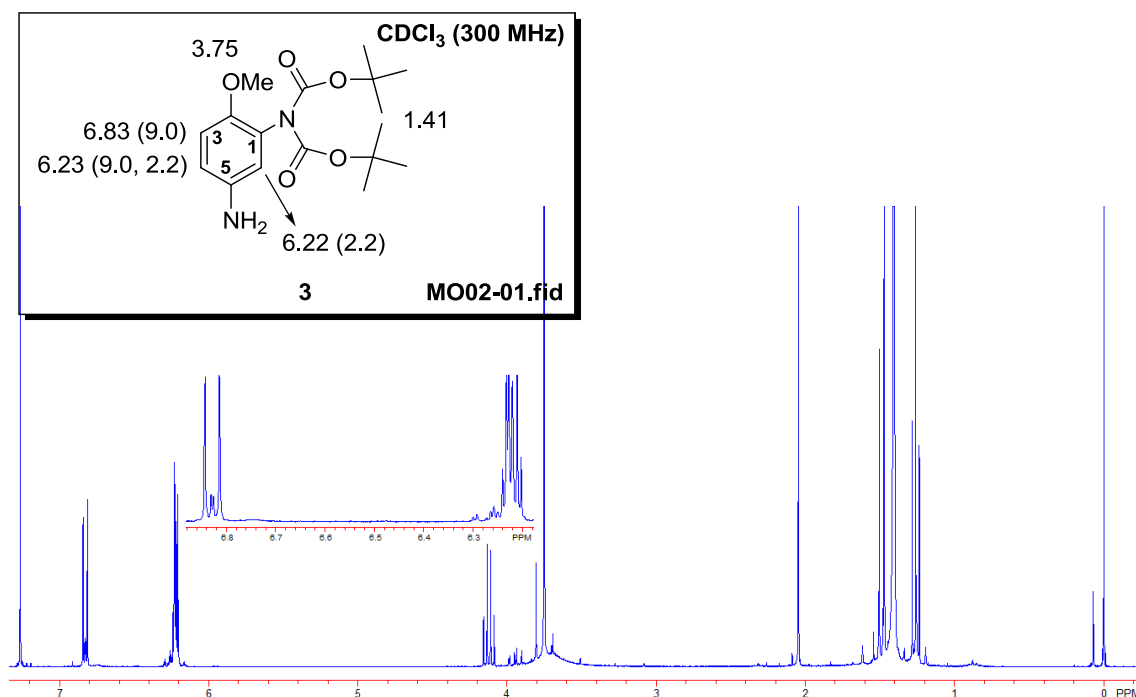
Zlúčenina **3** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 95.1-97.4 °C [EA], hnedá tuhá látka.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, MO04-01.fid): δ 6.65 (d, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, H-C(3)), 6.21 (d, 1H, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(6)), 6.07 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(4)), 5.16 (s, 2H, -NH₂), 3.65 (s, 3H, -OCH₃), 1.35 (s, 18H, (-COO^tBu)₂).

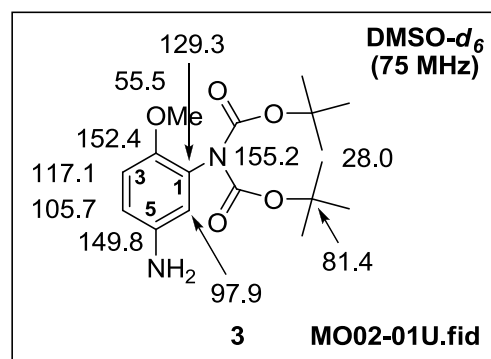
Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: EA (4.03, 1.99, 1.17), H₂O (3.33), MeOH (4.01, 3.17), DMSO (2.50), (CH₃)₂CO (2.09).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , MO02-01.fid): δ 6.83 (d, 1H, $J(3,4) = 9.0$ Hz, H-C(3)), 6.23 (dd, 1H, $J(3,4) = 9.0$ Hz, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(4)), 6.22 (d, 1H, $J(4,6) = 2.2$ Hz, H-C(6)), 3.75 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1.41 (s, 18H, $(-\text{COO}^t\text{Bu})_2$).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: CHCl_3 (7.26), EA (4.12, 2.05, 1.26).

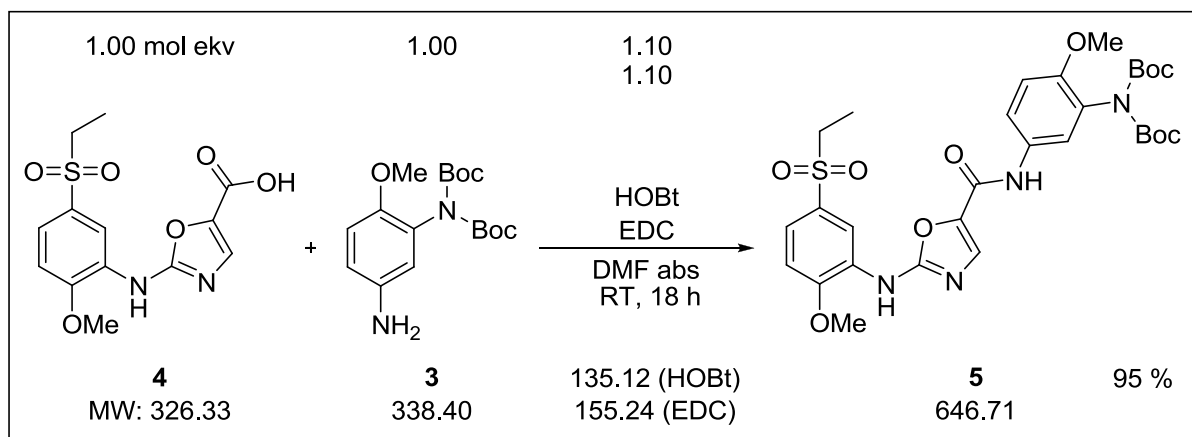
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, MO02-01U.fid): δ 155.2 (2 x s, $-\text{NCOO}-$), 152.4 (s, C(2)), 149.8 (s, C(5)), 129.3 (s, C(1)), 117.1 (d, C(3)), 105.7 (d, C(4)), 97.9 (d, C(6)), 81.4 (2 x s, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 55.5 (q, $-\text{OCH}_3$), 28.0 (6 x q, $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$).



FT IR (solid, cm^{-1}): 1741 (s), 1717 (s), 1619 (m), 1521 (m), 1433 (w), 1364 (m), 1213 (m), 1116 (s), 1035 (m), 877 (w).

MS (ESI+): 699.4 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$).

3.1.3. Syntéza N-[3-(di-terc-butyl imidodikarbonát)-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-karboxamidu (5)



Literatúra:¹⁷ Postup prevzatý z literatúry aplikovaný na náš substrát **4**.

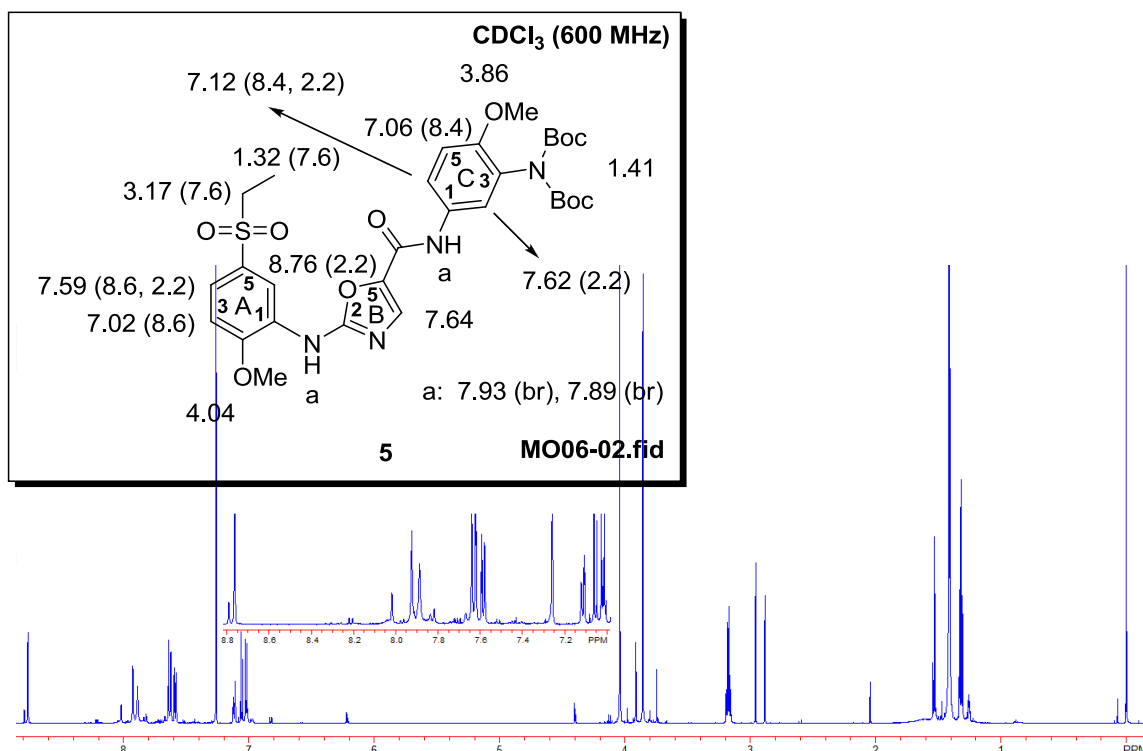
Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.31 mmol, 1.00 mol ekv) kyseliny **4** rozpustenej v 5 ml DMF sme pridali 103.7 mg (0.31 mmol, 1.00 mol ekv) anilínu **3**, 45.5 mg (0.34 mmol, 1.10 mol ekv) HOBT, 52.3 mg (0.34 mmol, 1.10 mol ekv) EDC a reakčnú zmes sme miešali 18 h pri RT. Prikvapkávaním 20 ml H₂O vypadla z roztoku kryštalická látka. Kryštály produktu sme prefiltrovali na Büchnerovom lieviku, premyli 20 ml H₂O, dosušili na vzduchu a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 189.0 mg (0.29 mmol, 95.4 %) produktu **5** vo forme bielo-hnedej kryštalickej látky.

TLC (produkt 5): (SiO₂, H / EA (1 / 2), 1 x vyvolané), R_F = 0.33 (UV₂₅₄).

Zlúčenina **5** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 163.7-166.2 °C [EA], bielo-hnedá kryštalická látka.

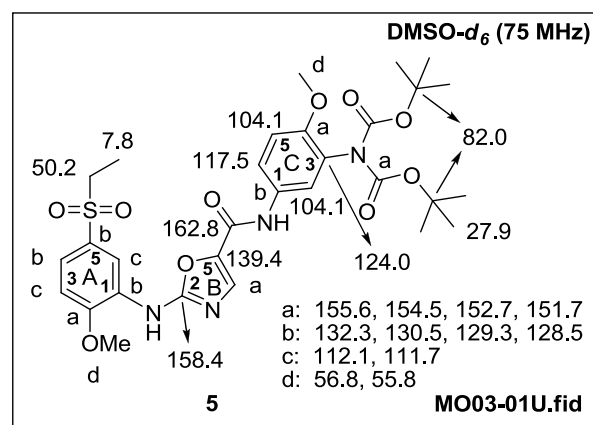
¹⁷ Kohda, K.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Kohara, A.; Ninomiya, S. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, 14, 3313-3317.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , MO06-02.fid): δ 8.76 (d, 1H, $J(\text{A}_2, \text{A}_6) = 2.2$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(6)$), 7.93 a 7.89 (2 x s, 2 x 1H, -NH- a -CONH-), 7.64 (s, 1H, H- $\text{C}_\text{B}(4)$), 7.62 (d, 1H, $J(\text{C}_2, \text{C}_6) = 2.2$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(2)$), 7.59 (dd, 1H, $J(\text{A}_3, \text{A}_4) = 8.6$ Hz, $J(\text{A}_4, \text{A}_6) = 2.2$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(4)$), 7.12 (dd, 1H, $J(\text{C}_5, \text{C}_6) = 8.4$ Hz, $J(\text{C}_2, \text{C}_6) = 2.2$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(6)$), 7.06 (d, 1H, $J(\text{C}_5, \text{C}_6) = 8.4$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(5)$), 7.02 (d, 1H, $J(\text{A}_5, \text{A}_6) = 8.6$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(3)$), 4.04 (s, 3H, $\text{C}_\text{A}(2)\text{-OCH}_3$), 3.86 (s, 3H, $\text{C}_\text{C}(4)\text{-OCH}_3$), 3.17 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.6$ Hz, $\text{-SO}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1.41 (s, 18H, $(\text{-COO}^t\text{Bu})_2$), 1.32 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.6$ Hz, $\text{-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: DMF (8.02, 2.96, 2.88), CHCl_3 (7.26), EA (4.12, 2.04, 1.26).

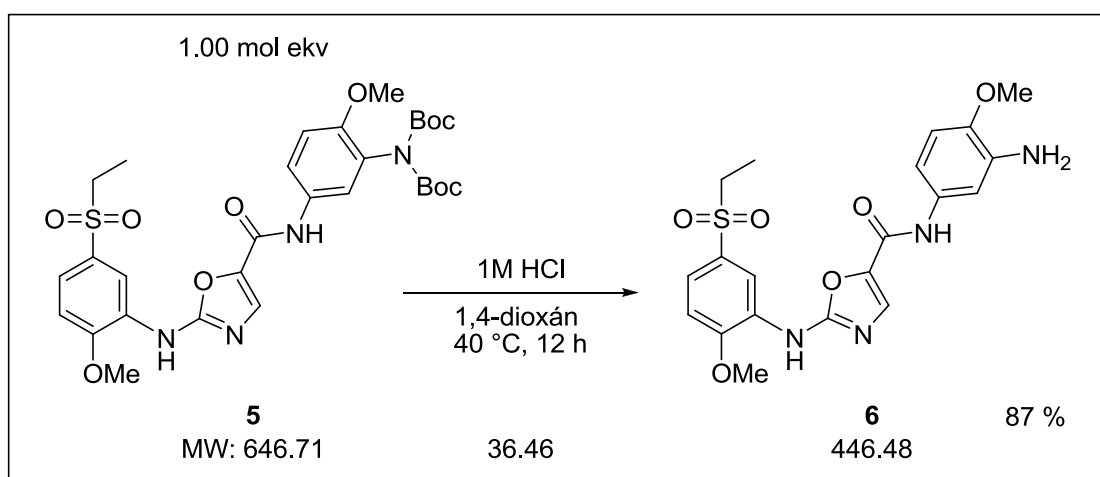
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, MO03-01U.fid): δ 162.8 (s, -CONH-), 158.4 (s, $\text{C}_\text{B}(2)$), 155.6 a 154.5 152.7 a 151.7 (3 x s, 1 x d, $\text{C}_\text{A}(2)$ a $\text{C}_\text{B}(4)$ a $\text{C}_\text{C}(4)$ a -NCOO, 139.4 (s, $\text{C}_\text{B}(5)$), 132.3 a 130.5 a 129.3 a 128.5 (3 x d 1 x s, $\text{C}_\text{A}(1)$ a $\text{C}_\text{A}(4)$ a $\text{C}_\text{A}(5)$ a $\text{C}_\text{C}(1)$), 124.0 (s, $\text{C}_\text{C}(3)$), 117.5 (s, $\text{C}_\text{C}(6)$), 112.1 a 111.7 (2 x d, $\text{C}_\text{A}(3)$ a $\text{C}_\text{A}(6)$), 104.1 (2 x d, $\text{C}_\text{C}(2)$ a $\text{C}_\text{C}(5)$), 80.2 (s, $\text{-OCC(CH}_3)_3$), 56.8 a 55.9 (2 x q, $\text{C}_\text{A}(2)\text{-OCH}_3$ a $\text{C}_\text{C}(4)\text{-OCH}_3$), 50.2 (t, $\text{-SO}_2\text{CH}_2\text{-}$), 27.9 (q, $\text{-C(CH}_3)_3$), 7.8 (q, $\text{-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3297 (m), 2980 (s), 2937 (m), 1699 (w), 1571 (m), 1514(m), 1454 (w), 1366 (w), 1265 (m), 1140 (s), 737 (w).

MS (ESI-): 645.2 ([M-H]⁻).

3.1.4. Syntéza N-[3-amino-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-oxazol-5-karboxamidu (6)



Literatúra:¹⁸ Postup prevzatý z literatúry upravený predĺžením reakčného času na 12h, zvýšením teploty na 40 °C a aplikovaným na náš substrát 5.

Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.15 mmol, 1.00 mol ekv) látky 5 rozpustenej v 5 ml dioxánu sme pridali 5 ml 1 M HCl a reakčnú zmes sme miešali 12 h pri 40 °C. Po prebehnutí reakcie sme pH upravili pridaním 5 ml nasýteného roztoku NaHCO₃ na pH = 10, zmes sme extrahovali 3 x 10 ml EA, spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a vysušili nad bezvodým Na₂SO₄. Zvyšok sme prefiltrovali, filtrát zahustili pomocou RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Surový produkt sme prečistili tritiráciou zo zmesi EA / Hex. Získali sme 60.0 mg (0.13 mmol, 86.9 %) produktu 6 vo forme bielej kryštalickej látky.

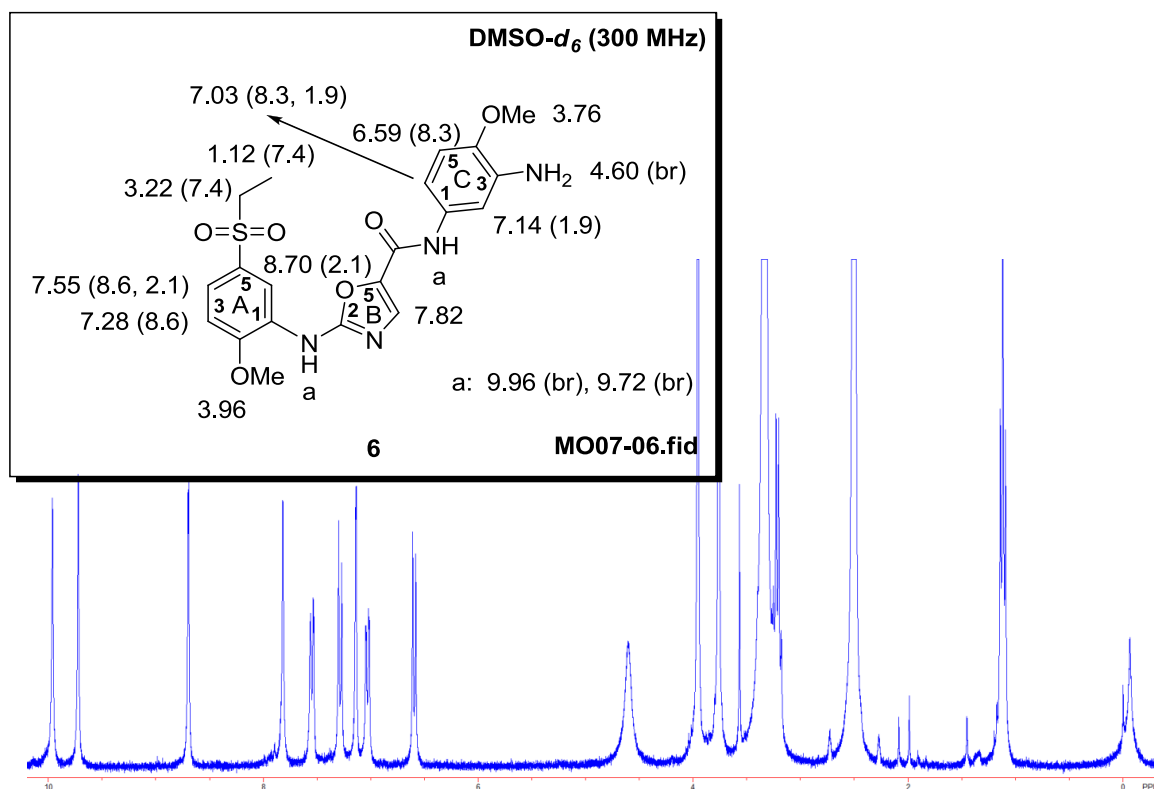
TLC (produkt 6): (SiO₂, EA, 2 x vyvolané), R_F = 0.45 (UV₂₅₄).

¹⁸ Hashimoto, Y.; Ishikawa, M.; Mita, Y.; Noguchi-Yachide, T.; Dodo, K. *Bioorg Med Chem* **2013**, 21, 993-1005.

Poznámka: Zvýšením teploty reakčnej zmesi na 50 °C sa produkt reakcie **6** rozpadával. S TFA pri 40 °C dochádza k odstráneniu len jednej Boc chrániacej skupiny.

Zlúčenina **6** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 208.7-211.4 °C [EA], biela kryštalická látka.



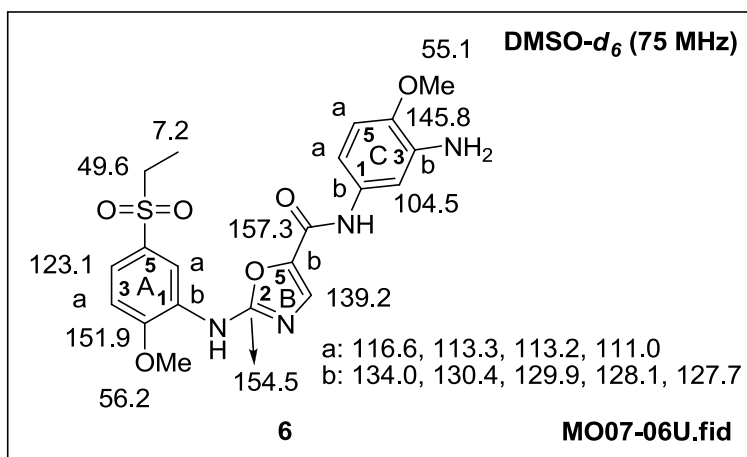
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, MO07-06.fid): δ 9.96 a 9.72 (2 x s, 2 x 1H, C_A(1)-NH-C_B(2) a -CONH-), 8.70 (d, 1H, *J*(A₄,A₆) = 2.1 Hz, H-C_A(6)), 7.82 (s, 1H, H-C_B(4)), 7.55 (dd, 1H, *J*(A₃,A₄) = 8.6 Hz, *J*(A₄,A₆) = 2.1 Hz, H-C_A(4)), 7.28 (d, 1H, *J*(A₃,A₄) = 8.6 Hz, H-C_A(3)), 7.14 (d, 1H, *J*(C₂,C₆) = 1.9 Hz, H-C_C(2)), 7.03 (dd, 1H, *J*(C₅,C₆) = 8.3 Hz, *J*(C₂,C₆) = 1.9 Hz, H-C_C(6)), 6.59 (d, 1H, *J*(C₅,C₆) = 8.3 Hz, H-C_C(5)), 4.60 (br s, 2H, -NH₂), 3.96 (s, 3H, C_A(2)-OCH₃), 3.76 (s, 3H, C_C(4)-OCH₃), 3.22 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, -SO₂CH₂-), 1.12 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, -SO₂CH₂CH₃).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: EA (4.03, 1.99, 1.17), EtOH (4.01, 3.17), H₂O (3.33), DMSO (2.50).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 ,

MO07-06U.fid): δ 157.3 (s, -CONH-), 154.5 (s, $\text{C}_\text{B}(2)$), 151.9 (s, $\text{C}_\text{A}(2)$), 145.8 (s, $\text{C}_\text{C}(4)$), 139.2 (d, $\text{C}_\text{B}(4)$), 134.0 a 130.4 a 129.9 a 128.1 a 127.7 (5x s, $\text{C}_\text{A}(1)$ a $\text{C}_\text{A}(5)$ a $\text{C}_\text{B}(5)$ a $\text{C}_\text{C}(1)$ a $\text{C}_\text{C}(3)$), 123.1 (d, $\text{C}_\text{A}(4)$), 116.6 a 113.3

a 113.2 a 111.0 (4x d, $\text{C}_\text{A}(3)$ a $\text{C}_\text{A}(6)$ a $\text{C}_\text{C}(5)$ a $\text{C}_\text{C}(6)$), 104.5 (d, $\text{C}_\text{C}(2)$), 56.2 (q, $\text{C}_\text{A}(2)$ -OCH₃), 55.1 (q, $\text{C}_\text{C}(4)$ -OCH₃), 49.6 (t, -SO₂CH₂-), 7.2 (q, -SO₂CH₂CH₃).

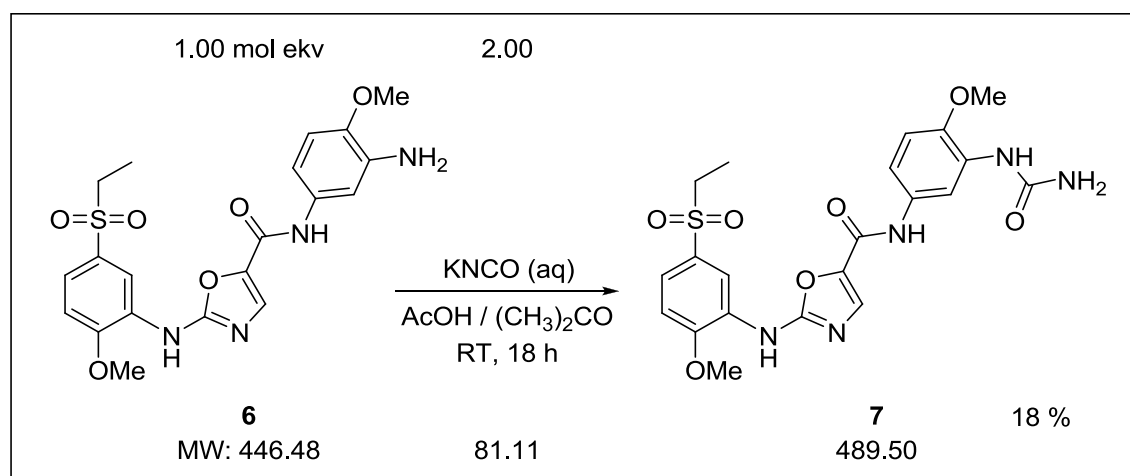


FT IR (solid, cm⁻¹): 3295 (s), 1605 (s), 1571 (s), 1514 (s), 1443 (w), 1422 (m), 1265 (m), 1121 (s), 1087 (w), 738 (w).

MS (ESI+): 447.1 ([M+H]⁺).

MS (ESI-): 445.1 ([M-H]⁻).

3.1.5. Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-metoxy-3-ureido-fenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)



Literatúra:¹⁹ Postup prevzatý z literatúry bol upravený pridaním acetónu kvôli zlej rozpustnosti a aplikovaný na náš substrát **6**.

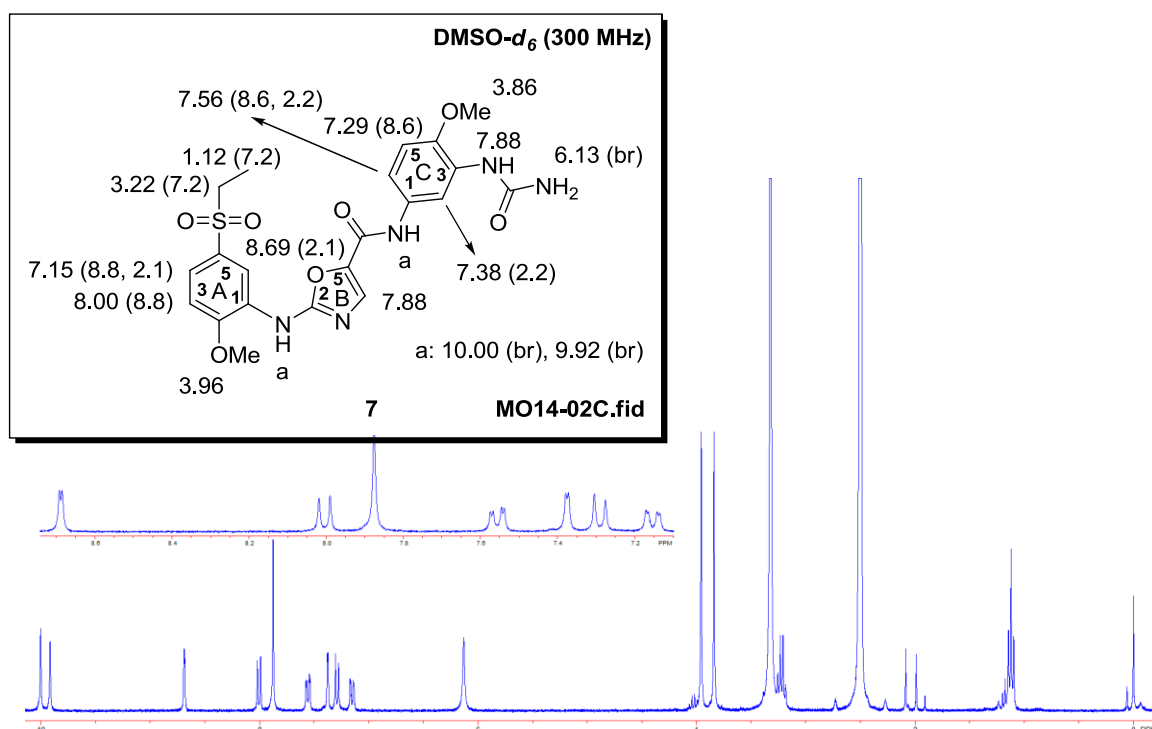
¹⁹ Laudien, R.; Mitzner, R. J. *Chem Soc* **2001**, *11*, 2226-2229.

Experimentálny postup: Do roztoku 100.0 mg (0.22 mmol, 1.00 mol ekv) N-[3-amino-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-karboxamidu **6** rozpusteného v 5 ml AcOH a v 5 ml (CH₃)₂CO, sme pri RT počas 18 h prikvapkávali roztok 36.3 mg (0.45 mmol, 2.00 mol ekv) KNCO v 10 ml H₂O. Pridaním 10 ml H₂O a neutralizáciou reakčnej zmesi s 20 ml 5 M NaOH, vypadla z roztoku zrazenina, ktorú sme prefiltrovali na Büchnerovom lieviku, premyli 20 ml H₂O, dosušili na vzduchu a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Surovú zmes sme prečistili pomocou FLC. Pomocou EA ako elučného činidla sme na kolóne oddelili acetamid **7.1** spolu s východiskovou látkou **6**. Produkt **7** bol získaný až po pridaní MeOH do elučnej zmesi (5 % MeOH / 95 % EA). Po prečistení zmesi sme získali 20.0 mg (0.04 mmol, 18.2 %) produktu **7** vo forme sivej kryštalickej látky.

TLC (produkt 7): (SiO₂, EA, 2 x vyvolané), R_F = 0.25 (UV₂₅₄).

Zlúčenina **7** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 205.2-206.9 °C [EA], sivá kryštalická látka.

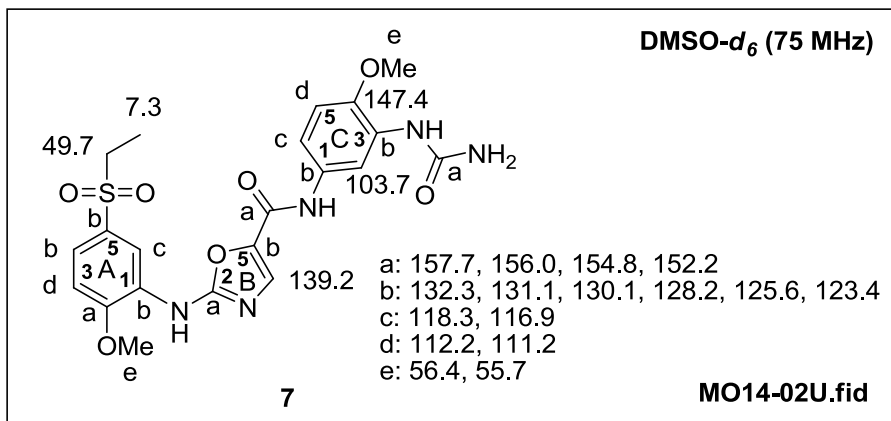


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, MO14-02C.fid): δ 10.00 a 9.92 (2 x s, 2 x 1H, C_A(1)-NH-C_B(2) a -CONH-), 8.69 (d, 1H, *J*(A₄,A₆) = 2.1 Hz, H-C_A(6)), 8.00 (d, 1H, *J*(A₃,A₄) = 8.8 Hz, H-C_A(3)), 7.88 a 7.88 (2 x s, 2 x 1H, H-C_B(4) a C_C(3)-NH-), 7.56 (dd, 1H, *J*(C₅,C₆) = 8.6 Hz, *J*(C₂,C₆) = 2.2 Hz, H-C_C(6)), 7.38 (d, 1H, *J*(C₂,C₆) = 2.2 Hz, H-C_C(2)), 7.29 (d,

^1H , $J(\text{C}_5, \text{C}_6) = 8.6 \text{ Hz}$, $\text{H}-\text{C}_\text{C}(5)$), 7.15 (dd, 1H , $J(\text{A}_3, \text{A}_4) = 8.8 \text{ Hz}$, $J(\text{A}_4, \text{A}_6) = 2.1 \text{ Hz}$, $\text{H}-\text{C}_\text{A}(4)$), 6.13 (br, 2H , $-\text{NH}_2$), 3.96 (s, 3H , $\text{C}_\text{A}(2)-\text{OCH}_3$), 3.86 (s, 3H , $\text{C}_\text{C}(4)-\text{OCH}_3$), 3.22 (q, 2H , $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.2 \text{ Hz}$, $-\text{SO}_2\text{CH}_2-$), 1.12 (t, 3H , $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.2 \text{ Hz}$, $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: EA (4.03, 1.99, 1.17), H_2O (3.33), DMF (7.95, 2.89, 2.73), DMSO (2.50), $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (2.09), AcOH (1.91).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , MO14-02U.fid): δ 157.7 a 156.0 a 154.8 a 152.2 (4x s, $\text{C}_\text{A}(2)$ a $\text{C}_\text{B}(2)$ a CONH- a $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), 147.4 (s, $\text{C}_\text{C}(4)$), 139.2 (d, $\text{C}_\text{B}(4)$), 132.3 a 131.1 a 130.1



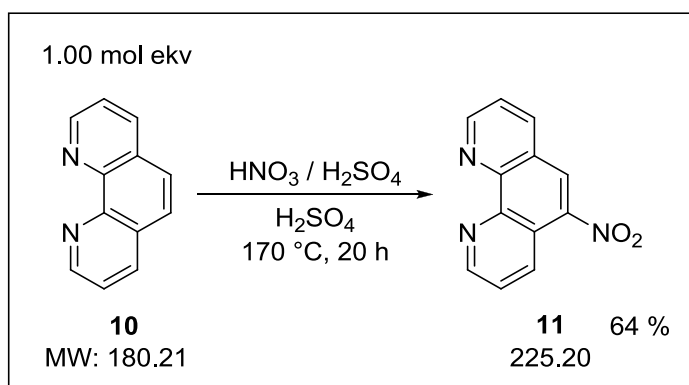
a 128.2 a 125.6 a 123.4 (6x s, $\text{C}_\text{A}(1)$ a $\text{C}_\text{A}(4)$ a $\text{C}_\text{A}(5)$ a $\text{C}_\text{B}(5)$ a $\text{C}_\text{C}(1)$ a $\text{C}_\text{C}(3)$), 118.3 a 116.9 (2x d, $\text{C}_\text{A}(6)$ a $\text{C}_\text{C}(6)$), 112.2 a 111.2 (2x d, $\text{C}_\text{A}(3)$, $\text{C}_\text{C}(5)$), 103.7 ($\text{C}_\text{C}(2)$), 56.4 a 55.7 (2x q, $\text{C}_\text{A}(2)-\text{OCH}_3$, $\text{C}_\text{C}(4)-\text{OCH}_3$), 49.7 (t, $-\text{SO}_2\text{CH}_2-$), 7.3 (q, $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

FT IR (solid, cm^{-1}): 3330.4 (s), 1608.7 (m), 1570.7 (m), 1515.8 (s), 1409.6 (w), 1265.5 (m), 1145.6 (m), 1123.6 (m), 1021.1 (w), 807.7 (w), 716.5 (w).

MS (ESI+): 490.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

MS (ESI-): 488.0 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

3.1.6. Syntéza 5-nitro-1, 10-fenantrolínu (11)



Literatúra:²⁰ Postup s rovnakým substrátom **10** uvedený v literatúre.

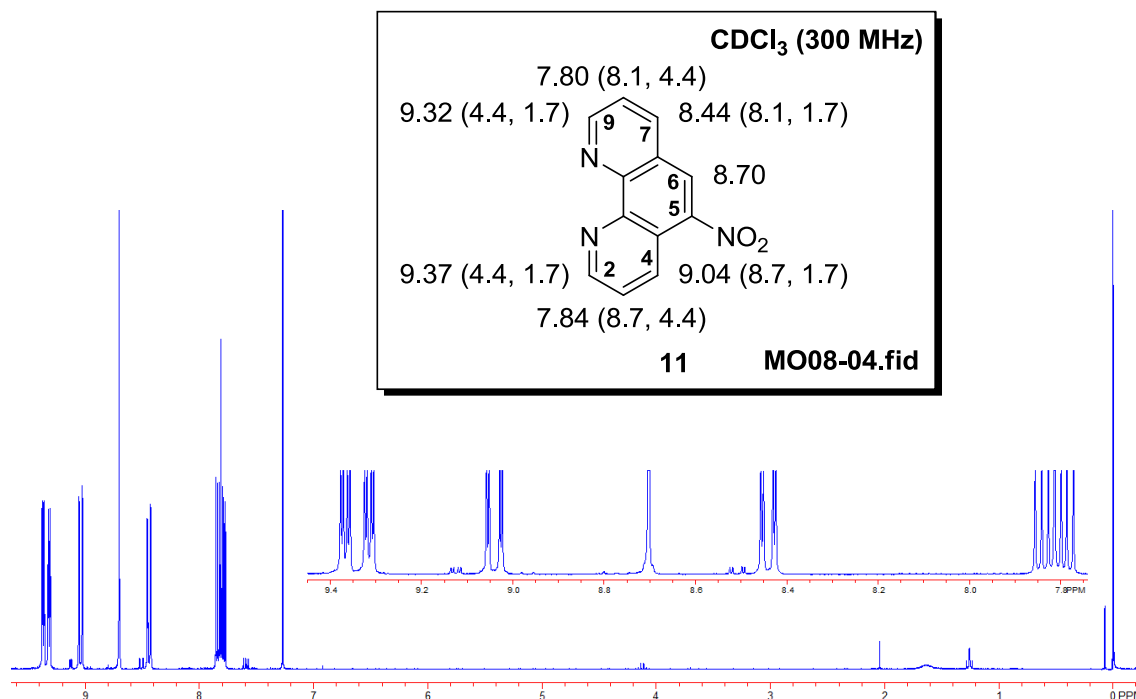
Experimentálny postup: Do roztoku 2.00 g (0.01 mol, 1.00 mol ekv) 1,10-fenantrolínu (**10**) rozpusteného v 20 ml 96 % H₂SO₄ sme za chladenia a miešania prikvapávali 50 ml nitračnej zmesi (96 % H₂SO₄ a 65 % HNO₃, 1/1). Reakčnú zmes sme refluxovali 20 h pri 170 °C. Reakčnú zmes sme za chladenia ľadom neutralizovali 10 M roztokom NaOH (150 ml) na pH = 8 a extrahovali 4 x 100 ml EA. Spojené organické fázy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a vysušili nad bezvodým Na₂SO₄, prefiltrovali, zahustili na RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 1.60 g (7.1 mmol, 64.0 %) produktu **11** vo forme žltej kryštalickej látky.

TLC (produkt **11**): (SiO₂, EA, 1 x vyvolané), R_F = 0.24 (UV₂₅₄).

Poznámka: Pri pH = 2 začne z roztoku kryštalizovať nerozpustný NaHSO₄.

Zlúčenina **11** je v literatúre kompletne spektrálne opísaná.

M.p.: 201.8-202.3 °C [EA], žltá kryštaliclá látka.

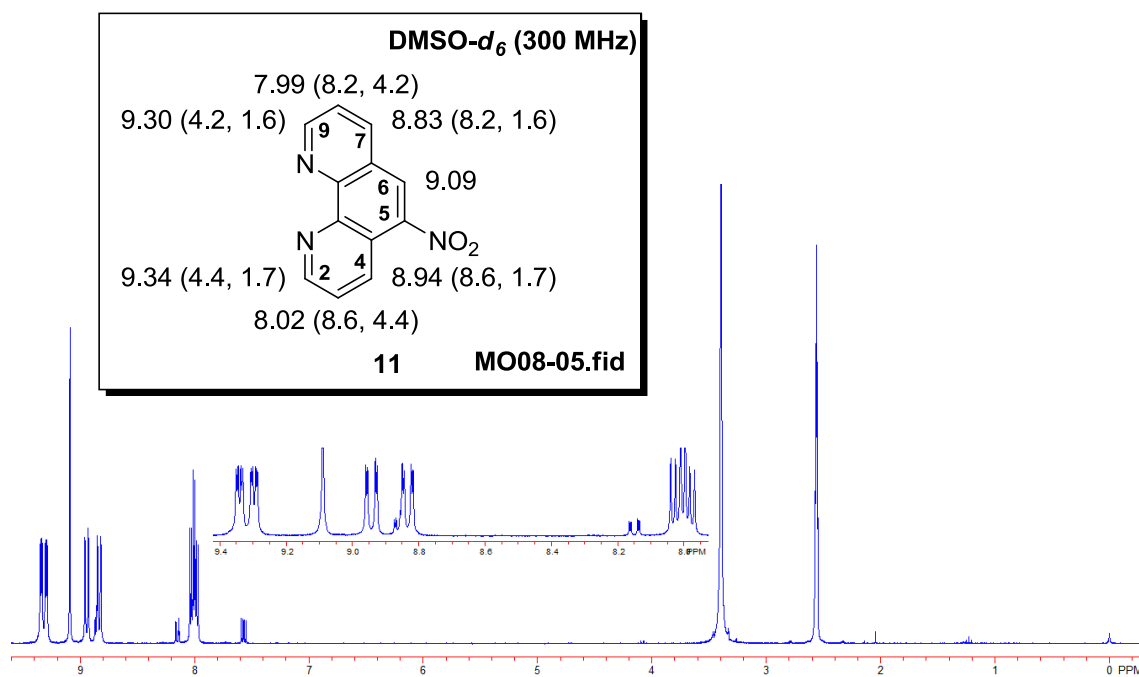


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, MO08-04.fid): δ 9.37 (dd, 1H, *J*(2,3) = 4.4 Hz, *J*(2,4) = 1.7 Hz, H-C(2)), 9.32 (dd, 1H, *J*(8,9) = 4.4 Hz, *J*(7,9) = 1.7 Hz, H-C(9)), 9.04 (dd, 1H, *J*(3,4) =

²⁰ Xu, C. *Monatsh Chem* **2010**, 141, 631-635.

8.7 Hz, $J(2,4) = 1.7$ Hz, H-C(4)), 8.70 (s, 1H, H-C(6)), 8.44 (dd, 1H, $J(7,8) = 8.1$ Hz, $J(7,9) = 1.7$ Hz, H-C(7)), 7.77 - 7.89 (m, 2H, H-C(3) a H-C(8)).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: CHCl_3 (7.27), EA (4.12, 2.05, 1.26), H_2O (1.64).



^1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , MO08-05.fid): δ 9.34 (dd, 1H, $J(2,3) = 4.4$ Hz, $J(2,4) = 1.7$ Hz, H-C(2)), 9.30 (dd, 1H, $J(8,9) = 4.2$ Hz, $J(7,9) = 1.6$ Hz, H-C(9)), 9.09 (s, 1H, H-C(6)), 8.94 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.6$ Hz, $J(2,4) = 1.7$ Hz, H-C(4)), 8.83 (dd, 1H, $J(7,8) = 8.2$ Hz, $J(7,9) = 1.6$ Hz, H-C(7)), 7.94 - 8.05 (m, 2H, H-C(3) a H-C(8)).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: EA (4.03, 1.99, 1.17), H_2O (3.33), DMSO (2.50), $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (2.09).

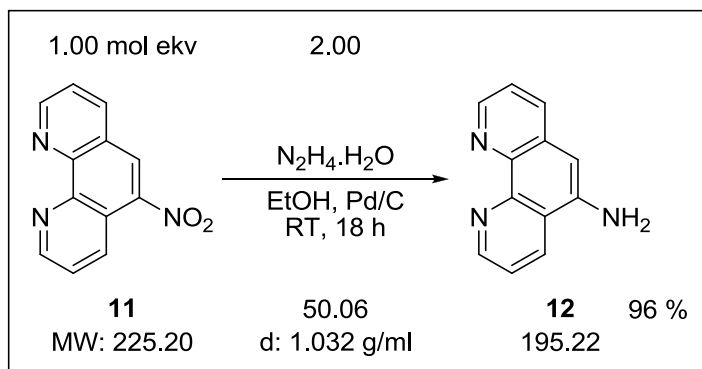
^{13}C -NMR:²¹

FT IR, MS:²²

²¹ Guo, H.; Ji, S.; Wu, W.; Wu, W. Zhao, J.; Ding, H.; Li, X.; Yuan, X.; Ding, H.; Gao, P.; Zhao, Ch. *Org Lett* **2010**, 12, 2876-2879.

²² Xu, C. *Monatsh Chem* **2010**, 141, 631-635.

3.1.7. Syntéza 1, 10-fenantrolín-5-amínu (12)



Literatúra:²³ Postup s rovnakým substrátom **11** uvedený v literatúre.

Experimentálny postup: Do roztoku 1.20 g (5.33 mmol, 1.00 mol ekv) nitrofenantrolínu (**11**) rozpusteného v 20 ml EtOH sme prikvapkali 517 μl (533.50 mg, 10.66 mmol, 5.00 mol ekv) $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Počas 3 h sme pri RT postupne pridávali 50.0 mg Pd/C a reakciu nechali prebiehať cez noc. Reakčnú zmes sme odfiltrovali cez krátky stĺpec silikagélu. Produkt **12** vykryštalizoval z roztoku po odfiltrovaní tuhých podielov z r. zmesi, vysušili sme ho na vzduchu a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV a získali 1.00 g (5.12 mmol, 96.1 %) produktu **12** vo forme žlto-hnedej kryštalickej látky.

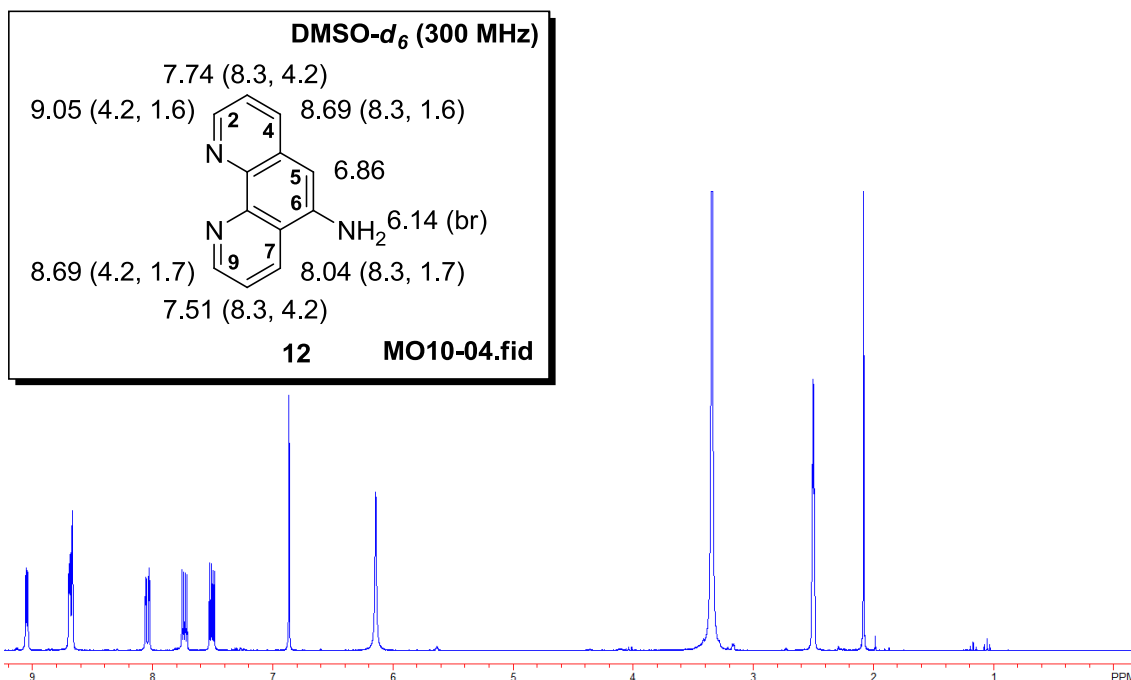
TLC (produkt 12): (reverzná C18 platňa, MeOH, 1 x vyvolané), $R_F = 0.55$ (UV_{254}).

Poznámka: Produkt reakcie **12** počas 24 hod státia samovoľne zmenil farbu na hnedo-čiernu bez zmeny kvality.

Zlúčenina **12** je v literatúre kompletne spektrálne opísaná.

M.p.: 244.8-246.5 °C [EtOH], hnedo-čierna kryštalická látka.

²³ Lee, S. J.; Bae, D. R.; Han, W. S.; Lee S. S.; Jung, J. H. *Eur J Inorg Chem* **2008**, 10, 1559-1564.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, MO10-04.fid): δ 9.05 (dd, 1H, $J(8,9) = 4.2$ Hz, $J(7,9) = 1.6$ Hz, H-C(9)), 8.69 (dd, 1H, $J(7,8) = 8.3$ Hz, $J(7,9) = 1.6$ Hz, H-C(7)), 8.69 (dd, $J(2,3) = 4.2$ Hz, $J(2,4) = 1.7$ Hz, H-C(2)), 8.04 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, $J(2,4) = 1.7$ Hz, H-C(4)), 7.74 (dd, 1H, $J(7,8) = 8.3$ Hz, $J(8,9) = 4.2$ Hz, H-C(8)), 7.51 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, $J(2,3) = 4.2$ Hz, H-C(3)), 6.86 (s, 1H, H-C(6)), 6.14 (br s, 2H, -NH₂).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: EA (4.03, 1.99, 1.17), H₂O (3.33), DMSO (2.50), (CH₃)₂CO (2.09).

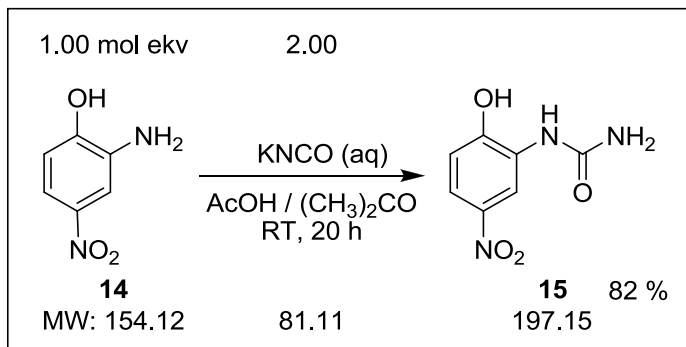
¹³C-NMR, FT IR:²⁴

MS:²⁵

²⁴ Garcia-Fresnadillo, D.; Orellana, G. *Helv Chim Acta* **2001**, *84*, 2708-2730.

²⁵ Lee, S. J.; Bae, D. R.; Han, W. S.; Lee S. S.; Jung, J. H. *Eur J Inorg Chem* **2008**, *10*, 1559-1564.

3.1.8. Syntéza 1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)močoviny (15)



Literatúra:²⁶ Reakčné podmienky z literatúry boli upravené predĺžením reakčného času, pridaním acetónu a aplikované na náš substrát **14**.

Experimentálny postup: Do roztoku 2.00 g (12.98 mmol, 1.00 mol ekv) 2-amino-4-nitrofenolu (**14**) rozpusteného v 20 ml AcOH a 20 ml (CH₃)₂CO sme počas 20 h pri RT prikvapávali roztok 2.10 g KNCO (25.95 mmol, 2.00 mol ekv) v 20 ml H₂O. Počas reakcie vykryštalizovala látka, ktorú sme prefiltrovali na Büchnerovom lieviku, premyli 20 ml H₂O, dosušili na vzduchu a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 2.10 g (10.65 mmol, 82.1 %) zmesi produktu **15** a N-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)acetamidu v 6 % zastúpení. Zmes sme bez ďalšieho čistenia použili v nasledujúcom syntetickom kroku.

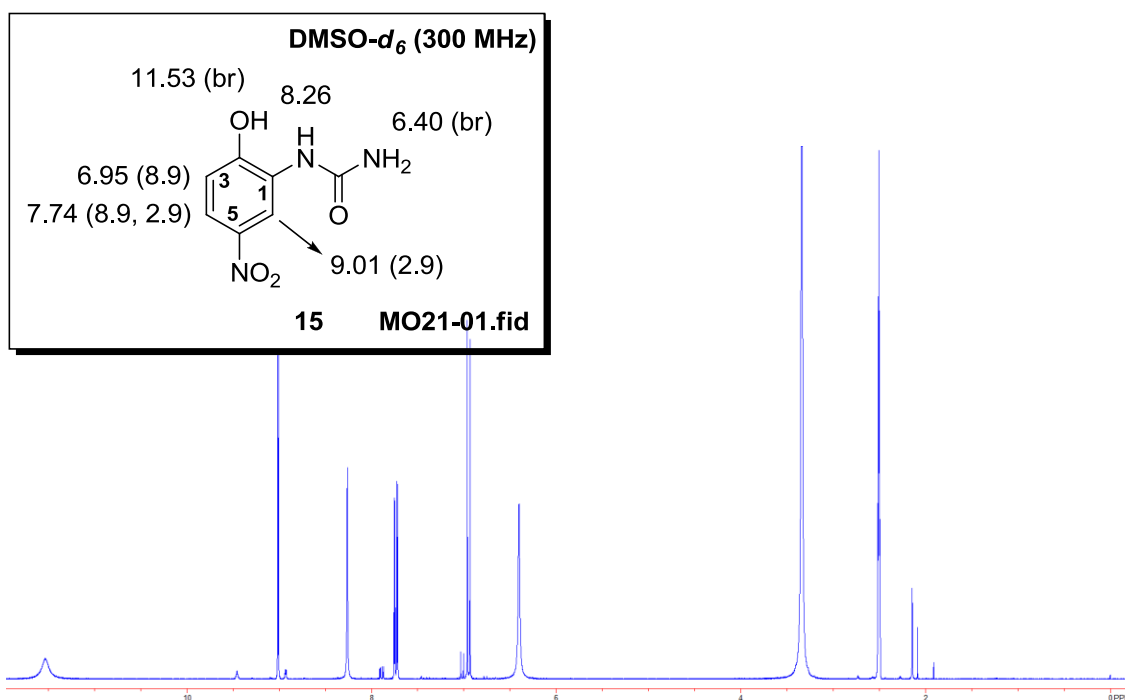
TLC (produkt **15**): (SiO₂, EA, 1 x vyvolané), R_F = 0.54 (UV₂₅₄).

Poznámka: N-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)acetamid má rovnaký posun pri TLC analýze ako produkt reakcie **15**. Tieto látky sa preto na danom nosiči dajú len problematicky podeliť chromatografiou.

Zlúčenina **15** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 215.3-217.8 °C [(CH₃)₂CO], biela kryštalická látka.

²⁶ Laudien, R.; Mitzner, R. J. *Chem. Soc* **2001**, *11*, 2226-2229.

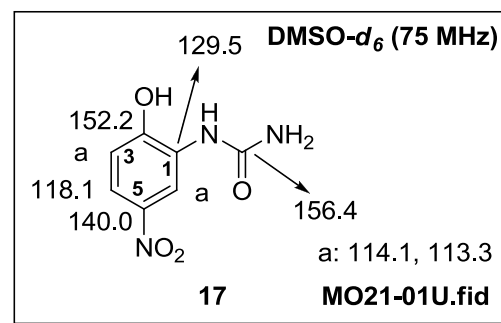


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, MO21-01.fid): δ 11.53 (br s, 1H, -OH), 9.01 (d, 1H, $J(4,6) = 2.9$ Hz, H-C(6)), 8.26 (s, 1H, C(1)-NHCO-), 7.74 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.9$ Hz, $J(4,6) = 2.9$ Hz, H-C(4)), 6.95 (d, 1H, $J(3,4) = 8.9$ Hz, H-C(3)), 6.40 (br s, 2H, -CONH₂).

Posuny vedľajšieho produktu: 9.46, 8.93, 7.89, 7.02, 2.14.

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: H₂O (3.34), DMSO (2.51), (CH₃)₂CO (2.09), AcOH (1.91).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, MO21-01U.fid):
 δ 156.4 (s, -NH-CO-NH₂), 152.2 (s, C(2)), 140.0 (s, C(5)), 129.5 (s, C(1)), 118.1 (d, C(4)), 114.1 a 113.3 (2 x d, C(3) a C(6)).

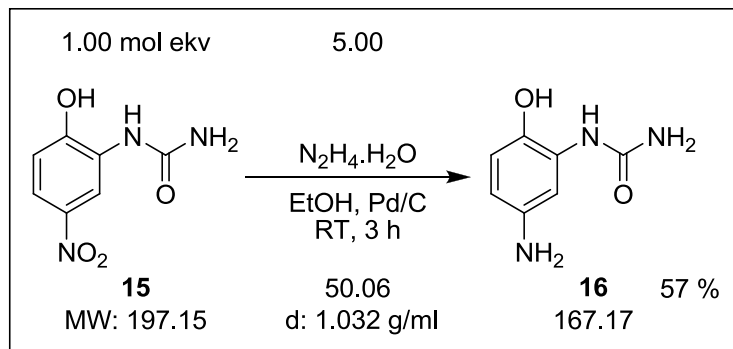


FT IR (solid, cm⁻¹): 3475 (m), 3355 (s), 3214 (w), 2851 (w), 2564 (m), 1672 (w), 1411 (m), 1327 (s), 1282 (s), 1206 (w), 1082 (m).

MS (ESI⁺): 198.0 ([M+H]⁺).

MS (ESI⁻): 196.1 ([M-H]⁻).

3.1.9. Syntéza 1-(5-amino-2-hydroxyfenyl)močoviny (**16**)



Literatúra:²⁷ Reakčné podmienky prevzaté z literatúry aplikované na našom substráte **15**.

Experimentálny postup: Do roztoku 350.0 mg (1.78 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **15** rozpustenej v 20 ml EtOH sme prikvapkali 430.6 μl (444.4 mg, 8.88 mmol, 5.00 mol ekv). $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Počas 3 h sme pri RT postupne pridávali 30.0 mg Pd/C. Po identifikácii smerodajného posunu na TLC analýze sme Pd/C z reakčnej zmesi odfiltrovali cez krátky stĺpec silikagélu, EtOH odparili na RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 170.0 mg (1.02 mmol, 57.3 %) produktu **16** vo forme žltej kryštalickej látky.

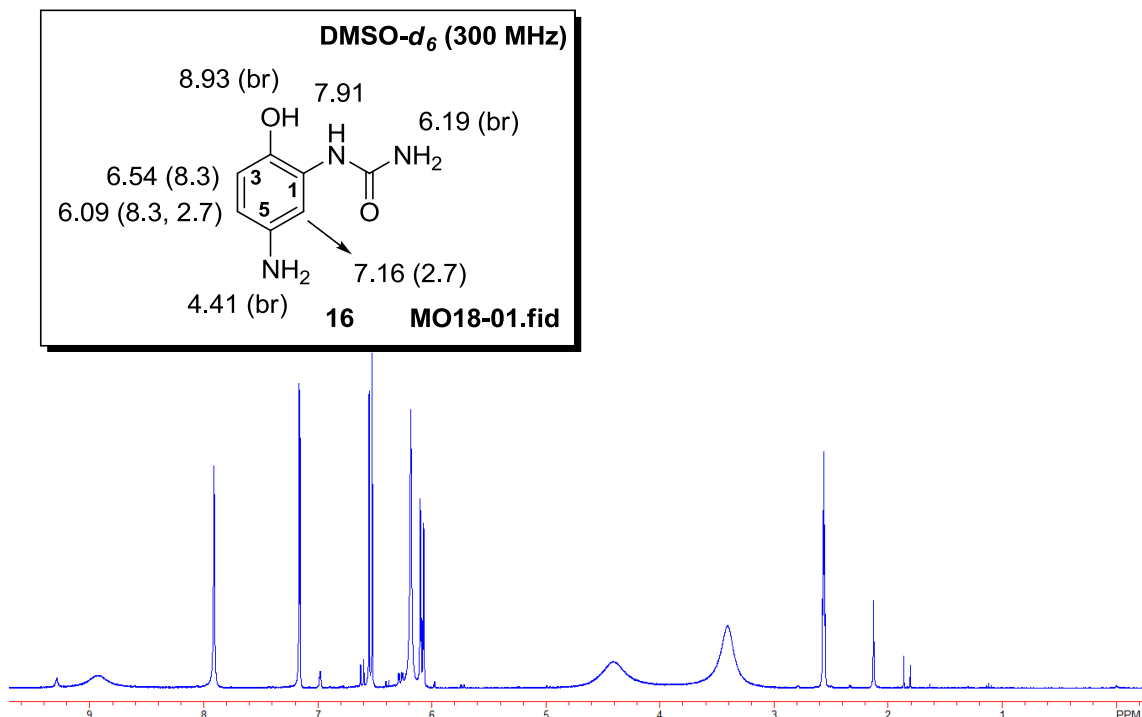
TLC (produkt **16):** (SiO_2 , EA, 1 x vyvolané), $R_F = 0.21$ (UV_{254}).

Poznámka: Produkt **16** po pár dňoch zmenil farbu na tmavo čiernu, podľa $^1\text{H-NMR}$ spektra zostala kvalita látky zachovaná.

Zlúčenina **16** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 173.8-176.0 $^\circ\text{C}$ [EtOH], čierna kryštaliclá látka.

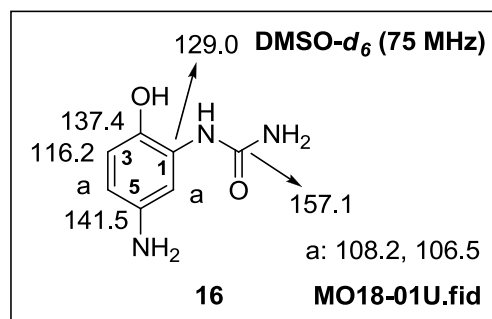
²⁷ Dewar, M. J. S.; Mole, T. J. *Chem Soc* **1956**, 2556.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, MO18-01.fid): δ 8.93 (br s, 1H, -OH), 7.91 (s, 1H, C(1)-NH-), 7.16 (d, 1H, $J(4,6) = 2.7$ Hz, H-C(6)), 6.54 (d, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, H-C(3)), 6.19 (br s, 2H, -CONH₂), 6.09 (dd, 1H, $J(3,4) = 8.3$ Hz, $J(4,6) = 2.7$ Hz, H-C(4)), 4.41 (br s, 2H, C(5)-NH₂).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: H₂O (3.34), DMSO (2.51), (CH₃)₂CO (2.09).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, MO18-01U.fid):
 δ 157.1 (s, -NHCONH₂), 141.5 (s, C(5)), 137.4 (s, C(2)), 129.0 (s, C(1)), 116.2 (d, C(3)), 108.2
 a 106.5 (2 x d, C(4) a C(6)).



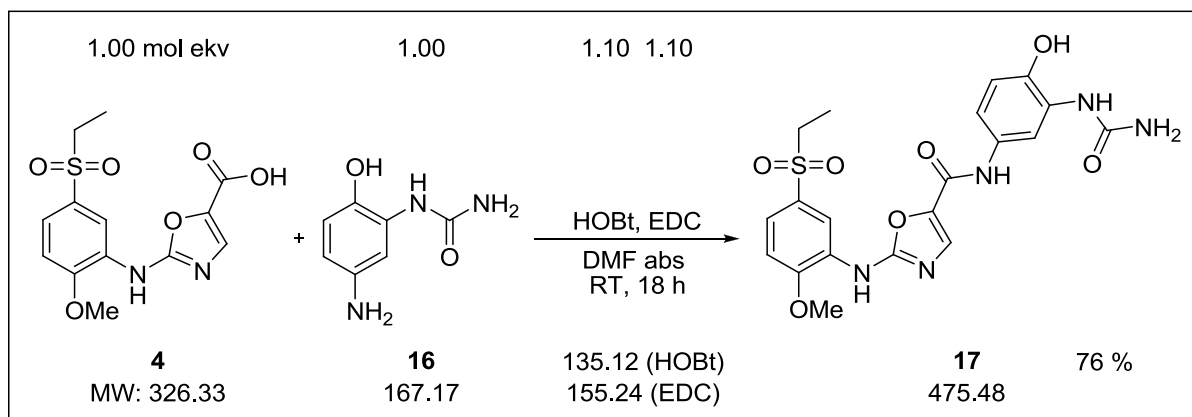
FT IR (solid, cm⁻¹): 3432 (m), 3377 (m), 3290 (s), 3197 (w), 1651 (s), 1543 (m), 1370 (w), 1234 (m), 1176 (w), 1024 (w), 777 (m).

MS (ESI+): 168.1 ([M+H]⁺).

MS (ESI-): 166.1 ([M-H]⁻).

3.1.10. Syntéza

2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (17)



Literatúra:²⁸ Postup prevzatý z literatúry aplikovaný na našom substráte **16**.

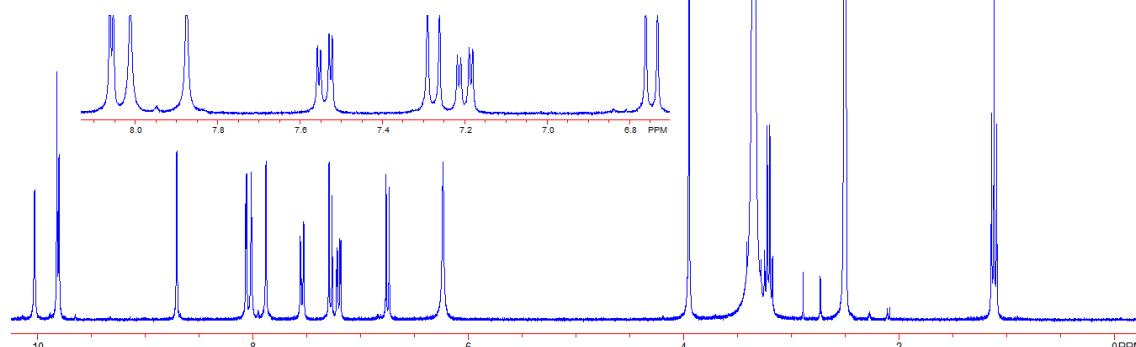
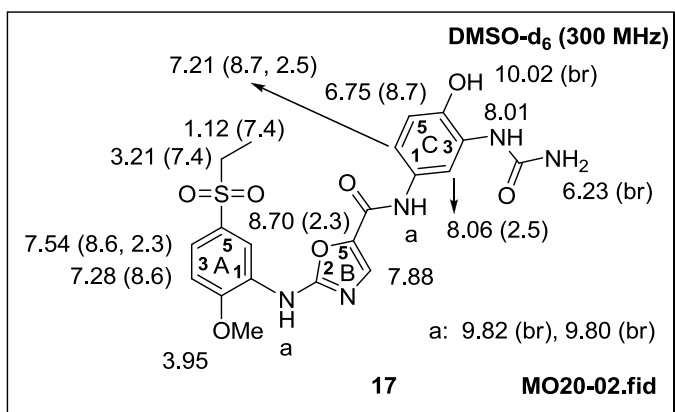
Experimentálny postup: Do roztoku 300.0 mg (0.92 mmol, 1.00 mol ekv) kyseliny **4** rozpustenej v 10 ml DMF abs sme pridali 153.7 mg (0.92 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **16**, 136.6 mg (1.01 mmol, 1.10 mol ekv) HOBt, 157.0 mg (1.01 mmol, 1.10 mol ekv) EDC a reakčnú zmes sme počas 18 h miešali pri RT. Pridali sme 100 ml H₂O a z roztoku vypadla látka, ktorú sme prefiltrovali na Büchnerovom lieviku, vysušili na vzduchu a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 330.0 mg (0,69 mmol, 75.5 %) produktu **17** vo forme čierneho-hnedej tuhej látky.

TLC (produkt 17): (SiO₂, EA, 2 x vyvolané), R_F = 0.15 (UV₂₅₄).

Zlúčenina **17** nie je v literatúre opísaná.

M.p.: 179.9-182.2 °C [DMF], čierneho-hnedej tuhá látka.

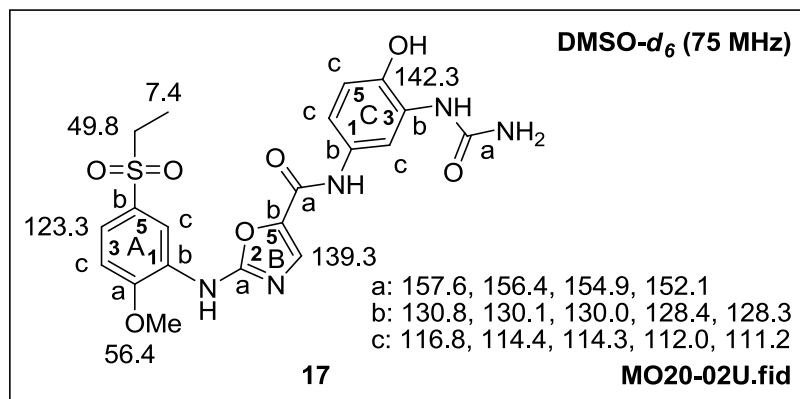
²⁸ Kohda, K.; Kouketsu, A.; Matsuura, A.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Kohara, A.; Ninomiya, S. *Bioorg. Med Chem Lett* **2004**, 14, 3313-3317.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , MO20-02.fid): δ 10.02 (br s, 1H, -OH), 9.82 a 9.80 (2 x s, 2 x 1H, $\text{C}_\text{A}(1)\text{-NH-C}_\text{B}(2)$ a -CONH-), 8.70 (d, 1H, $J(\text{A}_4, \text{A}_6) = 2.3$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(6)$), 8.06 (d, 1H, $J(\text{C}_2, \text{C}_6) = 2.5$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(2)$), 8.01 (s, 1H, $\text{C}_\text{C}(3)\text{-NHCO-}$), 7.88 (s, 1H, H- $\text{C}_\text{B}(4)$), 7.54 (dd, 1H, $J(\text{A}_3, \text{A}_4) = 8.6$ Hz, $J(\text{A}_4, \text{A}_6) = 2.3$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(4)$), 7.28 (d, 1H, $J(\text{A}_3, \text{A}_4) = 8.6$ Hz, H- $\text{C}_\text{A}(3)$), 7.21 (dd, 1H, $J(\text{C}_5, \text{C}_6) = 8.7$ Hz, $J(\text{C}_2, \text{C}_6) = 2.5$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(6)$), 6.75 (d, 1H, $J(\text{C}_5, \text{C}_6) = 8.7$ Hz, H- $\text{C}_\text{C}(5)$), 6.23 (br s, 2H, -CONH₂), 3.95 (s, 3H, $\text{C}_\text{A}(2)\text{-OCH}_3$), 3.21 (q, 2H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, -SO₂CH₂-), 1.12 (t, 3H, $J(\text{CH}_2, \text{CH}_3) = 7.4$ Hz, -SO₂CH₂CH₃).

Posuny zvyškových rozpúšťadiel v spektre: DMF (7.95, 2.89, 2.73), EA (4.03, 1.99, 1.17), H₂O (3.35), DMSO (2.50), (CH₃)₂CO (2.09).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6 , MO20-02U.fid): δ 157.6 a 156.4 a 154.9 a 152.1 (4 x s, $\text{C}_\text{A}(2)$ a $\text{C}_\text{B}(2)$ a -CONH- a -NHCONH₂), 142.3 (s, $\text{C}_\text{C}(4)$), 139.3 (d, $\text{C}_\text{B}(4)$), 130.8 a 130.1 a 130.0 a 128.4 a 128.3 (5 x s, $\text{C}_\text{A}(1)$ a $\text{C}_\text{A}(5)$ a $\text{C}_\text{B}(5)$ a $\text{C}_\text{C}(1)$ a $\text{C}_\text{C}(3)$), 123.3 (d, $\text{C}_\text{A}(4)$), 116.8, 114.4, 114.3, 112.0



a 111.2 (5 x d, C_A(3), C_A(6), C_C(2), C_C(5) a C_C(6)), 56.4 (q, C_A(2)-OCH₃), 49.8 (t, -SO₂CH₂-), 7.4 (q, -SO₂CH₂CH₃).

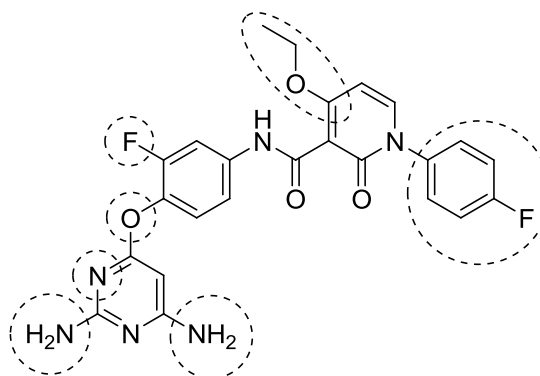
FT IR (solid, cm⁻¹): 3436 (m), 3350 (s), 2942 (w), 1667 (w), 1573 (s), 1526 (s), 1435 (m), 1347 (w), 1295 (m), 1126 (s), 1028 (w), 833 (w).

MS (ESI+): 498.0 ([M+Na]⁺).

MS (ESI-): 474.0 ([M-H]⁻).

4. DISKUSIA

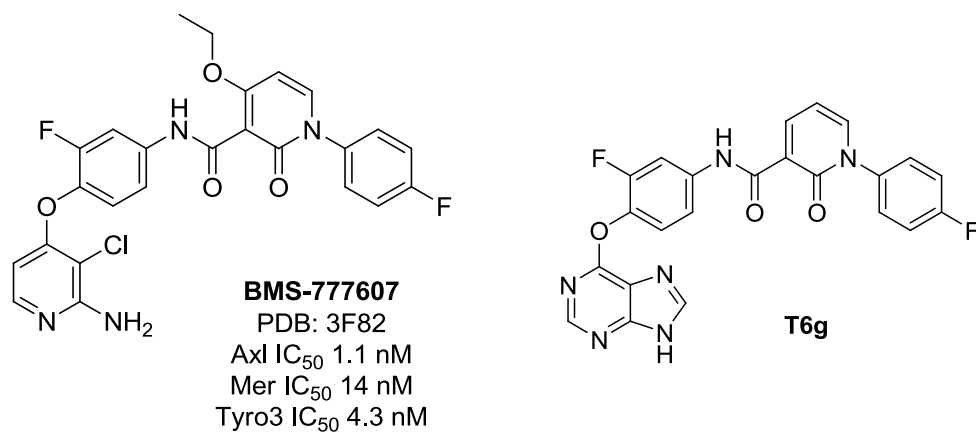
TAM RTK sú proteíny, ktorých signálne dráhy sú zodpovedné za biologické procesy ako prežitie, proliferácia, migrácia buniek a mnoho ďalších. V prípade ich nadmernej expresie môže dochádzať k vzniku nádorových ochorení. Prípravou a aplikáciou selektívnych inhibítorov je možné progresívny rast tumorov ovplyvniť. Účinnosť inhibítorov je posudzovaná na základe viacerých biologických a farmakokinetických vlastností. Dôkazom, že molekuly kinázových inhibítorov môžu byť účinnými liekmi nádorových ochorení bolo schválenie viacerých inhibítorov TKs ako liečiv. Sunitinib, Vandetanib, C-52 a Spiroindolín sú všetko označenia inhibítorov, ktoré boli schválené FDA USA na liečbu nádorových ochorení. (**Schéma 4**) Slabá selektivita znemožňuje cielenú inhibíciu konkrétnej signálnej dráhy, čo spôsobuje mnohé vedľajšie efekty a pozorovanú toxicitu. Vývoj tyrozín kinázových inhibítorov preto smeruje k príprave inhibítorov typu 2, ktoré zasahujú aj do menej konzervovaných častí tyrozín kináz a tým zvyšujú pravdepodobnosť vývoja selektívnych inhibítorov. Mnohé štúdie v súčasnosti používajú známe inhibítory ako východiskové štruktúry, pričom pre zlepšenie selektívneho profilu dobudovávajú ich štruktúru alebo menia rôzne časti ich štruktúry. (**Obrázok 16**)



Obrázok 16. Inhibítor **BMS-777607** so zakrúžkovanými návrhmi pre zvýšenie selektivity inhibítorov na TK

BMS-777607 je inhibítor receptora Met typu II, ktorý sa v súčasnosti nachádza v štádiu klinických testov. Jeho cielený inhibičný účinok je však obmedzený nízkou selektivitou. Autori ho použili na prípravu inhibítora **T6g**, ktorý predstavuje jeden z najlepších autormi vyvinutých inhibítorov receptorov rodiny TAM TK. Znižuje rast tumoru o menej ako 10 %. Ide o inhibítor typu II, ktorý sa viaže aj do menej konzervovaných miest enzýmu, čo je hlavnou príčinou jeho selektivity voči rodine TAM.

Najväčšiu inhibíciu prejavuje voči Axl a Mer, o niečo menšiu voči Tyro3, do ktorého DFG-out štruktúry bol inhibítor **T6g** dokovaný.



Obrázok 18. Selektívny inhibítor rodiny TAM **T6g** pripravený z BMS-777607.

4.1. Príprava potenciálneho inhibítora receptorov VEGFR2 tyrozín kináz 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-metoxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)

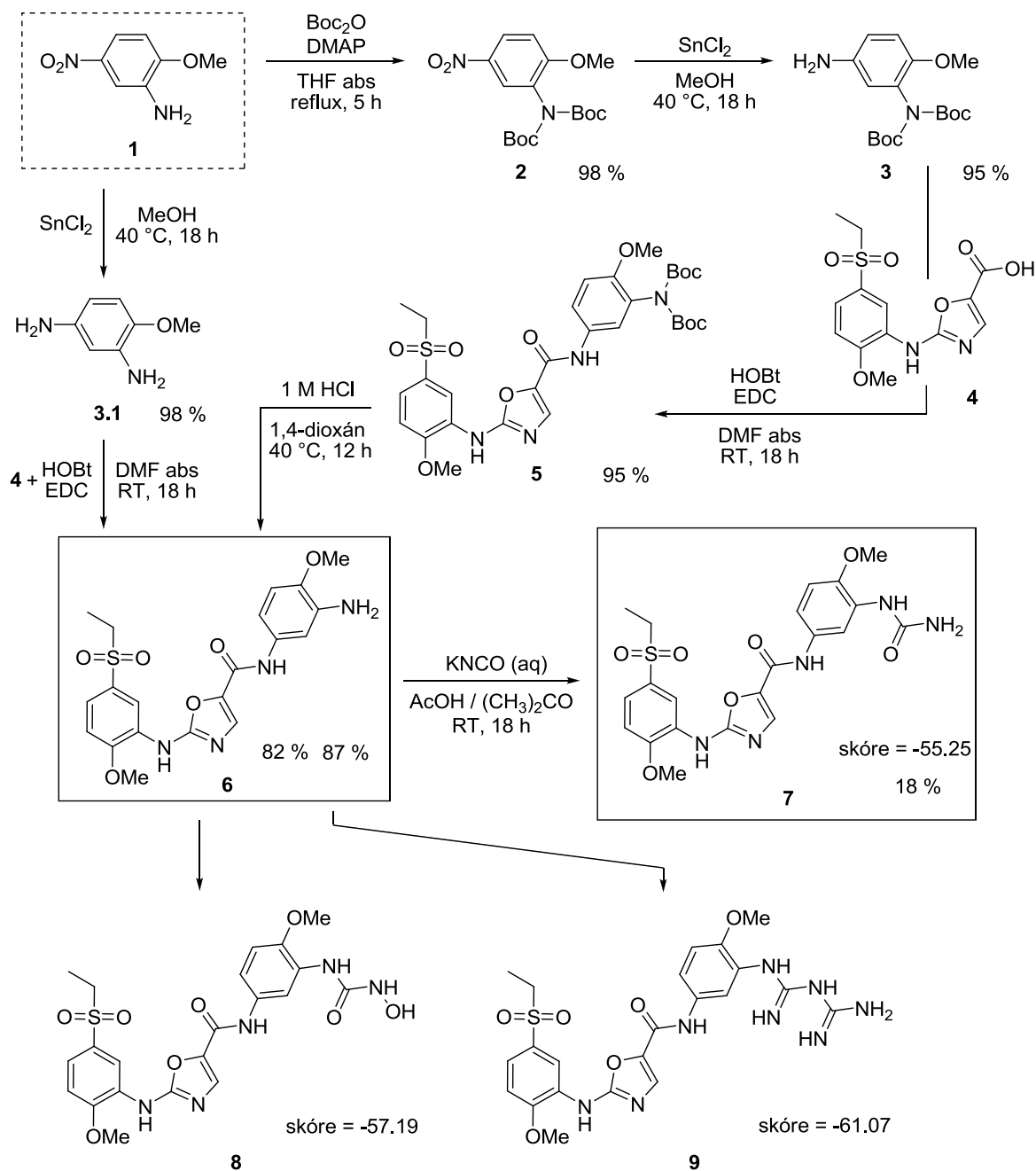


Schéma 1. Syntetický návrh a príprava prekursoru 6, ako aj niektorých z predpovedaných VEGFR2 TK inhibítorov.

4.1.1. Syntéza di-terc-butyl (2-metoxy-5-nitrofenyl) imidodikarbonátu (2)

Zlúčenina **1** predstavuje komerčnú VL dvoj, alebo päťstupňovej syntézy počítačom navrhnutého inhibítora **7**.

Uskutočnili sme redukcii nitroderivátu **1** a pripravili aryldiamínový produkt **3.1** ktorý sme použili do reakcie s kyselinou **4**. V $^1\text{H-NMR}$ spektre urobenom zo surového reakčného produktu (**Schéma 14**) sme identifikovali 2 regioizomérne látky **6** a **6.1**, ktoré sa líšili naviazaním rôznych NH_2 skupín na kyselinu **4** v pomere približne 1 / 1.

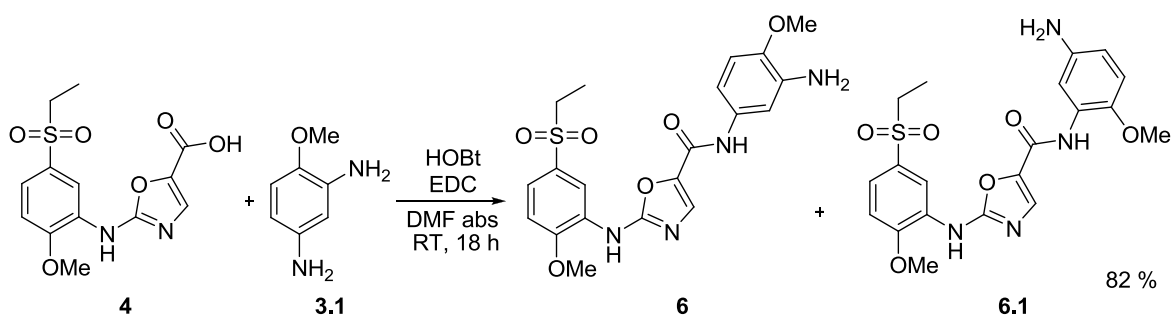


Schéma 14. Pozorovaný vznik regioizomérov **6** a **6.1** v reakcii kyseliny **4** s nechráneným anilínom **3.1**.

Kvôli pozorovanej neselektivite reakcie kyseliny **4** s diamínom **3.1** (**Schéma 14**) sme sa rozhodli pripraviť zlúčeninu **3** s jednou chránenou NH_2 skupinou. Ako chrániacu skupinu sme sa rozhodli použiť Boc, ktorý je stabilný v bázických podmienkach, pričom v dostatočne kyslom prostredí dochádza k jeho odstráneniu. Pri príprave zlúčeniny **2** sme vychádzali z komerčne dostupného nitroanilínu **1** a postup syntézy sme prebrali z literatúry.¹⁵ Pri spracovaní reakcie sme pH reakčnej zmesi upravili primeraným množstvom kyseliny, čím sme protonizovali prítomný DMAP a tým zvýšili jeho rozpustnosť vo vode. Extrakciou do EA a následným odparením rozpúšťadla sme získali surový produkt vo forme žltej kryštalickej látky vo výťažku 98 %. V $^1\text{H-NMR}$ spektre urobenom zo surovej zmesi sme identifikovali disubstituovaný anilín **2**. Mechanizmus reakcie začína nukleofilným atakom atómu dusíka molekuly DMAPu na karbonylový uhlík anhydridu Boc_2O . (**Schéma 15**) Týmto atakom DMAP viaže Boc časť vo forme kladne nabitej pyridíniovej soli, ktorá je reaktívnejšia než samotný Boc anhydrid. Vzniknutá soľ potom reaguje s prítomným nitroanilínom **1** najskôr za vzniku monosubstituovaného **2.1** a v ďalšom kroku za vzniku disubstituovaného anilínu **2**.

4.1.3. Syntéza N-[3-(di-terc-butyl imidodikarbonát)-4-metoxyfenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]oxazol-5-karboxamidu (5)

Pre prípravu amidu **5** sme použili anilín **3** pripravený v predchádzajúcom syntetickom kroku a kyselinu **4**, ktorej syntéza bola vyvinutá nedávno našou výskumnou skupinou. Postup amidácie bol prevzatý z literatúry.¹⁷ V ¹H-NMR spektre produktu sme nevedeli jednoznačne priradiť posuny kyslých vodíkov NH skupín, pretože predikcie takýchto typov vodíkov sú zaťažené veľkou nepresnosťou a ich posun výraznejšie závisí od fyzikálnych podmienok (rozpušťača, pH, teploty ...). Mechanizmus kondenzačnej reakcie anilínu **3** a kyseliny **4** spočíva v adícii kyseliny na karbodiimid, čo umožní ľahšie odstúpenie kyslíka z -COOH skupiny. (Schéma 17) Intermediát vzniknutý z kyseliny **4** a EDC je v prostredí nukleofilu nestabilný. Do reakcie sa pridáva pomocné činidlo HOBt, ktoré vytvorí intermediárny aktivovaný -OBt ester kyseliny **4**. Podstatou aktivácie karbonylu z karboxylátu takýmto esterom je mimoriadna schopnosť odstúpenia esterickej skupiny za vzniku stabilného OBt aniónu stabilizovaného delokalizáciou na aromatickom systéme a tiež elektrónakceptórnymi vlastnosťami troch dusíkových atómov triazolu. Aktivovaný ester vzniká *in situ* (neizolujeme ho) a tento ďalej reaguje aj so slabo nukleofilnými anilínmi už pri RT za vzniku požadovaných amidov.

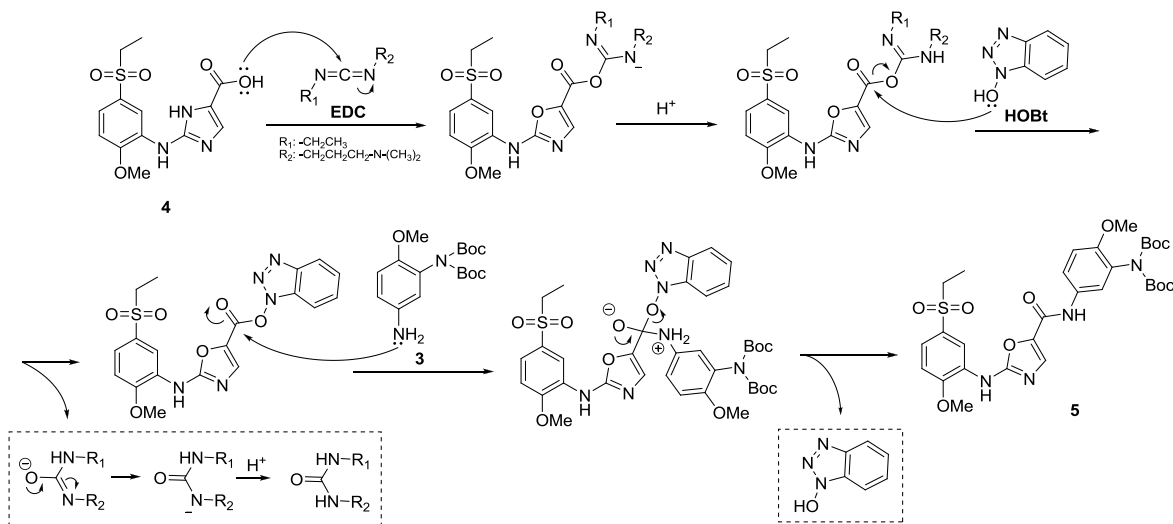


Schéma 17. Mechanizmus vzniku amidov použitím HOBt a EDC.

4.1.4. Syntéza

N-[3-amino-4-metoxifenyl]-2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifenylamino]oxazol-5-karboxamidu (6)

Zlúčenina **6** je kľúčovým prekursorom syntézy cieľových molekúl potenciálnych inhibítorov VEGFR2 tyrozín kinázy. Látku **6** sme pripravili odchránením Boc skupín z amidu **5**. Pôsobením TFA došlo len k odstráneniu jednej Boc chrániacej skupiny, preto sme skúšali rôzne iné reakčné podmienky (kyseliny, teploty, rozpúšťadla) a ako najlepšie sa ukázala byť reakcia s 1 M HCl v 1,4-dioxáne pri teplote 40 °C. Postup z použitej literatúry bol upravený predĺžením reakčného času na 12 h a zvýšením teploty na 40 °C.¹⁸ Výsledok reakcie bol citlivý na teplotu a už pri teplote 50 °C dochádzalo k degradácii produktu **6**. Upravením pH reakčnej zmesi bázou, extrakciou a prečistením surového produktu trituráciou (EA / Hex) sme získali produkt **6** v 87 % výťažku. Objemný *tert*-butyl v Boc skupine chráni jej karbonyl pred nukleofilným atakom, ale Boc skupina je citlivá na kyslé prostredie a rozpadá sa na relatívne stabilný terciálny karbokatión a karbamovú kyselinu, ktorá po dekarboxylácii uvoľní požadovaný amín. (Schéma 18)

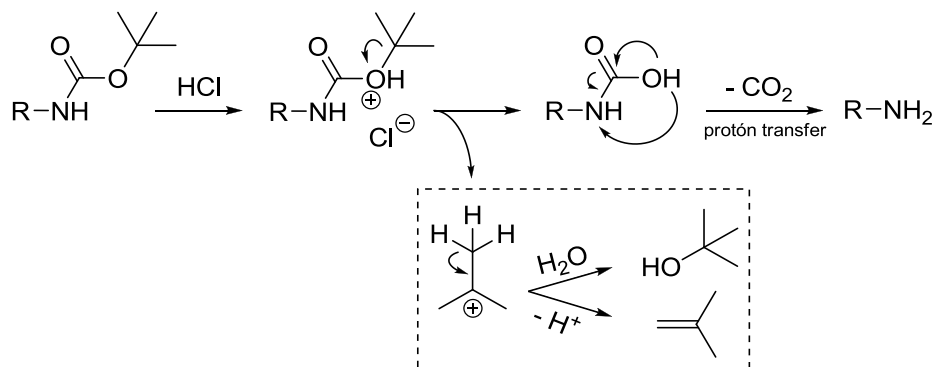


Schéma 18. Mechanizmus odchránenia Boc skupiny.

4.1.5. Syntéza

2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxifenylamino]-N-(4-metoxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (7)

Zlúčenina **7** je počítačom navrhnutý potenciálny inhibítor VEGFR2 TK. Postup syntézy močovín z anilínov je uvedený v citovanej literatúre.²⁶ Zistili sme, že pre lepší priebeh reakcie je výhodné roztok KNCO do reakčnej zmesi postupne prikvapávať. Produkt sme z reakčnej zmesi vyzrážali prídavkom vody a získali tak po premytí a vysušení surový produkt **7**. Analýzou ¹H-NMR spektra sme v ňom identifikovali okrem

produktu **7** aj vedľajší produkt acetamid **7.1**. Ten má v porovnaní s produktom **7** namiesto terminálnej NH_2 skupiny naviazanú metylovú skupinu. V nami navrhnutom mechanizme je vysvetlený vznik produktu **7** aj konkurenčného vedľajšieho produktu **7.1** reakciou anilínu **6** a činidla (zmiešaný anhydrid kys. octovej a karbámovej), ktoré vzniklo in situ v r. zmesi z uvoľnenej kyseliny izokyanatej a prítomnej kyseliny octovej. (**Schéma 19**) Produkt **7** sme sa po viacerých neúspešných kryštalizáciách rozhodli izolovať pomocou FLC. Ako elučné činidlo sme použili čistý EA, ktorým sme oddelili vedľajší produkt acetamid **7.1**. a na následné vymytie produktu **7** z kolóny sme do elučnej zmesi pridali 5 % MeOH. Po FLC separácii sme získali 18 % čistého produktu **7**.

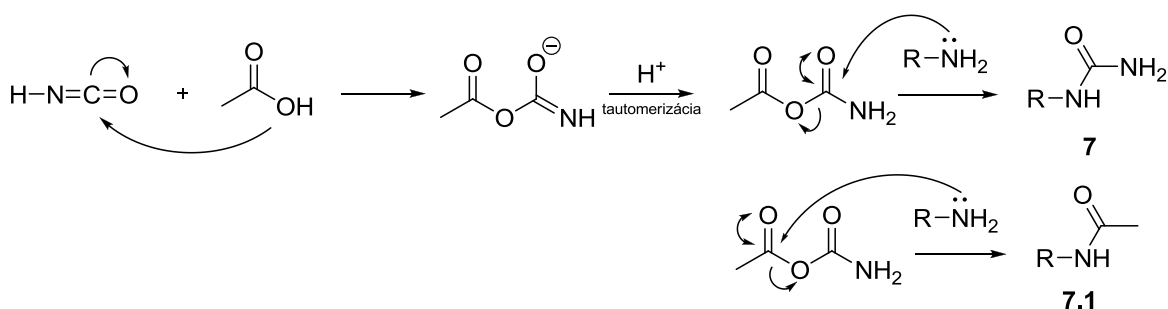


Schéma 19. Mechanizmus vzniku močovinového produktu **7** a vedľajšieho produktu acetamidu **7.1**.

Ďalšie predpovedané inhibítory **8** a **9** sa nám zatiaľ nepodarilo pripraviť.

4.2. Syntéza potenciálneho inhibítora 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(1, 10-fenantrolín-5-yl)oxazol-5-karboxamidu (13)

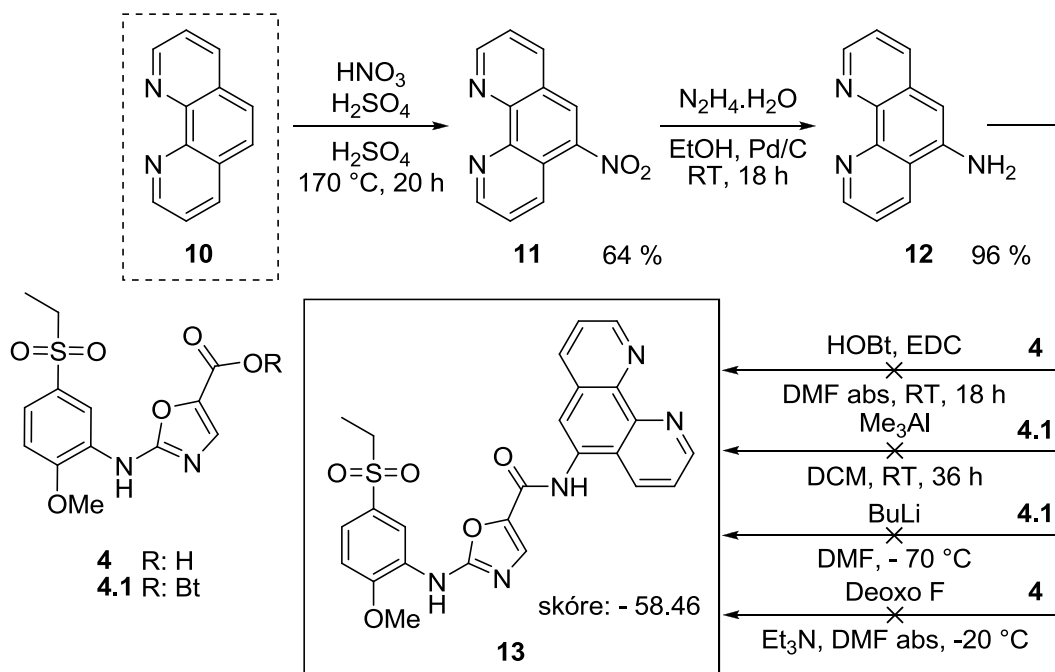


Schéma 2. Návrh a realizácia syntézy predpovedaného VEGFR2 TK inhibítora **13**.

4.2.1. Syntéza 5-nitro-1, 10-fenantrolínu (12)

Syntéza nitrofenantrolínu **11** predstavuje prvý krok trojstupňovej syntézy počítačom predikovaného potenciálneho inhibítora **13**. Postup prvého stupňa syntézy je priamo opísaný v literatúre.²⁰ Pri príprave nitrofenantrolínu **11** sme vychádzali z komerčne dostupného fenantrolínu **10**. Voľný elektrónový pár pyridínového jadra sa nezapája do konjugácie a prítomné dusíky pôsobia iba svojim elektrónakceptórnym efektom a tieto jadrá sú teda relatívne elektrónovo chudobné. Z uvedeného dôvodu nitrácia fenantrolínu **10** prebieha prednostne na stredovom aromatickom jadre. V nitračnej zmesi konc. kyselina sírová protonizuje konc. kyselinu dusičnú za vzniku medziproduktu, ktorý po odstúpení molekuly vody umožňuje vznik elektrofilného nitróniového katiónu. (Schéma 20) Táto častica reaguje cez π a δ komplex a výsledkom je očakávaný produkt **11**.

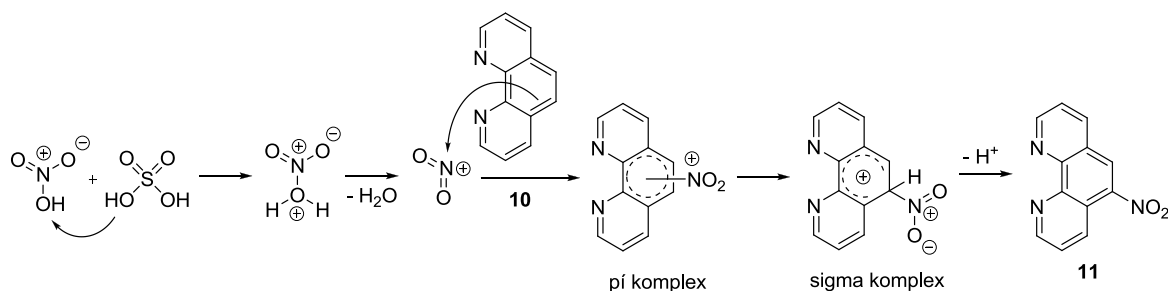


Schéma 20. Mechanizmus nitrácie fenantrolínu **10**

4.2.2. Syntéza 1,10-fenantrolín-5-amínu (**12**)

Na redukciu nitro skupiny v zlúčenine **11** sme použili monohydrát hydrazínu v EtOH. Katalyzátorom reakcie bol Pd/C. Hydrazín hydrát v reakcii slúži ako zdroj vodíka, ktorý sa podieľa na samotnej redukcii nitro skupiny. (**Schéma 21**) Podstatou urýchlenia reakcie je okrem iného aj energetický zisk dosiahnutý vznikom stabilnej molekuly plynného dusíka, ktorého uvoľňovanie sa dá vidieť, ako šumenie na hladine reakčnej zmesi. Zistili sme, že postupné pridávanie katalyzátora počas reakcie samotnú reakciu redukcii nitro skupiny urýchľuje. Produkt **12** počas 24 h od jeho prípravy zmenil farbu na hnedo-čiernu, avšak kvalita látky zostala podľa NMR analýzy zachovaná.

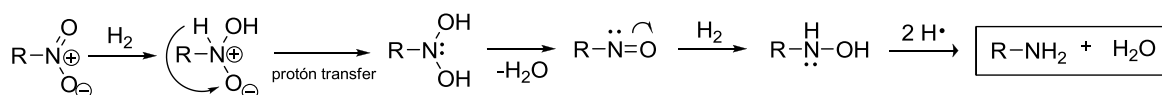


Schéma 21. Mechanizmus redukcie nitro skupiny.

4.2.3. Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(1, 10-fenantrolín-5-yl)oxazol-5-karboxamidu (**13**)

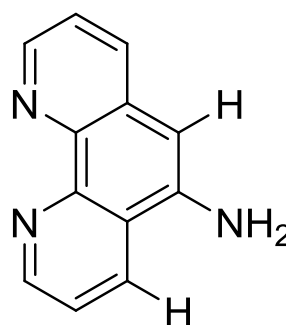
Prípravu potenciálneho inhibítora **13** sme chceli uskutočniť pomocou HBOt, EDC cez vytvorenie aktivovaného esteru z kyseliny **4**, ktorý mal byť následne atakovaný aminofenantrolínom **12**. Avšak ani po viacerých pokusoch sa nám amid **13** nepodarilo pripraviť. Preto sme skúsili upraviť reakčné podmienky zvýšením teploty z RT na 70 °C, zmenou poradia pridávania reaktantov, zmenou ekvivalentov reagujúcich látok, predĺžením

reakčného času atď. (**Schéma 2**) Žiadna z týchto úprav reakčných podmienok však nevedla k vzniku požadovanému amidu **13**. V niektorých prípadoch dochádzalo na základe TLC analýzy k úbytku VL a k vzniku novej škvrny. Avšak, po spracovaní a následnej $^1\text{H-NMR}$ analýze sme izolovali iba východiskové látky a len ťažko charakterizovateľnú zmes ostatných látok. Rozhodli sme sa preto testovať iné reakčné podmienky. Použili sme aj Me_3Al v DCM s aktivovaným -OBt esterom. Opäť viacere pokusy nevedli k jednoznačnej príprave produktu **13**. $^1\text{H-NMR}$ spektrum bolo natoľko prekryté, že sme v ňom nedokázali s istotou identifikovať prítomnosť produktu **13**. Rozhodli sme sa preto získanú zmes vyčistiť FLC chromatografiou na reverzno-fázovej kolóne, avšak získané frakcie viedli buď k izolácii východiskových látok, alebo k izolácii neidentifikovateľných vedľajších látok.

Ďalším pokusom prípravy produktu **13** bola reakcia anilínu **12** s BuLi a následne s aktivovaným HOBt esterom. BuLi je silná báza a z amínov podmieňuje vznik aniónu NH^- , čím malo dôjsť k zvýšeniu nukleofility pôvodného anilínu **12**. Reakciu uskutočnenú za chladenia (izopropanol/ N_2) sme uskutočnili v rozpúšťadlách DMF aj THF. Obidva prípady však nevedli k izolácii očakávaného produktu **13**.

Posledným pokusom bola reakcia kyseliny **4** s Deoxofluórom v prítomnosti bázy Et_3N . Účinkom fluoračného činidla malo dôjsť k vytvoreniu fluoridu kyseliny a ten mal reagovať s aminofenantrolínom **12**. Reakcie prebiehali v suchých rozpúšťadlách DMF alebo aj THF. Pri všetkých odskúšaných podmienkach sme v $^1\text{H-NMR}$ spektrách surových produktov identifikovali východiskové látky, poprípade došlo k ich deštrukcii.

Možnú príčinu nereaktívnosti zlúčeniny **12** predpokladáme v nízkej nukleofilite. Voľné elektrónové páry na dusíkoch pyridínových jadier sa nezapájajú do konjugácie, čím sú tieto jadrá elektrónovo chudobné. Predpokladáme, že tento efekt sa prejaví aj na strednom jadre, na ktorom je naviazaná NH_2 skupina, ktorá mala v reakcii reagovať za vzniku amidu. Tiež prítomnosť vodíkov na alfa a beta uhlíku skeletu fenantrolínu voči NH_2 skupine, by mohli stéricky brániť naviazaniu anilínu na OBt ester kyseliny **4**. Použitím všetkých uvedených reakčných podmienok, ani ich úpravami sa nám požadovaný produkt **13** zatiaľ nepodarilo pripraviť.



4.3. Syntéza potenciálneho inhibítora 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (17)

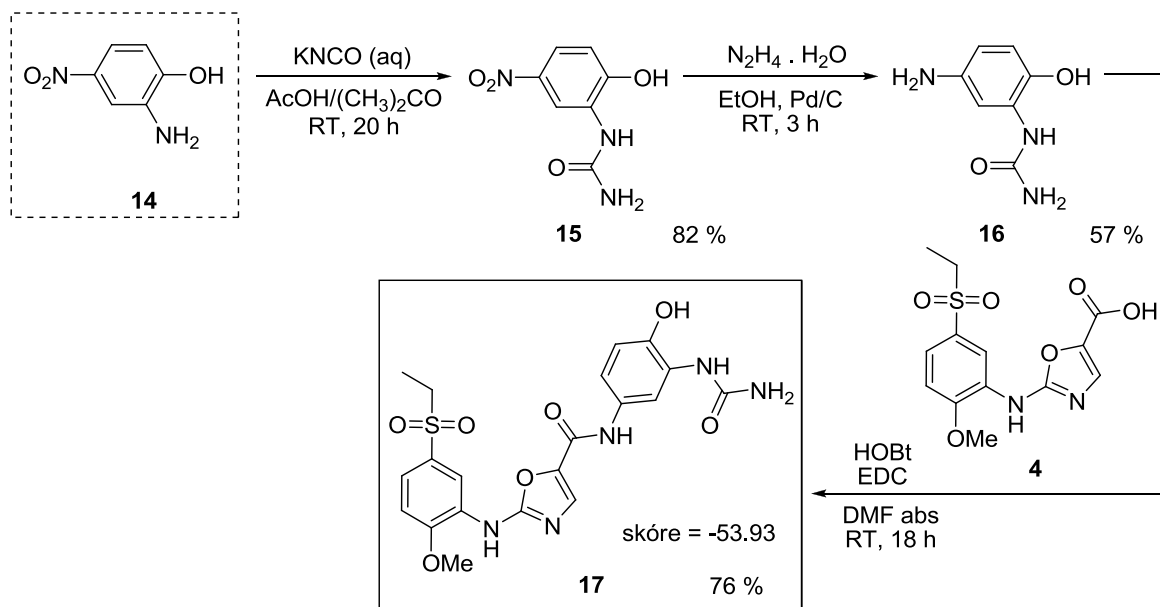


Schéma 3. Návrh a realizácia syntézy predpovedaného inhibítora VEGFR2 TK.

4.3.1. Syntéza 1-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)močoviny (15)

Zlúčenina **15** predstavuje produkt prvého kroku trojstupňovej syntézy, ktorej cieľom je príprava potenciálneho inhibítora **17**. Na prvý stupeň sme použili reakčné podmienky ako boli použité v reakcii na prípravu molekuly **7** z látky **6**. (Schéma 1) Podľa NMR analýzy sme v surovom produkte okrem očakávaného produktu **15** identifikovali aj prítomnosť neželaného acetamidu (do 10 %) podobne ako acetamid **7.1** vzniknutý pri príprave látky **7**. Pripravenú surovú zmes sme použili priamo do ďalšieho kroku bez čistenia.

4.3.2. Syntéza 1-(5-amino-2-hydroxyfenyl)močoviny (16)

Ako východiskovú látku na prípravu anilínu **16** sme použili surovú močovinu **15**. Reakčné podmienky boli prevzaté z literatúry.²⁷ Postup syntézy je rovnaký ako v prípade

redukcie nitro skupiny nitrofenantrolínu **11**. Podľa $^1\text{H-NMR}$ spektra surovej zmesi získanej po redukcii, aminomočovínový produkt **16** obsahoval aj minoritné zastúpenie neželaného aminoacetamidu. Do ďalšej syntézy sme postupovali so zmesou bez ďalšieho čistenia.

4.3.3 Syntéza 2-[5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino]-N-(4-hydroxy-3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (**17**)

Zlúčenina **17** je cieľovou molekulou navrhutej trojstupňovej syntézy. Látka **17** má byť potenciálnym inhibítorom VEGFR2 tyrozín kinázy. Na jej prípravu sme použili nami používaný syntetický spôsob prípravy amidov z kyseliny **4** pomocou HOBt a EDC v bezvodom prostredí. Surový produkt sme získali filtráciou vypadnutej látky z roztoku po pridaní vody k reakčnej zmesi. $^1\text{H-NMR}$ analýza potvrdila prítomnosť tentoraz čistého produktu **17**.

5. ZÁVER

V teoretickej časti bakalárskej práce som spracoval dostupnú literatúru, v ktorej sú opísané charakteristické vlastnosti vybraných receptorových tyrozín kináz, ich výskyt v jednotlivých tkanivách organizmu a tiež spôsob, ako je možné pôsobením inhibítorov ovplyvniť ich aktivitu.

V praktickej časti sme vypracovali metodiku syntézy potenciálnych inhibítorov VEGFR2 TK **7**, **13** a **17** a optimalizovali sme reakčné podmienky na prípravu amidov arylaminooxazolov z kyseliny **4**.

Zlúčeninu **7** sme pripravili z komerčného anilínu **1** päťstupňovou syntézou v celkovom výťažku 14 %.

Zlúčeninu **17** sme pripravili z komerčného anilínu **14** po trojkrokovej syntéze v celkovom 36 % výťažku.

Syntéza amidu **13** sa nám nepodarilo uskutočniť aj napriek použitým viacerým reakčným podmienkam a ich optimalizáciám.

V priebehu diplomovej práce sme uskutočnili viac ako 16 syntetických krokov, pripravili sme 7 dosiaľ v literatúre neopísaných látok, z ktorých 2 zlúčeniny predstavujú počítačom predpovedané potenciálne inhibítory VEGFR2 TK. Všetky pripravené látky sme komplexne fyzikálno-chemicky charakterizovali.