UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

Syntéza prekurzorov N,4-diaryloxazol-2-aminových inhibítorov VEGFR 2 TK

Bakalárska práca

Študijný program:BiochémiaŠtudijný odbor:4.1.14. ChémiaŠkoliace pracovisko:Katedra organickej chémie, PriF UKŠkoliteľ:Mgr. Peter ŠramelKonzultant:doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava 2014

Matúš Hlaváč



Univerzita Komenského v Bratislave Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Študijný program:		Matúš Hlaváč biochémia (Jednoodborové štúdium, bakalársky I. st., denná forma)	
Študijný odbor:		4.1.14. chémia	
Typ záverečnej práce: Jazyk záverečnej práce: Sekundárny jazyk:		bakalárska slovenský anglický	
Názov:	Syntéza prekurzorov N,4-diaryloxazol-2-aminových 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		
Ciel':	Práca je zameraná na zíkanie informácii ohľadom vývoja nových ihibítorov Tyro3 a Mer Tkináz, ako aj na syntézu niektorych počítačom navrhnutých prekurzorov N,4-diaryloxazol-2-aminových VEGFR2 inhibítorov.		
Kľúčové			
slová:	N,5-diaryloxazolamíny, mechanizmus, organická syntéza		
Vedúci: Katedra: PriF vedúci katedry:	Mgr. Peter PriF.KOrC doc. RND	Šramel h - Katedra organickej chémie : Martin Putala, CSc.	
Dátum zadania	: 14.03.201	Mi Palica	
Dátum schválei	nia: 14.05.201	doc. RNDr. Martin Putala, CSc.	

oc. RNDr. Martin Putala, CSc vedúci katedry

študent

vedúci práce Polen Slovel

Prehlásenie

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

V Bratislave, dňa 19. 05. 2014

podpis autora práce

_

Chcel by som sa poďakovať všetkým, ktorí mi pomáhali a podporovali ma pri písaní bakalárskej práce. Mimoriadna vďaka patrí vedúcemu bakalárskej práce Mgr. Petrovi Šramelovi za cenné rady a usmernenie pri práci v laboratóriu, ako aj doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. za trpezlivosť, odbornú pomoc a podporu. Ďakujem Biomagi Ltd. za koncept DP a predpovedané štruktúry prekurzorov VEGFR2 inhibítorov. V neposlednom rade by som chcel poďakovať aj mojim spolužiakom Kike, Marekovi a Ivanovi za priateľskú spoluprácu.

Obsah

1.	Ab	ostrak	.t	6		
2.	2. Grafický abstrakt					
	2.1.	Synt inhil	tetický postup prípravy prekurzoru N,4-diaryloxazol-2-amínových v bítorov 8	VEGFR2		
3.	Ab	ostrak	tt ¹ H-NMR spektier	9		
4.	4. Použité skratky					
5.	. Úvod					
	5.1.	Ciel	e bakalárskej práce	13		
6.	5. Teoretická časť		14			
	6.1.	Inhi	bítory rakovinových kmeňových buniek (CSCs)	14		
	6.1	.1.	Nedávno opísané inhibítory CSCs	14		
	6.2.	Nov	é inhibítory Mer a Tyro3 tyrozín kinázy	19		
	6.2	2.1.	UNC1062 – pyridazolpyrimidínový Mer TK inhibítor	19		
	6.2	2.2.	Mer TK inhibítor s pyridínpyrimidínovým skeletom	25		
	6.2	2.3.	Inhibítory Tyro3 kinázy			
7.	Pr	akticl	ká časť	40		
	7.1.	Mate	eriál a použité metódy			
	7.2.	Synt	téza prekurzoru N,4-diaryloxazol-2-amínových inhibítorov VEGFR2 (8).	41		
	7.2	2.1.	Syntéza 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (2)	41		
	7.2	2.2.	Syntéza N-(4-acetyl-2-brómfenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (3)			
	7.2	2.3.	Syntéza N-(2-bróm-4-(2-brómacetyl)fenyl)-2,2,2-trifluóracetamidu (5)	47		
	7.2	2.4.	Syntéza N-(2-bróm-4-(2,2-dibrómacetyl)fenyl)-2,2,2-trifluor-acetamidu	(6) 49		
8.	Di	skusia	a	54		
	8.1.	Teor	retická časť	54		
	8.2.	Prak	ttická časť	56		
9.	Zá	ver		58		

1. Abstrakt

Matúš Hlaváč: Syntéza prekurzorov N,4-diaryloxazol-2-aminových inhibítorov VEGFR2

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie

Bakalárska diplomová práca, 59 strán, 2014

Receptorové tyrozín kinázy sú transmembránové receptory, ktoré sprostredkúvajú rôzne biologické procesy nevyhnutné pre život. Regulujú základné bunkové pochody ako sú: bunkový rast, cyklus a diferenciácia. Zvýšená aktivita týchto receptorov má však za následok aj vznik rôznych chorôb, hlavne rakoviny. Na základne týchto faktov sa tyrozín kinázové receptory stali zaujímavým terapeutickým cieľom pri liečbe rakovinových ochorení, pričom inhibícia ich aktivity vedie k eliminácii rastu rakovinových buniek. V poslednom období bolo objavených niekoľko typov nízkomolekulových zlúčenín, ktoré preukázali inhibičnú aktivitu voči tyrozín kinázovým receptorom a tým otvorili možnosť efektívnejšej liečby nádorových ochorení.

Kľúčové slová: receptorové tyrozín kinázy, inhibícia, rakovinové bunky, nízkomolekulové zlúčeniny

Abstract

Matúš Hlaváč: Synthesis of Precursors of N,4-diaryloxazole-2-amine Based VEGFR2 Inhibitors

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

Bachelor diploma work, 59 pages, 2014

Receptor tyrosine kinases are transmembrane receptors, which mediate various biological processes necessary for life. They regulate basic cellular processes, expecially cell proliferation, cycle and differentiation. Increased activity of these receptors cause emergence of various diseases, mainly cancer. Based of this facts, tyrosin kinases receptors have become interesting therapeutic target in treatment of cancer diseases and inhibition of their activity leads to growth elimination of cancer cells. Recently, several types of small-molecule compounds, which exhibited inhibitory activity against receptor tyrosine kinases, were invented and thus they gave opportunities of more effective treatment of cancer diseases.

Key words: receptor tyrosin kinases, inhibition, cancer cells, small-molecule compounds

2. Grafický abstrakt

2.1. Syntetický postup prípravy prekurzoru N,4-diaryloxazol-2amínových VEGFR2 inhibítorov 8



Schéma 1. Návrh a realizácia syntézy navrhnutého prekurzoru 8 VEGFR2 TK inhibítora.

3. Abstrakt ¹H-NMR spektier





4. Použité skratky

abs	absolútny, suchý	
AN	acetonitril	
CSCs	rakovinové kmeňové bunky(Cancer Stem	
	Cells)	
DMSO	dimetylsulfoxid	
EA	etyl acetát	
F (%)	vylučovanie (clearance) -	
	farmakokinetický parameter, ktorý opisuje	
	schopnosť obličiek filtrovať určitú látku v	
	organizme	
Hex	zmes hexánov	
HML $t_{1/2}$ (min)	Polčas existencie látok v prítomnosti	
	ľudských pečeňových mikrozómov	
	(Human Liver Microsomes)	
HV	vákuum olejovej vývevy (High Vacuum)	
	koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne	
IC ₅₀	aktivita enzýmu na polovicu (Inhibition	
	Concentration)	

mCPBA	kyselina 3-chlórperoxobenzoová
NBS	N-brómsukcínimid
NSCLC	typ rakoviny pľúc (Non-small-cell lung
	carcinoma)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (Nuclear
	Magnetic Resonance)
RT	laboratórna teplota (Room Temperature)
RVO	rotačná vákuová odparka
RZ	reakčná zmes
SAR	vzťah medzi štruktúrou inhibítora a jeho
	biologickou aktivitou
SCs	kmeňové bunky (Stem Cells)
t _{1/2} (h)	farmakokinetický parameter, ktorý udáva
	čas, za ktorý klesne koncentrácia lieku po
	jeho <i>in vivo</i> podaní na polovičnú hodnotu
	(biological half-life)
TLC	tenkovrstvová chromatografia (Thin Layer
	Chromatography)
ТК	tyrozín kináza
UV/ VIS	Ultrafialové / viditeľné svetlo (Ultraviolet /
	Visible Light)
VL	východisková látka
Vss (L/kg)	distribúcia (Distribution) -
	farmakokinetický parameter, ktorý opisuje
	krvný trasport látky medzi rôznymi
	tkanivami

5. Úvod

Receptorové tyrozín kinázy (RTK) sú receptory nachádzajúce sa v cytoplazmatickej membráne bunky. Tieto receptory sú pre bunku esenciálne, zohrávajú dôležitú úlohu pri jej diferenciácii a proliferácii. Regulujú vývoj a rast všetkých tkanív v organizme, takže poruchy ich aktivity spôsobujú závažne problémy, predovšetkým nekontrolovateľné bunkové bujnenie a tým pádom aj vznik a rozvoj rakovinových ochorení.¹ Existuje až 20 rodín tyrozín kináz (TK), ktoré sa od seba odlišujú štruktúrou a typom príslušného ligandu, zabezpečujúceho prenos bunkového signálu. Inhibíciou zvýšenej aktivity týchto receptorov je možné zastaviť bunkové bujnenie a tým potlačiť rast a rozmnožovanie rakovinových buniek.

Na začiatku mojej práce opisujem funkciu rakovinových kmeňových buniek (CSCs) a objavené aktívne látky na potlačenie ich diferenciácie a proliferácie. V ďalších podkapitolách sa venujem štruktúre a aktivite nedávno vyvinutých nízkomolekulových inhibítorov Mer a Tyro3 tyrozín kináz, ktoré sú schopné inhibovať priebeh rôznych ochorení napr. trombózy, srdcových ochorení a v neposlednom rade rôznych typov rakoviny.

V praktickej časti opisujem vyvinutú prípravu N,4-diaryloxazol-2-amínovej zlúčeniny **8**, ktorá je prekurzorom predpovedaných inhibítorov aktivity tyrozín kinázového receptora VEGFR2.

¹ Kramoliš, M. Bakalárska práca 2012, Prírodovedecká fakulta Masarikovej Univerzity, Brno.

5.1.Ciele bakalárskej práce

Ciele mojej bakalárskej práce sú:

- 1. Spracovanie najnovšej prehľadnej literatúry týkajúcej sa doteraz opísaných inhibítorov CSCs.
- Spracovanie vybranej literatúry týkajúcej sa vývoja nových inhibítorov tyrozín kináz: Tyro3 a Mer.
- Návrh metodiky na syntézu TFA-chráneného α-bróm-1-(4-amino-3bromfenyl)etanónu 5, ako aj jeho dibrómovaného analógu 6.
- 4. Príprava látok **2**, **3**, **5**, **6** a **8**.

6. Teoretická časť

6.1. Inhibítory rakovinových kmeňových buniek (CSCs)

6.1.1. Nedávno opísané inhibítory CSCs

Nasledujúce informácie o rakovinových kmeňových bunkách a ich inhibítorov som čerpal z literatúry.² Rakovinové kmeňové bunky (CSCs) predstavujú subpopuláciu nádorových buniek, ktoré majú špecifické vlastnosti. CSCs, nachádzajúce sa v rôznych malígnych nádoroch ako sú napr. rakovina krvi, prsníka, kože, pľúc alebo prostaty, majú schopnosť sebaobnovovania (self-renewal), ktorá je príčinou "návratu" rakovinového ochorenia po aplikácii chemoterapeutickej liečby. Na základe doterajších štúdií sa zistilo, že CSCs disponujú niekoľkými typmi vnútorných mechanizmov rezistencie na v súčasnosti používanú chemoterapiu a rádioterapiu. Rezistencia umožňuje CSCs prežiť a zabezpečiť tvorbu metastáz.

Väčšina doteraz vyvinutých liečiv určených na cielenú liečbu rakoviny, má vplyv iba na proliferačne aktívne (deliace sa) rakovinové bunky, teda nie na kľudové CSCs. Napríklad **imatinib** eliminuje proliferujúce bunky chronickej myeloidnej leukémie (CML), ale kmeňové bunky tohto typu rakoviny nepreukázali citlivosť na uvedené liečivo. **Trastuzumab** je monoklonálna protilátka pôsobiaca proti nadmernej expresii epidermaného rastového faktora (HER2). Tento rastový faktor podporuje rast a vývoj nádorov a znižuje intenzitu apoptózy rakovinových buniek. **Sorafenib** predstavuje nízkomolekulový inhibítor niekoľkých tyrozín kinázových receptorov, ktoré umožňujú angiogenézu a proliferáciu buniek akútnej myeloidnej leukémie (AML). Podobne ako predchádzajúce dva inhibítory, sorafenib neredukuje počet a aktivitu rakovinových kmeňových buniek AML.

Na základe predchádzajúcich výsledkov sa zistilo, že CSCs predstavujú perspektívny cieľ na cielenú liečbu rôznych typov rakoviny. Vplyvom takejto cielenej liečby spojenej s chemoterapiou by mohlo dôjsť k eliminácii všetkých rakovinových kmeňových buniek. Niekoľko druhov prírodných liečiv (mikrobiálneho alebo rastlinného pôvodu) bolo tiež objavených. (Tabuľa 1) Aktívne látky sú zamerané na

² Naujokat, C.; Laufer S. J. Cancer. Res. Updates, 2013, 2, 36-67.

inhibíciu dôležitých signálnych dráh CSCs a špecifických molekúl na ich povrchu. Podobnú inhibičnú aktivitu preukázali aj niektoré klasické lieky ako napr. **metformín**, vo všeobecnosti používaný na liečbu metabolických chorôb.

Trieda	Zlúčenina	Aktivita	
		CSCs prsníka	
Mikrobiálne ionofórne	Salinomycín	AML SCs	
antibiotikum		CSCs pľúc aprostaty	
		pankreaticke CSCs	
Mikrobiálne	3-O-metylfunikón	CSCs prsníka	
antibiotikum	(OMF)		
Seskviterpénny laktón	Partenolid a	AML SCs	
rastlinného pôvodu	dimetylpartenolid LC-1	CSCs prsníka a prostaty	
		Glioblastomové CSCs	
Steroidný alkaloid	Cyklopamín	CML SCs	
rastlinného pôvodu	Saridegib	CSCs prsníka a	
		prostaty	
Antidiabetický liek	Metformín	CSCs prsníka a prostaty	

Tabuľka 1. Objavené zlúčeniny s aktivitou na rôzne typy rakoviných kmeňových buniek.

Salinomycín je antibiotikum izolované z kultúr *actinobacterium Streptomyces albus,* pre ktorého chemickú štruktúru je charakteristická prítomnosť polyéterových reťazcov a karboxylovej skupiny. (Obrázok 1)



Obrázok 1. Štruktúra salinomycínu.

V cytoplazmatickej a mitochondriálnej membráne plní salinomycín úlohu ionofóru (t.j. zlúčeniny umožňujúcej prenos iónov cez membránu bunky) s vysokou selektivitou pre alkalické kovy.³ Taktiež preukazuje antimikrobiálnu aktivitu voči Gram-pozitívnym baktériám (*Bacillussubtillis, Staphylococcus aureus, Micrococcus flavus* atď.) a proti niektorým hubám (*Plasmodium falciparum* a *Eimeria spp.*). Salinomycín je však pre ľudí toxický a doteraz sa používal iba na liečbu kokcidiózy (choroba tráviaceho traktu hospodárskych zvierat). Jeho toxicita sa prejavuje akútnou nevoľnosťou, tachykardiou a zvýšením krvného tlaku.

V roku 2009 nemeckí vedci zistili, že salinomycín selektívne eliminuje ľudské CSCs prsníka. Pri stanovení CSC-inhibičnej aktivity salinomycínu použili rakovinové epiteliálne kmeňové bunky (HMLER-shEcad), pričom zaznamenali zníženú životaschopnosť a zvýšenú intenzitu apoptózy týchto buniek. Podobné výsledky boli zistené aj v prípade kmeňových buniek akútnej myeloidnej leukémie (AML SCs), ktoré neboli rezistentné na liečbu salinomycínom. Mechanizmus účinku salinomycínu na CSCs nie je zatiaľ jasný, ale ukázalo sa, že inhibuje rôzne biologické procesy, ktoré sú esenciálne pre život buniek a zvyšuje intenzitu apoptózy CSCs.

3-O-Metylfunikón (**OMF**) predstavuje sekundárny metabolit produkovaný hubou *Penicillium pinophilum* a austrálskymi morskými hubami. Ide o toxickú pyránovú zlúčeninu, ktorá je schopná inhibovať rast rôznych fytopatogénnych húb a aktivitu cicavčích DNA polymeráz. (Obrázok 2) OMF spôsobuje zastavenie bunkového cyklu a apoptózu v bunkách ľudského melanómu a krčka maternice. Nedávno bolo preukázané, že OMF dokáže selektívne redukovať bunkové línie MCF-7 rakoviny prsníka, čo vedie k eliminácii CSCs prsníka.

³ Steinrauf, L. K.; Hamilton, J. A.; Sabesan, M. N. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 4085-4091.



Obrázok 2. 3-O-Metylfunikón.

Partenolid je nukleofilný seskviterpénny laktón (Obrázok 3) izolovaný z kvetov a listov rastliny *Tanacetum parthenium*, ktorý inhibuje aktivitu transkripčného faktora NF-κB. Keďže NK-κB je dôležitý transkripčný faktor pre expresiu génov umožňujúcich tvorbu zápalov a v značnej miere ovplyvňuje aj progresiu rakoviny, partenolid zohráva dôležitú úlohu pri protizápalových a protirakovinových procesoch.

Partenolid bola prvá zlúčenina objavená na cielenú liečbu rakoviny inhibíciou CSCs. Guzman, Jordan a spolupracovníci vo svojej štúdii poukázali na to, že partenolid indukuje apoptózu v ľudských AML SCs bez vplyvu na zdravé kmeňové bunky. Podobné výsledky boli zistené aj pri rakovinových kmeňových bunkách prostaty, myelómu a prsníka.



Obrázok 3. Partenolid.

Cyklopamín je steroidný alkaloid (Obrázok 4) izolovaný z kalifornskej rastliny *Veratrum californicum*. Má teratogénne a protinádorové účinky vyplývajúce z jeho schopnosti inhibovať bunkovú odpoveď na "Hedgehog" signálnu dráhu stavovcov. Hedgehog dráha je hlavným regulátorom mnohých základných procesov počas embryonálneho vývoja stavovcov, napr. podpory tvorby kmeňových buniek, bunkovej diferenciácie a proliferácie.

Nedávne zistenia naznačujú, že Hedgehog dráha reguluje aj proliferáciu CSCs a tvorbu nádorov. Na základe in vitro testov a testov na myšiach vedci zistili, že inhibícia Hedgehog dráhy cyklopamínom vedie k eliminácii glioblastomových CSCs, kmeňových buniek mnohonásobného myelómu (MM) a CML SCs. Neskoršie štúdie potvrdili aj elimináciu žalúdočných, pečeňových a prostatických CSCs. Kvôli nízkej orálnej biodostupnosti a metabolickej stabilite cyklopamínu bol navrhnutý jeho analóg, ktorý má označenie IPI-926 a nazýva sa **saridegib**. Má podobné biologické vlastnosti ako cyklopamín, no vyznačuje sa výrazne vyššou orálnou biodostupnosťou a v súčasnosti je v prvej fáze klinických testov.



Obrázok 4. Štruktúra cyklopamínu a saridegibu.

Metformín patrí medzi biguadinídy izolované z rastliny *Galega officinalis* a používa sa už niekoľko rokov na liečbu diabetes mellitus typu 2. Potláča glukoneogenézu v pečeni, čím znižuje hladinu glukózy v krvi, reguluje cirkuláciu inzulínu, potláča nadmernú expresiu epidermálneho rastového faktora (HER2) a inhibuje niekoľko typov tyrozín kinázových receptorov.

Na základe najnovších štúdií bolo preukázané, že metformín selektívne inhibuje CSCs rôznych typov rakoviny napr. rakoviny prsníka, pankreasu, či štítnej žľazy. V súčasnosti je metformín v rôznej fáze klinických testov na pacientoch.



Obrázok 5. Štruktúra metformínu.

Najnovšie výskumy naznačujú aj perspektívnu možnosť cielenej liečby CSCs, ktoré sú pôvodcami vzniku rakoviny a budú predmetom skúmania najbližšie roky. Zatiaľ sa najviac osvedčilo ionofórne antibiotikum **salinomycín**, ktoré efektívne zredukovalo počet CSCs v rôznych typoch rakoviny *in vitro* a v testoch na myšiach.

6.2. Nové inhibítory Mer a Tyro3 tyrozín kinázy

6.2.1. UNC1062 – pyridazolpyrimidínový Mer TK inhibítor

Mer kináza je tyrozín kinázový receptor nachádzajúci sa na povrchu cytoplazmatickej membrány a spolu s receptormi *Tyro3* a *Axl* patrí do rodiny tyrozín kináz s označením TAM. Úlohou Mer kinázy v organizme je podpora proliferácie a prežitia bunky, aktivita krvných doštičiek a vplyv na produkciu cytokínov (malé molekuly slúžiace na prenos informácii medzi bunkami). Abnormálna aktivita Mer TK receptora často vyúsťuje k onkologickým ochoreniam. Nadmerná expresia Mer kinázy bola zaznamenaná v B- a T-bunkách akútnej lymfoblastickej leukémie (ALL), pričom v zdravých B- a T-lymfocytoch sa tento jav nepotvrdil. Zvýšená intenzita Mer expresie bola zaznamenaná aj v bunkách akútnej myeloidnej leukémie (AML), v špecifických bunkách rakoviny pľúc (NSCLC), v glioblastóme (GBM) a v metastatickom melanóme. Na základe týchto faktov sa zistilo, že Mer receptor predstavuje zaujímavý terapeutický cieľ z hľadiska liečby ALL, AML, NSCLC a iných chorôb súvisiacich s nadmernou aktivitou Mer TK. Účinný Mer inhibítor by mal spôsobovať apoptózu tumorových buniek a zvyšovať ich citlivosť na chemoterapiu.

Niekoľko typov nízkomolekulových Mer inhibítorov bolo nedávno objavených. Zlúčenina s označením **UNC569** preukázala dobrú inhibičnú aktivitu. (Obrázok 6) Žiaľ inhibítor **UNC569** sa vyznačoval aj inhibičnou aktivitou voči génu kódujúcemu draslíkové kanály (hERG), pričom inhibícia tohto génu môže spôsobiť QT syndróm (porucha srdcovej činnosti) a náhlu smrť pacienta. Preto je inhibícia hERG považovaná za neprijateľnú *"antitarget"*. Aby sa znížila intenzita hERG inhibície, vedci navrhli látku **T2** s podobnou aktivitou voči Mer TK s potlačenou aktivitou na hERG. Táto zlúčenina sa stala najvhodnejšou východiskovou zlúčeninou pre vývoj potenciálneho Mer TK inhibítora.



Obrázok 6. Štruktúra a enzymatická aktivita zlúčenín **T1** a **T2**. Hodnoty IC_{50} sú uvedené pre Mer TK, ako aj pre zvyšné tyrozín kinázy rodiny TAM (Tyro3 a Axl).

Najúčinnejší inhibítor bol vyvinutý na základne SAR testov, v rámci ktorých sa testovali rôzne analógy nosného skeletu **T2** s rozdielnymi R^1 a R^2 substituentami, pričom sa kládol dôraz na minimálnu afinitu k hERG a tiež na vhodné farmakokinetické vlastnosti zabezpečujúce dobrú biodostupnosť nových derivátov.



Obrázok 7. Nosny skelet T6.

Syntéza nosného skeletu **T6** (Obrázok 7) vychádza z molekuly **T3.** V prvom kroku dochádza k nukleofilnej substitúcii metyltiolovej skupiny (po jej oxidácii s mCPBA) za butylaminovú skupinu. Takto pripravený intermediát **T4** sa potom alkyluje na dusíku v pozícii 1 pyrazolového kruhu, pričom vznikajú látky so štruktúrou **T5**. Posledným krokom je zavedenie alkylu na skelet **T5** v polohe 3 pyrazolového kruhu s využitím Suzukiho "*couplingovej*" reakcie. Takto sa dajú pripraviť látky s finálnym skeletom **T6**. (Schéma 2)



Schéma 2. Syntéza zlúčenín obsahujúcich nosný skelet T6.

Prvá séria SAR testov sa týkala substituenta R^2 , pričom v pozícii R^1 bola konštantne naviazaná N-metylbenzénsulfónamidová skupina (-PhSO₂NHMe). Vzhľadom na to, že väčšina aktívnych hERG inhibítorov obsahuje aminoskupinu v pozícii R^2 , výsledná zlúčenina nemohla obsahovať v tejto pozícií primárny amín. V prípade, že bol primárny amín nahradený hydroxylovou skupinou **T8**, aktivita inhibítora sa 5-krát znížila. Test potvrdil, že dĺžka R^2 reťazca má taktiež značný vplyv na aktivitu inhibítora. Ako najvhodnejší substituent bol podľa SAR testu v pozícii R^2 vyhodnotený *trans*-4hydroxycyklohexyl, ktorý je vidno napr. v zlúčenine **T9**. (Obrázok 8)



Obrázok 8. Najaktívnejšie zlúčeniny podľa prvého SAR testu (skúmaná bola R² substitúcia).

Druhý SAR výskum sa týkal zlúčenín s rozdielnymi substituentami v pozícii R¹, ktoré mali vysokú aktivitu už pri subnanomolárnych koncentráciách. (Obrázok 9) Tieto zlúčeniny sú charakteristické aj svojou vysokou selektivitou voči Mer receptoru v porovnaní s ostatnými členmi rodiny TAM. Vysokú aktivitu preukázala zlúčenina obsahujúca naviazaný sulfónamidový substituent na benzénovom jadre **T10**. V prípade, že bol jeden z vodíkov sulfónamidu nahradený cyklopentylovou skupinou **T11**, aktivita inhibítora sa zvýšila. Najlepšie farmakokinetické vlastnosti a vysoká aktivita voči Mer kináze bola zaznamenaná u zlúčeniny **T12** (**UNC1062**) obsahujúca sulfónamidovú skupinu substituovanú sekundárnym amínom. V porovnaní s pôvodným inhibítorom **UNC569** mala látka **UNC1062** vyššiu afinitu k Mer kináze a oveľa vyššiu Mer selektivitu v rámci rodiny TAM.



Obrázok 9. Najaktívnejšie zlúčeniny podľa druhého SAR testu (skúmaná bola R¹ substitúcia).

Intenzita inhibície Mer TK autofosforylácie bola testovaná na rakovinových B-bunkách (bunkách imunitného systému), ktoré rástli v médiu s rôznou koncentráciou inhibítora UNC1062. Na základe uskutočneného testu bola pre látku UNC1062 stanovená hodnota $IC_{50} = 6.4$ nM. (Obrázok 10) Pre pôvodný inhibítor UNC569 bola stanovená hodnota $IC_{50} = 141$ nM.



Obrázok 10. Inhibícia fosforylácie Mer TK v bunkách akútnej myeloidnej leukémie (AML). Bunky boli inhibované rôznou koncentráciou UNC1062 po dobu 1 h. Mer receptor bol následne izolovaný z bunkového lyzátu interakciou so špecifickými protilátkami (imunoprecipitácia). Celkový obsah

fosforylovaného resp. nefosforylovaného Mer proteínu bol stanovený pomocou Western blot analýzy. Táto analýza slúži na detekciu určitého druhu proteínu v zmesi proteínov. Využíva gélovú elektroforézu, pomocou ktorej sa proteíny najprv separujú na základe ich hmotnosti a následne sú prenesené na povrch membrány, kde sú detegované pomocou príslušných protilátok.⁴

Na dôkaz inhibície Mer fosforylácie v adherentných bunkách (priľnavé bunky schopné tvoriť tuhé kolónie) boli uskutočnené testy na bunkových líniách rakoviny mozgu (BT-12) a dvoch bunkových líniách NSCLC (A549 a Colo699). Inhibícia Mer autofosforylácie v BT-12 bola zaznamenaná pri použití koncentrácie látky UNC1062 vyššej ako 300 nM, podobné výsledky boli zaznamenané aj v A549 a Colo699. (Obrázok 11) Tieto výsledky naznačili, že ohraničené nádory vyžadujú oveľa vyššie koncentrácie UNC1062 ako neadherentné rakovinové bunky.



Obrázok 11. Intenzita inhibície Mer kinázy v adherentných rakovinových bunkách pomocou látky UNC1062. **A**) bunkové línie BT-12, **B**) bunkové línie NSCLC.

Na základe vyššie spomenutých SAR testov sa podarilo identifikovať a pripraviť niekoľko typov zlúčenín obsahujúcich pyrazolpyrimidínový skelet, ktoré boli schopné účinne inhibovať Mer kinázovú aktivitu. Zlúčenina **UNC1062** (Obrázok 12) má vysokú inhibičnú aktivitu, dobrú selektivitu, nízku afinitu k hERG a v testoch na živých bunkách účinne inhibovala Mer TK fosforyláciu.⁵

⁴ Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. P. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 79, 4350-4354.

⁵ Liu, J.; Zhang, W.; Stashko, M.; DeRyckere, D.; Cummings, C.T.; Hunter, D.; Yang, C.; Jayakody, C. N.; Cheng, N.; Simpson, C.; Norris-Drouin, J.; Sather, S.; Kireev, D.; Janzen, W. P.; Earp, H. S.; Graham, D. K.; Frye, S. V.; Wang, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 83-93.



Obrázok 12. Štruktúra zlúčeniny UNC1062, ktorá sa ukázala ako najvhodnejší Mer TK inhibítor.

6.2.2. Mer TK inhibítor s pyridínpyrimidínovým skeletom

Nedávno bolo objavených niekoľko účinných pyrazolpyrimidínových Mer inhibítorov napr. UNC1062. Vedci sa však snažili nájsť podobné zlúčeniny s ešte lepšími farmakokinetickými vlastnosťami a vyššou selektivitou v rámci TAM rodiny. Preto bola vyriešená kryštalická štruktúra komplexu Mer TK so zlúčeninou **T1**, pomocou ktorej vedci zistili presné priestorové usporiadanie a štruktúru daného inhibítora v aktívnom mieste kinázy.⁶ (Obrázok 13A) Kryštalografická analýza odhalila interakcie inhibítora**T1** s adenínovým vreckom Mer TK, pričom sa zistilo, že pyrazolový kruh netvoril väzbu so žiadnym aminokyselinovým zvyškom. Na základe týchto zistení vedci vyslovili predpoklad, že nahradenie pyrazolového kruhu zlúčeniny **T1** tzv. pseudokruhom, stabilizovaným vnútromolekulovou vodíkovou väzbou, by mohlo viesť k vytvoreniu účinnejšieho Mer inhibítora **T13** s lepšími fyzikálnochemickými vlastnosťami v porovnaní s pyrazolpyrimidínovými zlúčeninami. (Obrázok 13B) Zlúčenina so pseudokruhom (udržiavaný cez intramolekulovú vodíkovú väzbu medzi pyridínovým dusíkom a aminoskupinou v polohe 4 pyrimidínového kruhu) vykazovala lepšiu interakciu s väzobným vreckom Mer TK.

⁶ Stahly, G. P. Crystal Growth & Design **2009**, *9*, 4212-4229.



Obrázok 13. Kryštalická štruktúra dvoch rôznych inhibítorov v ATP-väzbovom mieste Mer kinázy. **A**) Štruktúra zlúčeniny **T1** v komplexe s Mer kinázou. **B**) Štruktúra zlúčeniny **T13** v komplexe s Mer TK.

Syntéza pyridínpyrimidínového inhibítora vychádza z komerčne dostupnej zlúčeniny 5bróm-2,4-dichlórpyrimidínu. V prvom kroku dochádza k nukleofilnému nahradeniu chlóru v polohe 4 pyrimidínového kruhu R²-aminoskupinou za vzniku zlúčeniny **T15**. Následnou nukleofilnou substitúciou atómu chlóru v polohe 2 za R³-aminoskupinu vznikne zlúčenina **T16**. Posledným krokom je zavedenie substituenta R¹ do polohy 5 pyrimidínového kruhu s využitím *"cross-couplingovej"* reakcie za vzniku finálnych zlúčenín s nosným skeletom **T17**. (Schéma 3)



Schéma 3. Postup syntézy pyridínpyrimidínových inhibítorov s nosným skeletom T17.

Vedci vyvinuli aj alternatívny postup syntézy vedúci k príprave zlúčenín s rôznymi R³ substituentami. V tomto postupe je uľahčená výmena R³ substituentov v porovnaní s predchádzajúcim postupom (viď Schéma 3). V prvom kroku dochádza k nukleofilnému nahradeniu chlóru v polohe 4 heterocyklu komerčne dostupnej zlúčeniny 5-bróm-4-chlór-2-metyltiopyrimidínu **T18**, pričom vzniká intermediát typu **T19**. Tento intermediát možno transformovať na **T20** pomocou Suzukiho-Miyaurovej *"cross-couplingovej"* reakcie. Oxidácia **T20** s následnou nukleofilnou substitúciou s požadovaným R³-amínom vedie ku vzniku finálnych produktov **T21**. (Schéma 4)



Schéma 4. Alternatívny postup syntézy zlúčenín s nosným skeletom T21.

Ako prvý účinný inhibítor bola pripravená zlúčenina T22 a niekoľko jej analógov. (Obrázok 14) Hodnota IC₅₀ zlúčeniny **T22** bola podobná ako bola hodnota východiskového pyrazolpyrimidínového inhibítora T1 (UNC569). Nukleofilnou zámenou 4-aminocyklohexylmetylaminovej skupiny trans za trans 4hydroxycyklohexylaminovú skupinu vznikla aktívna zlúčenina T23 s podstatne nižšou afinitou k nebezpečnému hERG (srdcovému iónovému kanálu, aká bola zaznamenaná u zlúčeniny T1). V porovnaní so zlúčeninou T1, zlúčeniny T22 a T23 vykazovali väčšiu Mer selektivitu v rámci TAM rodiny. Na základe ďalších testov sa zistilo, že inhibičná aktivita analógov sa výrazne znížila, keď došlo k narušeniu alebo zániku intramolekulovej vodíkovej väzby napr. pri zmene polohy pyridinylového dusíka (viď zlúčenina T24), alebo po nahradení dusíka uhlíkom (viď. zlúčenina T25). Kompletné odstránenie pyridinylovej skupiny (zlúčenina T26) znížilo inhibičnú aktivitu až 890krát.



Obrázok 14. Štruktúra a TK inhibičná aktivita zlúčeniny T22 a jej analógov T23-T26.

Kvôli vývoju Mer TK inhibítora s čo najvyššou inhibičnou aktivitou boli uskutočnené d'alšie SAR testy na základe ktorých boli vybrané najúčinnejšie zlúčeniny s rôznymi R^1 , R^2 a R^3 substituentami na pyridínpyrimidínovom skelete. Ako prvé sa skúmali zlúčeniny s rôznymi R^1 substituentami, zatiaľ čo v pozícii R^2 bola naviazaná *trans*-4hydroxycyklohexylová skupina a v pozícii R^3 butylová skupina (viď. skelet **T27**). (Obrázok 15)



Obrázok 15. Nosný skelet **T27** použitý v SAR výskume na identifikáciu najvhodnejšieho R¹ substituenta.

Najaktívnejšie zlúčeniny obsahovali v pozícii R^1 morfolínmetylpyridínovú skupinu, pričom bola pre aktivitu rozhodujúca poloha morfolínmetylu na pyridyle. Najaktívnejší analóg **T28** obsahoval morfolín naviazaný na pozícii 5 pyridínového kruhu, zatiaľ čo látka **T29** s morfolínom v polohe 3 nemala Mer inhibičnú aktivitu. (Obrázok 16)



Obrázok 16. Zlúčeniny **T28-T30** obsahujúce v pozícii R¹ morfolínmetylpyridylový substituent.

Ďalší SAR optimalizačný výskum sa týkal substituentov v pozícii R^2 skeletu **T21**. Pomocou *in silico* výpočtov sa zistilo, že polárna skupina v pozícii R^2 vytvára vodíkovú väzbu s aminokyselinou Glu595 v ATP-väzbovom mieste Mer TK. Práve existencia tejto väzby napomáhala zvýšeniu inhibičnej aktivity testovaných zlúčenín.⁷ Potvrdilo sa, že NH skupina v polohe 4 na pyrimidínovom kruhu vytvára intramolekulovú vodíkovú väzbu s dusíkom pyridínového kruhu, pričom bez tejto vodíkovej väzby by aktivita inhibítora bola minimálna. Najvyššiu aktivitu mala zlúčenina **T32** obsahujúca v polohe 4 *trans* 4-hydroxycyklohexylamínovú skupinu. (Obrázok 17)

⁷ Lengauer, T.; Rarey, M. Curr. Opin. Struct. Biol. 1996, 6, 402-406.



Obrázok 17. Zlúčeniny **T31-T33** s rôznymi R² substituentami.

Ako posledný bol uskutočnený SAR výskum so substituentami v pozícii R³ skeletu **T21**. Ako vyplýva z už zmieňovanej v kryštalickej štruktúry (Obrázok 13), amino skupina z butylamínového R³ reťazca vytvára vodíkovú väzbu so závesným regiónom Mer kinázy. Uvedená interakcia je kľúčová pre inhibičnú aktivitu týchto zlúčenín. Nahradením amino skupiny metylsulfanylovou skupinou, ako v zlúčenine **T34**, zanikla vodíková väzba a tým pádom došlo k výraznému zníženiu aktivity inhibítora. Zánik vodíkovej väzby a následné zníženie inhibičnej aktivity bolo zaznamenané aj v analógu **T35**, u ktorého bol vodík aminoskupiny v polohe 3 nahradený metylovou skupinou. Naopak, predĺžením alkylamínového reťazca v polohe 3 došlo k zvýšeniu inhibičnej aktivity príslušných analógov, ako najaktívnejší sa ukázal byť inhibítor **T36**.



Obrázok 18. Zlúčeniny **T34-T36** s rôznymi R³ substituentami.

Pre lepšiu predstavu o interakciách zlúčeniny **T23** s Mer kinázou vedci vyriešili kryštalickú štruktúru jej komplexu s Mer TK. (Obrázok 19) Výsledky kryštalografickej analýzy jasne ukázali interakcie 2-aminopyrimidínového reťazca zlúčeniny **T23** s aminokyselinami Pro672 a Met674 z ATP-väzbového miesta Mer kinázy. Ukázalo sa aj, že hydroxylová skupina R² reťazca zlúčeniny **T23** vytvára vodíkovú väzbu s karboxylovou skupinou Glu595 Mer kinázy, zatiaľ čo amino skupina R² reťazca zlúčeniny **T1** interagovala s Arg727. (Obrázok 13A) Tento rozdiel je spôsobený konformačnou zmenou cyklohexylovej skupiny zapríčinenou intramolekulovou vodíkovou väzbou v inhibítore **T23**. Treba tiež spomenúť, že dôležitá **aminokyselina ATP-väzbového miesta Mer TK Ile650 nie je prítomná v ostatných kinázach rodiny TAM. Axl a Tyro3 obsahujú na identickej pozícii aminokyselinu metionín alebo alanín. Táto variabilita spôsobuje výraznú inhibičnú selektivitu v rámci kináz TAM rodiny.**



Obrázok 19. Vyriešená kryštalická štruktúra komplexu zlúčeniny T23 s Mer tyrozín kinázou.

Kvôli štúdiu farmakokinetických vlastností daného typu inhibítorov, bolo vybraných niekoľko podobných zlúčenín s rozdielnymi R¹ reťazcami, pričom práve štruktúra R¹ reťazca v **T21** v najväčšej miere ovplyvňuje farmakokinetické vlastnosti a rozpustnosť týchto látok. Testované zlúčeniny boli intravenózne a orálne podávané myšiam. Zlúčenina **T28** (Obrázok 20) mala najlepšie farmakokinetické vlastnosti s vhodnou hodnotou $t_{1/2}$ (*biological half-life*), vylučovania (*clearance*) a distribúcie (*distribution*). Taktiež sa vyznačovala dobrou rozpustnosťou a Mer TK selektivitou v porovnaní s ostatnými TAM kinázami.⁸

⁸ Zhang; Zhang, D.; Stashko, M. A.; DeRyckere, D.; Hunter, D.; Kireev, D.; Miley, M. J.; Cummings, C.; Lee, M.; Norris-Drouin, J.; Stewart, W. M.; Sather, S.; Zhou, Y.; Kirkpatrick, G.; Machius, M.; Janzen, W. P.; Earp, H. S.; Graham, D. K.; Frye, S. V.; Wang, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9683-9692.



Obrázok 20. Zlúčenina **T28** s pyridínpyrimidínovým skeletom, ktorá ukázala najlepšie farmakokinetické vlastnosti, rozpustnosť a selektivitu v rámci rodiny TAM.

6.2.3. Inhibítory Tyro3 kinázy

Rôzne srdcovo-cievne ochorenia predstavujú jeden z najzávažnejších problémov súčasnej medicíny. Na liečbu arteriálnej trombózy sa predovšetkým používa známy antikoagulačný liek **clopidorel** (Plavix), ktorý zabraňuje zhlukovaniu krvných doštičiek, čím zamedzuje vzniku krvných zrazenín – trombov. (Obrázok 21) Ireverzibilne sa viaže na krvné doštičky a tým výrazne zvyšuje prietokový čas krvi *"bleeding time"*. Práve zvýšený prietokový čas zamedzí vzniku trombov. Test prietokového času počas krvácania spočíva vo vytvorení malej rany a v následnom meraní času pokým sa krvácanie prirodzene nezastaví.⁹ Clopidorel je prijímaný do tela v podobe neaktívnej zlúčeniny, ktorá je aktivovaná až po metabolickej premene príslušnými enzýmami v pečeni. Žiaľ, jedna tretina až jedna štvrtina pacientov nie je schopná dostatočne metabolizovať tento liek a vytvárať jeho aktívnu formu.¹⁰

⁹Lehman, C. M.; Blaylock, R. C.; Alexander, D. P.; Rodgers, G. M. Clin. Chem. 2001, 47, 1204-1211.

¹⁰ Pereillo, J. M.; Maftouh, M.; Andreieu, A.; Uzabiaga, M. F.; Fedeli, O.; Savi, P.; Pascal, M.; Herbert, J. M.; Maffrand, J. P.; Picard, C. Drug. Metab. Dispos. 2002, 30, 1288-1295.



Obrázok 21. Štruktúra clopidogrelu.

Gas6 (growth arrest-specific 6) predstavuje bielkovinu patriacu do rodiny proteínov vitamínu K. Gas6 zohráva dôležitú úlohu pri procesoch tvorby trombov a hemostázy (zabránenie straty krvi z poškodenej cievy). Inhibícia Gas6 spôsobuje disfunkciu zrážania krvi a zároveň aj prevenciu proti trombóze. Taktiež Gas6 je ligandom pre tyrozín kinázové receptory Tyro3, Axl a Mer.

Nedávne štúdie preukázali, že špecifické inhibítory Tyro3 tyrozín kinázy výrazne znižujú intenzitu zhlukovania krvných doštičiek, pričom účinnosť týchto inhibítorov je porovnateľná s účinnosť ou clopidogrelu. Počas inhibičného účinku týchto látok nebol zaznamenaný zvýšený prietok krvi, ktorý by viedol k vnútornému krvácaniu. Inhibícia receptora Tyro3 preto predstavuje perspektívny spôsob liečby trombózy bez neželaných účinkov.

Nedávno boli objavené inhibítory Mer TK so spiroindolovým skeletom, ktoré vykazovali dobrú Tyro3 selektivitu v porovnaní s ostatnými kinázami TAM rodiny, no na druhej strane sa vyznačovali aj nízkou orálnou biodostupnosťou a mali tiež inhibičnú aktivitu voči expresii génu kódujúceho dôležitý enzým cytochróm CYP2D6. Následne vedci objavili zlúčeninu **T37** s 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxyamidovým skeletom, ktorá preukazovala dobré farmakokinetické vlastnosti a mala nízku hERG inhibičnú aktivitu. (Obrázok 22)



Obrázok 22. Zlúčenina T37 s 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxamidovým základným skeletom.

Syntetický postup na prípravu zlúčenín s 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxamidovým skeletom je znázornený na nižšie uvedenej schéme. Kondenzačnou reakciou N-(3-aminopropyl)butyrolaktámu so zlúčeninou **T38** vzniká intermediát **T39**. V ďalšom kroku sa nukleofilnou substitúciou pri 80 °C nahradí chlór za amín (R^1NH_2) za vzniku zlúčeniny **T40**. Oxidácia metyltiolovej skupiny pomocou mCPBA vedie k vzniku lepšie odstupujúcej metylsulfónovej skupiny a následnou nukleofilnou substitúciou tejto skupiny za amín R^2NH_2 vzniká výsledný produkt **T41**. (Schéma 5)



Schéma 5. Syntéza zlúčenín s 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxamidovým skeletom T41.

Najaktívnejšie zlúčeniny boli získané SAR výskumom, kde sa vyšetril vplyv substituentov R^1 a R^2 naviazaných na atómoch dusíka 2,4-diaminopyrimidín-5-

karboxamidového skeletu **T41**. (Obrázok 23) Zlúčeniny obsahujúce cyklopentylamín naviazaný v pozícii R¹ preukázali najlepšiu aktivitu, pričom substituenty v pozícii R² museli obsahovať pyridínový kruh, prípadne benzénové jadro s naviazanou polárnou skupinou, ktorá by vytvárala vodíkovú väzbu s aminokyselinami z ATP-väzbového miesta Tyro3 kinázy.



Obrázok 23. Najaktívnejšie substituenty R^1 a R^2 v zlúčeninách s nosným skeletom **T41**.

Interakčná mapa 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxamidového typu inhibítora s ATP-väzbovým miestom Tyro3 kinázy bola zistená na základe kryštalografickej analýzy komplexu látky T42 s danou kinázou. (Obrázok 24) V tejto štruktúre sú zobrazené 3 vodíkové väzby medzi 2-aminopyrimidín-5-karboxamidovým jadrom inhibítora T42 a aminokyselinami Pro594 a Met596 Tyro3 kinázy. Vodíková väzba 5-karboxamidom a karbonylovou skupinou medzi Met596 je stabilizovaná medzi vnútromolekulovou vodíkovou väzbou karboxamidovou a aminocyklopentylovou skupinou. Interakcia 4-etylpyridínovej skupiny inhibítora s aminokyselinou Asp663 narúša iónovú väzbu medzi Lys540 a Asp663 z kinázy. Táto väzba je kľúčová pre aktivitu inhibítora a narušenie tejto iónovej väzby vedie k zvýšeniu aktivity inhibítora T42.



Obrázok 24. Kryštalická štruktúra zlúčeniny T42 s ATP-väzbovým miestom Tyro3 kinázy.

Na základe kryštalickej štruktúry spomínaného komplexu sa zistilo, že pyridínetylová skupina v polohe 2 pyrimidínového kruhu zlúčeniny **T42** nevypĺňa alanínové (Ala574) vrecko ATP-väzbového miesta. Obsadenie toho vrecka hrá kľúčovú úlohu pri selektivite Tyro3 kinázy voči ostatným kinázam. Vedci vyslovili predpoklad, že skrátením pyridínetylového reťazca zlúčeniny **T42** by mohlo dôjsť k opätovnému vyplneniu alanínového vrecka a tým aj k zlepšeniu Tyro3 selektivity pre tento typ inhibítora. Kryštalografická analýza komplexu zlúčeniny **T47** v ATP-väzbovom mieste receptora Tyro3 potvrdila túto hypotézu. (Obrázok 25)



Obrázok 25. Kryštalická štruktúra a interakcie zlúčeniny T47 v ATP-väzbovom mieste Tyro3 kinázy.

Následné SAR testy zlúčenín obsahujúcich rôzne substituované skupiny benzylamínového typu v polohe 2 na pyrimidínovom kruhu preukázali ich vysokú inhibičnú aktivitu. (Obrázok 26)



Obrázok 26. Výsledky SAR testu zlúčenín s ArCH₂NH nosným skeletomT46.

Metabolická stabilita najzaujímavejších zlúčenín bola analyzovaná pomocou ich inkubácie s ľudskými pečeňovými mikrozómami (HLM). Testované zlúčeniny (**T47** – **T49**) žiaľ preukázali nízku metabolickú stabilitu, pričom metabolizácia týchto zlúčenín viedla k naviazaniu hydroxylovej skupiny na α karbonylový uhlík butyrolaktámového kruhu. Na zabránenie tejto oxidatívnej hydroxylácie sa použil oxazolidín-2-ónový analóg **T50**, ktorý však taktiež preukázal nízku metabolickú stabilitu ale zároveň mal vyššiu inhibičnú aktivitu.

Na základe doterajších štúdií sa podarilo vedcom vyvinúť Tyro3 inhibítory s 2,4diamín-5-karboxamidovým skeletom. Spomínané zlúčeniny preukázali vysokú Tyro3 inhibičnú aktivitu, no nepreukázali dostačujúcu metabolickú stabilitu. Práve optimalizácia metabolickej stability týchto látok bude predmetom ich najbližšieho vedeckého skúmania.¹¹

¹¹ Powell, N. A.; Hoffman, J. K.; Ciske, F. L.; Kaufman, M. D.; Kohrt, J. T.; Quin III, J.; Sheehan, D. J.; Delaney, A.; Sangita, M. B.; Catana, C.; McConnell, P.; Ohren, J.; Perrin, L. A.; Edmunds, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1046-1050.

7. Praktická časť

7.1. Materiál a použité metódy

NMR spektrá boli merané v CDCl₃ a DMSO- d^6 na prístroji Varian Gemini (300 MHz pre H a 75MHz pre C). Chemické posuny sú udávané v ppm, pričom ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS). Priebeh reakcií sme sledovali prostredníctvom TLC analýzy (Merck Silica gel 60 F₂₅₄), na vizualizáciu sme použili UV lampu (254 nm), prípadne pary jódu. Na FLC analýzu sme použili silikagél Merck 60 (40-63 µm). Všetky použité rozpúšťadlá sme čistili a sušili na základe štandardných postupov uvedených v literatúre.¹² Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich.

¹² Armarego, W. Purifications of Laboratory Chemicals, Buttleworth Heinemann, Burlington 2003.

7.2. Syntéza prekurzoru N,4-diaryloxazol-2-amínových inhibítorov VEGFR2 (8)



7.2.1. Syntéza 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (2)

Schéma 6. Syntéza 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (2).

Literatúra:¹³ Literatúra uvádza 85 % výťažok. Napriek viacnásobnému opakovaniu reakcii sme získali len 80 % výťažky.

Experiment: K 500.0 mg (3.7 mmol, 1.00 mol ekv) *p*-aminoacetofenónu **1** rozpusteného v 2.6 ml AN sme za stáleho miešania pri 0 °C po kvapkách pridávali roztok 700.0 mg (3.9 mmol, 1.06 mol ekv) NBS v 2.95 ml AN v priebehu 20 min. Potom sme odobrali časť reakčnej zmesi na TLC analýzu, ktorá preukázala prítomnosť produktu **2** so stopami východiskovej látky **1**. Reakciu sme nechali miešať ešte 3 h, aby zreagovalo celé množstvo východiskovej látky. Následná TLC analýzu potvrdila prítomnosť produktu **2** bez prítomnosti východiskovej látky. Surovú reakčnú zmes sme zahustili pomocou RVO a odparok rozpustili v EA. Túto zmes sme premyli 1 % roztokom NaHCO₃, potom nasýteným roztokom NaCl. Oddelenú organickú vrstvu sme sušili nad Na₂SO₄, prefiltrovali a opäť zahustili pomocou RVO. Posledné stopy prchavých podielov sme odstránili pomocou HV. ¹H-NMR analýza potvrdila prítomnosť čistého produktu **2**. Získali sme 633.0 mg (3.0 mmol, 80 %) **2** vo forme tuhej červenohnedej látky.

¹³ Patent; Illig; Carl, R.; Ballentine, Shelley, K.; Schen; Jinsheng; DesJarlais; Louise, R.; Meegalla; Sanath, K.; Wall; Mark; Wilson; Kenneth. US2007/249647, **2007**, (A1).

Poznámky: K pripravenému roztoku NBS sme museli pridať navyše 0.6 ml AN a zahrievať, kvôli zlej rozpustnosti NBS.

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f (produkt **2**) = 0.60.

Zlúčenina **2** je opísná v literatúre. Existuje ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS (ESI).¹³ **Teplota topenia:** 59-62 °C [EA].¹⁴

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, CDCl₃, MH-001-13) 8.07 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.74 (dd, 1H, J(5,6) = 8.4 Hz, J(2,6) = 2.0, H-C(6)), 6.75 (d, 1H, J(5,6) = 8.4 Hz, H-C(5)), 4.59 (br s, 2H, NH₂), 2.50 (s, 3H, CH₃).



¹⁴ Patent; Baker; Pamela, K.; Kiernan; Jane, A. American Cyanamid Company, US4404222, 1983, A1



Obrázok 27. ¹H-NMR spektrum (MH-001-13) produktu **2**. Nami namerané ¹H-NMR údaje sa zhodujú s údajmi v literatúre.¹³

7.2.2. Syntéza N-(4-acetyl-2-brómfenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (3)



Schéma 7. Syntéza N-(4-acetyl-2-bromfenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (3).

Literatúra:¹⁵ Náš postup sa líšil od postupu z literatúry. Pracovali sme s pomerom východisková látka / (TFA)₂O / $Et_3N = 1.00 / 1.10 / 1.10$ mol ekv, pričom sme dosiahli 62 % výťažok látky **3**. Literatúra uvádza pomer 1.00 / 1.19 / 1.20 mol ekv. so 42 %

¹⁵ Patent; Cai, L.; Pike, V.; Innis, R. US Gov. Health and Human Serv. WO2007/124345, 2007, (A2).

výťažkom látky **3**. V prípade, že sme pracovali s pomermi východisková látka / $(TFA)_2O / Et_3N = 1.00 / 1.53 / 1.55$, získali sme iný produkt **4** so 64 % výťažkom

Experiment: Pred začiatkom reakcie sme reakčnú banku dôkladne vysušili a naplnili Ar. Do roztoku pripraveného rozpustením 150.0 mg (0.70 mmol, 1.00 mol ekv) acetofenónu **2** v 2 ml CH₂Cl₂ abs a ochladeného na 0 °C sme za stáleho miešania pod Ar atmosférou postupne pridali 107.0 µl (161.9 mg, 0.77 mmol, 1.10 mol ekv) (CF₃CO)₂O a 107.0 µl (77.9 mg, 0.77 mmol, 1.10 mol ekv) Et₃N. Takto pripravenú RZ sme nechali miešať počas 1.5 h pri RT. Následná TLC kontrola potvrdila prítomnosť iba produktu **3** bez prítomnosti iných látok. RZ sme premyli vodou (2 x 2 ml), spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄ a sušidlo odfiltrovali. Zvyšné rozpúšťadlo sme odparili pomocou RVO a posledné stopy prchavých podielov sme odstránili pomocou HV. Získali sme 134.7 mg (0.43 mmol, 62 %) červeno-hnedej tuhej látky. Štruktúru produktu **3** potvrdila ¹H-NMR analýza (MH-007-13.fid).

TLC analýza: Et₂O (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie. R_f (produkt **3**) = 0.47.

Zlúčenina **3** je opísná v literatúre. Existuje ¹H-NMR spektrum.¹⁵

Teplota topenia: Látka **3**: 93.0 – 95.0 °C [CH₂Cl₂].

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, CDCl₃, MH-007-13) 8.63 (br s, 1H, NH), 8.49 (d, 1H, J(5,6) = 8.6 Hz, H-C(5)), 8.23 (d, 1H, J(3,5) = 1.9 Hz, H-C(2)), 7.97 (dd, 1H, J(5,6) = 8.6 Hz, J(3,5) = 1.9 Hz, H-C(6)), 2.61(s, 3H, CH₃).





Obrázok 28. ¹H-NMR spektrum (MH-007-13) produktu **3**. Zmerané ¹H-NMR spektrum sa zhoduje s údajmi uvedenými v literatúre.¹⁵

Iný produkt 4 vznikol, ak sme použili nadbytok činidiel.

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, CDCl₃, MH-003-13) 8.5 (s, 1H, NH), 8.39 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.71 (d, 1H, J(3,5) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.49 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(3,5) = 2.1 Hz, H-C(6)), 5.65 (d, 1H, $J(H_B, H_A) = 3.6$ Hz, H_B) 5.35 (d, 1H, $J(H_A, H_B) = 3.6$ Hz, H_A).





Obrázok 29.¹H-NMR spektrum (MH-003-13) surového, neželaného produktu 4. Spektrum je znečistené produktom **3.**

7.2.3. Syntéza N-(2-bróm-4-(2-brómacetyl)fenyl)-2,2,2trifluóracetamidu (5)



Schéma 8. SyntézaN-(4-(2-brómacetyl)fenyl)-2,2,2-trifluóracetamidu (5).

Literatúra:¹⁶ Postup syntézy sme aplikovali na inú východiskovú látku, ako je uvedená v literatúre. V literatúre sa uvádza podobná východisková látka bez naviazaného brómu na benzénovom jadre. Taktiež bol uvádzaný reakčný čas 12 h, pričom náš reakčny čas bol 2 h. Získali sme 60 % výťažok, pričom v literatúre sa uvádza 71 %.

Experiment: Rozpustili sme 100.0 mg (0.32 mmol, 1.00 mol ekv) acetofenónu **3** v 3 ml CHCl₃. Do takto pripravenej zmesi sme v priebehu 10 min pridávali 640 μl roztoku, ktorý obsahoval 51.3 mg (0.32 mmol, 1.00 mol ekv) Br₂ rozpusteného v CHCl₃. RZ sme následne nechali miešať 2 h pri teplote 35 °C, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy. Po 2 h nám TLC analýza potvrdila prítomnosť produktu **5** a stopového množstva východiskovej látky **3**. Reakčnú zmes červenohnedej farby sme extrahovali 5 ml 1 % roztoku NaHCO₃, izolovanú organickú vrstvu sme sušili státím nad Na₂SO₄, potom sme ju prefiltrovali, získaný roztok zahustili na RVO a stopy prchavých podielov odstránili pomocou HV. Získali sme 69.7 mg (0.17 mmol, 56 %) tuhej svetlo-oranžovej látky. Zo surovej zmesi sme urobili ¹H-NMR (MH-011-14.fid), ktoré potvrdilo štruktúru želaného produktu **5**.

¹⁶ Dumur, F.; Mayer, C.R. Helv. Chim. Acta. 2013, 96, 889-896.

Poznámky: RZ sa po premytí roztokom NaHCO₃ odfarbila z tmavohnedej na oranžovobielu.

Zlúčenina 5 je opísná v literatúre. Existuje ¹H-NMR spektrum.¹³

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1 krát vyvolané), na vizualizáciu látok sme použili UV žiarenie. R_f (produkt **5**) = 0.60.

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, CDCl₃, MH-011-14) 8.65 (br s, 1H, NH), 8.53 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(6)), 8.27 (d, 1H, J(3,5) = 2.0 Hz, H-C(3)), 8.00 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(3,5) = 2.0 Hz, H-C (5)), 4.39 (s, 2H, -CH₂Br).





Obrázok 30. ¹H-NMR spektrum (MH-011-14) surového produktu **5**. ¹H-NMR údaje sa zhodujú s udajmi z literatúry. ¹³ Spektrum je znečistené malým množstvom dibrómovaného acetofenónu **6**.



7.2.4. Syntéza N-(2-bróm-4-(2,2-dibrómacetyl)fenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (6)

Schéma 9. Syntéza N-(2-bróm-4-(2,2-dibrómacetyl)fenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (6).

Literatúra:¹⁶ Postup syntézy sme aplikovali na inú východiskovú látku, ako je uvedená v literatúre. V literatúre sa uvádza podobná východisková látka bez naviazaného brómu na benzénovom jadre. Pri postupe sme použili nadbytok Br_2 (2.50 mol ekv) a taktiež predĺžili reakčný čas na 20 h, pričom v literatúre sa uvádza 12 h. Získali sme 60 % výťažok, pričom v literatúre sa uvádza 71 %.

Experiment: Rozpustili sme 50.0 mg (0.16 mmol, 1.00 mol ekv) acetofenónu **3** v 2 ml CHCl₃. Potom sme do zmesi v priebehu 10 min pridávali 770 µl roztoku, ktorý obsahoval 64.2 mg (0.40 mmol, 2.50 mol ekv) Br₂ rozpusteného v CHCl₃. RZ sme nechali miešať 2 h pri teplote 35 °C, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy. Po 2 h nám TLC analýza ukázala prítomnosť monobrómovaného medziproduktu **5** a len stopového množstva produktu **6**. RZ sme preto nechali miešať počas noci pri 45 °C. Po 18 h reakcie nám TLC analýza potvrdila prítomnosť produktu **6** a stopového množstva monobrómovaného medziproduktu **5**. Červenohnedú RZ sme premyli 2-krát s 3 ml 1 % roztoku NaHCO₃. Izolovanú organickú vrstvu sme sušili nad Na₂SO₄, prefiltrovali, zahustili na RVO a posledné stopy prchavých podielov odstránili

na HV. Získali sme 45 mg (0.10 mmol, 60 %) olejovitej tmavo-hnedej látky. Štruktúru produktu **6** sme potvrdili ¹H-NMR analýzou (MH-013-14.fid).

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1 krát vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie. Hodnota R_f (produkt **6**) = 0.67.

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, CDCl₃, MH-013-14) 8.67 (br s, 1H, NH), 8.55 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(6)), 8.38 (d, 1H, J(3,5) = 2.0 Hz, H-C (3)), 8.16 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(3,5) = 2.0 Hz, H-C (5)), 6.56 (s, 1H, -CHBr₂).





Obrázok 31. ¹H-NMR spektrum (MH-013-14.fid) produktu 6.



7.2.5. Syntéza N-(2-bróm-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino oxazol-4-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoracetamidu (8)

Schéma 10. Syntéza požadovaného oxazolového prekurzoru VEGFR2 inhibítorov 8.

Literatúra:¹⁷Postup syntézy sa odlišoval od postupu z literatúry. V literatúre sú uvádzané močovina a 1-brómpropanón ako východiskové látky. Taktiež ako rozpúťadlo je uvádzaný etanol a reakcia prebiehala pri refluxe s výťažkom 65-75 %. Reakčný čas nebol uvedený.

Experiment: Rozpustili sme 900.0 mg (2.31 mmol, 1.00 mol ekv) acetofenónu **5** v 3 ml DMSO. Následne sme pridali 597.6 mg (2.31 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **7** a 127.5 mg (3.00 mmol, 1.30 mol ekv) LiCl abs. Takto pripravenú reakčnú zmes sme nechali miešať 24 h pri 75 °C. Pomocou TLC analýzy sme uskutočnili kontrolu priebehu reakcie, ktorá nám ukázala prítomnosť produktu a neznámych vedľajších látok. Do RZ sme pridali 3 ml 1 % roztoku NaHCO₃ a extrahovali ju s EA (3 x 5 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl (3 x 5 ml), sušili státím nad Na₂SO₄, potom sme zmes prefiltrovali. Nadobudnutý roztok sme zahustili na RVO a posledné stopy prchavých látok odstránili pomocou HV. Získali sme 700.0 mg červenohnedej tuhej látky, ktorú sme čistili pomocou FLC (SiO₂, eluent Hex /EA (1 /

¹⁷ Ge, Y.; Ipek, M.; Massefski, W.; Pan, N.; Tam, S.; Xiang, J.; Suri, V.; Tam, M.; Tobin, J. F.; Xing, Y.; Xu, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2865-2869.

3)). Po čistení sme izolovali 300 mg oranžovej tuhej látky. ¹H-NMR analýza (MH-024-14.fid) potvrdila prítomnosť cieľovej zlúčeniny **8**, ako aj prítomnosť vedľajšieho produktu **9** v pomere 69 / 31.

TLC analýza: EA (1 krát vyvolané), na vizualizáciu látok sme použili UV žiarenie. R_f (látka 8) = 0.55.

¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, DMSO-*d*₆, MH-024-14) Látka **8:** 11.50 or 11.20 (2 x br s, 2 x 1H, 2 x NH), 7.94 (d, 1H, *J*(A4,A6) = 2.3 Hz, H-C_A(6)), 7.72 (dd, 1H, *J*(A3,A4) = 8.8 Hz, *J*(A4,A6) = 2.3 Hz, H-C_A(4)), 7.27 (d, 1H, *J*(A3,A4) = 8.8 Hz, H-C_A(3)), 7.80 (d, 1H, *J*(C2,C6) = 1.9 Hz, H-C_C(2)), 7.48 (dd, 1H, *J*(C5,C6) = 8.4 Hz, *J*(C2,C6) = 1.9 Hz, H-C_C(6)), 7.39 (d, 1H, *J*(C5,C6) = 8.4 Hz, H-C_C(5)), 5.89 (s, 1H, H-C(B)), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 3.16 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃), 0.92 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₂).



¹**H-NMR analýza:** (300 MHz, DMSO- d_6 , MH-024-14) Látka **9:** 11.65 or 11.29 (br s, 2 x 1H, 2 x NH), 8.26 (s, 1H, H-C(B)), 7.83 – 7.76 (dd, d, 2 x 1H, H-C_A(4), H-C_A(3)), 7.66 (d, 1H, J(A4,A6) = 2.0 Hz, H-C_A(6)), 7.47 (dd, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, J(C3,C5) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d, 1H, J(C5,C6) = 8.3 Hz, H-C_C(6)), 7.24 (d, 1H, J(C3,C4) = 1.9 Hz, H-C_C(5)), 7.41 (d

8.8 Hz, H-C_A(3)), 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 3.18 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.2$ Hz, $SO_2CH_2CH_3$), 0.85 (t, 3H, $J(CH_2,CH_3) = 7.2$ Hz, $SO_2CH_2CH_3$).



Obrázok 32 ¹H-NMR spektrum (MH-024-14.fid) zlúčenín 8 a 9.

8. Diskusia

8.1. Teoretická časť

V teoretickej časti mojej bakalárskej práci sme sa zamerali na zlúčeniny, inhibujúce vznik a progres nádorových ochorení. Rakovinové kmeňové bunky (CSCs) predstavujú subpopuláciu nádorových buniek, ktoré sa vyznačujú schopnosťou sebaobnovovania (self-renewal), ktorá je príčinou "návratu" rakovinového ochorenia po aplikácii chemoterapeutickej liečby.

V prvej podkapitole sme opísali niekoľko identifikovaných zlúčenín účinne inhibujúcich dôležité biologické procesy v rakovinových kmeňových bunkách (CSCs). Napr. ionofórne antibitikum **salinomycín**, ktoré efektívne redukovalo počet CSCs v rôznych typoch rakoviny. (Obrázok 33)



Obrázok 33. Salinomycín.

V ďaľšej podkapitole sme opísali niekoľko účinných inhibítorov Mer tyrozín kinázy. Mer kináza podporuje proliferáciu a prežívanie buniek, tvorbu krvných doštičiek a tvorbu cytokínov. Avšak zvýšená aktivita Mer TK často vyúsťuje k onkologickým ochoreniam. Aktivita inhibítorov sa optimalizovala pomocou SAR testov, kde výskumníci skúmali zlúčeniny s rôznymi substituentami naviazanými na hlavnom skelete. Najúčinnejšie Mer inhibítory obsahovali pyrazolpyrimidínový a pyridínpyrimidínový skelet, ktorý kompetetívne blokoval ATP-väzbové miesto Mer kinázy a tým inhiboval jej aktivitu. Zlúčeniny **UNC1062** a **T28** (Obrázok 34) mali

vysokú inhibičnú aktivitu, dobrú selektivitu a nízku neželanú afinitu k hERG iónovému kanálu. Vysoká afinita inhibítora k hERG spôsobuje poruchu činnosti srdca a možnú smrť pacienta.



Obrázok 34. Štruktúra zlúčenín UNC1062 a T28.

V poslednej podkapitole sme opísali Tyro3 kinázu, ktorá rovnako ako spomínané kinázy Mer a Axl, patrí do tyrozín kinázovej rodiny TAM. Inhibíciou aktivity Tyro3 TK dochádza k výraznému zníženiu intenzity zhlukovania krvných doštičiek. Táto kináza preto predstavuje zaujímavý terapeutický cieľ z hľadiska liečby trombózy, navyše bez vedľajších neželaných účinkov. Najaktívnejšie Tyro3 inhibítory obsahovali 2,4-diaminopyrimidín-5-karboxamidový skelet **T46**. (Obrázok 35) Hoci tieto zlúčeniny preukázali vysokú aktivitu, vyznačovali sa žiaľ nízkou metabolickou stabilitou, ktorá bude predmetom ďalšieho skúmania.



Obrázok 35. Štruktúra zlúčenín s nosným skeletom T46.

8.2. Praktická časť

Cieľom praktickej časti bakalárskej práce bola syntéza univerzálneho oxazolového prekurzoru na prípravu skupiny predikovaných potenciálnych VEGFR2 inhibítorov. Naša syntéza vychádzala z komerčne dostupného acetofenónu 1, ktorý sme pomocou NBS pri 0 °C transformovali na 3'-brómacetofenón 2 s výťažkom 80 %. (Schéma 11)



Schéma 11. Návrh a realizácia syntézy navrhnutého prekurzoru 8 predpovedaného VEGFR2 TK inhibítora.

V nasledujúcej kroku sme uskutočnili TFA-chránenie NH₂ skupiny látky **2**. Na základe informácií z databázy Reaxys a SciFinder sme sa rozhodli použiť (TFA)₂O s Et₃N. Pri použití pomeru reaktantov, východisková látka / (TFA)₂O / Et₃N = 1.00 / 1.10 / 1.10 mol ekv, sme získali cieľový produkt **3** v 62 % výťažku. Náš postup sa mierne odlišoval od postupu z literatúry.¹⁴ Literatúra uvádza pomer reaktantov 1.00 / 1.19 / 1.20 mol ekv so 42 % výťažkom produktu. Pri použití pomeru východisková látka / (TFA)₂O / Et₃N = 1.00 / 1.53 / 1.55 sme získali hlavne vedlajší olefinický produkt **4** v 64 % výťažku.

V ďaľšom kroku sme uskutočnili premenu zlúčeniny **3** na jej α -bróm derivát **5**. Reakciu prebiehala za prítomnosti Br₂ v CHCl₃ pri 35 °C. Pri použití väčšieho množstva východiskových látok (približne 5 násobok) sme museli zvýšiť reakčnú teplotu na 45 °C a predĺžiť reakčný čas z 2 h na 24 h.

V poslednom kroku (budovanie oxazolového jadra) sme vychádzali z α brómacetofenónu **5** a močovinového derivátu **7**. V našej výskumnej skupine sme robili identickú reakciu s podobnými východiskovámi látkami a ako rozpúšťadlo sme použili etanol. Táto reakcia preukázala len nízky výťažok produktu. S cieľom zistenia vhodných podmienok oxazolácie a získania väčšieho množstva produktu sme sa rozhodli uskutočniť reakciu v chlórovaných rozpúšťadlách. Ako rozpúšťadlo sme použili 1,2-dichlóretán, ktorého teplota varu bola vyššia ako teplota klasických chlórovaných rozpúšťadiel (CHCl₃, CH₂Cl₂). Do reakcie sme pridali LiCl, ktorý slúžil ako Brönstedtová kyselina a tým katalyzoval reakciu na elektrofilnom karbonylovom uhlíku. Reakciu sme miešali pri 75 °C, pričom sme si všimli, že sa východiskové látky úplne nerozpustili. Priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy, ktorá nám po troch dňoch potvrdila prítomnosť len stopového množstva požadovaného oxazolu **8** a vysokú prítomnosť východiskových látok.

Pri podobnej reakcii v etanole sme spozorovali rýchle odbúranie brómu z α polohy zlúčeniny **5** vplyvom močovinového derivátu **7**. Preto sme sa rozhodli pripraviť α -dibrómovaný acetofenón **6**, pri ktorom sme predpokladali odstupovanie len jedného brómu z α polohy a tým lepšiu reaktivitu s látkou **7** a vyšší výťažok produktu **8**. Bohužiaľ, dibrómovaný acetofenón **6** v reakcii v 1,2-dichlóretáne neukázal vyššiu reaktivitu.

Kvôli zvýšeniu výťažku a rozpustnosti východiskových látok sme identickú reakciu uskutočnili aj v DMSO. Priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC analýzy, ktorá po 24 h preukázala prítomnosť produktu **8** a neznámych vedľajších látok.

Po oddelení vedľajších látok pomocou FLC nám ¹H-NMR analýza ukázala z frakcie produktu štruktúru požadovaného oxazolu **8** ako aj podobne polárnej vedľajšej látky (produktu "inej" cyklizácie) **9** v pomere 69 (**8**) / 31 (**9**). (Schéma 12)



Schéma 12. Mechanizmus vzniku vedľajšieho produktu 9.

Látky sa nám do odovzdania diplomovej práce nepodarilo od seba oddeliť trituráciou, kryštalizáciou ani zistením vhodnej elučnej zmesi na delenie pomocou chromatografie. Je možné, že po uskutočnení následnej couplingovej reakcie s pyridyl-ciničitým činidlom a zmesou zlúčenín **8** a **9** budú mať ich produkty odlišnejšie vlastnosti (napr. polaritu) a bude takáto zmes sa bude dať jednoduchšie rozdeliť pomocou FLC chromatografie.

9. Záver

V teoretickej časti bakalárskej práce sme opísali biologickú funkciu a inhibítory CSCs, ako aj vybraných tyrozín kinázových receptorov Mer a Tyro3.

V praktickej časti bakalárske práce sme navrhli spôsob syntézy a experimentálne pripravili prekurzor **8** určený k produkcii VEGFR2 TK inhibítorov. Celkovo sme pripravili a charakterizovali 7 látok, z toho 4 nové zlúčeny. Cieľovú zlúčeninu **8** sa nám podarilo pripraviť 4 stupňovou syntézou, ale požadovaný oxazol **8** sme získali v zmesi s vedľajšou látkou **9**. Nanešťastie obe uvedené zlúčeniny majú veľmi podobnú polaritu a zatiaľ sme nezistili spôsob ako oxazol **8** separovať od vedľajšej látky **9**. Navrhli sme aj alteratívny postup a to delenie zmesi až po nasledujúcom syntetickom stupni, akým je

"couplingová" reakcia, pomocou ktorej pripravíme a vyčistíme in Silico navrhnutý VEGFR2 inhibítor.