

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

**Syntéza prekursorov N-arylaminooxazolbenzonitrilových
inhibítorov VEGFR2 TK**

Bakalárska práca

Študijný program:	Biochémia
Študijný odbor:	4.1.14. Chémia
Školiace pracovisko:	Katedra organickej chémie, PriF UK
Školiteľ:	Mgr. Peter Šramel
Konzultant:	doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava 2014

Kristína Ferenczyová



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Kristína Ferenczyová
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 N-arylaminooxazolbenzonitrilových 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: VEGFR2 TK je kľúčovým receptorom neovaskularizácie tumorov, N-arylaminooxazol benzonitrilové deriváty boli počítačom predpovedané ako zaujímavé možné inhibítory VEGFR2 TK. Diplomová práca je zameraná na rešerž ohľadom dôležitých TAM TKináz a ich biologických vlastností, ako aj na prípravu niektorých N-arylaminooxazolbenzonitrilových inhibítorových kandidátov.

Kľúčové slová: VEGFR2 TK, oxazol, syntéza

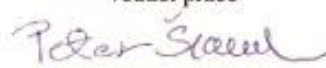
Vedúci: Mgr. Peter Šramel
Katedra: PriF.KOrCh - Katedra organickej chémie
PriF vedúci katedry: doc. RNDr. Martin Putala, CSc.

Dátum zadania: 14.03.2013

Dátum schválenia: 14.05.2014


doc. RNDr. Martin Putala, CSc.
vedúci katedry


študent

vedúci práce


Prehlásenie

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

V Bratislave, dňa 22.5.2014

podpis autora práce

Chcela by som sa poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri spracovaní tejto bakalárskej práce. Moje poďakovanie patrí vedúcemu diplomovej práce Mgr. Petrovi Šramelovi 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 motiváciu, pozitívny prístup, ochotu, podporu a najmä trpezlivosť ďakujem svojej rodine a priateľom, kolegom Marekovi Ondrušovi, Matúšovi Hlaváčovi a Ivanovi Mäsiarovi.

Obsah

1. Abstrakt.....	7
2. Grafický abstrakt	9
3. Abstrakt ¹H-NMR spektier	10
4. Použité skratky	11
5. Úvod.....	12
Ciele bakalárskej práce	13
6. Teoretická časť	14
6.1. Vlastnosti a funkcia TAM rodiny TK receptorov.....	14
6.1.1 Všeobecné vlastnosti rodiny TAM TK receptorov	14
6.1.2 Axl TK receptor	15
6.1.3 Tyro3 TK receptor	15
6.1.4 Mer TK receptor	16
6.1.1 Mutácia MER TK génu – „Pigmentózna dystrofia sietnice oka“	18
6.1.2 Gas6 a proteín S, ligandy rodiny TAM TK receptorov	20
6.1.3 Prenos signálu TAM TK receptormi	21
6.1.4 Signalizácia Axl TK receptora.....	22
6.1.5 Signalizácia Tyro3 TK receptora.....	23
6.1.6 Signalizácia Mer TK receptora	24
6.2. Vývoj vybraných Mer TK inhibítorov	24
6.2.1 Štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK receptora	33
6.2.2 Inhibítory Mer TK receptora.....	36
6.2.3 Inhibícia Mer v JM doméne.....	40
6.3. Vývoj vybraných Tyro3 TK inhibítorov.....	41
7. Experimentálna časť	46
7.1. Syntéza 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (2).....	46

7.2. Syntéza 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu (3).....	48
7.3. Syntéza 4-(2,2-dibrómacetyl)-2-brómbenzonitrilu (4)	50
7.4. Syntéza 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu (5)	52
7.5. Syntéza N-2-brómo-4(2-(5-(etylsufonyl)-2-metoxyfenylamino)-4,5- dihydrooxazol-4-yl)benzonitrilu (7).....	55
8. Diskusia	57
9. Záver.....	61

1. Abstrakt

Kristína Ferenczyová: Syntéza prekursorov N-arylaminooxazolbenzonitrilových inhibítorov VEGFR2 TK.

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie
Bakalárska práca, 61 strán, 2014

Tyrozín kinázové receptory patria do skupiny biomakromolekúl esenciálnych pre život. Sú to oligoméne transmembránové proteíny, ktorých nadmerná expresia je príčinou rakovinových a iných patológií. Selektívnou inhibíciou aktivity spomínaných receptorov môžeme ovplyvniť priebeh ochorenia a prispieť tak k vývoju efektívnej liečby ochorení, ako sú napr. pigmentózna dystrofia sietnice oka, akútna lymfoblastická leukémia a pod.

V teoretickej časti našej práce sme sa zamerali na vlastnosti TAM rodiny TK receptorov a stručný prehľad doteraz pripravených najúčinnnejších inhibítorov rodiny TAM tyrozín kináz. Praktická časť zahŕňa prípravu intermediátov **2**, **3**, **4** a **5** ako východiskových látok na syntézu látky **7**, prekursoru N-arylaminooxazolbenzonitrilového inhibítora VEGFR2 TK.

Kľúčové slová: TAM TK, VEGFR2 TK, oxazol

Abstract

Kristína Ferenczyová: Synthesis of precursor N-arylaminooxazolbenzonitriles inhibitors of VEGFR2 TK.

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

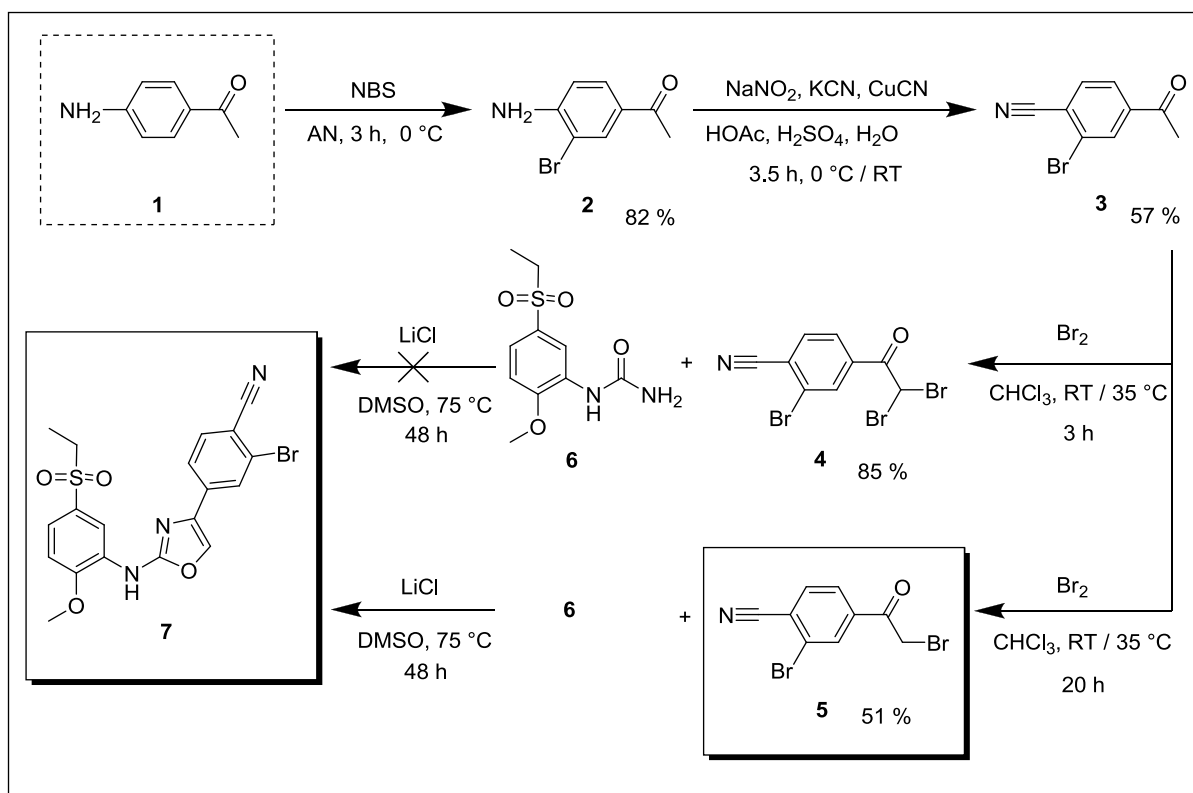
Diploma thesis, 61 pages, 2013

Tyrosine kinase receptors belong to the group of biomacromolecules essential for life. They are oligomeric transmembrane proteins, whose overexpression is the reason of several causes of cancer and other diseases. Selective inhibition of the activity of tyrosine kinase receptors can influence the course of the disease and contribute to the development of effective treatments for diseases such as retinis pigmentosa, acute lymphoblastic leukemia and others.

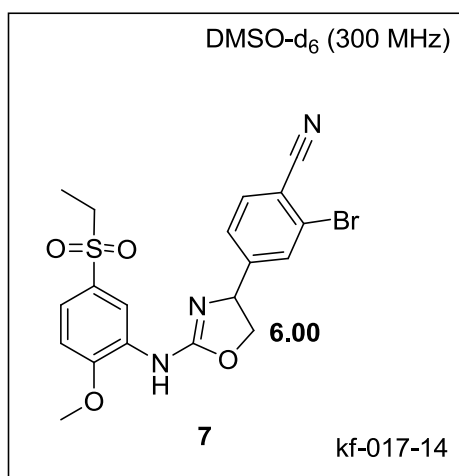
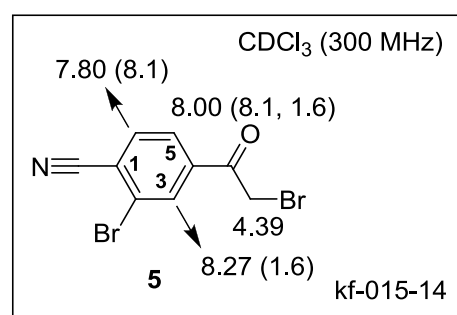
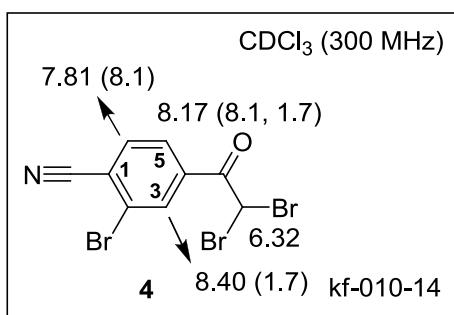
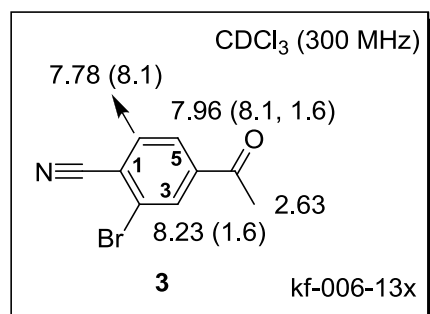
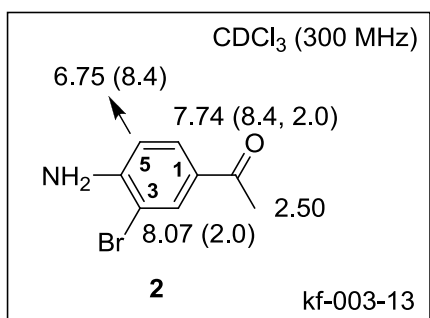
In the theoretical part of our work, we focused on properties of TAM family TK receptors and on recently prepared effective TAM family inhibitors of tyrosine kinases. The practical part includes synthesis of intermediates **2**, **3**, **4** and **5** as starting molecules for synthesis **7** that is a precursor of predicted N-arylaminooxazolbenzonitrile VEGFR2 TK inhibitors.

Key words: TAM TK, VEGFR2 TK, oxazole

2. Grafický abstrakt



3. Abstrakt ^1H -NMR spektier



4. Použité skratky

AN	acetonitril
Cl	farmakologický pojem hovoriaci o rýchlosti odbúraní liečiva z krvi (<i>Clearance</i>)
DMSO	dimetylsulfoxid
EA	etyl acetát
F	orálna biodostupnosť
H	zmes hexánov
HV	vákuum olejovej vývevy (<i>High Vacuum</i>)
IC ₅₀	Koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne aktivita enzýmu na polovicu (<i>Half Maximal Inhibition Concentration</i>)
NBS	N-brómsukcínimid
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
RT	laboratórna teplota (<i>Room Temperature</i>)
RVO	rotačná vákuová odparka
RZ	reakčná zmes
TLC	tenkovrstvová chromatografia (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TK	tyrozín kináza
VL	východisková látka

5. Úvod

Tyrozín kinázové (TK) receptory patria do skupiny transmembránových proteínov, ktoré v organizme plnia širokú škálu funkcií v závislosti od ich štruktúry, umiestnenia a charakteru signalizačných molekúl, s ktorými tieto receptory interagujú. V bunke kontrolujú činnosti ako je proliferácia, migrácia a delenie buniek. V prípade ich nadmernej expresie sú príčinou rôznych nádorových a degeneratívnych ochorení.

Novodobým terapeutickým cieľom v oblasti liečby nádorových ochorení sa stáva selektívna inhibícia TK receptorov pomocou špecifických nízkomolekulových zlúčenín. Funkčný TK inhibítor s potenciálom na terapeutické využitie by mal disponovať vysokou inhibičnou aktivitou voči príslušnému biologickému cieľu, dobrou selektivitou, biodostupnosťou a nízkou toxicitou. Aj napriek rôznym výpočtom a predikciám je obtiažne pripraviť účinný a zároveň selektívny inhibítor pôsobiaci na konkrétnu tyrozín kinázu bez vedľajších účinkov. Príčinou okrem iného je podobnosť ATP väzbového miesta, do ktorého sa väčšinou inhibítory viažu. Vyvinuté inhibítory sú, kvôli ich účinnosti aj napriek menšej selektivite, schvaľované pre liečbu nádorových a ďalších vážnych ochorení.

Ciele bakalárskej práce

1. Spracovanie vybranej literatúry so zameraním na vlastnosti TAM rodiny TK receptorov.
2. Spracovanie vybranej literatúry so zameraním na Mer a Tyro3 TK inhibítory.
3. Návrh metodiky syntézy a príprava intermediátov **2**, **3**, **4** a **5** ako východiskových látok na syntézu **7** - prekursoru VEGFR2 TK inhibítora.
4. Príprava cieľovej zlúčeniny **7** cyklizačnou reakciou intermediátov **4** a **5**.

6. Teoretická časť

6.1. Vlastnosti a funkcia TAM rodiny TK receptorov

6.1.1 Všeobecné vlastnosti rodiny TAM TK receptorov

Jednou z dvadsiatich rodín tyrozín kinázových receptorov je IX. rodina TK receptorov, najčastejšie nazývaná rodina TAM (menej používaný, starší názov je rodina Axl). **Názov TAM je odvodený od počiatočných písmen zástupcov tejto rodiny: Tyro3, Axl a Mer.** Všetky tri receptory TAM rodiny obsahujú enzýmovú doménu - tyrozín kinázu, ktorá katalyzuje prenos fosfátovej skupiny z ATP na tyrozín cieľových proteínov.

Zo štruktúrneho hľadiska sú tieto TK receptory tvorené extracelulárnou, transmembránovou a intracelulárnou doménou. Spája ich niekoľko spoločných štruktúrnych znakov v extracelulárnej doméne, ktorá sa nachádza z vonkajšej strany cytoplazmatickej membrány. Prvým z týchto znakov je ich **interakcia** so špecifickými molekulami – **ligandami**, ktoré sú pre túto rodinu typické. Sú to proteín **Gas6** a **Proteín S**, ktoré patria do skupiny proteínov špecificky závislých na vitamíne K. **Ďalšími spoločnými znakmi extracelulárnej domény TAM receptorov** sú typické, konzervované sekvencie aminokyselín: **dve N-koncové immunoglobulínové domény (Ig)**, ktoré sú v živočíšnej ríši jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich domén. Prítomnosť Ig domény **umožňuje receptoru interagovať s ďalšími bunkami prostredníctvom signalizačných molekúl** na povrchu viažucich sa buniek. Takouto signalizačnou molekulou môže byť **napríklad fosfatidylserín** umiestnený v cytoplazmatickej membráne na fotoreceptorových bunkách. Interakcia medzi bunkami sa tak tvorí **prostredníctvom ligandov**, ktoré vytvárajú pasívny štrukturálny spoj. Posledným spoločným znakom extracelulárnej domény tejto rodiny sú dva fibronektíny typu III – ide o konzervovanú sekvenciu aminokyselín, ktorá sa vyskytuje v adhézných molekulách a v extracelulárnych doménach rôznych typov receptorov.¹

Z funkčného hľadiska sa **TAM receptory podieľajú na** prenose signálu medzi bunkami a na kontrole procesov spojených s bunkovým delením (**proliferáciou**), **migráciou**,

¹ Hafizi, S.; Dahlbäck, B. *Cytokine.Growth..F. R.* **2006**, *17*, 295- 304.

fagocytózou a prežívaním buniek. (Obrázok 1) S procesmi, ktoré sú v bunke kontrolované receptormi rodiny TAM, súvisí aj vznik ochorení v prípade nadmernej expresie týchto receptorov. Týka sa to najmä vzniku **rakovinových, zápalových, autoimunitných a cievnych ochorení.**

Typické vlastnosti, špecifiká a činnosti, ktoré podliehajú kontrole receptormi rodiny TAM, sú opísané v nasledujúcich podkapitolách.¹

6.1.2 Axl TK receptor

Axl **kontroluje prežívanie buniek**, stimuluje bunkové **delenie, migráciu a pôsobí proti apoptóze** buniek. Prvý krát bol izolovaný z buniek pacientov trpiacich chronickou myeloidnou leukémiou. Nadmerná **expresia** tohto receptora **bola detegovaná** v bunkách **epiteliálneho, hematopoetického a mezenchymálneho pôvodu.** Axl je považovaný za onkogén a jeho nadexpresia sa stáva príčinou vzniku pľúcnych karcinómov a nádorových ochorení ako sú **rakovina hrubého čreva, pažeráka a štítnej žľazy.**

Hlavnou **špecifitou Axl je štruktúrna podobnosť extracelulárnej domény s molekulami, ktoré podmieňujú adhéziu buniek.** Sú to **napríklad adhézne molekuly NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule),** ktoré sa nachádzajú **na povrchu neurónu** a zabezpečujú „príľnavosť“ medzi neurónmi. Prítomnosť molekúl zabezpečujúcich schopnosť adhézie v extracelulárnej doméne receptora Axl je pre bunky dôležitá z hľadiska schopnosti agregovať (zhlukovať sa). Aktivita kinázovej domény receptora (fosforylácia cieľových proteínov) však nie je touto schopnosťou vôbec ovplyvňovaná. Jej činnosť je závislá na aktivácii receptora naviazaním zodpovedajúceho ligandu, ktoré vedie ku konformačnej zmene a následnej dimerizácii daného receptora. K aktivácii kinázovej domény v prípade Axl (ale aj Tyro3 a Mer) však môže niekedy dochádzať aj bez vonkajšieho impulzu, čo je kľúčový jav onkogénneho charakteru typický pre všetkých troch zástupcov TAM rodiny.¹

6.1.3 Tyro3 TK receptor

V roku 1994 bol Tyro3 TK receptor objavený dvoma nezávislými skupinami vedcov, ktorí stanovili jeho génovú sekvenciu (u myši aj u ľudí) a dokázali tak jeho príbuznosť s Axl TK receptorom. Receptor **Tyro3 TK** bol následne zaradený do rodiny TAM TK. V súčasnosti **je známy aj pod názvami Sky, Vrt, Rse, DTK, Tif.**

Tyro3 TK receptor je **exprimovaný najmä v bunkách centrálnej nervovej sústavy a v mozgu**. Okrem toho **pôsobí aj v osteoklastoch pri regulácii odbúravania kostného tkaniva a má anti-apoptické účinky**.

Poznatkov o spôsobe, akým sa Tyro3 receptor **podieľa na vzniku a rozvoji rakovinových ochorení** je doposiaľ pomerne málo. Dôkazom o vplyve receptora Tyro3 na tieto ochorenia je detekcia jeho nadmernej expresie v tumorových bunkách pacientov trpiacich myeloidnou leukémiou v porovnaní s expresiou Tyro3 v zdravých bunkách izolovaných u tých istých pacientov.

Ďalší dôkaz o vplyve nadmernej expresie Tyro3 na vznik nádorových ochorení bol zaznamenaný v plazmatických bunkách (bunky konečného štádia vývoja B-lymfocytov) u pacientov trpiacich Kahlerovou chorobou.¹ Ide o nádorové ochorenie plazmatických buniek, ktoré v dôsledku nepretržitého delenia vytvárajú tzv. mnohopočetný myelóm.² Nadmerné bunkové delenie v plazmatických bunkách je proces, ktorý je stimulovaný práve receptorom Tyro3.³

6.1.4 Mer TK receptor

Mer TK receptor bol po prvý krát identifikovaný vo forme protoonkogénu c-eyk v tele sliepky, ktorý pochádzal z vtáčieho retrovírusu RPL30.¹

Ku vzniku tohto patogénneho protoonkogénu dochádza po vytvorení mutácie v regulačnom gène, ktorý stimuluje aktiváciu bunkového delenia prostredníctvom molekúl, ktoré kóduje. Sú to napr. rastové faktory, receptory rastových faktorov a regulačné proteíny. Prítomnosť veľkého počtu kópii produktov protoonkogénu v bunke má za následok nekontrolovateľné a nepretržité delenie buniek, v dôsledku čoho dochádza k vzniku nádorov.⁴

5

Mer TK receptor v tele človeka **dostal názov podľa miesta pôsobenia – „monocytes and epithelial and reproductive tissues“** – monocytové (monocyty – najväčšia forma bielych krviniek), epitelové a reprodukčné tkanivá.

² Raab, M.S.; Podar, K.; Breitkreutz, I.; Richardson, P.G.; Anderson, K.S. *Lancet*. **2009**, 374, 324 – 339.

³ <http://nemoci.vitalion.cz/mnohocetny-myelom/>

⁴ <http://sk.wikipedia.org/wiki/Onkog%C3%A9n>

⁵ www.lfuk.sk/files/ref/proto.doc

Mer TK receptor je exprimovaný v reprodukčných tkanivách a v monocytoch, pričom v týchto bunkách je jeho expresia takmer výlučná (expresia ďalších prítomných receptorov je v porovnaní s Mer minimálna), preto sú monocyty vhodné objekty na štúdium expsie, vlastností a činnosti Mer TK.

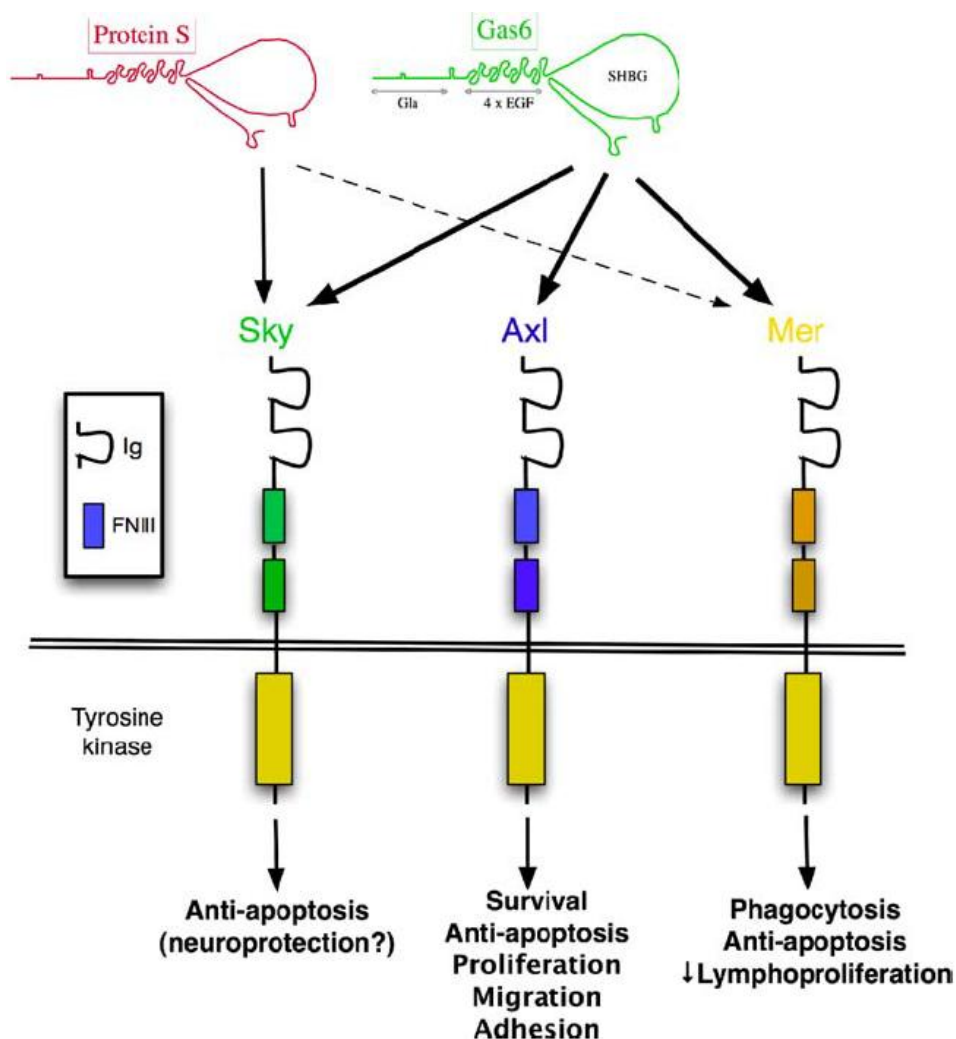
Vplyv expsie Mer v rakovinových bunkách je dodnes málo objasnený. Bolo však pozorovaných niekoľko typov rakovinových buniek, v ktorých bola detegovaná nadmerná expresia Mer v porovnaní s jeho expresiou v zdravých bunkách. Takéto pozorovania vo všeobecnosti viedli k spájaniu nadmernej expsie Mer so vznikom rakoviny. Konkrétnym príkladom je zaznamenanie nadmernej expsie Mer TK receptoru pozorovanej u pacientov postihnutých zhubným ochorením lymfatického systému (lymfómom) v porovnaní s expresiou v zdravých lymfocytoch B a T. Ten istý jav bol pozorovaný pri porovnaní expsie Mer v bunkách hypofýzy zasiahnutej adenómom (ktorý vyvoláva poruchy v produkcii adrenokortikotropného hormónu) so zdravými bunkami hypofýzy. Expresia Mer TK receptoru je ale naopak podpriemerná v bunkách hypofýzy zasiahnutej adenómom, ktorý vyvoláva poruchy v produkcii prolaktínu. Vzhľadom na uvedené fakty nie je možné jednoznačne spájať vznik rakoviny určitého typu buniek s nadmernou expresiou Mer.

Mer TK receptor sa od ostatných TK receptorov rodiny TAM líši svojou schopnosťou kontrolovať fagocytózu určitých typov buniek, ako sú napr. makrofágy (bunka fagocytujúca bunky, ktoré zahynuli apoptózou), neuróny a epitelové pigmentové bunky.

Dôkaz o kontrole fagocytózy receptorom Mer priniesol experiment na potkanoch, v ktorom umelo vyvolaná delécia nukleotidov v géne MERTK (gén kódujúci Mer TK receptor) podmieňuje ochorenie zvané pigmentózna dystrofia sietnice. Fenotypovým prejavom tejto mutácie je neschopnosť fagocytózy epitelových buniek. Za normálnych okolností, Mer TK receptor reguluje prestavbu cytoskeletu pre efektívny priebeh fagocytózy v zdravých bunkách. Následok pigmentózne dystrofie je porucha videnia v šere, poprípade úplná strata videnia.

Dôkazom **vplyvu Mer TK receptoru v organizme pri vytváraní imunity** bol pokus na myšiach, ktoré trpeli stratou videnia. V ich organizme bola potlačená expresia všetkých troch receptorov rodiny TAM, čoho následkom bol významný nárast počtu apoptických buniek. Okrem toho bol u tých istých myší pozorovaný aj nárast koncentrácie protilátok, čo naznačovalo neschopnosť organizmu bojovať s „odpadom“ a potrebu vytvárať autoimunitnú odpoveď. V skutočnosti na vyvolanie autominutnej odpovede úplne stačí prítomnosť Mer TK receptoru, Toto tvrdenie je podložené pokusom na myšiach s jediným funkčným receptorom -

Mer TK receptorom. Z vyššie uvedeného vyplýva, že **expresia Mer je dôležitá pri udržiavaní imunitnej homeostázy v organizme.**¹



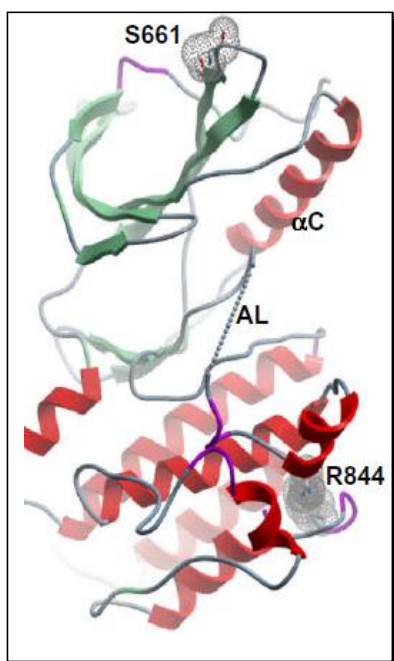
Obrázok 1. Zjednodušené znázornenie štruktúry jednotlivých členov rodiny TAM TK receptorov (Tyro3 = Sky, Axl a Mer), príslušných ligandov, ktoré s nimi interagujú (Protein S a Gas 6) a procesov, ktoré v bunke ovplyvňujú.¹

6.1.1 Mutácia MER TK génu – „Pigmentózna dystrofia sietnice oka“

Pigmentózna dystrofia sietnice (retinitis pigmentosa) je genetické dedičné ochorenie, pri ktorom dochádza k defektom fotoreceptorov a k ich stratám. V počiatočných štádiách ochorenia dochádza k strate periférneho videnia a šeroslepote, posledným štádiom je úplná

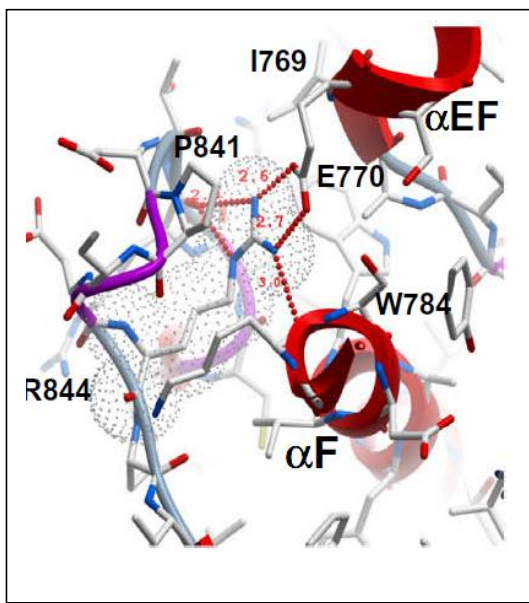
slepota. Vedci sa pri vyvíjaní liečby uberajú smerom ku genetickým zásahom, náhrade sietnice a neuroprotekcii.⁶

Vznik **pigmentóznej dystrofie sietnice** je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený mutáciami v géne kódujúcom **Mer TK receptor** (MERTK gén). V porovnaní s MERTK génom zdravých buniek boli identifikované **bodové mutácie** (zámeny nukleotidov), prípadne ďalšie zmeny indikujúce zlý splicing proteínu Mer v procese posttranskripčných úprav. **Najčastejšie pozorovaná bodová mutácia je** tzv. missense mutácia R844C, ktorej dôsledkom je **zámena aminokyseliny Cys844 za Arg844 (R844C)**. (Obrázok 2 a 3) **Prejavom** tejto zmeny je **zníženie kinázovej aktivity Mer TK receptora a pretočenie proteínu v priestore**. V pigmentových bunkách je na rozdiel od väčšiny doteraz uvedených komplikácii **problémom práve nízka expresia Mer**.



Obrázok 2. Kryštálová štruktúra Mer kinázy pacientov s pigmentóznou dystrofiou sietnice. Aminokyselina R844 je lokalizovaná mimo ATP väzbového miesta. N-helixy sú zvýraznené zelenou farbou a α C-helix je zvýraznený červenou farbou.¹⁰

⁶ <https://www.orpha.net/data/patho/SK/Retinitis-pigmentosa.pdf>



Obrázok 3. Kryštálová štruktúra znázorňujúca dôsledok *missense* mutáciu R844C v kinázovej doméne Mer TK receptora. K vzniku nových väzieb došlo medzi R844 a aminokyselinou E770 (Glu770), ktorá je súčasťou ATP väzbového miesta.¹⁰

Napriek tomu, že dochádza k ďalším mutáciám v MERTK géne, ktoré sú pozorované len u pacientov s pigmentóznou dystrofiou sietnice, ich vplyv na ochorenie nebol do dnešného dňa objasnený. Napríklad, „*missense*“ mutácia S661C spôsobujúca zmenu aminokyselín v kinázovej doméne, nemá vplyv na aktivitu Mer kinázy ani v zdravom organizme. Napriek tomu sa však bežne vyskytuje u pacientov s pigmentóznou dystrofiou sietnice bez zjavnej príčiny. Cys661 však neformuje väzby, ktoré sú považované za dôležité pre kinázovú aktivitu. Jeho zámena za inú aminokyselinu preto nie je natoľko významná.

Z uvedených zistení sa dá vyvodit' niekoľko záverov. Dôsledok *missense* mutácií v géne MERTK (zmena aminokyseliny) môže, ale nemusí mať za následok poruchu kinázovej aktivity. Zároveň sa nepodarilo jednoznačne potvrdiť, že *missense* mutácia R844C je príčinou ochorenia pigmentoznej dystrofie sietnice. Vysvetlenie vzniku ochorenia a spojenie s mutáciami v géne MERTK, sú predmetmi ďalšieho skúmania.¹⁰

6.1.2 Gas6 a proteín S, ligandy rodiny TAM TK receptorov

Gas6 a proteín S sú proteínové ligandy charakteristické pre rodinu TAM TK receptorov a ich spoločným znakom je ich závislosť od vitamínu K. Názov Gas6 je skratkou odvodenou z počiatočných písmen génu, ktorý ho kóduje („growth arrest-specific

gene 6“). Proteín S je fyziologický antikoagulant, ktorého nízka hladina v krvi môže vyvolať poruchy zrážanlivosti krvi a tvorby trombocytov.

Oba proteíny sú na N-konci posttranslačne upravené pripojením zvyškov kyseliny γ -karboxyglutámovej (Gla doména). Práve doména Gla poskytuje obom ligandom naviazaným na receptorech možnosť špecificky interagovať s negatívne nabitou fosfolipidovou membránou apoptických buniek. Tak môžu slúžiť ako signálne molekuly pre bunky, ktoré fagocytujú apoptické bunky.

Za doménou Gla sa nachádza doména, ktorá svojou stavbou pripomína slučku a skladá sa zo štyroch za sebou nasledujúcich epidermálnych rastových faktorov (EGF). Na C-konci oboch proteínov sa nachádza globulínová doména (SHBG), ktorá interaguje s globulárnymi pohlavnými hormónmi. Oba proteíny interagujú s receptormi rodiny TAM priamo doménou SHBG, zatiaľ čo doména Gla má podpornú funkciu (len u Gas6).

Vo všeobecnosti, interakcia ligandu Gas6 s receptormi rodiny TAM a následné transformačné zmeny v bunke, ktoré táto interakcia spôsobí (proliferácia, migrácia a adhézia), boli demonštrované niekoľkými štúdiami. Existuje však len veľmi málo dôkazov o interakcii proteínu S s receptormi rodiny TAM, ktorá by vyvolala v bunke podobné zmeny. Jedným z príkladov je kostná resorpcia, ktorú v osteoklastoch reguluje Tyro3. Ligandom, ktorý ho aktivuje, je v tomto prípade práve proteín S. Obidva ligandy sa však v rovnakej miere podieľajú na sprostredkovaní apoptických buniek fagocytujúcim bunkám, ktoré ich „požierajú“.¹

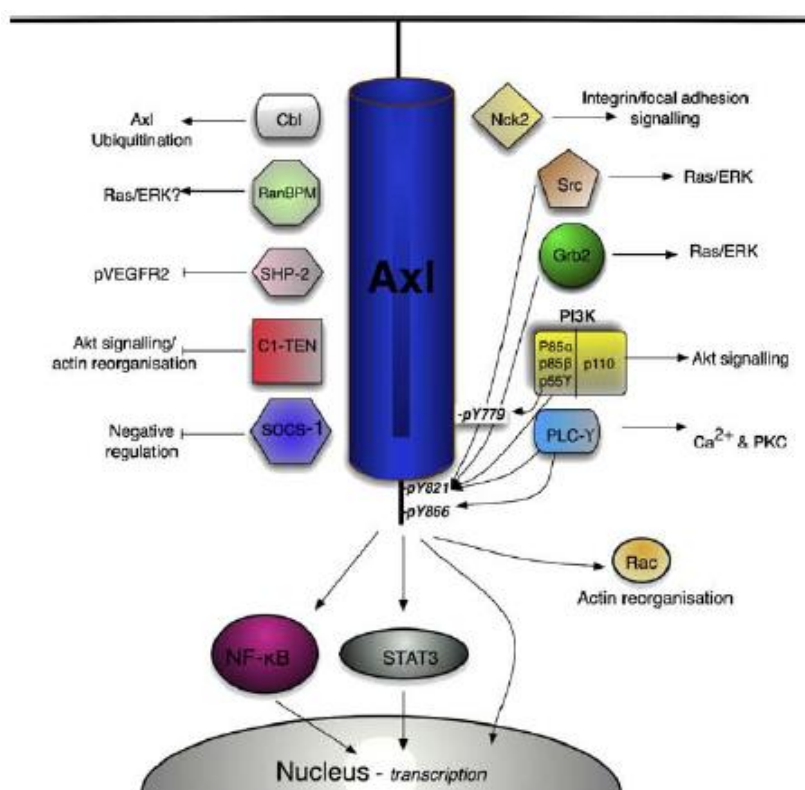
6.1.3 Prenos signálu TAM TK receptormi

K prenosu signálu dochádza v momente interakcie ligandu s extracelulárnou doménou monomérneho receptora a následnou sériou konformačných zmien receptora, ktoré vedú k tvorbe diméru so susedným receptorom. Dimerizácia susediacich receptorov vedie k ich aktivácii. Receptory rodiny TAM sú nebezpečné svojou schopnosťou samovoľnej aktivácie.¹

6.1.4 Signalizácia Axl TK receptora

Do iných signálnych dráh okrem vlastnej dráhy (Axl signálna dráha) sa Axl zapája interakciou s ďalšími enzýmami a proteínmi, **napríklad** s enzýmom patriacim do rodiny tensinových proteínov - **tyrozín-fosfatázou C1-TEN**.¹ Spoločným znakom v štruktúre enzýmov tensinovej rodiny je prítomnosť špecifickej podjednotky - fosfoproteínu tensinu so schopnosťou adhézie. Zástupcovia tensinovej rodiny túto schopnosť využívajú na interakcie s ďalšími molekulami. **C1-TEN fosfatáza interaguje s aktínovými vlákнами a reguluje tak migráciu buniek.**⁷ Interakciou s C1-TEN sa Axl zapája do signálnej dráhy regulujúcej bunkovú migráciu.

Rovnakým spôsobom sa Axl prejavuje v mnohých iných významných signálnych dráhach. V porovnaní s ostatnými zástupcami rodiny TAM TK receptorov sa do ďalších signálnych dráh zapája najviac. (Obrázok 4)

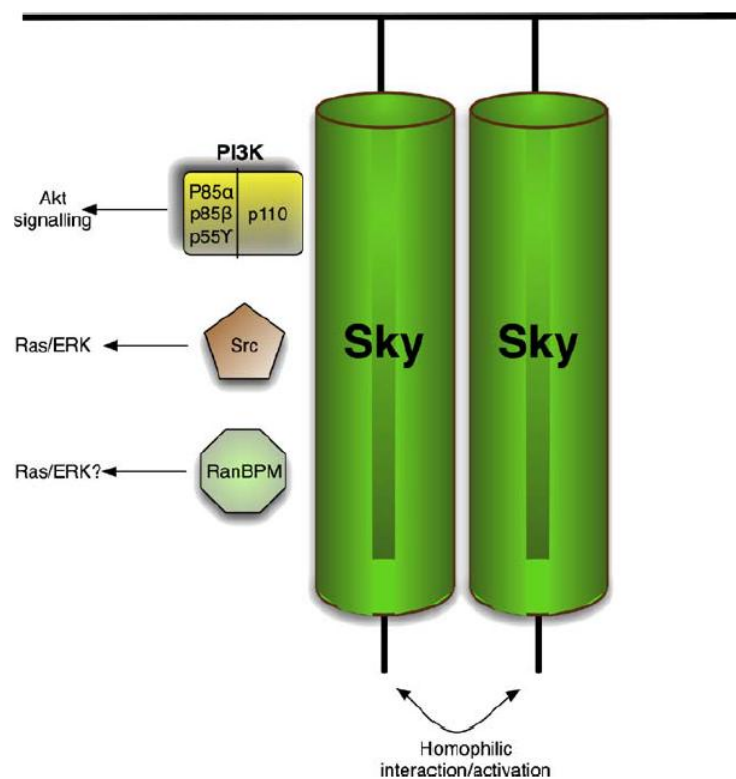


Obrázok 4. Zjednodušené zobrazenie signálnych dráh, do ktorých sa Axl TK receptor zapája a príslušných proteínov, s ktorými interaguje.¹

⁷ Hafizi, S.; Alindri, F.; Karlsson, R.; Dahlbäck, B. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2002**, 299, 793-800.

6.1.5 Signalizácia Tyro3 TK receptora

Tyro3 TK receptor, podobne ako Axl, nepôsobí len vo vlastnej signálnej Tyro3 dráhe, ale aj v mnohých ďalších.¹ Napríklad, **Tyro3 TK receptor sa interakciou s fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát 3 kinázou (PI3K) zapája do signálnej dráhy Akt**, ktorá kontroluje **proliferáciu, diferenciáciu a prežívanie buniek** (podobne ako Axl signálna dráha). (Obrázok 5) Do signálnej dráhy Akt sa interakciou s PI3K zapájajú zástupcovia celej rodiny TAM TK receptorov.⁸

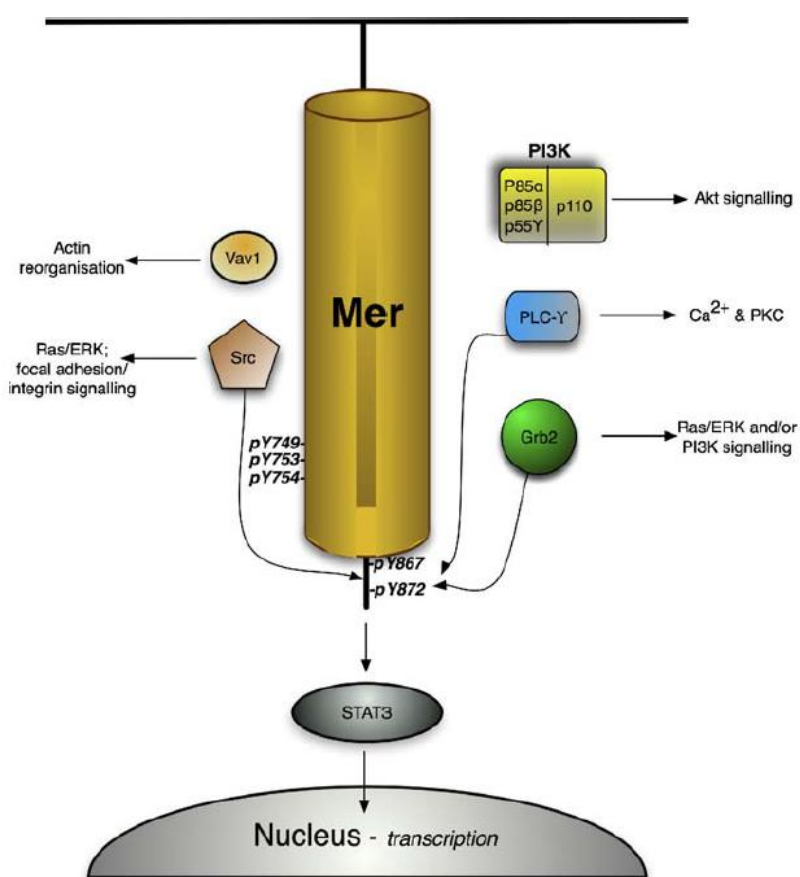


Obrázok 5. Zjednodušené znázornenie interakcie dvoch monomérov Tyro3 a interakcie Tyro3 s proteínmi príslušných signálnych dráh.¹

⁸ Zhong, Z.; Wang, Y.; Guo, H.; Sagare, A.; Fernández, J. A.; Bell, R.D.; Barrett, T.M.; Griffin, J. H.; Freeman, R.S.; Zlokovic, B. V. *J. Neurosci.* **2010**, *17*, 15 521 – 15 534.

6.1.6 Signalizácia Mer TK receptora

Mer TK receptor je rovnakým spôsobom zapojený okrem **vlastnej dráhy Mer** aj do **d ďalších signálnych dráh** interakciou so špecifickými proteínmi príslušných dráh. (Obrázok 6) Rovnako, ako Axl, aj Mer sa zapája do signálnej dráhy kontrolujúcej prestavbu cytoskeletu. Prestavba cytoskeletu je však v tomto prípade konrolovaná **inerakciou** receptoru Axl s adaptorovým proteínom Vav1.¹



Obrázok 6. Zjednodušené znázornenie pôsobenia Mer v ďalších signálnych dráhach interakciou s príslušnými proteínmi týchto dráh.¹

6.2. Vývoj vybraných Mer TK inhibítorov

Inhibícia akútnej lymfoblastickej leukémie

Akútna lymfoblastická leukémia (ALL) je zhubné nádorové ochorenie patriace medzi **30 % najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení u detí**, pričom je známym

niekoľko foriem tohto ochorenia. Na väčšinu z nich je vyvinutá efektívna liečba. **Jednou z menej liečiteľných foriem je ALL T – lymfocytov**, ktorá je v 60 - 75 % prípadoch liečiteľná len čiastočne. Stabilizovaný stav pacienta, bez recidívy, sa obvykle pohybuje v rozmedzí od 3 do 5 rokov. Liečba pozostáva z niekoľkofázovej chemoterapie podávanej v rôznych kombináciách s možnými vedľajšími účinkami (spomalenie rastu, poškodenie orgánov a vznik sekundárnych zhubných nádorov) a postupným rozvojom rezistencie na aplikovanú liečbu.

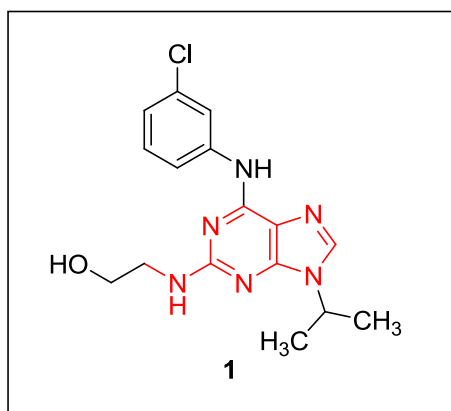
Nadmerná (ektopická) expresia Mer v T-lymfocytoch pacientov s ochorením ALL bola niekoľko krát experimentálne potvrdená nezávislými skupinami vedcov. Experimenty tiež potvrdili, že Mer nie je v zdravých bunkách T (aj B) lymfocytov ektopicky exprimovaný u ľudí ani u myši v žiadnom štádiu vývoja organizmu. **Následkom ektopickej expresie Mer je prežívanie T-lymfocytov** a zároveň vytvorenie rezistencie týchto buniek voči jednotlivým zložkám aplikovanej liečby.

Terapeutickým cieľom, pri vývoji efektívnych liečiv na ochorenie ALL, môže byť práve ovplyvnenie aktivity receptora Mer. Liečba ALL inhibíciou expresie Mer je perspektívna, čo potvrdzuje aj experiment, pri ktorom modifikáciou expresie Mer TK receptora v T-lymfocytoch vyvolávajúcich ALL došlo k eliminácii prežívania nádorových buniek a k zlepšeniu celkového stavu organizmu, na ktorom bol experiment uskutočnený.

Riešením problematickej liečby ALL sa preto stáva vývoj selektívnych inhibítorov pôsobiacich výlučne na Mer v bunkách T-lymfocytov. Takto pripravené inhibítory by mohli v kombinácii s chemoterapiou vytvoriť účinnú liečbu ALL, či neskôr dokonca viesť k zníženiu dávky chemoterapie a teda k eliminácii vedľajších nežiaducich účinkov liečby.

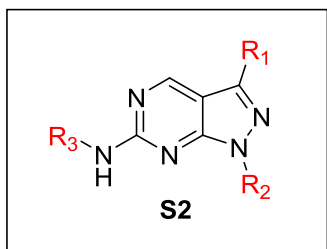
Z hľadiska selektivity je **Mer** vhodným cieľom záujmu, pretože jeho **štruktúra je zo 40 % odlišná od ostatných dvoch členov rodiny TAM – Tyro3 a Axl TK** receptorov. Cieľom tejto kapitoly je zhodnotiť vlastnosti najúčinnnejších a najselektívnejších nedávno testovaných zlúčenín s Mer inhibičnou aktivitou. Sériu pripravených štruktúr bola podrobená SAR optimalizácii, nie len na Mer receptor, ale aj vzhľadom na ostatných členov TAM rodiny. Výsledkom testu je hodnota IC_{50} zodpovedajúca koncentrácii inhibítora, ktorá je potrebná na zníženie aktivity kinázy na 50 %. Štruktúry s najnižšími hodnotami IC_{50} sú najvhodnejšie. Posledným, ale veľmi dôležitým kritériom pre praktické a efektívne využitie pripravenej zlúčeniny na možnú liečbu ochorenia ALL je jej netoxickosť.

Známy pyrazolpyrimidínový inhibítor C52 (zlúčenina **1**) pôsobiaci inhibične na Mer je neselektívny a preto je pre využitie pri liečbe ALL nepoužiteľný.⁹ (Obrázok 7)



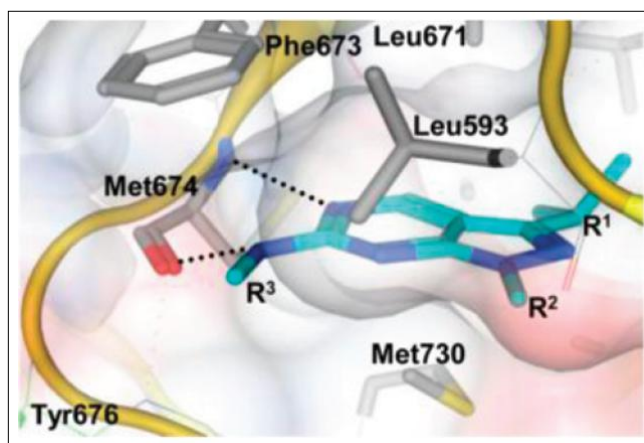
Obrázok 7. Štruktúrny vzorec inhibítora C52 (červenou farbou je zvýraznený pyrazolpyrimidínový (purínový) skelet).⁹

Na základe kryštalografickej analýzy komplexu inhibítora **1** (C52) v ATP väzbovom mieste Mer TK bol zachovaný základný pyrazolpyrimidínový heterocyklický skelet (zlúčenina **2**) a rozhodlo sa uskutočniť rôznu modifikáciu postranných substituentov.⁹ (Obrázok 9)



Obrázok 8. Štruktúrny vzorec pyrazolpyrimidínového základného skeletu (**S2**) s postrannými substituentmi R¹, R² a R³.⁹

⁹ Liu, J.; Yang, Ch.; Simpson, C.; DeRyckere, D.; Deussen, A. V.; Miley, M. J.; Kireev, D.; Norris-Drouin, J.; Sather, S.; Hunter, D.; Korboukh, V. K.; Patel, H. S.; Janzen, W. P.; Machius, M.; Johnson, G. L.; Earp, H. S.; Graham, D. K.; Frye, S. V.; Wang, X. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 129-134.



Obrázok 9. Kryštálová štruktúra pyrazolpyrimidínového skeletu s postrannými substituentmi R^1 , R^2 a R^3 v aktívnom mieste Mer TK.⁹

Novo navrhnuté inhibítory Mer podľa vzoru C52 boli upravované tak, aby aj po obmene substituentov v charakteristických polohách ostali zachované špecifické interakcie medzi skeletom inhibítora a aminokyselinami v ATP väzbovom mieste enzýmu. Hodnota IC_{50} a biodostupnosť sú vlastnosti zlúčeniny.

Syntéza bola navrhnutá tak, aby bolo možné v rámci SAR analýzy jednoducho meniť substituenty v polohách, ktoré práve analyzovali. Ako inšpirácia pri navrhnutí základného skeletu poslužil účinný inhibítor C52. Je to doteraz najúčinnnejší, ale neselektívny inhibítor na Mer TK.

V prvom kroku bola ketoskupina východiskovej látky 1-H-3,4-pyrimidín(6-metyltio)-pyrazol-2-ónu (**2**) nahradená brómom, pôsobením bromačného činidla $POBr_3$ v acetonitrile za vzniku zlúčeniny **3**. Cesta „a“ zahŕňa Suzukiho coupling zlúčeniny **3** s vhodným derivátom borónovej kyseliny za vzniku zlúčenín **4**, pričom došlo k pripojeniu príslušného R^1 -reťazca (arylu/alkylu/alkenylu/heteroarylu) na pyrazolový kruh. R^2 -reťazec bol následne pripojený na pyrazolový kruh pomocou elektrofílnych substitučných reakcií za vzniku zlúčenín **5**. Oxidáciou s meta-chlórperoxybenzoovou kyselinou (MCPBA) a následnou substitúciou metylsulfónovej skupiny za R^3 -NH- skupinu, vznikla cieľové zlúčeniny **6**. (Schéma 1)

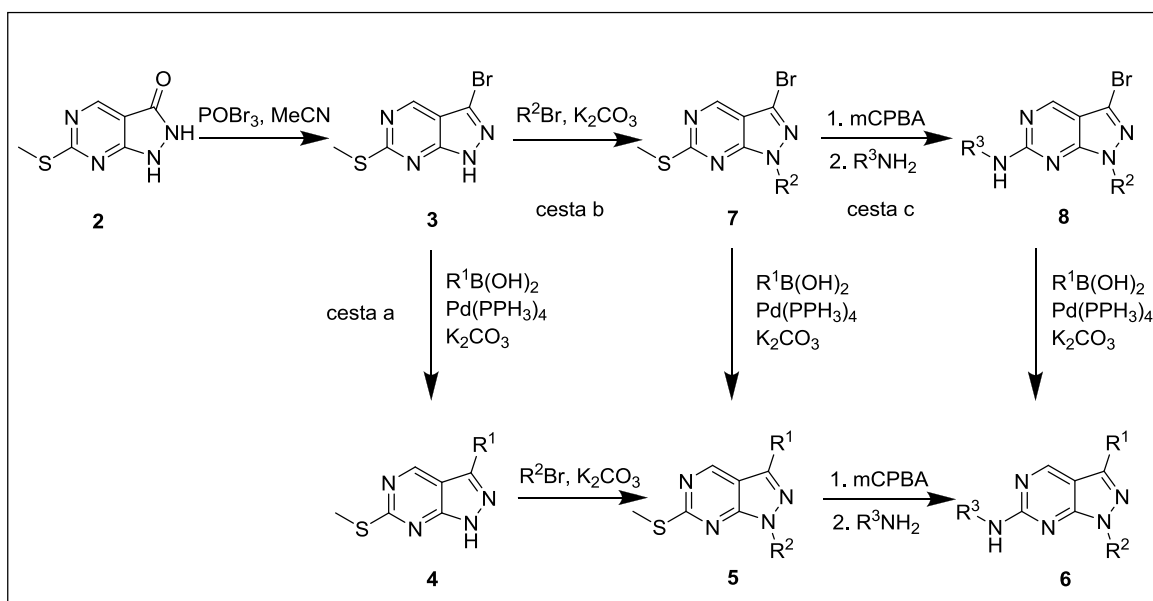
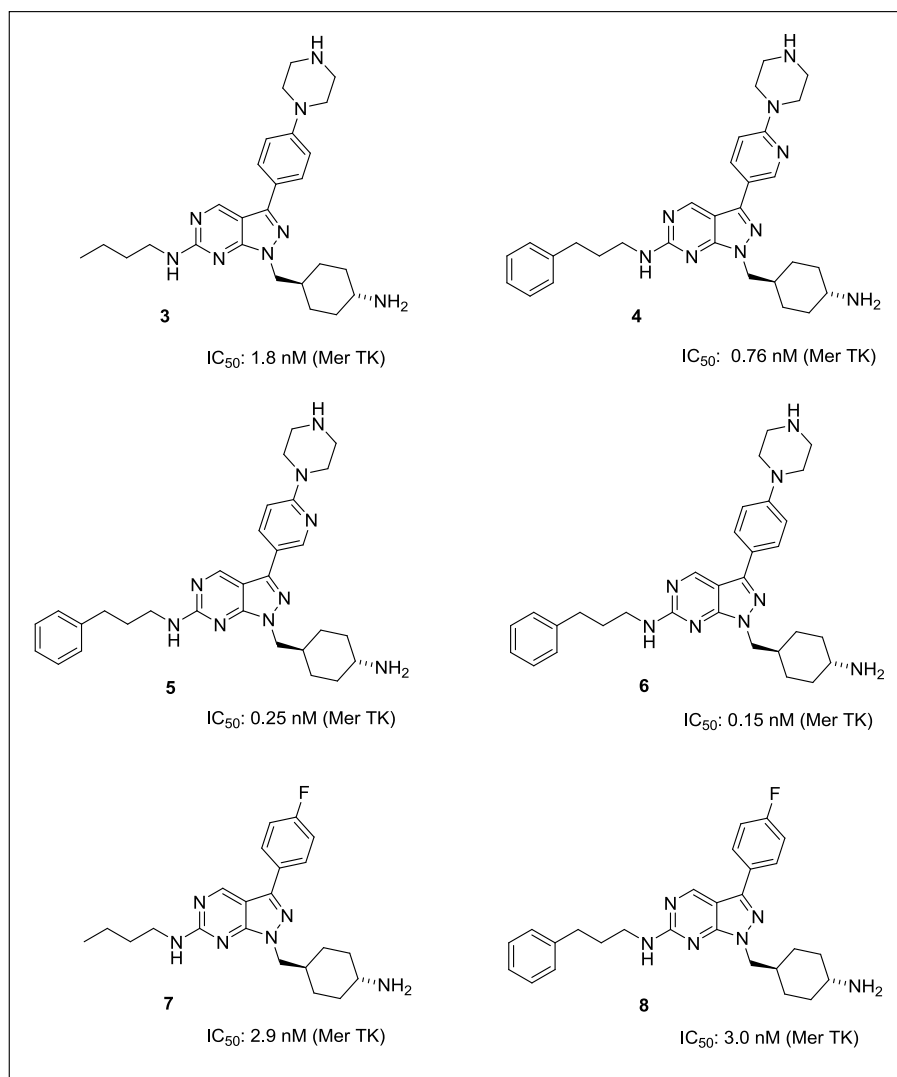


Schéma 1. Syntéza pyrazolpyrimidinového skeletu s postrannými substituentmi R^1 , R^2 a R^3 .⁹

Obmenou jednotlivých krokov tak mohli pripraviť rôznymi cestami tie isté štruktúry, pričom cesty boli zvolené na základe potreby SAR testu s cieľom preskúmať vplyv konkrétnych substituentov.

Všetky pripravené zlúčeniny boli podrobené analýze SAR, ktorou sa sleduje závislosť biologickej aktivity na chemickej štruktúre molekuly. Na záver bolo vybraných šesť najselektívnejších štruktúr s najlepšimi výsledkami hodnôt IC_{50} . Test bol zameraný na vývoj potenciálnych inhibítorov na Mer TK, pre porovnanie však uviedli aj hodnoty IC_{50} ostatných dvoch členov rodiny TAM. (Obrázok 10, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**)



Obrázok 10. Štruktúrne vzorce inhibítorov Mer TK a ich IC_{50} hodnoty zistené pre inhibíciu Mer TK.⁹

Tabuľka 1. Výsledky SAR vývoja inhibítorov Mer TK, pre porovnanie s uvedenými hodnotami IC_{50} pre všetky tri receptory rodiny TAM. Pre Mer TK je uvedená aj K_i hodnota.⁹

Zlúčenina	Mer	Mer	Axl	Tyro3
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
3	1.8	2.7	12	14
4	0.76	1.4	3.7	22
5	0.25	0.73	4.0	2.9
6	0.15	0.56	1.4	2.9
7	2.9	4.3	37	5.0
8	3.0	2.0	16	48

Analógy **3 - 8** sa ukázali byť ATP kompetitívne inhibítory.

V pozícii R^1 majú najlepší vplyv na IC_{50} hodnotu substituenty v nasledovnom poradí aryl > alkenyl > alkyl. Dva vybrané substituenty v polohe R^1 boli použité vo finálnych štruktúrach (elektrónodonorný para-substituovaný fenyl alebo pyridinyl). K zvýšeniu aktivity prispieva pripojenie piperazínu do para polohy. (Obrázok 10, zlúčeniny **3**, **4**, **5** a **6**).

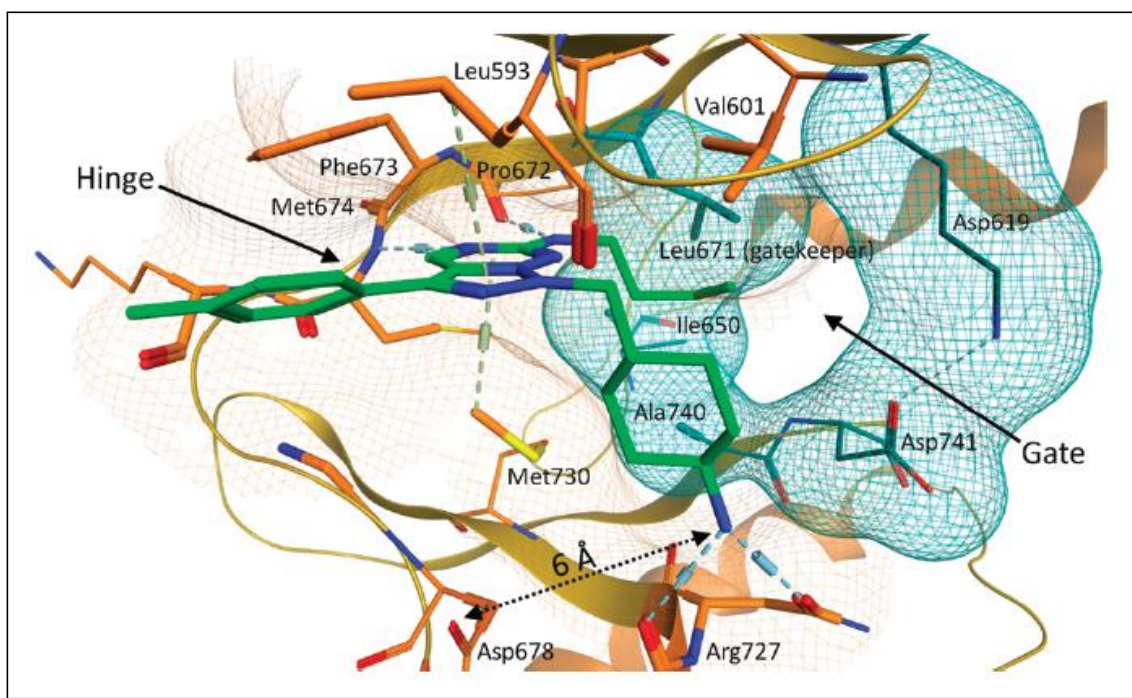
V pozícii R^2 je dôležité vybrať substituent, ktorý bude svojou polárnou časťou dostatočne vzdialený od pyrazolového kruhu. Ako optimálny R^2 substituent, spĺňajúci hlavné kritérium, bol vybraný metylcyklohexylamín. (Obrázok 10, zlúčeniny **3** - **8**)

V pozícii R^3 sa ukázalo veľmi dôležité zachovať sekundárny amín NH na sformovanie vodíkových väzieb s „hinge“ doménou aktívneho miesta, pričom existuje závislosť aktivity na dĺžke reťazca pripojeného cez NH skupinu. Výber substituenta v R^3 pozícii je veľmi dôležitý, pretože nepodmieňuje len rozdielnu inhibičnú aktivitu jednotlivých analógov na Mer kinázu, ale aj selektivitu Mer v rámci TAM rodiny. Najlepšie výsledky, dosiahli štruktúry s pripojením butylu (zlúčenina **3** a **7**), prípadne fenylbutylu (zlúčeniny **4**, **5**, **6** a **8**), pričom fenyl je v dostatočnej vzdialenosti (3C od NH skupiny). (Obrázok 10)

Na základe výsledkov hodnôt IC_{50} voči všetkým všetkým trom TAM receptorom pri analýze SAR boli vybrané štruktúry s najväčším inhibičným účinkom na Mer. K_i (**väzobná konštanta**) je uvedená len pre Mer TK receptor a je ukazovateľom inhibičného potenciálu jednotlivých zlúčenín. Je definovaná ako **koncentrácia inhibítora, pri ktorej dochádza k zníženiu maximálnej rýchlosti enzýmovej reakcie na polovičnú rýchlosť**. Všetkých šesť uvedených zlúčenín sa zaraďuje medzi kompetitívne inhibítory a zároveň sú všetky aktívnejšie voči Mer ako voči Axl a Tyro3.

Najaktívnejšie zlúčeniny, potenciálny inhibítor **6** a potenciálny inhibítor s najmenšou molekulovou hmotnosťou **7**, **boli testované aj na ďalších 72 kináz**. Len **pri troch kinázach bol pozorovaný väčší ako 50 % inhibičný účinok** zlúčenín **6** a **7** – FLT3 (82 % a 82 %), MAPKAPK2 (94 % a 92 %), Ret (79 % a 59 %).

Potenciálny inhibítor 7 UNC569 sa pri stanovení kryštálovej štruktúry ukázal zaujímavý svojím netradičným spôsobom interakcie s ATP väzbovým miestom Mer kinázy. (Obrázok 11)



Obrázok 11. Kryštálová štruktúra potenciálneho inhibítora 7 (UNC569) v ATP väzbovom mieste Mer TK.⁹

Substituent v pozícii R^3 (lipofilný butyl na NH skupine) sa naviazal v malom adenínovom vrecku, zatiaľ čo predpoklad bol, že obsadí lipofilné hydrofóbne vrecko. Na obrázku je butylový reťazec smerujúci smerom ku Leu671 zvýraznený zelenou farbou a NH skupina, ktorá interaguje s Pro672, modrou farbou. Tento zaujímavý jav je pravdepodobne spôsobený zvláštnou stavbou ATP väzbového miesta Mer kinázy. Niekoľko špecifických znakov aktívneho miesta Mer kinázy: (1) **Mer má pomerne objemnú aminokyselinu v pozícii “gatekeepera” - Leu671**, pred vstupom do hydrofóbneho vrecka určujúceho špecifitu kinázy, (2) hydrofóbne vrecko je ďalej formované aminokyselinami Ile650, Ala740, Asp741 a Lys619, (3) dve aminokyseliny Leu671 a Ile650, ktoré sú blízko miesta kde sa spája C-helix a N-helix (pod gatekeeperom Leu671), zabráňujú vstupu inhibítora do hydrofóbneho vrecka. **Ile650, jedna z aminokyselín formujúca vstup do hydrofóbneho vrecka, nie je konzervovaná v rámci rodiny TAM, čo sa dá potenciálne využiť pri hľadaní selektívnych štruktúr využívajúcich práve ojedinelú prítomnosť tejto aminokyseliny u Mer kinázy. Namiesto Ile650 obsahujú receptory Axl a Tyro aminokyseliny metionín a alanín.** Substituent v pozícii R^2 (metylcyklohexylamín) obsadzuje sacharidové vrecko, pričom aminoskupinou tvorí vodíkové väzby s Arg727. Opäť dochádza k neobvyklému javu, pretože na základe pôvodného predpokladu sa očakávalo, že ionizovaný dusík amino skupiny vytvorí energeticky silnejšie väzby s Asp678 podobne ako v prípade zlúčeniny C52.

Substituent v pozícii **R¹** **interaguje najviac s rozpúšťadlom. Úpravou jeho štruktúry možno regulovať rozpustnosť**, prípadne iné farmakokinetické vlastnosti danej zlúčeniny. Tieto neobvyklé výsledky predstavujú nové možnosti pri príprave potenciálnych inhibítorov.

Bola testovaná schopnosť inhibítora **7** utlmiť fosforyláciu v kinázovej doméne Mer v ľudských B-lymfocytoch vyvolávajúcej lymfoblastickú leukémiu (IC₅₀ 141 nM). Inhibítor **7** bol testovaný aj na základe najnižšej molekulovej hmotnosti. Farmakokinetické vlastnosti zlúčeniny **7** boli skúmané *in vivo* na myšiach po perorálnom a intravenóznom podaní. Miera odbúrania **7** (Cl = 19.5 ml/min/kg) určuje, akou rýchlosťou je liečivo ireverzibilne odstránené z tela obličkami. Hodnota distribučného objemu (V_{ss} = 5.83 l/kg) určuje vysokú mieru distribúcie látky krvnou plazmou do tkanív. Dobrá hodnota orálnej biodostupnosti (57 %) hovorí o tom, že látka bola organizmom dobre absorbovaná a došlo k malým stratám pri efekte prvého prechodu črevnou stenou až do obehového systému.

V tejto kapitole boli sumarizované najzaujímavejšie výsledky SAR analýzy, na základe ktorých sa zlúčenina **7** ukázala ako mimoriadne zaujímavá, predovšetkým svojim spôsobom interakcie v ATP väzbovom mieste receptora Mer TK. Dobrá Mer selektivita a a priaznivé výsledky biologických testov posúvajú tento potenciálny inhibítor medzi najsľubnejšie zlúčeniny pre možné terapeutické využitie.

Ďalšie Mer TK inhibítory

Nedávne výskumy Mer TK receptora a jeho špecifických vlastností viedli k niekoľkým dôležitým zisteniam, ktoré môžu byť dobrým základom pre vývoj účinných a selektívnych inhibítorov. Pri experimentoch sa vedci zamerali najmä na analýzu presného mechanizmu, akým dochádza k premene substrátu na produkt a na presný opis väzieb, ktoré vznikajú medzi substrátom a aminokyselinami v ATP väzbovom mieste receptora.¹⁰

Negatívny vplyv ektopickej expresie Mer u pacientov s uvedenými ochoreniami vyplýva z procesov, ktoré v bunke kontroluje. Napríklad, v pigmentových bunkách sietnice oka a v makrofágoch je to proces **fagocytózy**, v ostatných bunkách sú to procesy spojené hlavne s **proliferáciou a apoptózou** buniek. Defekty pri zhlukovaní krvných doštičiek (ktoré môžu vyústiť až do **tromboembólie** – pľúcnej embólie, čo je sprievodná potenciálna komplikácia

¹⁰ Huang, X.; Finerty, P. Jr.; Walker, J. R.; Butler-Cole, Ch.; Vedadi, M.; Schapira, M.; Parker, S. A.; Turk, B. E.; Thompson, D. A.; Dhe-Paganon, S. *J. Struct. Biol.* **2009**, 165, 88-96.

žilnej trombózy) a **nárast hladiny apoptických buniek** v organizme sú procesy tiež spájané s expresiou Mer.

Vývoj selektívnych a netoxických zlúčenín zamedzujúcich ektopickú expresiu Mer by mohol mať významný vplyv pri podávaní účinnej liečby spomínaných ochorení, ktorá by viedla k úplnému uzdraveniu pacienta. Do dnešného dňa však **nebol pripravený selektívny inhibítor Mer TK, ktorý by zároveň nebol pre organizmus toxický. Dôvodom neselektivity štruktúr je práve podobnosť aktívnych miest v kinázovej oblasti všetkých troch receptorov rodiny TAM** a ďalších tyrozín kinázových receptorov.¹⁰

Dôkazom, že príprava a využitie takéhoto inhibítora by mohli viesť k uzdraveniu, sú nedávne úspechy pri liečbe myeloidnej leukémie inhibítorom Imatinib, ktorý s Bcr-Abl vytvára komplex, ktorým zabraňuje naviazaniu ATP do ATP väzbového miesta. Imatinib nie je pre organizmus toxický, má 97 % biologickú dostupnosť a vedľajšie účinky nepredstavujú pre pacientov zvlášť extrémne riziko (bolesti svalov, alergické reakcie a kŕče). Chimerický proteín Bcr-Abl s tyrozín kinázovou aktivitou, produkt transkripcie a translácie fúzovaných génov v 22 chromozóme, vykazuje vysokú aktivitu a sám má za následok aktiváciu ďalších proteínov. V bunke kontroluje procesy ako bunkový cyklus a delenie buniek. Vznik a expresia chimerického Bcr-Abl tak vyústí do nádorového ochorenia zvaného myeloidná leukémia.^{11, 12}

6.2.1 Štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK receptora

ATP väzbové miesto, lokalizované v intracelulárnej časti kinázovej domény Mer TK receptora, je **zložené z dvoch hlavných častí** – karboxy-terminálneho helixu (C-terminálny helix, **α C helix**) a amino-terminálneho zoskupenia helixov (**N-terminálne zoskupenie helixov**). Na **α C helixe sú lokalizované dôležité sekvencie aminokyselín, podieľajúce sa na vytvorení väzby so substrátom. N-terminálne zoskupenie helixov obsahuje regulačné sekvencie** kontrolujúce priebeh fosforylačnej reakcie.

Zo štruktúrneho hľadiska je N-terminálne zoskupenie helixov zložené z piatich β -helixov, sformovaných do β -barelu, ktorý sa nachádza blízko α C helixu. **N a C helixy sú spojené „pántom“ závesným regiónom (angl. *hinge*), resp. tzv. „chrbticou katalytickej domény kinázy“. Priestor sformovaný medzi N a C-terminálnymi helixami, pripomínajúci**

¹¹ Rohrbacher, M.; Hasford, J. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **2009**, 22, 295-302.

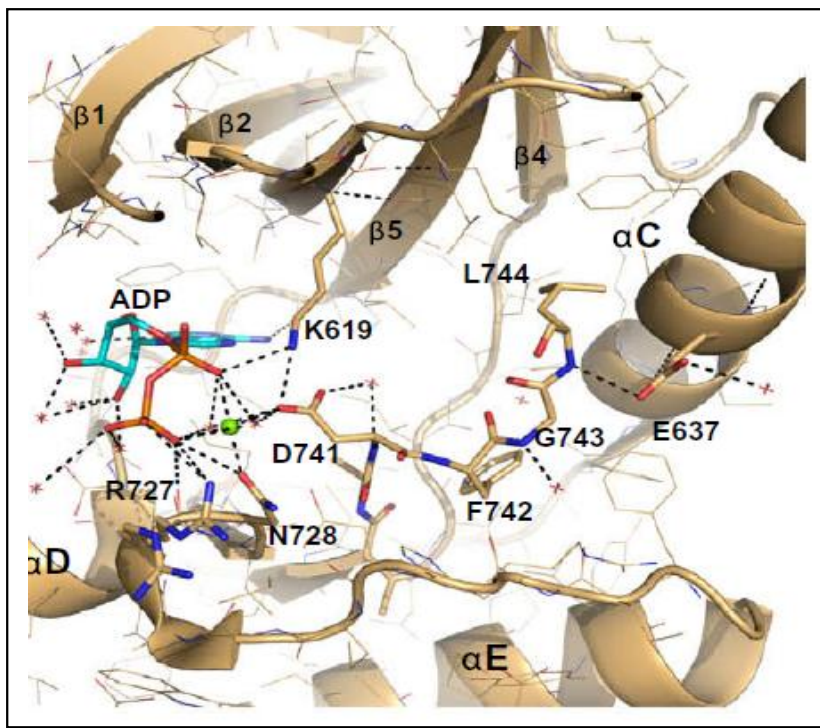
¹² Lugo, T. G.; Pendegrast, A. M.; Muller, A. J.; Witte, O. N. *Science* **1990**, 247, 1079-1082.

vrecko, **je ATP väzbové miesto kinázy** (miesto, kam sa viaže ATP, a tiež pripravený inhibítor, aby došlo k zabráneniu fosforylácie substrátu v aktívnom mieste kinázy).

Kinázo­vá doména kon­krétne ATP väzbové miesto, má niekoľko charakteristík. Jednou z nich sú špecifické väzby medzi substrátom a kinázou, ktoré vyplývajú zo zastúpenia aminokyselín v okolitej štruktúre formujúcej aktívne miesto. **K formovaniu väzieb medzi substrátom a kinázou prispievajú**, alebo sa tvorby väzieb priamo zúčastňujú **konzervované sekvencie aminokyselín**, ktoré sa medzi kinázami opakujú a sú nevyhnutné pre správnu aktivitu kinázy. Príkladom takejto esenciálnej sekvencie je tzv. **DFG sekvencia lokalizovaná na jednom z N-helixov**, ktorej názov je skratkou troch aminokyselín, ktoré ju tvoria – aspartát, fenylalanín a glycín. **Táto sekvencia určuje začiatok aktivačnej slučky, zatiaľ čo druhá konzervovaná sekvencia, APE (skratka troch aminokyselín) tvorí jeho koniec. Prítomnosť tejto sekvencie je dôležitá z niekoľkých dôvodov. Prvým dôvodom je tvorba špecifických väzieb (napr. aspartát stabilizuje Mg^{2+} ión) a druhým dôvodom je vytvorenie podmienok, za ktorých je kináza aktívna.**¹⁰ Kináza je aktívna len v prípade, že sa **nachádza v tzv. „DFG-in konformácii“**, pretože vtedy je v ATP väzbovom mieste naviazané ATP. V opačnom prípade je **kináza neaktívna**, neobsahuje naviazané ATP a hovoríme, že sa **nachádza v „DFG-out konformácii“**. Táto zmena súvisí aj s **α C-helixom**, ktorý vplyvom zmeny na N-helixe mení svoju konformáciu na tzv. **„ α C-Glu-in konformáciu“**, a **nachádza sa tak bližšie k ATP. Môže tak dôjsť k neželaným interakciám medzi α C-helixom a fosfátom z ATP. Kináza je aktívna len v prípade, že je α C-helix v tzv. „ α C-Glu-out konformácii“**, teda s ATP neinteraguje.¹³

Na Obrázok 12 je znázornená kryštalová štruktúra komplexu nukleotidového ligandu ADP v ATP väzbovom mieste Mer kinázy, ktorá zobrazuje všetky spomenuté prvky.

¹³ Shan, Y.; Seeliger, M. A.; Eastwood, M. P.; Frank, F.; Xu, H.; Jensen, M.; Dror, R. O.; Kuriyan, J.; Shaw, D. E. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 139 – 144.



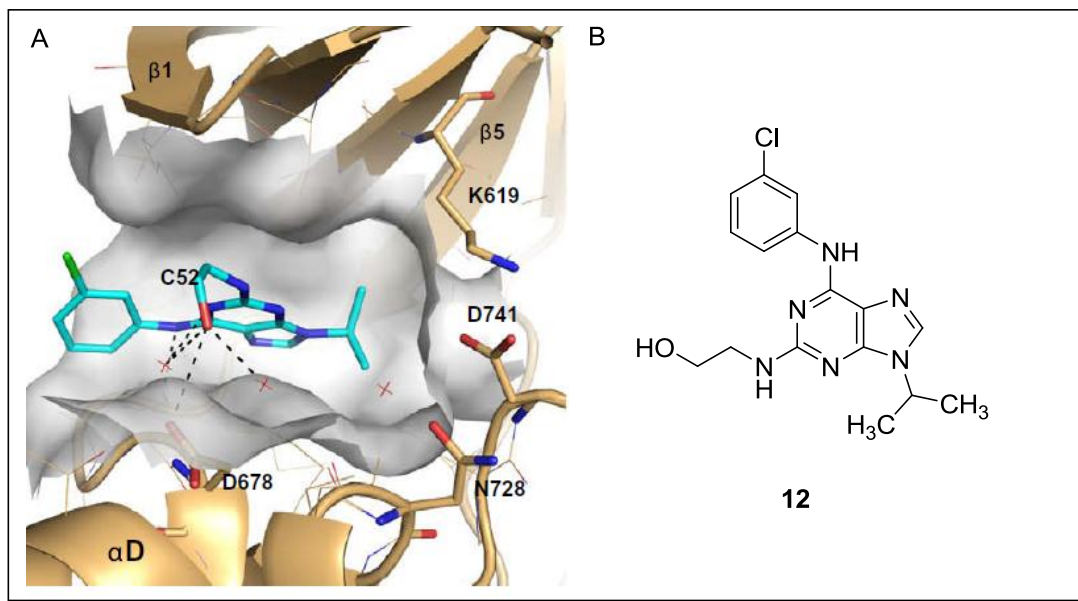
Obrázok 12. Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s nukleotidovým ligandom ADP.¹⁰

Karboxylová skupina D741 (zvýraznené červenou farbou) tvorí vodíkové väzby (prerušované čiary) s: (1) Mg^{2+} iónom (zvýraznené zelenou farbou), (2) s amino skupinou Lys619 (K619, zvýraznené modrou farbou), (3) s amidovou skupinou Asn728 (N728, zvýraznené modrou farbou). D741 netvorí žiadne vodíkové väzby so substrátom ADP (zvýraznený tyrkysovou farbou) a ani s druhou DFG aminokyselinou, Phe742 (F742). Konzervovaná aminokyselina Leu671 (nezobrazená) sa nazýva aj „gatekeeper“ - „strážca brány“. Názov je odvodený od umiestnenia - je lokalizovaná pred hydrofóbnym vreckom, ktoré zabezpečuje špecificitu enzýmu.

Obe konformácie (α C-Glu-out konformácia a DFG-in konformácia) boli potvrdené v katalytickej doméne funkčnej Mer TK pri porovnávaní s kryštálovými štruktúrami katalytických domén niektorých kináz (Abl, Src, Egfr a Met kinázy), ktoré sa vyskytujú v oboch spomínaných konformáciách. Detailné poznanie ATP väzbového miesta môže pomôcť pri predikcii nových potenciálnych inhibítorov.¹⁰

6.2.2 Inhibítory Mer TK receptora

Na Obrázok 13 je kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK so známym purínovým inhibítorom C52 (zlúčenina **12**). Aktívne miesto Mer kinázy je štruktúrne prispôsobené ATP (špeciálne vrecko sformované pre adenín a ribózu).



Obrázok 13. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom C52 (**12**), (B) Štruktúrny vzorec inhibítora C52 (**12**).¹⁰

Inhibítor C52 (**12**) bol pripravený tak, aby svojou štruktúrou pripomínal vlastný substrát Mer kinázy (teda ATP) a preto dobre zapadol do oboch prítomných vreciek. Izopropyllová skupina vyplňa priestor sformovaný aminokyselinami Ala617, Lys619, Met730, Asp741 a Leu671 (na Obrázok 13 sú znázornené len Lys619-K619 a Asp741-D741). Etanolamínový substituent umiestnený medzi dusíkmi purínového heterocyklu v polohe C4 vyplňa dutinu sformovanú aminokyselinami Leu593 a Val601 (nezobrazené) a hydroxylovou skupinou vytvára vodíkové väzby s Asp678 (D678) a Arg727 (nezobrazené). Ďalšie vodíkové väzby vznikajú (1) medzi Asp678 (D678) a inhibítorom C52, (2) medzi aminokyselinou Met 674 a dusíkom anilínu a N7 dusíkom purínového heterocyklu inhibítora **12**. V porovnaní s komplexom kináza-ADP je N-zoskupenie helixov komplexu kináza-**12** o 5 ° posunuté bližšie k αC-helixu. (Obrázok 13)

Rozsiahlym testom bolo podrobených ďalších 157 známych inhibítorov tyrozín kináz, ktorých efektivita sa posudzovala na základe hodnoty IC₅₀ a priemernej hodnoty teploty

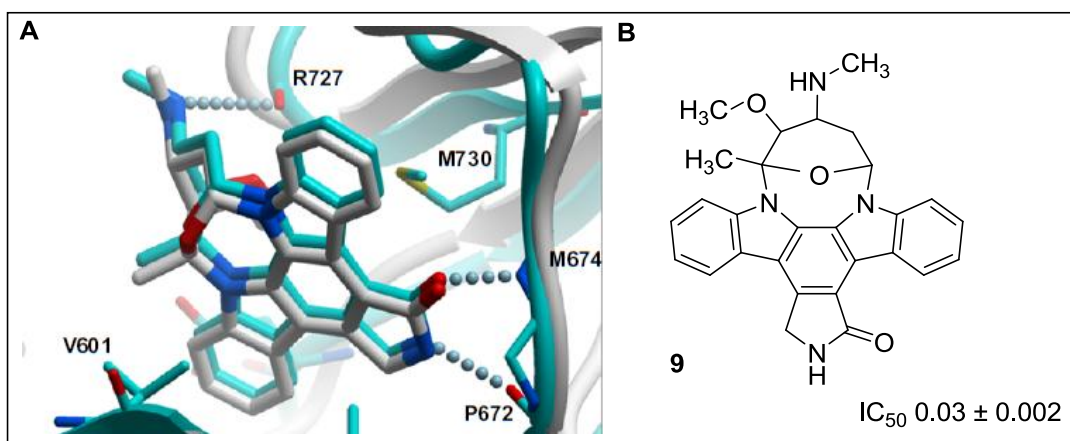
topenia T_m (Mer TK s naviazaným ligandom). Nameraná teplota topenia Mer s inhibítorom v ATP väzbovom mieste bola porovnaná s teplotou topenia $T_m = 40.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mer TK bez ligandu). Teplota topenia enzýmu sa naviazaním ligandu zvyšuje a komplex sa tak stáva termicky stabilnejším. Len šesť zlúčenín z predošlého výberu sa ukázalo ako potenciálne využiteľných. Ich názvy, príslušné teploty topenia T_m a IC_{50} sú uvedené v **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** (zlúčeniny **9-14**).

Tabuľka 2. Výsledky analýzy SAR a uvedené hodnoty teplôt topenia jednotlivých inhibítorov.¹⁰

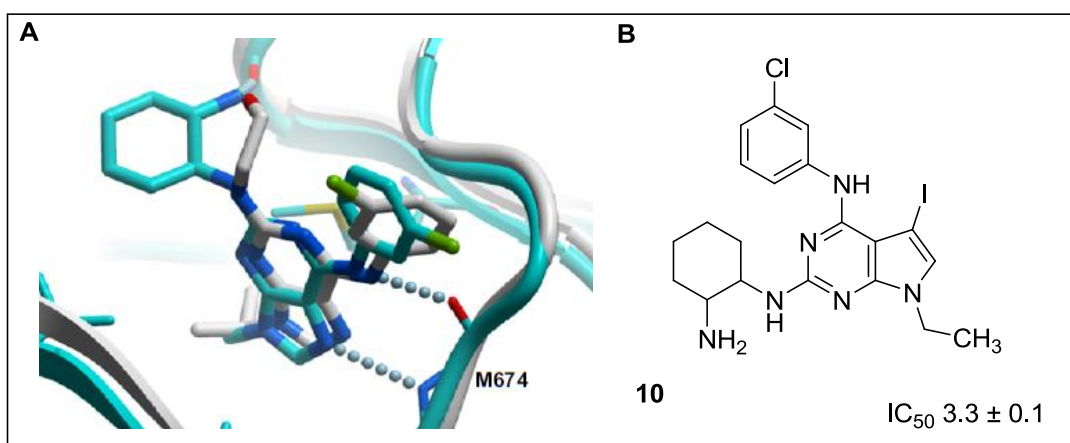
Číslo zlúčeniny	Názov inhibítora	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	IC_{50} (μM)
9	Staurosporín	51.2 ± 0.1	0.03 ± 0.002
10	Cdk1	48.1 ± 0.1	3.3 ± 0.1
11	5-jodotubercidín	46.8 ± 0.2	6.3 ± 0.4
12	BIM 9 (bisindolylmaleimid)	44.6 ± 0.1	5.3 ± 0.8
13	C52 (12)	44.2 ± 0.1	11.3 ± 2.1
14	SU9516	43.8 ± 0.4	6.3 ± 0.4

Najlepšie hodnoty IC_{50} boli namerané pôsobením inhibítora staurosporín a najhoršie hodnoty boli namerané pôsobením inhibítora C52. Pyrazolpyrimidínový základný skelet inhibítora C52 je napriek tomu veľmi obľúbeným skeletom pri syntéze nových kinázových inhibítorov kvôli jeho kompatibilite s ATP väzbovým miestom Mer kinázy.

Ani jedna zo šiestich zlúčenín však nie je vhodná na použitie pri liečbe pacientov z dôvodu toxicity zlúčenín a ich pomerne vysokej neselektivity (**9-14**). Výsledky testov však môžu pomôcť ďalšiemu výskumu, pretože bola vďaka nim bližšie opísaná štruktúra Mer TK domény a väzby medzi kinázou a inhibítorom. Takisto sú využiteľné pri návrhu ďalších, potenciálnych inhibítorov Mer tyrozín kinázy.¹⁰

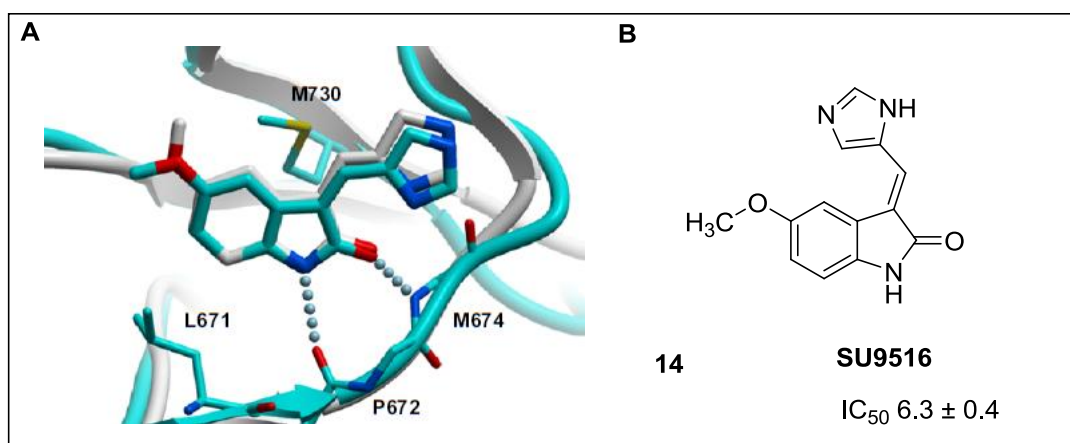


Obrázok 14. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom staurosporín, (B) Štruktúrny vzorec inhibítora staurosporínu.¹⁰

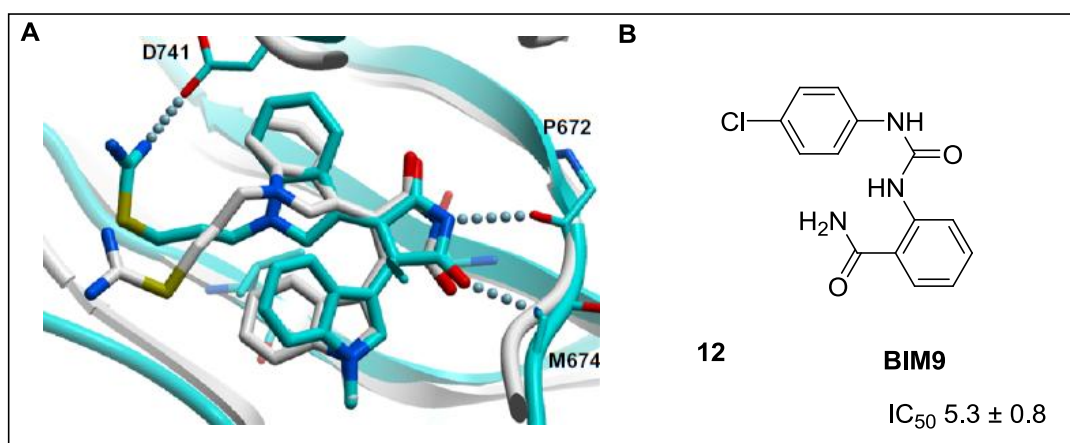


Obrázok 15. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom Cdk1, (B) Štruktúrny vzorec inhibítora Cdk1.¹⁰

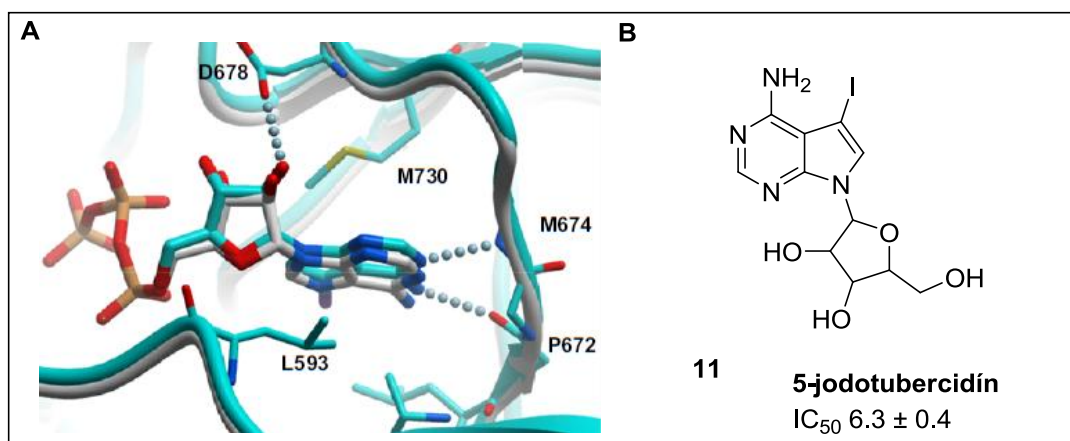
Cdk1 (zlučienina **10**) je najbližším analógom inhibítora C52 a vytvára podobné väzby za vzniku komplexu kináza-inhibítor. (Obrázok 15)



Obrázok 16. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom SU9516, (B) Štruktúrny vzorec inhibítora SU9516.¹⁰



Obrázok 17. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom BIM 9, (B) Štruktúrny vzorec inhibítora BIM 9.¹⁰



Obrázok 18. (A) Kryštálová štruktúra ATP väzbového miesta Mer TK v komplexe s inhibítorom 3-jodotubercidinom, (B) Štruktúrny vzorec inhibítora 5-jodotubercidínu.¹⁰

Jód sa v prípade 5-jodotubercidínu **11** veľmi presne viaže do hydrofóbneho vrečka, ktoré tvorí špecifitu kinázy. (Obrázok 18)

6.2.3 Inhibícia Mer v JM doméne

Medzi transmembránovou časťou receptora ukotvenou v membráne bunky a kinázovou doménou v intracelulárnej časti receptora sa nachádza tzv. juxtamembránová doména (JM doména). Obvykle táto doména obsahuje len niekoľko bázických aminokyselín (lyzín, arginín) a pravdepodobne má opornú funkciu pri prenose signálu z extracelulárnej domény do intracelulárnej domény. Mer však obsahuje v JM doméne aj niekoľko tyrozínových zvyškov, ktoré sa v tomto pokuse stali potenciálnym terčom inhibície exprese Mer TK receptora.

Pre väčšinu receptorov, charakteristických prítomnosťou fosforylovaných tyrozínov v JM doméne, má defosforylácia týchto tyrozínov za následok inhibíciu kinázovej aktivity. Napríklad, u rodiny EPH TK receptorov je fosforylácia JM tyrozínových zvyškov potrebná pre aktivitu kinázy, pretože fosforylované tyrozíny stabilizujú ATP väzbové miesto. Preto vznikla myšlienka, že defosforylácia tyrozínov v JM doméne môže znemožniť kinázovu aktivitu Mer TK receptora.

Defosforyláciou tyrozínov v JM doméne však nedošlo ku zmene aktivity kinázy Mer a dokonca ani k zmene rýchlosti premeny substrátu na produkt. Prítomné fosforylované tyrozíny v JM doméne Mer TK teda nemajú vplyv na kinázovú aktivitu, ich funkcia je pravdepodobne čisto oporná a ich defosforyláciou nie je možné dosiahnuť zastavenie činnosti kinázy. Tento fakt potvrdili ďalším experimentom, v ktorom vymenili tyrozíny v JM oblasti za fenylalaníny. Na aktivitu kinázy to však nemalo žiaden vplyv. Presná funkcia tyrozínov v JM oblasti ostáva do dnešného dňa neobjasnená.¹⁰

6.3. Vývoj vybraných Tyro3 TK inhibítorov

Koronárne ochorenie srdca (KOS) je jedným z najrozšírenejších ochorení v USA. V ohrození je približne 40 miliónov ľudí trpiacich trombózou v dôsledku artériosklerózy (skleróza / stuhnutie tepien) alebo iných kardiovaskulárnych porúch a ochorení. Zvýšená hladina cholesterolu, fajčenie a obezita sú rizikové faktory, ktoré zvyšujú pravdepodobnosť vzniku KOS. Stvrdnutie tepien znemožní prísun kyslíka do srdca (ischémia), čo môže spôsobiť bolesť srdca, či odumretie srdcového tkaniva (infarkt myokardu).¹⁴ Prevenciou proti KOS je **liečba arteriálnej trombózy liečivom Clopidogrel**, ktoré má však obmedzené možnosti pôsobenia. Jeho efektivita je limitovaná bez prítomnosti prídavnej zložky – aspirínu a približne **jedna štvrtina až jedna tretina pacientov je voči nemu rezistentná** (ich organizmus ho nedokáže efektívne využiť). Clopidogrel je inhibítor, ktorý **sa ireverzibilne viaže na receptory krvných doštičiek, čím zabraňuje ich aktivácii a agregácii**. Pacienti užívajúci Clopidogrel sú tak vystavený **zvýšenému riziku krvácania**. Hlavným kritériom pri vývoji liečby tohto ochorenia je **príprava liečiva so selektívnym účinkom a bez vzniku vedľajších efektov**.

Gas6 je jedným zo zástupcov proteínov závislých na vitamíne K. Proteíny zaradené do tejto skupiny hrajú dôležitú úlohu pri zhlukovaní krvných doštičiek (trombóze) a udržiavaní homeostázy. Inhibícia tejto skupiny proteínov je prevenciou proti zhlukovaniu krvných doštičiek a ochrana organizmu pred vznikom trombózy.¹⁴

Gas6 je ligand podmieňujúci aktivitu všetkých troch receptorov rodiny TAM (Tyro3, Axl a Mer), ktoré sú exprimované v krvných doštičkách u ľudí aj u myší. Expresiou týchto troch receptorov je indukovaná **signálna dráha Akt (interakciou receptorov rodiny TAM s proteínom PI3K), ktorá kontroluje zhlukovanie krvných doštičiek**.¹⁵

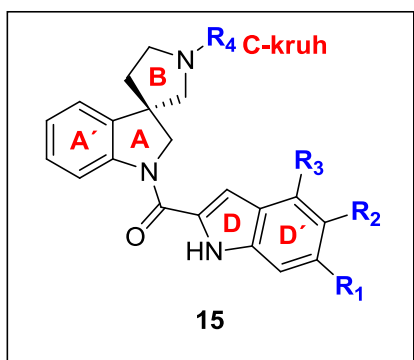
Výsledky niekoľkých experimentov zameraných na zastavenie zhlukovania krvných doštičiek dokázali, že elimináciou pôsobenia ligandu Gas6 boli dosiahnuté inhibičné účinky. Keďže Gas6 je ligand aktivujúci receptor Tyro3, logicky z toho vyplýva, že aj **inhibíciou Tyro3 je možné zastaviť zhlukovanie krvných doštičiek**. Tento predpoklad bol ďalšími

¹⁴ Powell, N. A.; Kohrt, J. T.; Filipski, K. J.; Kaufman, M.; Sheehan, D.; Edmunds, J. E.; Delaney, A.; Wang, Y.; Bourbonais, F.; Lee, D.; Schwende, F.; Sun, F.; McConnell, P.; Catana, C.; Chen, H.; Ohren, J.; Perrin, L. A. *Bioorgan. Med. Chem.* **2012**, 22, 190-193.

¹⁵ Burns, R.J.; Gibbons, R.J.; Yi, Q.; et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, 39, 30 - 36.

experimentami potvrdený, dokonca sa inhibícia Tyro3 vyrovnala účinku inhibítora Clopidogrelu bez zvýšeného rizika krvácania. Inhibícia receptora Tyro3 by sa tak mohla stať perspektívnym spôsobom liečby trombózy bez vedľajších negatívnych účinkov.

Ako základný skelet pre vývoj potenciálnych inhibítorov bol vybraný spiroindolínový templát (15) kvôli jeho selektivite voči Axl a Mer. (Obrázok 19)



Obrázok 19. Štruktúrny vzorec základného spiroindolínového skeletu (15) s postrannými substituentmi R^1 , R^2 , R^3 a R^4 .¹⁴

V Schéma 2 je znázornený syntetický postup prípravy spiroindolínového skeletu s postrannými substituentami. Pôsobením NCS na Cbz-3,4-dihydro-1H-pyrido(3,4)indol 2 došlo k vzniku racemickej zmesi Cbz-2-oxo-1,2-dihydro-1H-spiro(indol-3,3'pyrolidínu) 3. HPLC chirálnou chromatografiou boli oddelené S a R enantioméry. Pre biologické účely je využiteľný len S enantiomér (R enantiomér bol približne 10 krát menej aktívny voči Tyro3). Ďalším krokom bola hydrogenácia H_2 , Pd/C a výmena chrániacej skupiny Cbz za Boc v produkte 4. Pôsobením redukčného činidla $NaBH_4$ došlo k redukcii karbonylovej skupiny za vzniku Boc-1,2-dihydro-1H-spiro(indol-3,3'pyrolidínu) 5. Reakciou zlúčeniny 5 s 2-indolkarboxylovou kyselinou 6 vznikla zlúčenina 7. Deprotekciou v mierne kyslom prostredí došlo k vzniku zlúčeniny 8, z ktorej po reakcii s aldehydmi / ketónmi (s rôznymi R^2 a R^3 substituentmi) vznikli zlúčeniny 16-20. (Schéma 2)

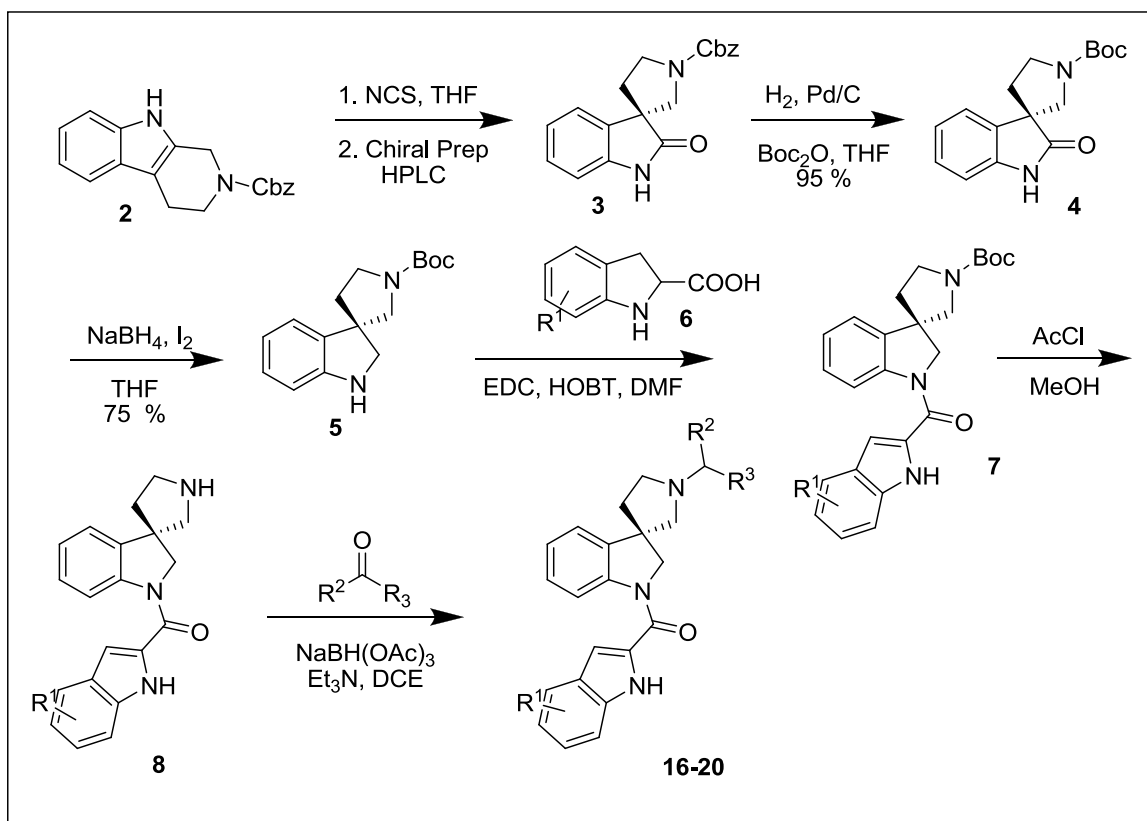


Schéma 2. Syntéza spirodindolín-2-karboxyindolového skeletu.¹⁴

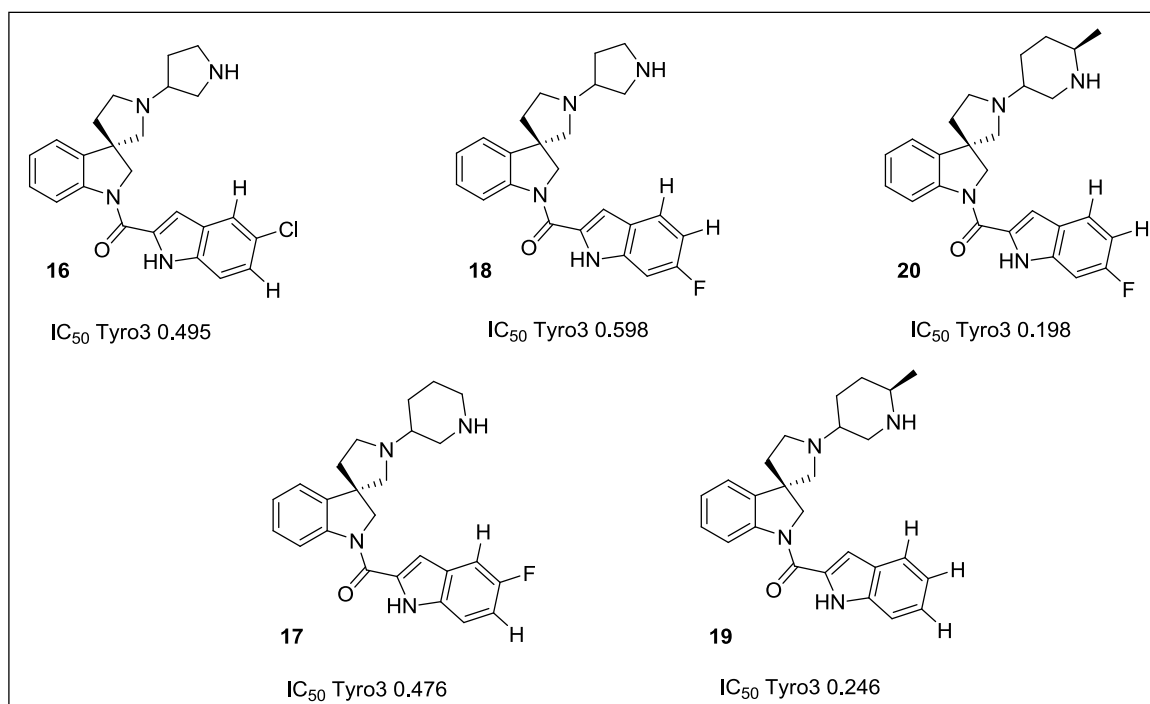
Najlepší spôsob substitúcie v jednotlivých pozíciách z hľadiska vysokej inhibičnej aktivity voči Tyro3 bol posudzovaný na základe SAR analýzy.

V pozícii **R⁴** (Obr. 19) boli najvýhodnejšie substituenty z hľadiska vysokej aktivity 3-piperidiny a 3-pyrolidiny. V **R²** pozícii prispievajú k zvýšeniu inhibičnej aktivity elektrónakceptorné skupiny (napr. F v zlúčenine **17**). V **R¹** pozícii majú elektrónakceptorné skupiny negatívny vplyv na aktivitu inhibítora a elektrónodonorné nespôsobujú takmer žiadnu zmenu.

Vybrané analógy **16**, **17**, **18**, **19** a **20** s najlepšimi výsledkami IC₅₀ boli podrobené ďalším biologickým testom. (Chyba! Nenalezen zdroj odkazů., Obrázok 20)

Tabuľka 3. výsledky analýzy SAR.¹⁴

Zlúčenina	16	17	18	19	20
Tyro3 IC ₅₀ (μM)	0.495	0.476	0.598	0.246	0.198



Obrázok 20. Štruktúry potenciálnych inhibítorov Tyro3 TK **16-19** s príslušnými hodnotami IC₅₀ v uM (Mer TK).¹⁴

Výsledky ďalších biologických testov

Napriek tomu, že zlúčenina **20** preukázala najlepšie výsledky IC₅₀, v biologických testoch sa ukázala zo všetkých hľadísk ako nepoužiteľná pre terapeutické využitie. Analógy **16** a **18** boli vybrané na základe predikcie dobrých biologických a farmakokinetických vlastností. Vybrané zlúčeniny **16** a **18** boli ďalej biologicky testované. Prvým testom je test ADME. (Obrázok 20,

Tabuľka 4. In vitro profil ADME vybraných analógov.¹⁴

Zlúčenina	c log P	Rozpustnosť (μM)	Priepustnosť (x 10 ⁻⁶ cm/s)	CYP2D6 IC ₅₀ (μM)
16	2.9	5.2	0.03	0.014
18	2.3	7.8	Netestované	0.655

Pri vypracovaní profilu ADME príslušných zlúčenín sa posudzujú 4 kritéria, ktoré ovplyvňujú správanie, kinetiku a celkové pôsobenie liečiv v organizme.

Hodnota c log P je definovaná ako miera **lipofility**. Výsledky c log P inhibítorov **16** a **18** boli podľa očakávaní nízke (dôvodom sú dusíky v štruktúre molekúl).

Podľa PAMPA testu bola meraná **priepustnosť** látky cez membrány (PAMPA: priepustnosť sledovaná na umelej membráne, metóda určovania schopnosti molekúl prejsť cez lipofilnú membránu) a v dôsledku nízkej miery lipofility bola aj nameraná priepustnosť analógu **16** nízka.

Rozpustnosť oboch analógov vo vodnom roztoku (pH = 6.5) bola nízka.

Oba sú potenciálnymi inhibítormi aj na zakázaný cieľ CYP2D6 (enzým, dôležitý pre metabolizmus xenobiotík (cudzích zlúčenín), ktoré sa vyskytnú v organizme).¹⁶

Tabuľka 5. In vivo farmakokinetický profil vybraných analógov.¹⁴

Analóg	Cl (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	F (%)
16	60	13	14
18	5	1.6	11

Bola zistená len mierna biodostupnosť (F %) u oboch analógov **16** aj **18** podaných perorálne *in vivo*. Analóg **16** má nízku orálnu biodostupnosť **F**, iba 14 %. Pravdepodobne pri efekte prvého prechodu látky **16** (distribúcia liečiva do obehového systému prechodom cez stenu čreva) došlo výrazným stratám.

Presun halogénu v analógu **18** do pozície R¹ na indole viedol k zvýšeniu Cl, ale k zníženiu V_{ss} distribučného objemu. Orálna biodostupnosť F analógu **18** však bola stále nízka (11 %).

¹⁶ Wang, B.; Yang, L. P.; Zhang, X. Z.; Huang, S. Q.; Bartlam, M.; Zhou, S. F. *Drug. Metab. Rev.* **2009**, *41*, 573–643.

7. Experimentálna časť

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

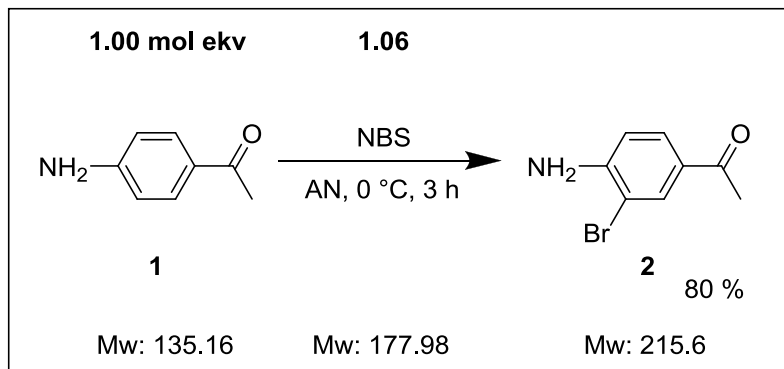


Schéma 3. Syntéza 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu 2.

Literatúra: Pri vyššie uvedených navážkach sa reakčný čas zhodoval s postupom z literatúry (pri menších navážkach sa reakčný čas pohyboval okolo 20 h.).¹⁷

Experiment: K 500 mg (3.70 mmol, 1.00 mol ekv) p-aminoacetofenónu (**1**) rozpusteného v 2.6 ml CH₃CN sme po kvapkách za miešania a chladenia počas 25 minút pridávali roztok 698.0 mg (3.92 mmol, 1.06 mol ekv) NBS v 3 ml CH₃CN. Z RZ sme odobrali vzorku na TLC analýzu, ktorá preukázala prítomnosť produktu **2**, ako aj stôp východiskovej látky. Na doreagovanie VL **1** sme reakciu nechali prebiehať ešte 3 h pri RT. TLC analýza po tomto čase potvrdila už len prítomnosť produktu **2**. Reakciu sme ukončili zahustením pomocou RVO. Získanú zmes sme rozpustili v EA a roztok extrahovali nasýteným vodným roztokom NaHCO₃ a následne roztokom NaCl. Oddelenú organickú fázu sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a stopy prchavých podielov sme odstránili pomocou HV. Zo surového produktu 650 mg (3.01 mmol, 82 %) sme odobrali vzorku na ¹H-NMR analýzu (KF-003-13.fid), ktorá potvrdila štruktúru a čistotu

¹⁷ Patent, Illig; Carl, R.; Ballentine, Shelley, K.; Schen; Jinsheng; DesJarlais; Louise, R.; Meegalla; Sanath, K.; Wall; Mark; Wilson; Kenneth; US2007/249647, 2007, (A1).

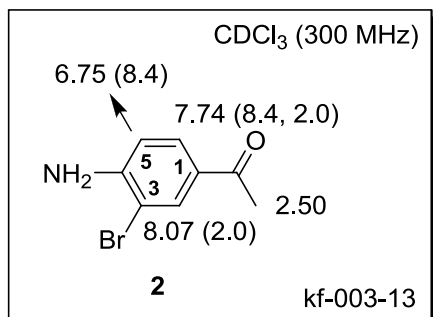
požadovaného produktu 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu **2**, získaného v podobe tmavo hnedej kryštalickej látky.

Poznámky: Pri rozpúšťaní NBS sme kvôli jeho zlej rozpustnosti museli pridať o 1.2 ml AN viac, ako bolo podľa predpisu z uvedenej literatúry (1.75 ml) a zmes bolo potrebné zahrievať na rozdiel od literatúry.

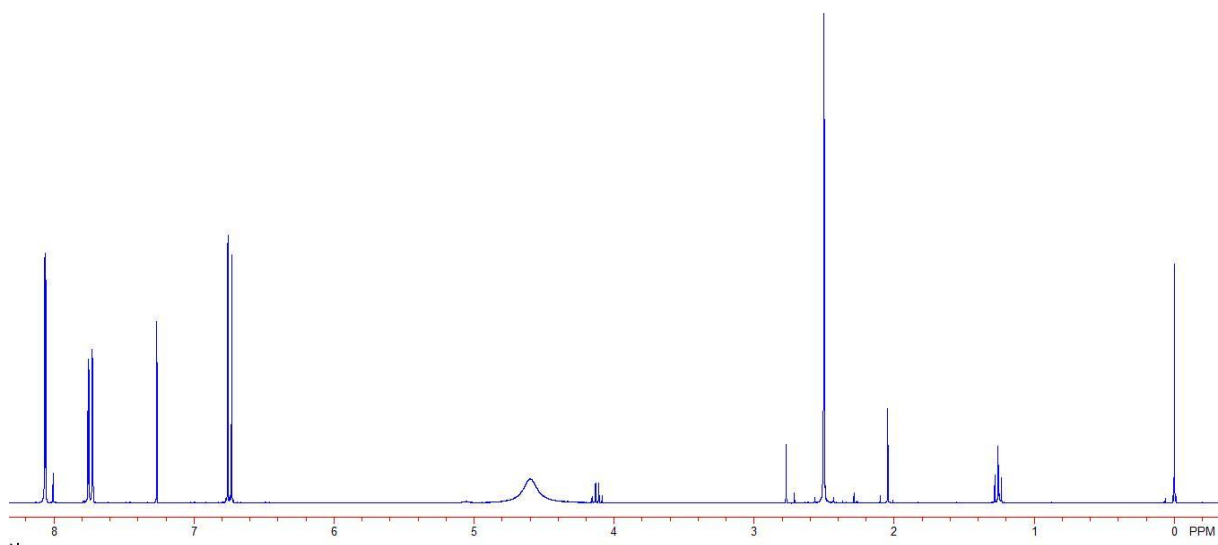
Zlúčenina **2** je opísaná v literatúre. Existuje ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (ESI), Mp: 59-62 °C [EA].¹⁸

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

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , KF-003-13.fid) 8.07 (d, 1H, $J(2,6) = 2.0$ Hz, H-C(2)), 7.74 (dd, 1H, $J(5,6) = 8.4$ Hz, $J(2,6) = 2.0$ Hz, H-C(6)), 6.75 (d, 1H, $J(5,6) = 8.4$ Hz, H-C(5)), 2.50 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).



¹⁸ Patent, Baker; Kiernan P.K.; Jane A. *American Cyanamid Company*, US4404222, **1983**, (A1).



Obrázok 21. ^1H -NMR spektrum KF-003-13.fid.

7.2. Syntéza 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu (3)

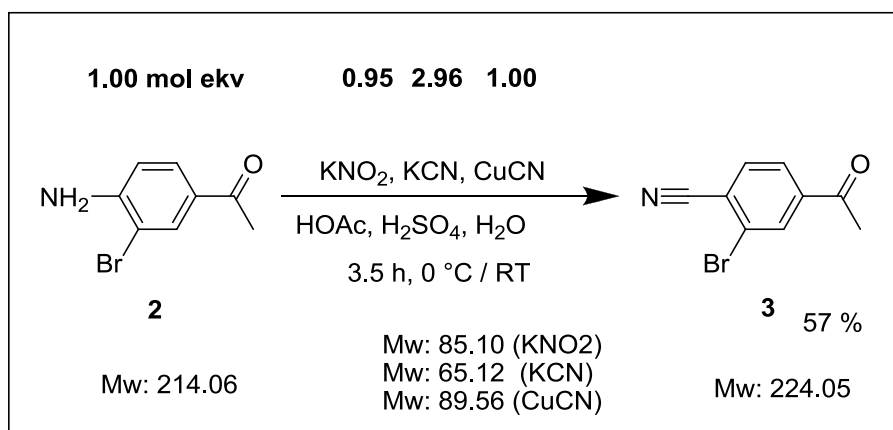


Schéma 4. Syntéza 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu **3**.

Literatúra: Uvedený postup sa zhoduje s literatúrou, no na miesto NaNO_2 používaného v postupe z literatúry sme použili KNO_2 .¹⁹

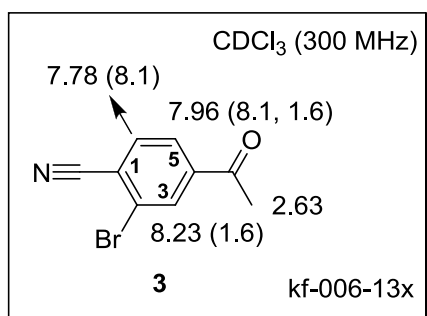
¹⁹ Patent, SANOFI AVENTIS, WO2009/7015, **2009**, (A1).

Experiment: K 1.25 g (5.84 mmol, 1.00 mol ekv) 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (**2**) rozpusteného v 21 ml HOAc sme po kvapkách za stáleho miešania a chladenia pridávali 0.95 ml H₂SO₄. Po 10 min sme pridali 472.0 mg (5.55 mmol, 0.95 mol ekv) KNO₂ rozpusteného v 5 ml vody a za chladenia (0 °C) sme RZ nechali miešať 30 min. Do roztoku 523.0 mg (5.84 mmol, 1.00 mol ekv) CuCN a 1.125 g (17.28 mmol, 2.96 mol ekv) KCN v 8 ml vody sme za miešania a chladenia (0 °C) po kvapkách pridávali vyššie pripravenú RZ. Po 30 min miešania pri 0 °C sme zmes nechali miešať ešte 2 h pri RT. Surovú zmes sme naliali do vody a vzniknutú zrazeninu prefiltrovali cez Buchnerov lievnik, čím sme získali 740 mg (3.30 mmol, 57 %) tehlovo oranžovej kryštalickej látky - produktu 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu (**3**) (KF-006-13x.fid).

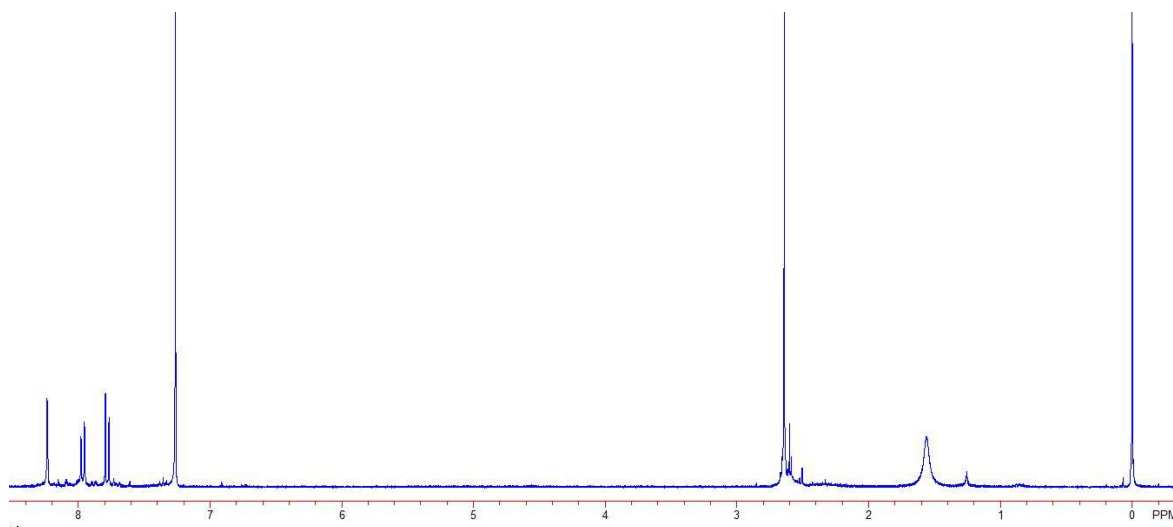
Zlúčenina **3** je opísaná v literatúre. Existuje ¹H-NMR, IČ, M.p.: 129-130 °C.[EA]²⁰

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1x vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie 254 nm, R_f(**3**) = 0.78

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, KF-006-13x.fid): 8.23 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.6 Hz, H-C(3)), 7.96 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, *J*(5,3) = 1.6 Hz, H-C(5)), 7.78 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, H-C(6)), 2.63 (s, 3H, -CH₃).



²⁰ Tagawa, H.; Kubo, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 3047-3052.



Obrázok 22. ^1H -NMR spektrum KF-006-13x.fid.

7.3. Syntéza 4-(2,2-dibrómacetyl)-2-brómbenzonitrilu (4)

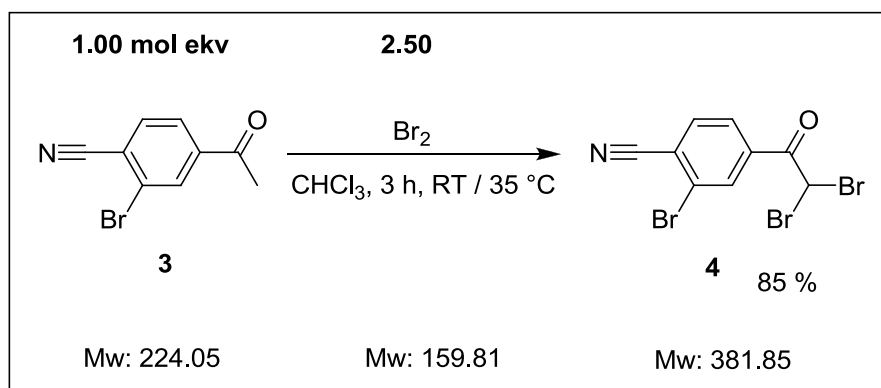


Schéma 5. Syntéza 4-(2,2-dibrómacetyl)-2-brómbenzonitrilu 4.

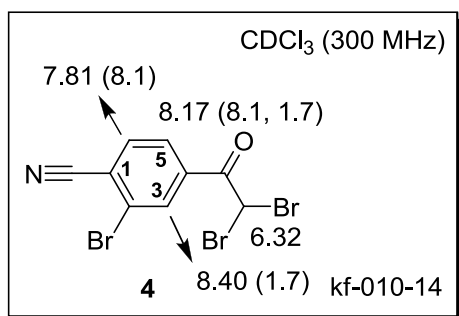
Literatúra: Na základe literatúry sme uskutočnili analogickú reakciu. Rozdiely sú vo východiskovej látke, aj keď ide o veľmi podobnú látku (ich substrát neobsahuje bróm naviazaný na benzenovom jadre). Ďalšia modifikácia postupu syntézy oproti pôvodnému postupu nastala pri úprave reakčného času (skrátienie reakčného času z cca 12 h na 3 h). Autori v článku neuvádzajú postup čistenia produktu.²¹

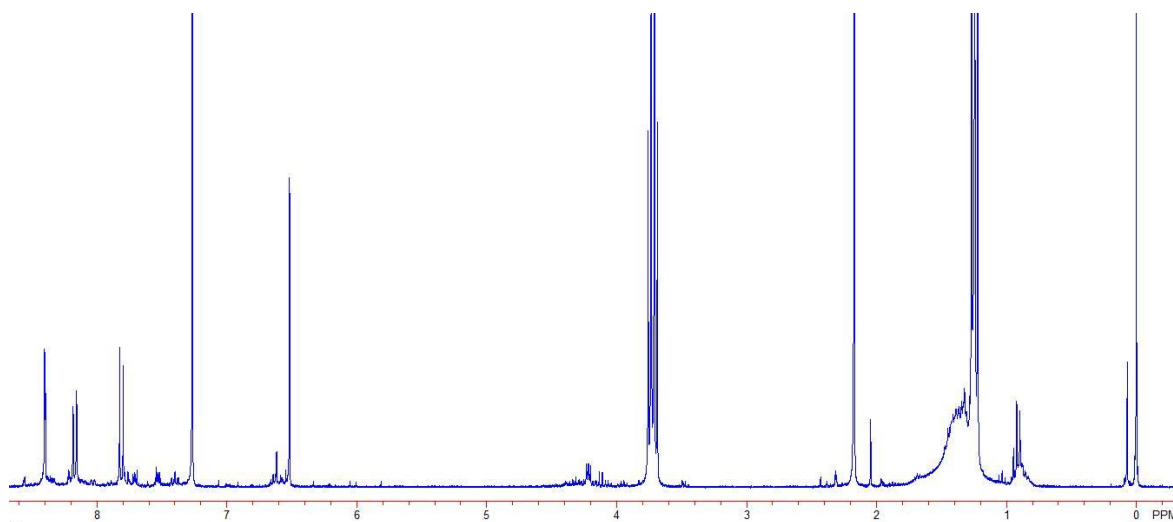
²¹ Dumur, F.; Mayer, C. R.. *Helv. Chim. Acta.* **2013**, 96, 889-896.

Experiment: Východiskovú látku 100 mg (0.44 mmol, 1.00 mol ekv) **3** sme za miešania rozpustili v 3 ml CHCl₃, k roztoku sme pri RT prikvapkali roztok 178.25 mg (1.12 mmol, 2.50 mol ekv) Br₂ v CHCl₃. Potom sme nechali RZ miešať 3 h pri 35 °C, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali TLC analýzou. Po ukončení reakcie sme RZ premyli 5 ml NaHCO₃, 5 ml vody a organickú fázu sme vysušili státím nad bezvodým Na₂SO₄. Rozpúšťadlo sme odparili pomocou RVO a posledné stopy prchavých podielov sme odstránili s HV. Zo surového produktu 144.0 mg (0.38 mmol, 84.5 %) sme odobrali vzorku na ¹H-NMR analýzu, ktorá potvrdila štruktúru a čistotu tmavo hnedej olejovitej látky 4-(2,2-dibrómacetyl)-2-brómbenzonitrilu **4** (KF-010-14.fid).

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1x vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f (**4**) = 0.95.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, KF-010-14.fid) 8.40 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.7 Hz, H-C(3)), 8.17 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, *J*(5,3) = 1.7 Hz, H-C(5)), 7.81 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, H-C(6)), 6.32 (s, 1H, -CHBr₂).





Obrázok 23. ^1H -NMR spektrum KF-010-14.fid.

7.4. Syntéza 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu (5)

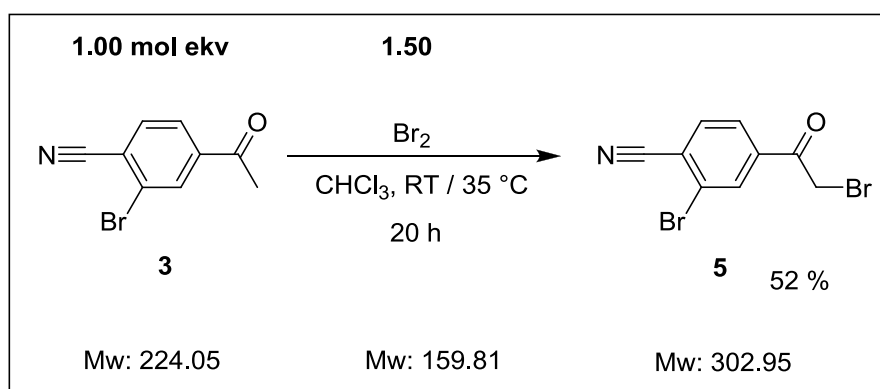


Schéma 6. Syntéza 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu 5.

Literatúra: Na základe literatúry sme uskutočnili analogickú reakciu. Rozdiely sú vo východiskovej látke, aj keď ide o veľmi podobnú látku (ich substrát neobsahuje bróm naviazaný na benzénovom jadre). Ďalšia modifikácia postupu syntézy oproti pôvodnému postupu nastala pri úprave reakčného času (predĺženie reakčného času z 12 h na 20 h). Autori v článku neuvádzajú postup čistenia produktu. **Chyba! Záložka není definována.**

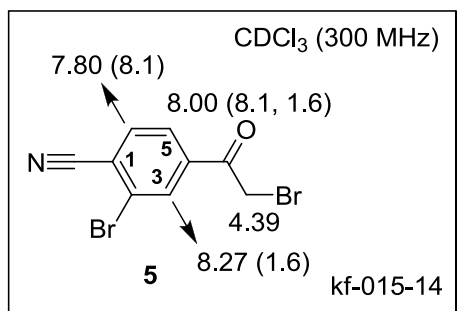
Experiment: Východiskovú látku 430.0 mg (1.92 mmol, 1.00 mol ekv) **3** sme za miešania rozpustili v 8 ml CHCl_3 , k roztoku sme pri RT prikvapkali 460.06 mg (2.88 mmol, 1.50 mol

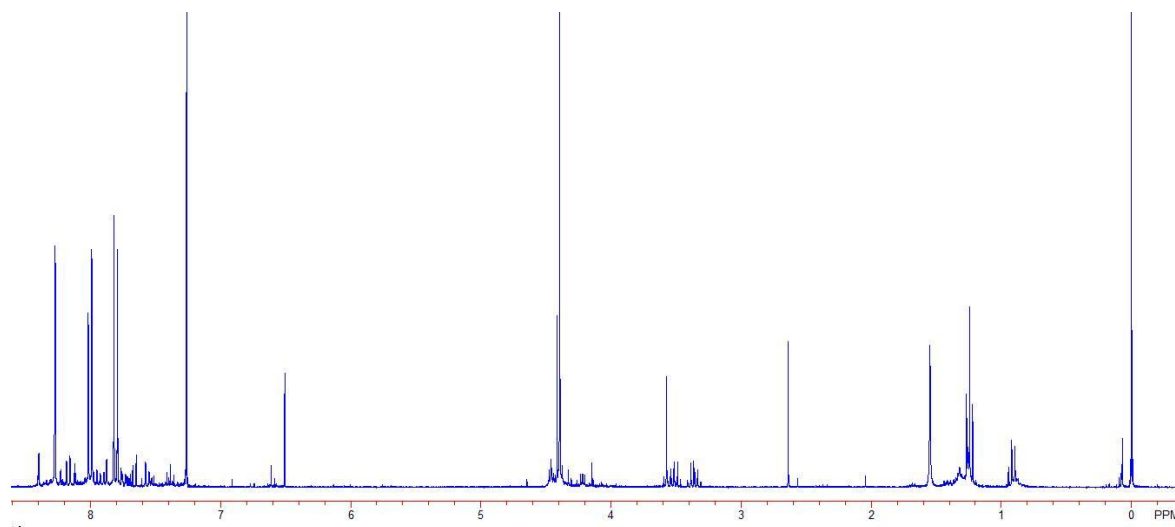
ekv) Br₂ v CHCl₃. Potom sme nechali RZ miešať 20 h pri 35 °C, pričom priebeh reakcie sme kontrolovali TLC analýzou. Po ukončení reakcie sme RZ premyli 10 ml NaHCO₃, 10 ml vody a organickú fázu sme vysušili státím nad bezvodým Na₂SO₄. Rozpúšťadlo sme odparili na RVO a posledné stopy prchavých podielov sme odstránili pomocou HV. Zo surového produktu 300 mg (0.99 mmol, 52 %) sme odobrali vzorku na ¹H-NMR analýzu, ktorá potvrdila štruktúru a čistotu tmavo hnedej olejovej látky 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu **5** (KF-015-14.fid).

Táto látka predstavuje novú, dosiaľ v lit. nepopísanú zlúčeninu, preto sme jej štruktúru potvrdili aj ďalšími analýzami (¹³C-NMR, IČ, MS).

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (1 x vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f (**5**) = 0.87.

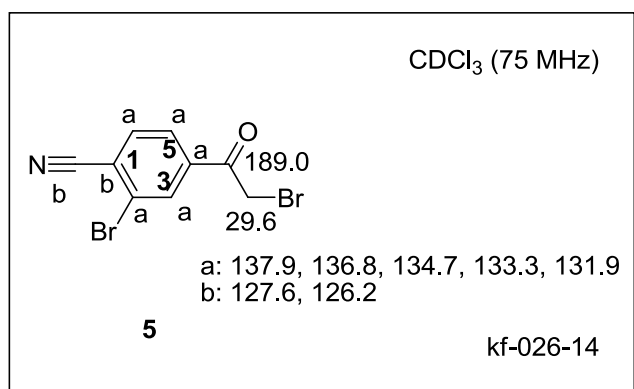
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, KF-015-14.fid) 8.27 (d, 1H, *J*(3,5) = 1.6 Hz, H-C(3)), 8.00 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, *J*(3,5) = 1.6 Hz, H-C(5)), 7.80 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.1 Hz, H-C(6)), 4.39 (s, 2H, -CH₂Br).





Obrázok 24. ^1H -NMR spektrum KF-015-14.fid.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz, KF-026-14) 189.0 (C=O), 137.9, 136.8, 134.7, 133.3 a 131.9 (3 x d, 2 x s, C(2), C(3), C(4), C(5) a C(6)), 127.6, 126.2 (2 x s, C(1) a CN), 29.6 ($-\text{COCH}_2-$).



FR IR (solid, cm^{-1}): 2940 (s), 2232 (s), 3069 (w), 1688 (s), 1279 (m), 1592 (w), 1043 (w), 621 (w).

MS(ESI-): 299.9 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

7.5. Syntéza N-2-brómo-4(2-(5-(etylsufonyl)-2-metoxyfenylamino)-4,5-dihydrooxazol-4-yl)benzonitrilu (7)

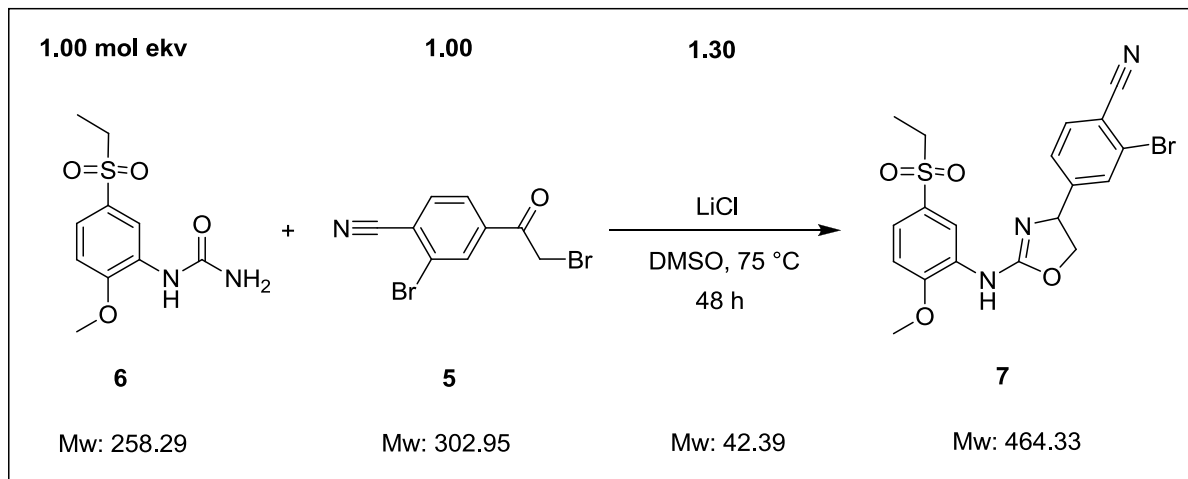


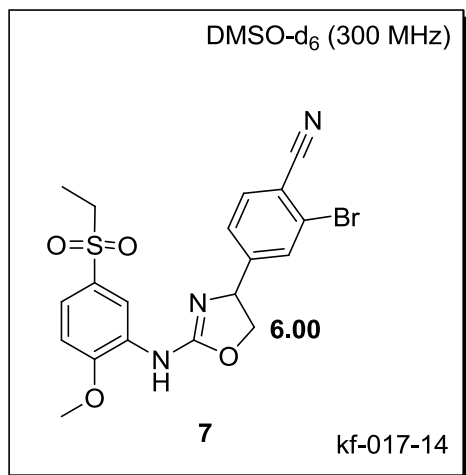
Schéma 7: Syntéza 7 - požadovaného oxazolového prekurzoru VEGFR2 TK receptora.

Literatúra: Postup z literatúry opísaný na močovine a 1-brómpropanóne sme aplikovali na našu reakciu. Modifikácie sme uskutočnili pridaním LiCl do RZ a pri výbere rozpúšťadla, pričom autori uvádzali ako rozpúšťadlo etanol. Reakčný čas nebol v literatúre vôbec uvedený.²²

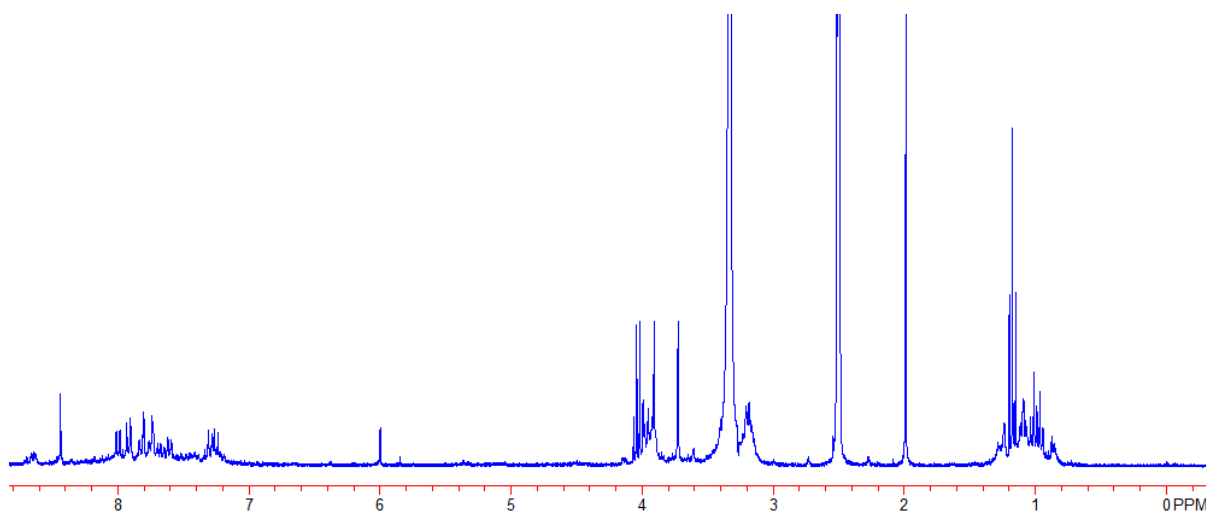
Experiment: V 4 ml DMSO sme rozpustili 65.0 mg (0.22 mmol, 1.00 mol ekv) 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu 5 a pridali sme 55.4 mg (0.22 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny 7 a 11.8 mg LiCl (0.28 mmol, 1.30 mol ekv). Reakčnú zmes sme za miešania zahrievali na 75 °C počas 48 h. Priebežnou kontrolou pomocou TLC analýzy sme preukázali prítomnosť produktu, ale aj ďalších vedľajších neznámych látok. Reakciu sme spracovali pridaním 4 ml 1 % NaHCO₃ a 8 ml vody. Následnou sme zmes extrahovali s EA (4 x 6 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl a sušili státím nad Na₂SO₄. Po prefiltrovaní sme zmes zahustili na RVO a zvyšky prchavých podielov odstránili pomocou HV. 30 mg surovej reakčnej zmesi sme dali na ¹H-NMR analýzu. Výstupom tejto analýzy bolo zmesné spektrum, ktorým sme preukázali prítomnosť produktu, východiskových látok, ako aj vedľajších produktov (KF-017-14.fid).

²² 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.

TLC analýza: Hex / EA (1 / 1) (2 x vyvolané), na vizualizáciu sme použili UV žiarenie, R_f (7) = 0.48.



Štruktúra očakávaného produktu 7.



Obrázok 25. ^1H -NMR spektrum KF-017-14.fid.

8. Diskusia

Do teoretickej časti tejto práce sme zahrnuli vlastnosti TAM rodiny TK receptorov a prehľad vybraných inhibítorov pôsobiacich na túto rodinu. Receptory rodiny TAM sú oligomérne proteínové kinázy, ktoré kontrolujú niekoľko činností bunky. V prípade Axl je to kontrola prežívania buniek, migrácia buniek, pôsobenie proti apoptóze a stimulácia bunkového delenia. O Tyro3 je známe, že v bunke kontroluje proces delenia buniek a pôsobí proti apoptóze. Mer je jediný z TAM rodiny TK receptorov, ktorý stimuluje v bunke okrem jej delenia aj fagocytózu. Všetky tri receptory v prípade nadmernej expresie predstavujú príčinu vzniku vážnych ochorení (lymfoblastická leukémia a pigmentózna dystrofia sietnice oka je spôsobená nadmernou expresiou Mer, myeloidná leukémia je spôsobená nadmernou expresiou Axl a KOS je spôsobené nadmernou expresiou Tyro3). Selektívnou inhibíciou aktivity týchto enzýmov dokážeme zabrániť vzniku a rozvoju uvedených ochorení. Vzhľadom na obtiažnosť vývoja selektívnych inhibítorov je posudzovanie ich vhodnosti dané parametrami z hľadiska ich biologických a farmakokinetických vlastností. V prípade selektívnej inhibície Mer TK by sme pravdepodobne dokázali zabrániť rozvoju lymfoblastickej leukémie, vyskytujúcej sa najmä u detí. S využitím pyrazolpyrimidínového skeletu pochádzajúceho z účinného, ale neselektívneho Mer inhibítora C52 (2), výskumníci pripravili sériu potenciálnych inhibítorov (zlúčeniny 3-8), ktorých účinnosť posudzovali na základe hodnoty IC_{50} (nM) Mer Tk. (Obrázok 10) Najúčinnnejší inhibitor 7 (UNC569), s najmenšou molekulovou hmotnosťou, bol zaujímavý svojím spôsobom viazania sa v ATP väzbovom mieste Mer kinázy, aj keď jeho hodnota IC_{50} nepatrila medzi najlepšie spomedzi uvedených zlúčenín (2.9 nM), (Obrázok 11) jeho potenciál je vzhľadom na jeho schopnosť selektívne inhibovať aktivitu Mer kinázy predmetom ďalšieho skúmania a neskoršieho možného terapeutického využitia.⁹ Ďalšie inhibítory boli testované na inhibíciu aktivity Mer kinázy (zlúčeniny 9-14). (Obrázky 14-18 B) Ani zlúčeniny s dobrými výsledkami IC_{50} však nie sú jednoducho využiteľné pre terapeutické využitie vzhľadom na ich neselektivitu, ale aj toxicitu. Veľmi dobre však poslúžili k lepšiemu pochopeniu interakcii, k akým dochádza medzi ATP väzbovým miestom a inhibítorom. (Obrázky 14-18) Pri ďalšom alternatívnom pokuse inhibovať aktivitu Mer kinázy pôsobením na tyrozíny prítomné v JM oblasti receptora neboli dosiahnuté pozitívne výsledky. Ale na druhej strane autori ukázali, že JM oblasť nie je z hľadiska inhibície TK dôležitá a má skôr stabilizujúci účinok na transmembránový receptor.¹⁰

Tyrosinový (TK) receptor v prípade nadmernej expzie a v dôsledku interakcie s Gas6 ligandom, ktorý ho aktivuje, je tiež známy ako jedna z príčin koronárneho ochorenia srdca (KOS). Inhibíciou jeho aktivity by bolo možné predísť vzniku krvných zrazenín bez vedľajších účinkov. Potenciál pripravených inhibitorov (zlúčeniny **16-20**) so spiroindolínovým skeletom bol posudzovaný na základe výsledku hodnoty IC_{50} . Vybrané inhibítory boli podrobené sérii ďalších testov, podľa ktorých sa posudzoval ich potenciál pre terapeutické využitie na živých organizmoch. Inhibítory s najnižšou hodnotou IC_{50} (**20**) mal žiaľ najhoršie výsledky pri skúmaní farmakokinetických vlastností látky. Ani vybrané inhibítory **16** a **18** napriek dobrej aktivite nemali vhodné farmakokinetické vlastnosti. Použitie spiroindolínovej štruktúry inhibitorov na zastavenie aktivity Tyrosinového (TK) receptora je v ranných štádiách výskumu, pretože takéto zlúčeniny neboli doteraz na Tyrosinový (TK) receptor testované. Ich potenciál preto zatiaľ nie je možné vylúčiť.¹⁴

Na základe dostupných informácií z odbornej literatúry a databáz Reaxys a SciFinder sme navrhli viacstupňovú syntézu prekursoru **7** na prípravu počítačom predpovedaných VEGFR2 TK inhibitorov N-arylaminooxazolnitrilového typu. (Schéma 8)

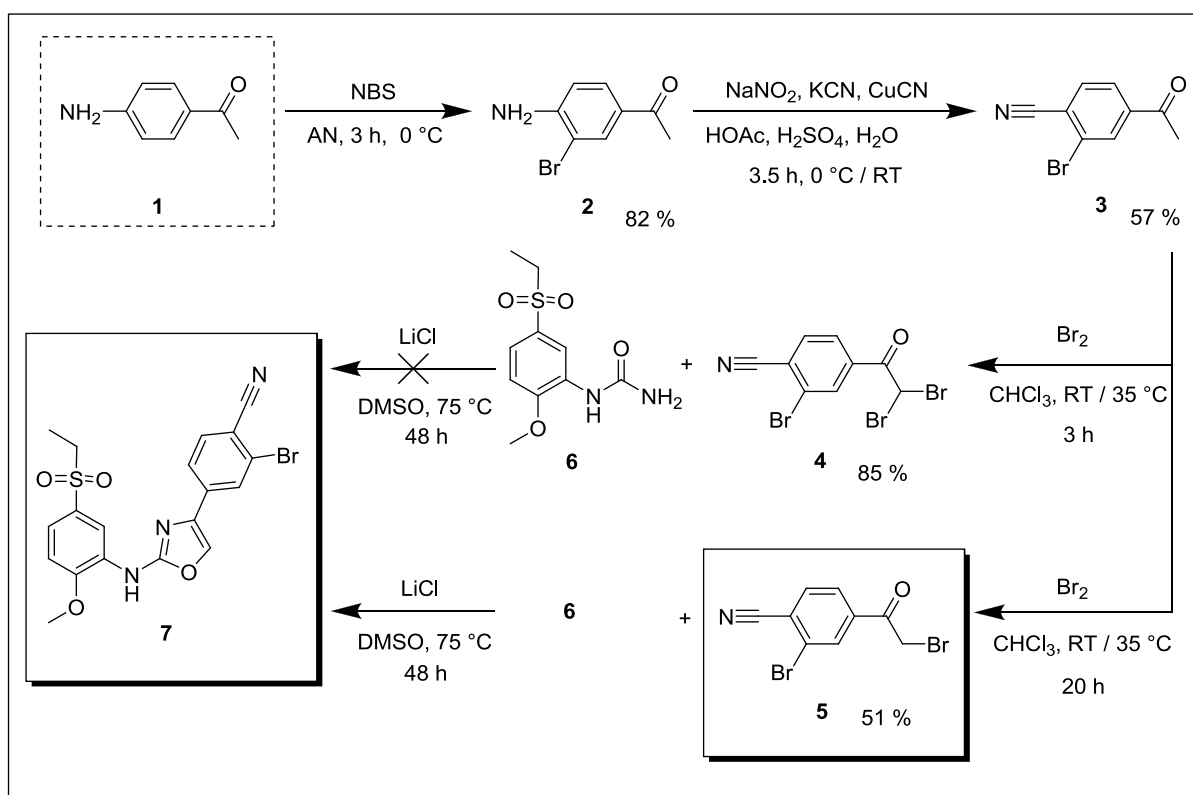


Schéma 8: Schéma grafického abstraktu.

Syntéza začala premenou p-aminoacetofenónu (**1**) na 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanón (**2**) pomocou NBS v AN pri 0°C.¹⁷ Použitý postup z literatúry sme modifikovali počiatocným zahrievaním NBS v AN kvôli jeho horšej rozpustnosti v tomto rozpúšťadle. Výťažok reakcie (82 %) sa takmer zhoduje s výťažkom uvedeným v použitej literatúre (85 %). S rastúcou navážkou VL bolo potrebné predlžovať reakčný čas reakcie. Štruktúru a čistotu produktu **2** sme potvrdili ¹H-NMR analýzou, ktorá sa zhodovala s publikovanými hodnotami.¹⁷

Druhým krokom syntézy bola príprava 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu (**3**) vychádzajúca z 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (**2**), s využitím diazotačnej reakcie.¹⁹ Syntetický postup sme v porovnaní s pôvodnou literatúrou modifikovali použitím KNO₂ namiesto NaNO₂. Na základe vlastných praktických skúseností sme potvrdili, že časť reakcie vedúca k príprave diazóniovej soli je, z dôvodu vysokej reaktivity tejto soli, citlivá na dodržiavanie nízkej reakčnej teploty (0 °C). Aj krátkodobé zvýšenie reakčnej teploty môže mať za následok rozklad spomínaného diazóniového medziproduktu. V prípade, že sme reakčné podmienky uvedené v literatúre dôsledne dodržali, cieľový produkt **3** sme pripravili vo výťažku 57 %. Výťažok sa zhodoval s publikovanou hodnotou v literatúre. Štruktúru a čistotu produktu **3** sme potvrdili pomocou ¹H-NMR analýzy.¹⁹

Tretím krokom bola premena 4-acetyl-2-brómbenzonitrilu (**3**) na 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitril (**5**) s využitím substitúcie brómu pôsobením roztoku Br₂ v CHCl₃.²¹ V literatúre nie je uvedený presný reakčný čas. V našom prípade bol 20 h pri teplote 35 °C s použitím 1.50 mol ekv Br₂, aj napriek tomu, že v literatúre je uvedený ekvivalent Br₂ 0.97 mol ekv. Po pridaní 0.97 mol ekv Br₂ však v našej reakcii nedošlo k zreagovaniu celej VL a preto bolo potrebné postup optimalizovať takým spôsobom, aby nedošlo k vzniku α,α-dibrómovaného produktu a zároveň, aby zreagovala všetka východisková látka. Tento krok bolo obtiažne uskutočniť, v každej reakcii dochádzalo k opakovanému vzniku α,α-dibrómovaného vedľajšieho produktu, resp. v RZ bola minoritná prítomnosť aj VL. Výťažok (51 %). Štruktúru a čistotu látky **5** sme potvrdili ¹H-NMR analýzou. Táto látka predstavuje novú, dosiaľ v lit. nepopísanú zlúčeninu, preto sme jej štruktúru potvrdili aj ďalšími analýzami (¹³C-NMR, IČ, MS).²¹

S využitím rovnakých reakčných podmienok ako v prípade syntézy látky **5**, sme pôsobením 2.50 mol ekv Br₂ za 3 h pripravili α,α-dibrómovaný produkt 4-(2,2-dibrómacetyl)-2-brómbenzonitril (**4**).²¹ Štruktúru a čistotu látky **4** sme potvrdili ¹H-NMR analýzou. Napriek tomu, že molekula nie je opísaná, ju v tejto práci z dôvodu nevyužívania v ďalšej syntéze bližšie nepopisujeme.

Posledným krokom našej syntézy bola cyklizácia močoviny **6** a intermediátu 4-(2-brómacetyl)-2-brómbenzonitrilu (**5**) za vzniku oxazolového prekursoru inhibítora VEGFR2 TK.²¹ Schéma 7) Postup z literatúry sme modifikovali pridaním LiCl, ktorý v reakcii pôsobí ako Bronstedtova kyselina a má funkciu katalyzátora. Tento postup je výsledkom optimalizácie po niekoľkých neúspešných pokusoch, pri ktorých sme vychádzali z neúčinného intermediátu **4** alebo sme používali nevhodné rozpúšťadlo (dichlóretán). Po tom, čo školiteľ uskutočnil neúspešnú analogickú reakciu v etanole, sme sa rozhodli skúmať priebeh reakcie v chlórovaných rozpúšťadlách. Použili sme dichlóretán ClCH₂CH₂Cl, pretože má vyššiu teplotu varu na rozdiel od iných chlórovaných rozpúšťadiel ako sú CH₂Cl₂ alebo CHCl₃. Reaktanty sa však ani v dichlóretáne dobre nerozpúšťali, preto sme sa rozhodli vyskúšať aj DMSO. V tomto rozpúšťadle boli vzorky dobre rozpustné. Z intermediátu **4** sme vychádzali na základe predpokladu, že po odstúpení jedného brómu pred uzavretím kruhu bude druhý bróm, ktorý ostal naviazaný, zvyšovať reaktivitu uhlíka, ktorý sa do reakcie zapája. Tento predpoklad bol však nesprávny a v zmesnom spektre sme nezachytili prítomnosť smerodajného oxazolového píku. Rohodli sme sa preto zamerať na syntézu prekursoru VEGFR2 TK inhibítora vychádzajúc z monobrómovaného intermediátu **5**. V tomto experimente, ktorého výstupom je ¹H-NMR analýza KF-017-14.fid, sa prvý krát podarilo v zmesnom spektre zachytiť prítomnosť oxazolového píku (ca 6.0 ppm). Reakciu sme najprv uskutočnili v malej navážke z **5** (65 mg). Výsledkom bol vznik 30 mg surovej reakčnej zmesi, z ktorých sme 5 mg odobrali na ¹H-NMR analýzu. Pri ďalšom pokuse zopakovať reakciu za rovnakých reakčných podmienok vychádzajúc z 360 mg intermdiátu **5**, (> 5 násobok), reakcia nebola úspešná. Zmes látok, ktorá vznikla z predošlej úspešnej reakcie, sa od seba pokúsime chromatograficky oddeliť a potvrdiť prítomnosť a čistotu požadovaného produktu **7**. Ďalšou optimalizáciou sa pokúsime upraviť reakčné podmienky tak, aby bola reakcia úspešná aj z väčších navážok.

9. Záver

V rámci diplomovej bakalárskej práce sa nám podarilo popísať vlastnosti TAM rodiny TK receptorov a ich prepojenie s ochoreniami ako sú lymfoblastická leukémia (Mer) a koronárne ochorenie srdca (Tyro3). Zároveň sa nám podarilo sprehľadniť sériu vybraných, nedávno pripravených inhibítorov Mer a Tyro3 TK receptorov. Zistili sme, že nízkomolekulová látka **7 (UNC569)** je zlúčeninou utlmujúcou fosforyláciu v kinázovej doméne Mer TK receptora, ktorá sa mimoriadne neočakávaným a zaujímavým spôsobom viaže do ATP väzbového miesta Mer. V prípade Tyro3 TK receptora sme nedosiahli jednoznačných výsledkov potvrdzujúcich mimoriadny potenciál vybraných spiroindolínových inhibítorov **16, 18 a 20**.

V praktickej časti práce sme uskutočnili 5 stupňov syntézy s cieľom pripraviť požadovaný intermediát **7**. Kroky 1-4 prebehli úspešne, pričom všetky látky (**1-5**) sa nám podarilo pripraviť v dostatočnej čistote. (Schéma 3-6) Posledným krokom bola syntéza oxazolu **7** - prekursoru inhibítorov VEGFR2 TK. Táto látka sa nám však nepodarila pripraviť v dostatočnom množstve a v dostatočnej čistote. (Schéma 7). V zmesnom spektre sa charakteristický posun oxazolového vodíku nachádza (KF-017-14.fid). Spektrum jednoznačne potvrdí štruktúru látky **7** až po jej oddelení od ďalších látok. Optimalizáciou reakčných podmienok sa po preukázaní prítomnosti prekursoru **7** bude treba zapodievať s cieľom pripraviť látku **7** vo väčšom množstve.