

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta

**Syntéza ligandov pre reakcie organických alkínov a azidov
katalyzované biologickým cieľom**

Bakalárska práca

Študijný program: Biochémia

Školiace pracovisko: Katedra organickej chémie, PRIF UK

Školiteľ: Mgr. Miroslav Murár

Konzultant: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Bratislava, 2017

Jana Hricová



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

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

Názov: Syntéza ligandov pre reakcie organických alkinov a azidov katalyzované biologickým cieľom
Synthesis of ligands for biological target guided reactions of organic azides and alkynes

Literatúra: pôvodné a prehľadové články vo vedeckých časopisoch, vedecké monografie

Cieľ: Inhibitory biologických cieľov (enzýmov, receptorov...) predstavujú moderné molekulové liečivá. Kinázy sú enzýmy zabezpečujúce receptorovú medzibunkovú signalizáciu prenosom fosfátu z ATP na cytosolické proteíny. VEGFR2 tyrozín kináza je kľúčový enzým uplatňujúci sa pri neovaskularizácii tumorov, čo súvisí s ich progresiou a schopnosťou vytvárať metastázy. Organické alkiny a azidy dávajú v jednom stupni fúziou 1,2,3-triazolové zlúčeniny. Reakcia prebieha s dobrým výťažkom a čisto, bez vedľajších produktov. Takéto reakcie sa nazývajú Click reakcie. Click reakcie sa dajú uskutočniť v laboratóriu, ako aj katalyzovať samotnou kinázou. Kináza si takto pripraví na mieru sity vlastný účinný inhibitor. In situ Click reakcie na VEGFR2 tyrozín kináze neboli dosiaľ uskutočnené. Cieľom práce je spracovanie najnovšej vedeckej literatúry ohľadom in Situ Click chémie a syntéza počítačom predpovedaného ligandu, ako prípravy na uskutočnenie reakcie v prostredí biomakromolekuly. Čiastkové ciele bakalárskej práce sú analýza literatúry 2014-2016 týkajúca sa In Situ Click chémie, trojstupňová syntéza počítačom predpovedaného alkinového ligandu určeného pre Click chémiu a syntéza 1,2,3-triazolového inhibítora a zabezpečenie jeho testovania na zistenie IC50 inhibičnej konštanty na izolovanom enzýme, čo je prípravou na samotnú In Situ Click chémiu katalyzovú VEGFR2 TK enzýmom.

Kľúčové slová: medicínska chémia, organická syntéza, VEGFR2 tyrozín kináza, in Situ Click chémia

Vedúci: Mgr. Miroslav Murár
Konzultant: doc. RNDr. Andrej Boháč, CSc.
Oponent: PharmDr. Ivica Sigmundová, PhD.
Katedra: PriF.KOrCh - Katedra organickej chémie
PriF vedúci katedry: doc. RNDr. Martin Putala, CSc.

Dátum zadania: 23.03.2016

Dátum schválenia: 19.05.2017 doc. RNDr. Martin Putala, CSc.



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

vedúci katedry

šľudent

vedúci práce

Prehlásenie

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

V Bratislave, dňa

Jana Hricová

Pod'akovanie:

Týmto chcem poďakovať doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. za odborné vedenie a úsilie venované korekcii tejto práce. Ďakujem môjmu školiteľovi Mgr. Miroslavovi Murárovi za cenné odborné rady, usmernenie a trpezlivosť pri práci v laboratóriu a pri písaní bakalárskej práce.

Moja vďaka patrí aj všetkým osobám, ktoré akokoľvek prispeli k realizácii tejto práce a taktiež mojej rodine.

Obsah

1	Grafický abstrakt uskutočnenej syntézy	10
1.1	Grafický abstrakt NMR spektier	11
	Použité skratky.....	13
	Ciele diplomovej práce	14
2	Návrhy syntézy požadovaných ligandov	14
2.1	Prvý návrh syntézy alkínových ligandov 8	14
2.2	Druhý návrh syntézy alkínových ligandov 8	14
3	Úvod.....	15
4	Teoretická časť – Medicínska chémia	16
4.1	<i>In-Situ</i> Click chémia.....	16
4.2	Huisgenova [3+2] cykloadícia a jej katalyzované modifikácie	16
4.3	Meďná katalýza v živých systémoch a v <i>In-Situ</i> syntéze.....	17
4.3.1	Meďou katalyzovaná alkín - azidová cykloadícia	17
4.3.2	Click reakcie pomocou cyklických alkínov s napnutým kruhom (<i>Strain-promoted alkyne - azide cycloaddition (SPAAC)</i>)	19
4.3.3	Cu-chelačné azidy (Copper-chelating azides)	20
4.3.4	Katalýza Click reakcie s polymérne zachytenými nano- časticami medi (<i>E-Cu-NPs entrapped copper nanoparticle catalysts</i>).....	21
4.4	Mechanizmus <i>In-Situ</i> Click reakcie	22
4.4.1	Acetylcholin esteráza	25
4.4.2	HIV-1 proteáza	27
4.5	Aplikácia Click chémie pri syntéze ligandov s protirakovinovou aktivitou	28
4.5.1	Inhibítory Topoizomerázy II.....	28
4.5.2	Inhibítory HDAC	29
4.5.3	Inhibítory PTKs	30
4.5.4	Antimikrotubulárne činidlá.....	31

5	Teoretická časť – Organická syntéza.....	32
5.1	K predpokladanej syntéze <i>N</i> -(4-kyanopyridín-2-yl)acetamidu (10a)	32
5.2	K návrhu syntézy <i>N</i> -(4-formylpyridín-2-yl)acylamidov (6 (a-c))	33
5.3	K návrhu syntézy <i>N</i> -(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acylamidov (8 (a-c))	35
5.4	K predpokladanej syntéze 2-aminoizonikotínnitrilu (11)	42
5.5	K predpokladanej syntéze 2-aminoizonikotínaldehydu (12)	44
5.6	K predpokladanej syntéze <i>N</i> -(4-formylpyridín-2-yl)acylamidov (6 (a-c))	45
5.7	K predpokladanej syntéze <i>N</i> -(4-((2-etynylfenylamino)metyl)-pyridín-2-yl)acylamidov (8 (a-c))	47
6	Experimentálna časť	48
6.1	Metódy a použitý materiál	48
6.2	Príprava 2-chlórizonikotínaldehydu (2)	48
6.3	Príprava 2-chlór-4-(dimetoxymetyl)pyridínu (3)	50
6.4	Príprava <i>N</i> -(4-(dimetoxymetyl)pyridín-2-yl)acetamidu (5a)	51
6.5	Príprava <i>N</i> -(4-formylpyridín-2-yl)acetamidu (6a)	52
6.6	Príprava <i>N</i> -(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acetamidu (8a)	54
7	Diskusia	55
8	Záver	59
	Conclusion	59
	Zoznam použitej literatúry	60
9	Prílohy.....	64
9.1	2-chlórizonikotínaldehyd (2).....	64
9.2	2-chlór-4-(dimetoxymetyl)pyridín (3)	66
9.3	<i>N</i> -(4-(dimetoxymetyl)pyridín-2-yl)acetamidu (5a).....	68
9.4	<i>N</i> -(4-formylpyridín-2-yl)acetamid (6a).....	70
9.5	<i>N</i> -(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acetamidu (8a)	72

Abstrakt

Jana Hricová: Syntéza ligandov pre reakcie organických alkínov a azidov katalyzované biologickým cieľom

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie
Bakalárska práca, 73 strán, 2017

Moderný vývoj chemických liečiv predpokladá molekulové liečivá ako inhibítory biologických cieľov. Identifikácia vhodných molekulových cieľov následne vedie k liečbe nádorových ochorení pomocou cielej terapie. Click reakcie prebiehajú mechanizmom [3+2] cykloadície medzi organickými alkínmi a azidmi za vzniku 1,2,3-triazolov. Práca sa zameriava na charakteristiku jednotlivých druhov Click reakcií a hlavne na aplikáciu Click chémie v oblasti syntézy ligandov s protirakovinovou aktivitou.

Kľúčové slová: *in situ* Click chémie, medicínska chémie, organická syntéza, VEGFR2 tyrozín kináza.

Abstract

Jana Hricová: Synthesis of ligands for biological target guided of organic alkynes and azides.

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

Bachelor work, 73 pp., 2017

The modern development of chemical drugs predicts molecular inhibitors of the biological targets. The identification of key molecular targets results in the treatment of cancer by means of targeted therapy. Click reactions undergoes [3+2] cycloaddition among organic alkynes and azides to form 1,2,3-triazoles. This work is focused on characteristics of the types of Click reactions and on the synthesis of Click chemistry precursors for compounds with predicted anticancer activity.

Key words: *in situ* Click chemistry, medicinal chemistry, organic synthesis, VEGFR2 tyrosine kinase.

1 Grafický abstrakt uskutočnenej syntézy

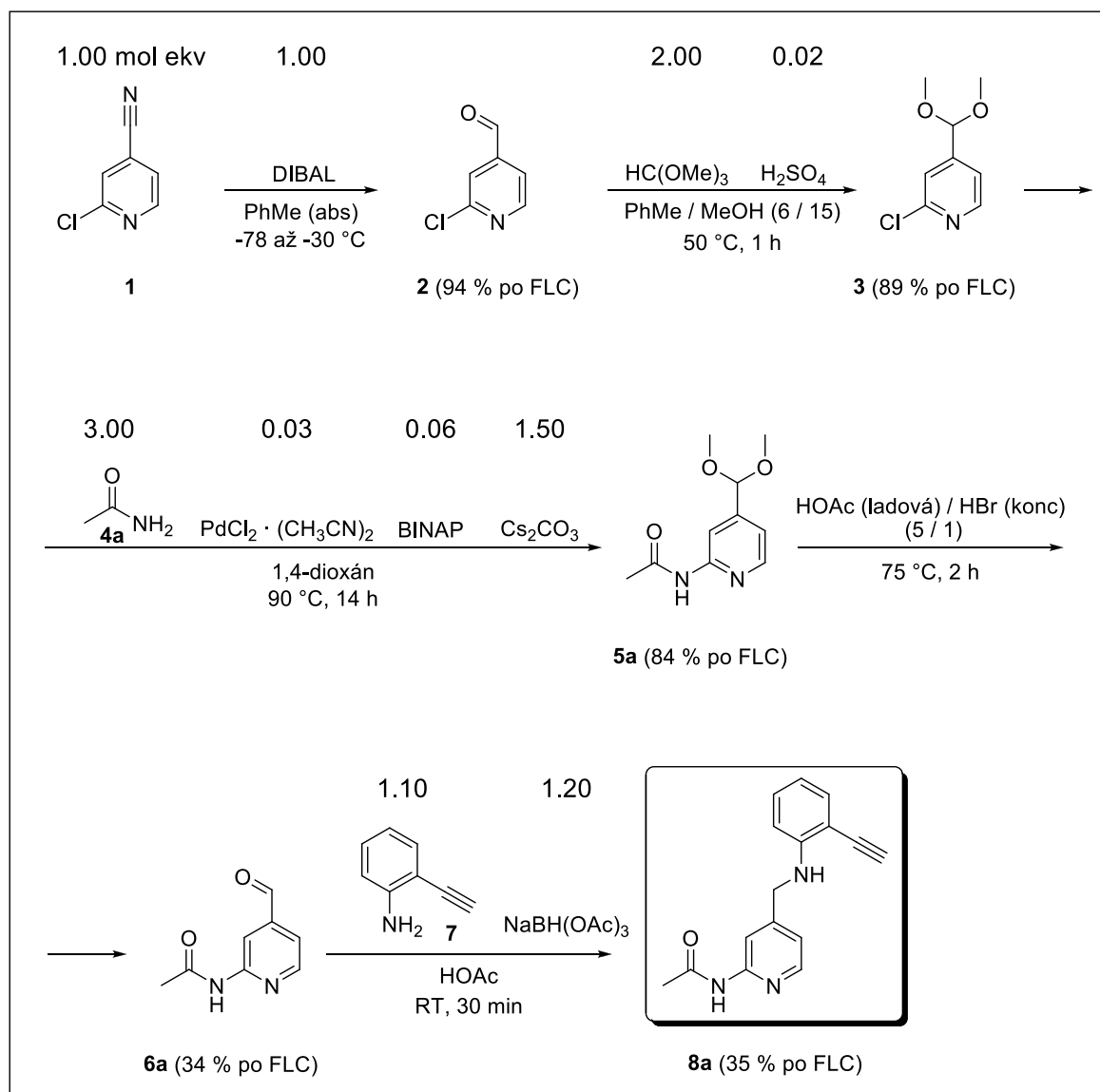
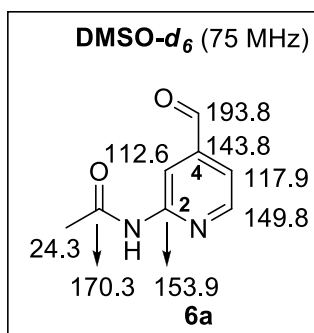
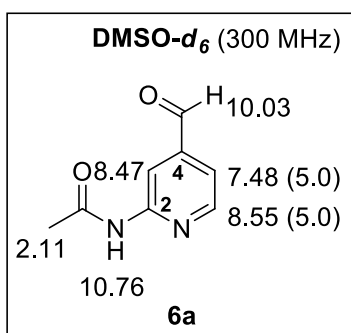
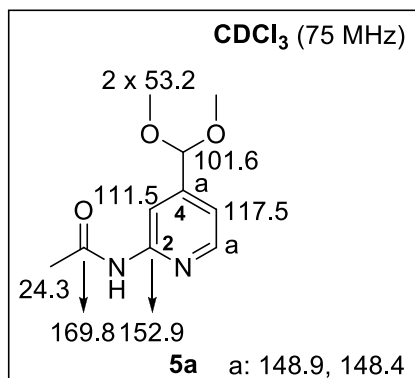
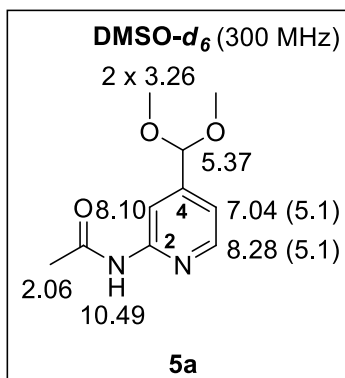
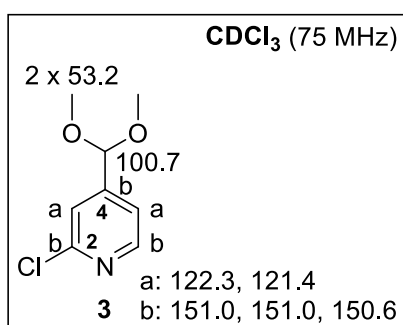
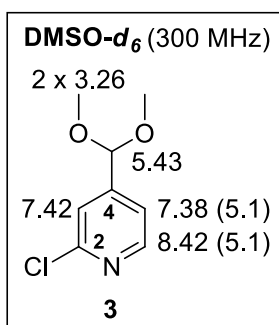
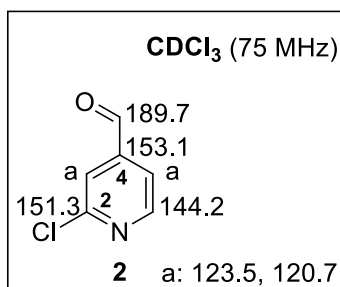
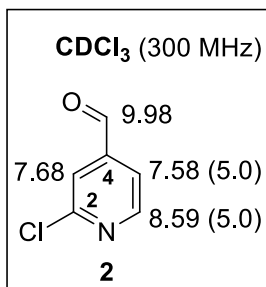
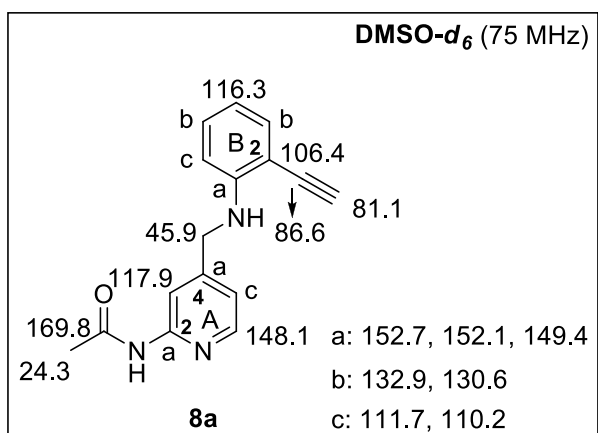
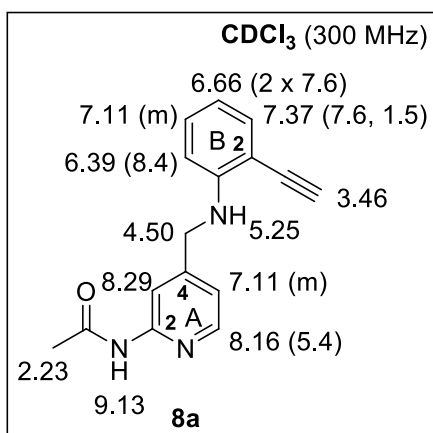


Schéma 1. Upravený úspešný návrh syntézy alkinu **8a**.

1.1 Grafický abstrakt NMR spektier



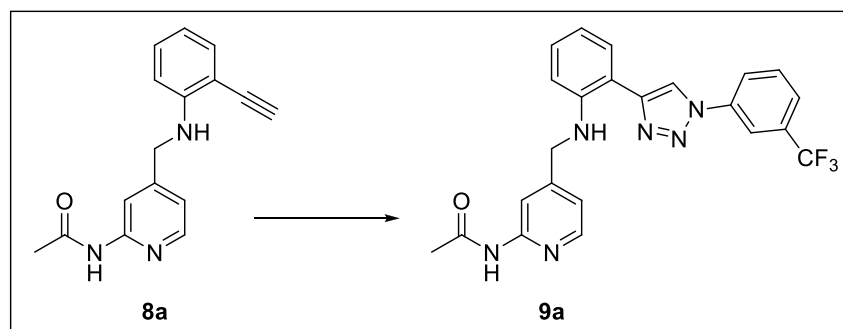


Použité skratky

AChE	Acetylcholin esteráza
BINAP	2,2'-bis(difenylfosfín)-1,1'-binaftyl
CuAAC	Meďou katalyzovaná alkín – azid cykloadícia (<i>Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
DCC	<i>Dynamic combinatorial chemistry</i>
DIBAL	diizobutylalumínium hydrid
DIEA	<i>N</i> -etyl- <i>N,N</i> -diizopropylamín
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DTP	dietyl 1,4-dihydro-2,6-dimetyl-3,5-pyridíndikarboxylát
EA	etyl-acetát
FLC	stredne tlaková stĺpcová chromatografia (<i>Flash chromatography</i>)
HDAC	histón deacetyláza (<i>Histone Deacetylase</i>)
HDACIs	inhibitory histón deacetylázy (<i>Histone deacetylase inhibitors</i>)
MCF-7	bunková línia rakoviny prsníka (<i>Michigan cancer foundation-7</i>)
Pd ₂ dba ₃	tris(dibenzylidéneacetón)dipaládium (0)
PdCl ₂ · (CH ₃ CN) ₂	bis(acetonitril)dichlóropaládium (II)
PTA	kyselina fosfowolfrámová (<i>Phosphotungstic acid</i>)
PTKs	proteín tyrozín kinázy (<i>Protein tyrosine kinases</i>)
Ra-Ni	Raneyov nikel
RuAAC	Ruténium katalyzovaná alkín - azid cykloadícia (<i>Ru-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
Schwartzovo činidlo	bis(cyklopentadienyl)zirkónium (IV) chlorid hydrid
SPAAC	Azid - alkín cykloadícia s napnutým kruhom (<i>Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
SPANC	Azid - nitrón cykloadícia s napnutým kruhom (<i>Strain-promoted azide-nitrone cycloaddition</i>)
TBTA	tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)metyl]amín
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfín
TFA	kyselina trifluóroctová
TGS	<i>Target-guided synthesis</i>
THF	tetrahydrofurán
THPTA	tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)amín
VEGFR 2	Vaskulárny endoteliálny rastový faktorový receptor 2 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>)

Ciele diplomovej práce

1. Spracovanie najnovších poznatkov z *in situ* Click chémie.
2. Viacstupňová syntéza počítačom predpovedaného alkínového ligandu navrhnutého pre *in situ* Click chémiu.
3. Syntéza 1,2,3-triazolového inhibítora na vyvinutom ligande (bod 2) v 50 mg množstve na zabezpečenie jeho testovania (IC_{50} , VEGFR2 kináza)



2 Návrhy syntézy požadovaných ligandov

2.1 Prvý návrh syntézy alkínových ligandov 8

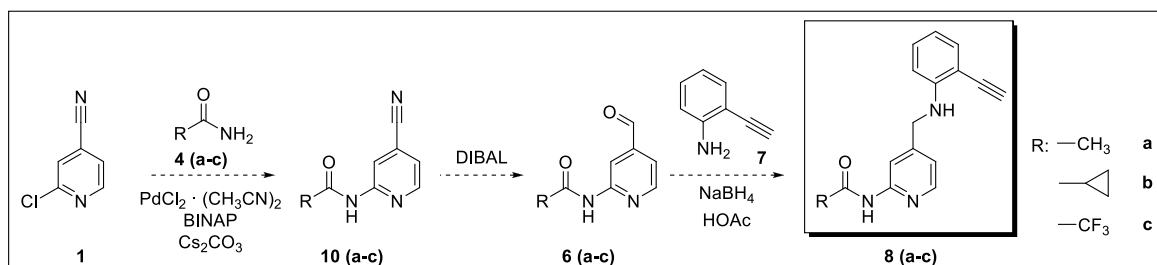


Schéma 2. Prvý návrh syntézy alkínového ligandu 8.

2.2 Druhý návrh syntézy alkínových ligandov 8

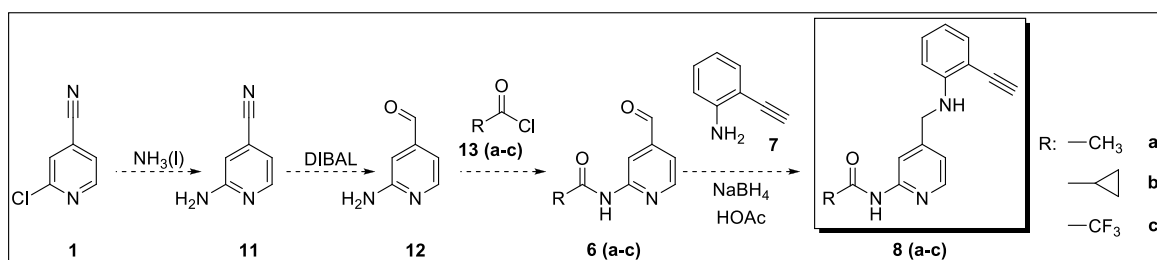


Schéma 3. Druhý návrh syntézy alkínového ligandu 8.

3 Úvod

V súčasnosti do oblasti medicíny preniká odbor medicínskej chémie: interdisciplína chemických a biologických odborov. Do praxe sa dostalo množstvo chemických liečiv, ktoré zachraňujú ľudské životy a zlepšujú kvalitu života jednotlivca. Moderný vývoj chemických liečiv sprevádza objasnenie funkcie enzýmov a porozumenie koncepcii receptorov. Inhibítory biologických cieľov predstavujú moderné molekulové liečivá.

Pokroky v molekulárnej biológii a príbuzných biologických odboroch viedli k objasneniu mechanizmov onkogenézy, čím pomáhajú identifikovať dôležité molekulové ciele, ktoré by bolo možné využiť v liečbe nádorových ochorení pomocou cielej terapie.

Jednou z najdôležitejších terapeutických dráh v biológii tumorov sú kinázové signálne dráhy. Kinázové receptory prenášajú signál z medzibunkového priestoru pomocou chemického posla (rastového faktoru, signálnej bielkoviny), ktorý informáciu odovzdáva tyrozínkinázovému receptoru. TK receptor sa konformačne mení a spúšťa požadovanú signálnu dráhu. Dôležitým receptorom pri neovaskularizácii tumorov je VEGFR2 tyrozínkinázový receptor.

Organické alkíny a azidy poskytujú jednostupňovou reakciou 1,2,3-triazolové zlúčeniny, takéto reakcie sa nazývajú Click reakcie. Uskutočňovaniu týchto reakcií v prostredí biomakromolekuly sa venuje *in situ* Click chémia. Samotné click reakcie prebiehajú relatívne čisto, bez vedľajších produktov a v dobrých výťažkoch. Pri *in situ* Click reakcii využívame katalýzu Click reakcie fixovaním vhodných ligandov slabými interakciami v aktívnom mieste biomakromolekuly, čím sa zníži aktivačná energia reakcie organického alkínu s azidom a za fyziologickej teploty môže dôjsť k syntéze účinného inhibítora, ktorú si samotný enzým katalyzuje a ušije si na mieru svoj vlastný inhibítor.

4 Teoretická časť – Medicínska chémia

4.1 *In-Situ Click chémia*

V súčasnosti Click chémia vzbudzuje veľký záujem a predstavuje vplyvný nástroj na vývoj bioaktívnych látok a liečiv.

Cieľom Click chémie je syntetizovať rôzne inhibítory s využitím vhodných východiskových látok. Väčšina Click reakcií v sebe zahŕňa tvorbu väzieb C-heteroatóm (N, O, S). Charakteristickými vlastnosťami Click chémie sú mierne reakčné podmienky, relatívne dostupné východiskové látky, vysoké výťažky, veľká selektivita a ľahká izolácia produktu.¹

4.2 Huisgenova [3+2] cykloadícia a jej katalyzované modifikácie

Mechanizmus katalyzovanej cykloadície bol opísaný Sharplessom a jeho spolupracovníkmi v roku 2002.²

Click reakcie prebiehajú ako [3+2] cykloadície. V prípade syntézy 1,2,3-triazolov z terminálnych alkínov a azidov ide o jednu z energeticky najvýhodnejších reakcií na vytváranie väzieb uhlík-heteroatóm(y)-uhlík. Dipóly a dipolarofily využívané v Click reakciách sú deriváty alkénov, alkínov a rôznych dipolárnych zlúčenín. Dvojité a trojité väzby sú energeticky bohaté funkčné skupiny, z ktorých v reakcii vzniká energeticky chudobnejší cykloadičný produkt, čo umožňuje dobrú energetickú bilanciu reakcie.

Huisgenova cykloadícia sa zakladá na reakcii dipolárofilu s 1,3-dipolárnou zlúčeninou, ktoré spolu vytvoria päťčlenný heterocyklický kruh. V zastúpení dipolarofilov môžu byť napr. alkény, alkíny, karbonyly alebo nitrily. Tieto zlúčeniny obsahujú atómy uhlíka, dusíka, kyslíka, zatiaľ čo 1,3-dipolárne zlúčeniny predstavujú dipólové molekuly a mali by obsahovať aspoň jeden heteroatóm.³ Click reakcie nevyžadujú inertnú atmosféru, ani suché prostredie a sú kompatibilné s mnohými funkčnými skupinami. Výhodou Click reakcií je ľahká izolácia produktu bez využitia chromatografických metód.⁴ Väčšina Click reakcií v sebe zahŕňa vznik väzby uhlík-heteroatóm (hlavne N, O, S). Click reakcia je termodynamicky preferovaná, ale zároveň pomalá reakcia kvôli vysokej aktivačnej bariére,

¹ Nie, J.; Li, J.-P.; Deng, H.; Pan, H.-C. *Chin. J. Anal. Chem.* **2015**, 43, 609-617.

² Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 2004-2021.

³ Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.

⁴ Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, 4905-4979.

ktorej hlavnou zložkou je entropický faktor. Termodynamickú preferenciu reakcie zabezpečuje nízka energia produktu voči relatívne vysoko energetickým východiskovým látkam.

V roku 1960 bola Huisgenom opísaná termická 1,3-dipolárna cykloadícia medzi alkínmi a azidmi. Spočiatku nemala dobrú selektivitu a poskytovala zmes 1,4- a 1,5-disubstituovaných derivátov 1,2,3-triazolov. Reakcia vyžadovala zahrievanie a dlhý reakčný čas na úplnú konverziu východiskových látok. S rozvojom Click chémie sa podarilo fyziologicky nekompatibilné podmienky eliminovať, čo viedlo k využiteľnosti 1,3-dipolárnej cykloadície v In-Situ Click chémii.³

V medicínskej chémii je 1,3-dipolárna cykloadícia medzi alkínmi a organickým azidom jednou z najvýznamnejších Click reakcií. Jej produktom sú 1,2,3-triazoly, ktoré sú π -elektrónovo bohaté zlúčeniny. Ich špecifickou vlastnosťou je slabá bázicita. Vo fyziologickom pH triazolový kruh nie je protonizovaný.⁵

4.3 Med'ná katalýza v živých systémoch a v *In-Situ* syntéze

Bioortogonálne reakcie predstavujú skupinu akýchkoľvek reakcií, ktoré prebiehajú vo vnútri živých systémov bez narušenia priebehu biochemických procesov. Click reakcie sú kvôli vysokej špecifícite a efektívnosti najvýhodnejšou stratégiou pre potreby zavedenia fluorofóru alebo liečiva vo vnútri bunky. Rôzne funkcionizované produkty Click reakcií (1,2,3-triazoly) sú súčasťou mnohých liekov, účinných fungicídov a herbicídov. Avšak Click reakcie vyžadujú katalýzu prechodnými kovmi, ktoré sú toxické pre živý organizmus.⁶

4.3.1 Med'ou katalyzovaná alkín - azidová cykloadícia

Novodobá katalýza Click reakcií umožňuje jej urýchlenie a takmer kvantitatívne výťažky dokonca aj vo vode bez potreby chránenia funkčných skupín. V roku 2002 sa zistilo, že katalýzou med'nými soľami sa urýchlí priebeh Click reakcie 10^7 až 10^8 krát

⁵ Chemama, M.; Fonvielle, M.; Arthur, M.; Valéry, J. M.; Etheve-Quelquejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1929-1938.

⁶ Clavadetscher, J.; Hoffmann, S.; Lilienkamp, A.; Mackay, L.; Yusop, R. M.; Rider, S. A.; Mullins, J. J.; Bradley, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15662-15666.

a súčasne bola pozorovaná regiošpecifická preferencia v prospech 1,4-disubstituovaných triazolov.^{7,8} Takáto 1,3-dipolárna cykloadícia sa nazýva CuAAC (*Copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*) a vyžaduje prítomnosť Cu(I) katalyzátora. Katalyzátor sa zvyčajne pripravuje *in situ* z Cu(II) solí pomocou redukčného činidla, akým je napríklad TCEP alebo askorbát sodný. V súčasnosti je opísaná široká škála CuAAC reakcií,⁹ ktoré sa javia byť užitočnými prostriedkami pre vývoj nových molekulových liekov, bioaktívnych materiálov, antibakteriálnych a neimunogénnych povrchov pre lekárske implantáty.

Regioselektívna cykloadičná reakcia medzi organickými terminálnymi alkínmi a azidmi za vzniku 1,5-disubstituovaných regioizomérov môže byť taktiež katalyzovaná napr. komplexami pentametylcyklopentadienylruténium chloridu ($\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$). V porovnaní s CuAAC, ruténium katalyzovaná alkínovo-azidová cykloadícia (RuAAC) môže byť uskutočnená aj na interných (disubstituovaných) alkínoch.¹⁰

CuAAC a RuAAC katalýza umožňujú selektívny syntetický prístup k obom regioizomérom 1,2,3-triazolov a pomáha k objaveniu nových zlúčenín, ktoré majú požadovanú biologickú aktivitu.⁴ Pomocou CuAAC reakcie bol pripravený inhibítor histón deacetylázy (HDAC), ktorý ukázal vysokú účinnosť inhibície progresie viacerých tumorových bunkových línii.^{11,34,35} (Obr. 9, 10)

Na zlepšenie aktivity a prekonanie bakteriálnej rezistencie boli pripravené antimikrobiálne konjugáty na základe ciprofloxacínu a neomycínu B.¹²

Nevýhodou CuAAC reakcií je dôsledok cytotoxicity Cu(I) v živých organizmoch. Meďné ióny sú ľahko a ochotne chelátované natívnymi aminokyselinami a môžu indukovať tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, čo má za následok poškodenie buniek a tkanív v organizme oxidačným stresom a indukciou zlomov v DNA.¹³ V dôsledku toxického efektu Cu(I) iónov bolo vynaložené značné úsilie odstrániť potrebu medi v bioorganických reakciách uskutočňovaných za prítomnosti cieľových biomakromolekúl.

Na odstránenie vplyvu toxicity medi sa využili Cu^I-stabilizované ligandy (deriváty triazolov) TBTA a THPTA (Obr. 1). TBTA a THPTA sú ligandy, ktoré sa využívajú na

⁷ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

⁸ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

⁹ The Scripps Research Institute (TSRI); Patent US7375234 B2, **2008**.

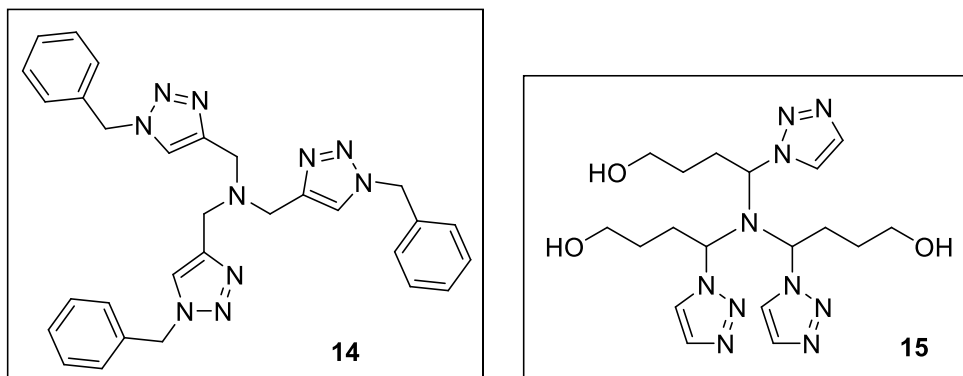
¹⁰ Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.

¹¹ Accenda Tech Co., Ltd.; Patent WO2011003365 A1, **2011**.

¹² Technion Research & Development Foundation Limited; Patent WO2010113151 A1, **2010**.

¹³ Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.

zvýšenie rýchlosti cykloadície a zníženie toxicity Cu(I) v *in situ* Click chémii. V prípadoch, kde kinetika cykloadície nepresiahne 24 h sú Cu(I) stabilizované ligandy efektívnym nástrojom na potlačenie toxicity meďných iónov. Avšak po 24 h sa objavuje toxicita spôsobená meďnými soľami aj napriek prítomnosti Cu(I)-stabilizovaných ligandov.¹⁴



Obrázok 1. Cu^I-stabilizované ligandy **14**, **15** využívané na Click reakcie. Vľavo sa nachádza TBTA a vpravo THPTA.

4.3.2 Click reakcie pomocou cyklických alkínov s napnutým kruhom (*Strain-promoted alkyne - azide cycloaddition* (SPAAC))

Na potlačenie toxického efektu meďných solí vedci využili pnutie kruhu ako alternatívny prostriedok na aktiváciu alkínov a uskutočnenie cykloadície s azidmi v živých bunkových systémoch.^{15,16} Príkladom sú rôzne druhy cyklooktínov, ktorých vnútorné pnutie spôsobilo zvýšenie reakčnej rýchlosti s azidmi.

Obmedzenie reakcie spočíva v prítomnosti osemčlánkového kruhu, ktorý nie je vždy želaný fragment pri *In-Situ* Click reakcii. Urýchlenie Click reakcie cez cyklooktíny umožnilo ich úspešné využitie na značenie biomakromolekúl napr. v živých organizmoch (Obr. 2).^{17,18,19}

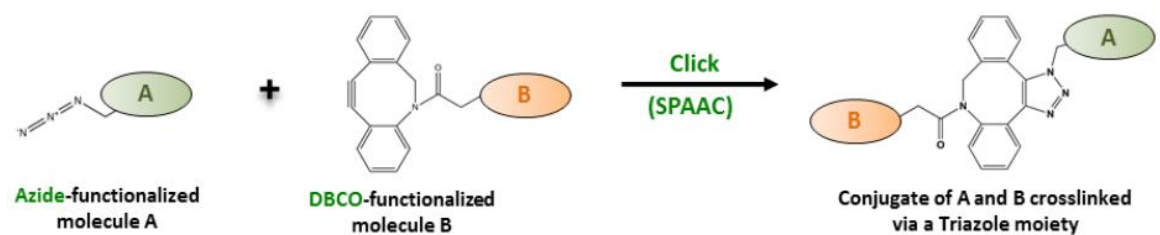
¹⁴ Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano Del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8051-8056.

¹⁵ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.

¹⁶ Agarwal, P.; Beahm, B. J.; Shieh, P.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 11504-11510; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 11666-11672.

¹⁷ Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 16793-16797.

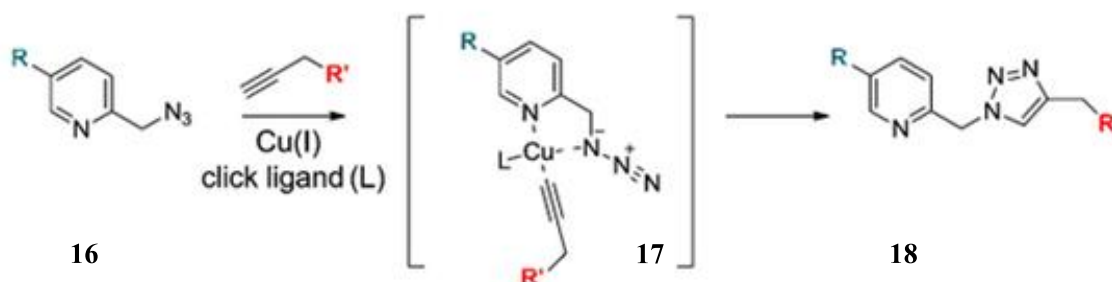
¹⁸ Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107, 1821-1826.



Obrázok 2. SPAAC Click reakcia bez využitia Cu(I) katalyzátora.

4.3.3 Cu-chelačné azidy (Copper-chelating azides)

Druhým spôsobom potlačenia cytotoxicity je využitie vo vode rozpustných ligandov, ktoré obsahujú komplex medi s katalytickou funkciou. K molekule azidu **16** je chelatačne viazaná Cu(I) v adukte **17**, pričom je relatívne silno fixovaná, čím sa znižuje jej cytotoxický charakter.^{20,21} (Obr. 3)



Obrázok 3. CuAAC s využitím Cu-chelačných azidov.

¹⁹ Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253-2255.

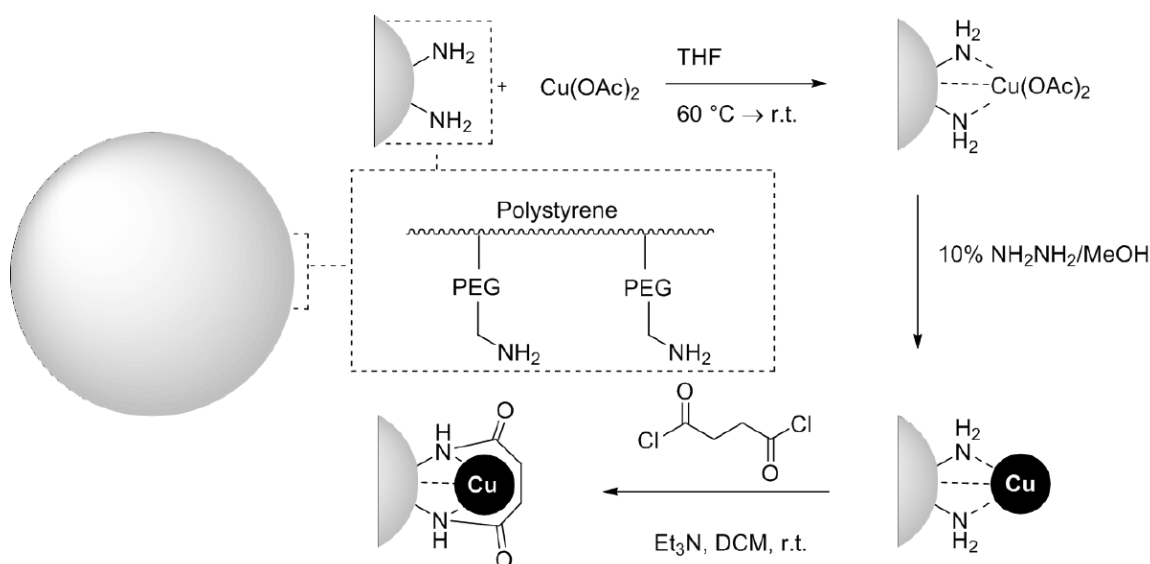
²⁰ Uttamapinant, C.; Tangpeerachaikul, A.; Grecian, S.; Clarke, S.; Singh, U.; Slade, P.; Gee, K. R.; Ting, A. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5852-5856.

²¹ Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 5872-5876.

4.3.4 Katalýza Click reakcie s polymérne zachytenými nanočasticami medi (*E-Cu-NPs entrapped copper nanoparticle catalysts*)

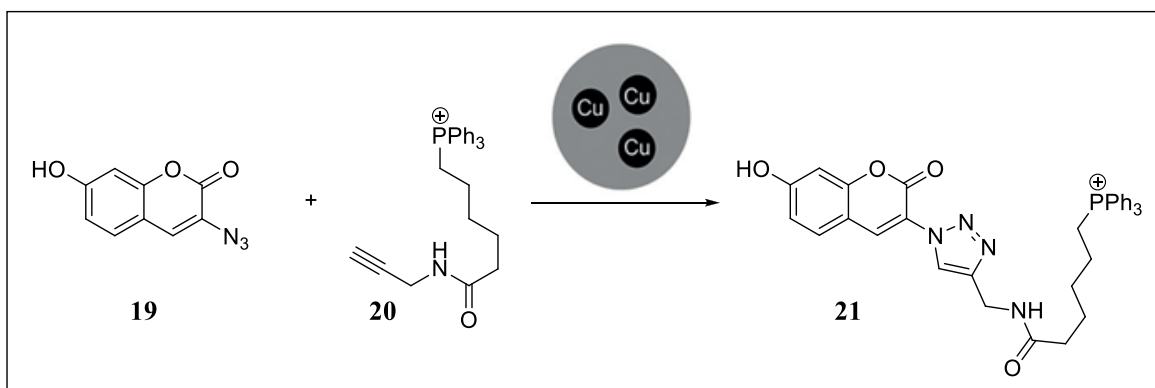
Vedci opisujú rozvoj a využitie⁶ netoxického, biokompatibilného a implantovateľného heterogénneho Cu katalyzátora, ktorý vykazuje funkčnosť v *in vitro* aj *in vivo* systémoch. Koncept E-Cu-NPs je použiteľný v *in situ* syntéze bioaktívnych liečiv.

Heterogénny katalyzátor obsahuje uväznenú Cu v polymérnom nosiči. Syntéza katalyzátora prebieha v troch hlavných krokoch. (Obr. 4)



Obrázok 4. Na obrázku je znázornená syntéza heterogénneho katalyzátora. Na polymérny nosič obsahujúci ramienka s NH_2 -funkčnými skupinami sa po inkubácii s roztokom $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ naviaže Cu. Následne dochádza k redukcii pomocou hydrazínu a uväzneniu medi vo vnútri nanočastice premostením amínov sukcinyl dichloridom.

Katalytická aktivita takýchto Cu nanočastíc bola preukázaná na 3-azido-7-hydroxykumaríne **19** (kumarínový profluorofór) s alkínovým derivátom **20**. (Obr. 5) Aktivovaný profluorofór **21** následne autori využili na bunkové testy.



Obrázok 5. E-Cu-NPs sprostredkovaná cykloadícia 3-azido-7-hydroxykumarínu **19** a derivátu alkínu **20**.

SKOV-3 (*ovarian adenocarcinoma*) bunky boli inkubované v prítomnosti aktívneho profluorofóru **19** s derivátom alkínu **20** a heterogénnym katalyzátorom lokalizovaným v extracelulárnom priestore. Detekciu vzniknutého triazolového produktu **21** potvrdili pomocou live-cell fluorescenčnej mikroskopie a cytometrie. Pomocou takto aktivovaného profluorofóru zaznamenali osemnásobný nárast fluorescencie v celkovej bunkovej populácii. Heterogénny katalyzátor nepreukázal cytotoxicitu v porovnaní s využitím homogénneho katalytického systému (CuSO_4 / THPTA), ktorý vykazoval cytotoxicitu po 24 h.

Dôležitým dôkazom biokompability heterogénneho katalyzátora a následná aplikácia v živých organizmoch bola jeho implantácia do žltkového vaku rybích embryí (Zebrafish). Heterogénny katalyzátor nevykazoval toxicitu, nebola pozorovaná zmena fenotypu a embryá sa vyvíjali prirodzeným spôsobom až do larválneho štádia.

Metodikou E-Cu-Nps vstavaných do polymérneho podkladu autori demonštrovali biokompabilitu heterogénneho katalyzátora v živých bunkových systémoch.

Katalyzátory pripravené pomocou metódy E-Cu-NPs umožňujú *in situ* syntézu cytotoxických protirakovinových zlúčenín, ktoré indukujú apoptózu bunky.

4.4 Mechanizmus In-Situ Click reakcie

Jeden z možných prístupov pri navrhovaní liečiv v medicínskej chémii pozostáva zo syntézy zlúčenín a ich následného biologického testovania. Ak by si biologický cieľ aktívne vybral svoj najvhodnejší ligand, celý postup by sa optimalizoval a skrátil. Takto by

biologický cieľ fungoval ako ideálna predloha na syntézu dokonalého inhibítora. Tento princíp je využívaný v *In-Situ Click* chémii.

V biologických systémoch je to práve bioortogonalnosť alkínov a azidov, ktorá dáva týmto zlúčeninám vlastnosť ideálnych reakčných partnerov.²² Klasická alkínovo-azidová cykloadícia musí prekonať veľkú aktivačnú energetickú bariéru, a preto sa uskutočňuje pri zvýšených teplotách (> 80 °C). Avšak ak má templát v živom organizme schopnosť viazať dve podjednotky vhodným spôsobom, t.j. privedie alkín a azid do vzájomnej blízkosti s vhodnou orientáciou, aktivačná energia reakcie sa zníži natoľko, že reakcia prebehne už pri fyziologickej teplote a vytvorí sa detekovateľné množstvo triazolu. Hnacou silou reakcie je zníženie aktivačnej entropie na takú úroveň, aby reakcia začala prebiehať už pri laboratórnej či fyziologickej teplote. To je možné docieľiť vhodným farmakofórickým ukotvením podjednotiek (ligandov) v aktívnom mieste enzýmu.

Spôsob, akým biologický cieľ pôsobí na výber vhodných ligandov, z ktorých vzniká produkt sa nazýva target-guided synthesis (TGS).²³ V TGS sa rozlišujú dva základné prístupy, ktoré boli doposiaľ opísané. Prvým je rovnováha, alebo termodynamický prístup. Druhým je kinetický prístup. Oba prístupy zahŕňajú inkubáciu biologického cieľa s reaktívnymi stavebnými jednotkami.

Termodynamický rovnovážny prístup je známy aj pod názvom DCC (*Dynamic Combinatorial Chemistry*) a je založený na reverzibilnom spájaní jednotiek. Efekt templátu biologického cieľa posunie rovnováhu k špecifickému produktu. Termodynamický produkt sa identifikuje pomocou MS, NMR.²⁴ Do kinetického prístupu sa zaraďujú *In-Situ Click* reakcie, v ktorých je spájanie stavebných podjednotiek ireverzibilné, z dôvodu veľkej stability produktu voči relatívne reaktívnym východiskovým látkam.

Zlúčeniny, ktoré sú vytvorené oboma prístupmi pomocou TGS, sa následne veľmi ochotne viažu na proteín s oveľa vyššou väzobnou afinitou, ako ich individuálne stavebné podjednotky.

Vzhľadom na rôznorodé heterocyklické produkty, predstavuje Click chémia v navrhovaní liečiv všeobecnú a aplikovateľnú metódu pre mnohé biologické ciele. Jej budúcnosť spočíva v použití sady podjednotiek, pričom by sa liečivo mohlo syntetizovať pomocou *In-Situ Click* chémie aj priamo v organizme, napr. v tumore. Dôkazom je záujem

²² McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chemistry and Biology*. **2014**, 1075-1101.

²³ Abet, V.; Mariani, A.; Truscott, F. R.; Britton, S.; Rodriguez, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 4474-4489.

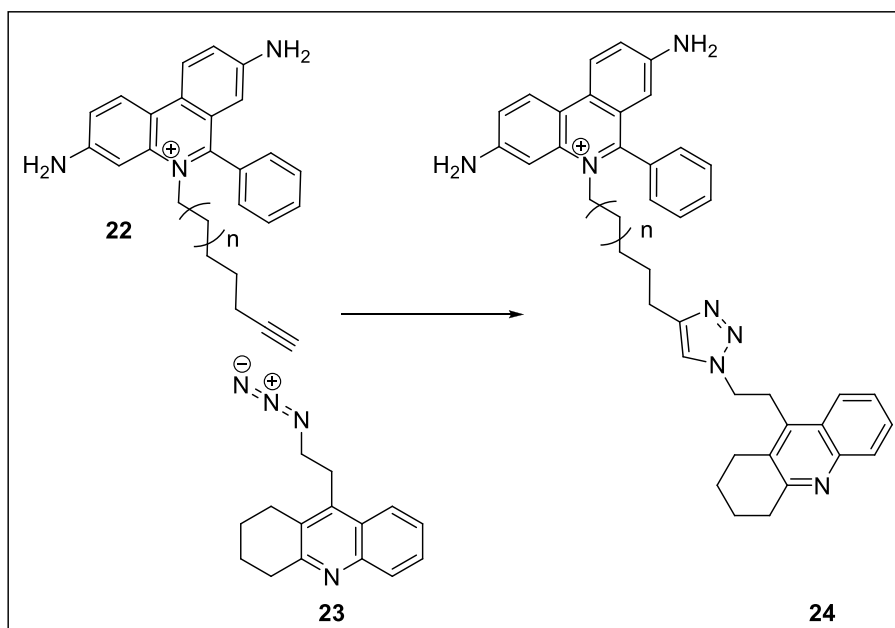
²⁴ Bunyapairoonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J.-M.; Peng, L.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2001**, 2, 438-444.

mnohých výskumných skupín, ktoré sa rozvojom *In-Situ* syntetizovaných bioaktívnych liečiv zaoberajú. Skúmanie prebieha na ochoreniach ako rakovina, AIDS, Huntingtonova choroba, antrax...

Konvenčný prístup vývoja liečiv pozostáva zo syntézy zlúčenín a ich následného biologického testovania. Tento postup by sa mohol skrátiť, ak by si biologický cieľ pre seba aktívne vybral najvhodnejší inhibítor. V skutočnosti by cieľ takto zohral úlohu ideálneho templátu a spôsobil by tak spojenie niektorých ligandov do väčšej molekuly. Dôležité je to, že enzým by mal byť schopný priniesť alkín a azid obsahujúce podjednotky do vzájomnej tesnej blízkosti, tak aby sa mohla prekonať vysoká aktivačná bariéra a cykloadičná reakcia by mohla prebehnúť už pri fyziologickej teplote. Týmto spôsobom reagujú len zlúčeniny, ktoré sú stereoelektronicky kompatibilné s aktívnym miestom enzýmu a súčasne sú reakčné skupiny udržiavané vo vhodnej vzdialenosti a geometrii.²⁵ V tomto prípade sa aktívne miesto enzýmu správa ako reaktívna komora. Táto stratégia bola využitá na identifikáciu vysoko účinných inhibítorov AChE.

AChE je kľúčový enzým, ktorý hydrolyzuje (deaktivuje) neurotransmitter acetylcholín v synaptickej nervovej štrbine. AChE je tiež farmakologický cieľ pre mnoho klinicky závažných chorôb, vrátane Alzheimerovej choroby. Na uskutočnenie syntézy vedci použili sadu analógov takrínu a fenantridínia ako derivátov terminálnych alkínov a azidov. Tieto zlúčeniny boli inkubované spolu s enzýmom a poskytli z viac ako 75 možných kombinácií len šesť 1,5-disubstituovaných triazolov. Následne boli zlúčeniny overené, ako najúčinnnejšie nekovalentné inhibítory AChE s nízkymi disociačnými konštantami. Jedna zlúčenina **24** sa ukázala ako doposiaľ najúčinnnejší objavený inhibítor AChE s pôsobivou afinitou charakterizovanou cez $K_d = 77$ fM. (Obr. 6)

²⁵ Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-12818.



Obrázok 6. *In-Situ* Click chémia. Na ľavej strane sa nachádzajú vhodné ligandy acetylcholíner esterase **22**, **23** viazanej v jej aktívnom mieste. Na pravej strane sa nachádza 1,5-disubstituovaný triazolový produkt **24** – účinný AChE inhibítor.

Na *in situ* Click reakciu sa nevyžaduje prítomnosť medi, pretože efektívnosť reakcie je založená na vzájomnej blízkosti ligandov (nízka entropia). Zaujímavé je poznamenať, že v tomto prípade 1,4-regioizomér nebol takto pripravený. Po jeho syntéze CuAAC a RuAAC metódami bolo dokázané, že 1,4-regioizomér predstavuje oveľa slabší inhibítor v porovnaní s jeho 1,5-disubstituovaným analógom produkovaným aj pomocou *in situ* Click chémie.²⁶

4.4.1 Acetylcholíner esterase

Sharpless uskutočnil prvý úspešný dôkaz konceptu *In-Situ* Click chémie s využitím acetylcholíner esterase (AChE).²⁷

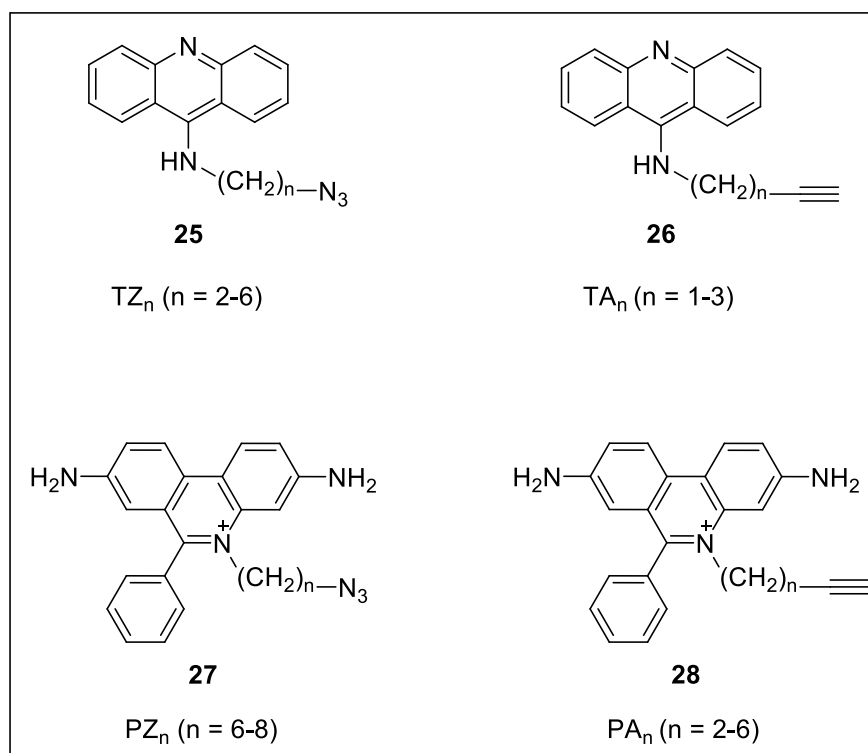
Využitie enzýmu ako enzymatického katalyzátora Huisgenovej reakcie s prípravou predpovedaných dipólov a dipolarofilov je doposiaľ relatívne nepreskúmanou metódou.

²⁶ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, 278-308.

²⁷ Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1053-1057.

Poňatie tohto prístupu závisí na simultánnom naviazaní sa oboch ligandov do väzbových miest proteínu, ktoré obsahujú komplementárne reaktívne skupiny schopné spolu reagovať.

Autori vybrali ako cieľ enzým acetylcholín esterázu AChE, ktorý má kľúčovú úlohu v hydrolýze (odbúraní) neurotransmiteru acetylcholínu v centrálnom a periférnom nervovom systéme.²⁸ AChE bola použitá, aby si vybrala a pomohla pripraviť triazolovo spojený inhibítor použitím vlastného špecifického miesta, kde sa viaže neurotransmitter pred jeho hydrolýzou. Na výber boli poskytnuté takrínové a fenantridíniové deriváty s rôzne dlhými bočnými reťazcami, ktoré boli zakončené alkínovými alebo azidovými zvyškami. (Obr. 7) Hoci sú AChE inhibítory klinicky využívané na liečbu Alzheimerovej demencie, musí sa s týmito zlúčeninami zaobchádzať s veľkou obozretnosťou pretože vysoko afinitné inhibítory sú potenciálne neurotoxické.



Obrázok 7. Alkínové a azidové stavebné jednotky. T-tacrine, P-fenantridínium, A-alkínový zvyšok, Z-azidový zvyšok, n-počet $-\text{CH}_2-$ skupín v reťazci linkera ligandov.

Ligandy znázornené na Obr. 7 umožňujú zostavenie 98 potenciálnych inhibítorov AChE, ktoré predstavujú regioizomérmne páry (*syn* a *anti* triazolov) vznikajúce zo zmesi ligandov tacrine / fenantridínium ($\text{TZ } 2-6/ \text{ PA } 2-6$ a $\text{TA } 1-3/ \text{ PZ } 6-8$) a regioizomérmnych párov zo zmesi tacrine / tacrine triazolov ($\text{TA } 1-3/ \text{ TZ } 2-6$). Každá z týchto možných

²⁸ Taylor, P.; Radic, Z. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 34, 281-320.

binárnych kombinácii bola inkubovaná v prítomnosti AChE pri laboratórnej teplote. Rýchlosť reakcie je pri týchto podmienkach bez prítomnosti enzýmu zanedbateľná, čo sa využíva ako negatívna kontrola reakcie. Detekovateľné množstvo triazolu je vytvorené iba v prítomnosti alkínu, azidu a enzýmu, ktorý ich spojí. Preskúmanie výsledných 49 reakcií ukázalo iba jedinú kombináciu, TZ 2 + PA 6, ktorá viedla k vytvoreniu triazolu s femtomolárnou aktivitou. Kontrolné experimenty potvrdili, že blokovaním enzýmu v aktívnom mieste buď kovalentným alebo nekovalentným spôsobom, inhibuje vznik daného triazolu. Okrem toho bolo dokázané, že 2 mol ekvivalenty triazolu vznikli na 1 mol ekvivalent aktívneho enzýmu. Z toho vyplýva, že adukt sa pevne viaže na AchE a uvedená *in situ* Click reakcia je preto veľmi pomalá.

4.4.2 HIV-1 proteáza

Experiment bol založený na využití katalýzy reakcie alkínu a azidu s HIV-1 proteázou. Ligandy spojené pomocou CuAAC dajú 1,4-disubstituovaný triazol - inhibítor tohto enzýmu. V skutočnosti pri *in situ* Click sa takýto inhibítor vytvorí spontánne v aktívnom mieste enzýmu. V tomto prípade bol 1,4-disubstituovaný triazolový ako dominantný produkt vytvorený v prítomnosti enzýmu s pomerom 18 : 1 v porovnaní s jeho 1,5-disubstituovaným regioizomérom. Keď boli do rovnakej zmesi pridané aj odlišné alkíny, bol spozorovaný selektívny výber vyššie uvedeného inhibítora čo demonštrovalo, že enzým môže riadiť selektivitu cykloadície.²⁹

Aplikácia tejto *in situ* Click techniky bola tiež demonštrovaná na príprave inhibítorov karbonickej anhydrázy,³⁰ čo naznačuje, že *in situ* Click technika je všeobecná a využiteľná pre rôzne biologické ciele.

²⁹ Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435-1439.

³⁰ Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H.; Kolb, H. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 116-120.

4.5 Aplikácia Click chémie pri syntéze ligandov s protirakovinovou aktivitou

Rakovina, tiež nazývaná ako malígna neoplázia, je zapríčinená poruchami v mechanizme bunkovej proliferácie, prežívania a súdržnosti buniek a je ťažkým zdravotným problémom vo všetkých krajinách sveta. Hoci sa klinicky využívajú protirakovinové liečivá s významnými liečebnými účinkami, stále je potrebné hľadať nové prostriedky s rôznymi aplikáciami. Významnú úlohu pri liečbe rakoviny zohrávajú inhibítory enzýmov v eukaryotických genómoch.

4.5.1 Inhibítory Topoizomerázy II

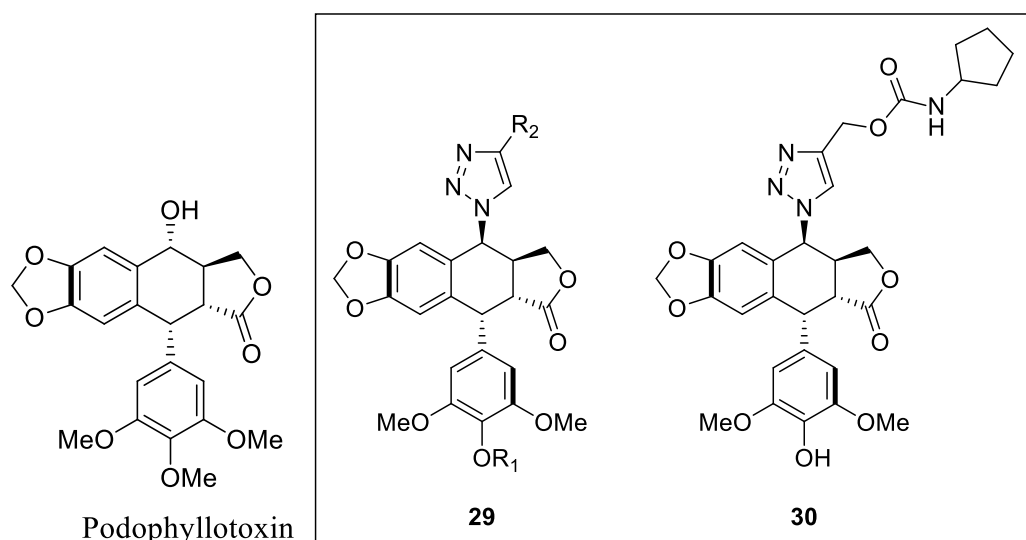
Topoizomerázy I, II sú enzýmy, ktoré riadia zmeny v terciárnej štruktúre DNA pomocou zlomov a následného znovuspojenia fosfodiesterovej väzby v DNA vlákne. V súčasnosti sú topoizomerázy dôležitým cieľom pre získavanie nových chemoterapeutík na liečbu rakoviny.

Antimikrotubulárne činidlo Podophyllotoxin pôsobiace v kolchicín-väzobnom mieste na tubulín³¹ sa kvôli vysokej toxicite klinicky nevyužíva. Napriek tomu sú známe jeho semisyntetické deriváty Etoposide, Teniposide využívané na liečbu rakoviny pľúc, lymfómu a Kaposiho sarkómu.

Autori pripravili deriváty Podophyllotoxinu (Obr. 8), kde väčšina z nich je účinnejšia ako Etoposide. Vybrané zlúčeniny vykazovali protirakovinovú aktivitu s IC_{50} v rozsahu 0.001 - 1 μ M. Prítomnosť menších substituentov (metyl, etyl, hydroxyl) v zlúčenine triazolu zvyšuje protirakovinovú aktivitu jednotlivých zlúčenín. Na druhej strane prítomnosť dlhého alkylového bočného reťazca aktivitu znižuje.³²

³¹ Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259-296.

³² Reddy, D. M.; Srinivas, J.; Chashoo, G.; Saxena, A. K.; Sampath Kumar, H. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1983-1991.



Obrázok 8. Štruktúry Podophyllotoxínu a inhibítorov Topoizomerázy II (**29** a **30**) pripravené pomocou Click chémie.

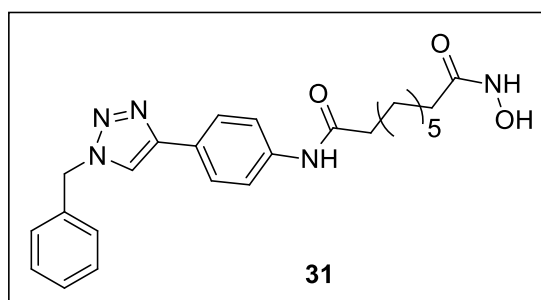
4.5.2 Inhibítory HDAC

HDAC sú enzýmy, ktoré katalyzujú deacetylovanie lyzínového bočného reťazca v chromatine. Ich funkcia je využívaná v mnohých biologických procesoch bunky – bunková diferenciácia, proliferácia, angiogenéza a apoptóza. HDACIs vykazujú schopnosť indukovať inhibíciu bunkového delenia, diferenciácie a apoptózy. Základný farmakofór pre HDACIs pozostáva z troch odlišných štruktúrnych častí: zinok viažúca skupina, hydrofóbny linker a čiapočku rozpoznávajúca skupina.³³

Chen a kolektív modifikovali cap region pomocou HDACIs s triazolovým základom. Autori sledovali produkty s pankreatickými bunkovými líniami a výsledkom skúmania bolo, že substitúcia na fenylovom kruhu zohráva hlavnú úlohu pri selektivitě medzi HDAC1 a 6. Triazolový ligand (Obr. 9) účinne inhibuje HDAC6 s IC_{50} 1.9 nM.³⁴

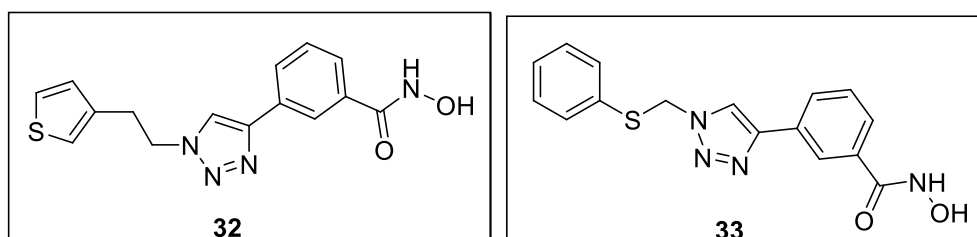
³³ Miller, T.A.; Witter, D.J.; Belvedere, S. *J Med Chem.* **2003**, 46, 5097-5116.

³⁴ Chen, Y.; Lopez-Sanchez, M.; Savoy, D. N.; Billadeau, D. D.; Dow, G. S.; Kozikowski, A. P. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3437-3448.



Obrázok 9. Štruktúra HDACIs syntetizovaných pomocou Click chémie.

Suzuki a kolektív pripravili 2 účinné inhibítory **32** a **33** (Obr. 10), ktoré selektívne inhibujú HDAC8. Inhibítory spôsobili selektívnu acetyláciu kohezínu v bunkách a ovplyvnili tak inhibíciu rastu T-lymfocytov a neuroblastových buniek ($GI_{50} = 3 - 80 \mu M$). HDAC8 selektívne inhibítory sú potenciálnymi protirakovinovými liečivami.³⁵



Obrázok 10. Selektívne inhibítory HDAC8 **32** a **33**.

4.5.3 Inhibítory PTKs

Proteín tyrozín kinázy katalyzujú fosforyláciu fenolovej skupiny tyrozínu prenosom fosfátu z ATP. PTKs majú dôležitú úlohu v transdukčných signálnych dráhach. Zmenená regulácia kinázovej aktivity je spájaná s pôvodom mnohých ochorení vrátane rakoviny.

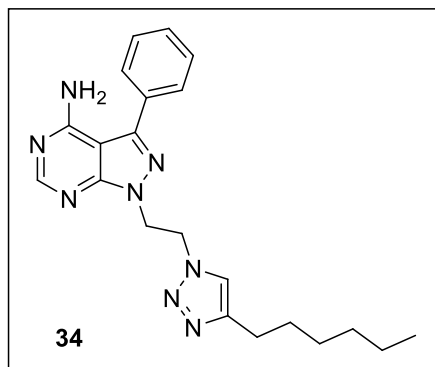
Src kinases (rodina PTKs) regulujú bunkové signálne dráhy: signalizácia rastových faktorov, diferenciácia, prežitie, adhézia, migrácia a invázia.³⁶ Src mutácie spôsobujú rast tumorov, metastázy a angiogézu.

Autori študovali 1,4-disubstituované 1,2,3-triazoly ako ligandy pre inhibítory Src kinázy. Predpokladali substitúciu v polohe N₁ a 4- na triazolovom deriváte s hydrofóbnymi zvyškami, ktoré môžu interagovať s hydrofóbnym vreckom Src ATP-väzbového miesta.

³⁵ Suzuki, T.; Ota, Y.; Ri, M.; Bando, M.; Gotoh, A.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Tatum, P. R.; Mizukami, T.; Nakagawa, H.; Iida, S.; Ueda, R.; Shirahige, K.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9562-9575.

³⁶ Summy, J. M.; Gallick, G. E. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 337-358.

Syntetizovali hexyl triazolyl-3-fenylpyrazolopyrimidínový inhibítor **34** (Obr. 11), ktorý vykazoval inhibíciu Src kinázy s IC_{50} 5.6 μ M.³⁷



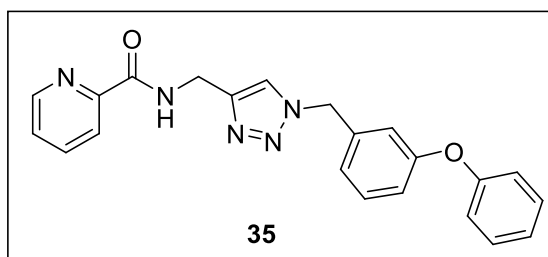
Obrázok 11. Štruktúra Src inhibítora **34** pripraveného pomocou Click chémie.

4.5.4 Antimikrotubulárne činidlá

Tubulín má kľúčovú úlohu počas mitózy a jeho narušenie môže zabrániť bunkovému deleniu a následne indukuje apoptózu bunky. Súčasťou cytoskeletu sú mikrotubuly, ktoré sa skladajú z α a β -tubulínu a navzájom tvoria heterodimér.

Hľadanie nových mikrotubuly viažucich ligandov, ktoré majú zvýšenú špecifitu k tumoru, zníženú neurotoxicitu a zároveň insenzivitu k chemorezistentným mechanizmom sa v súčasnosti stalo cieľom pre vývoj nových protirakovinových liečiv.³⁸

Stefely a kolektív syntetizovali *N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)metyl)arylamid **35** pomocou CuAAC, ktorý slúži ako antimikrotubulárne činidlo. (Obr. 11) Zlúčenina **35** vykazovala účinnú inhibíciu s IC_{50} = 46 nM voči MCF-7 ľudským nádorovým bunkám prsníka.³⁹



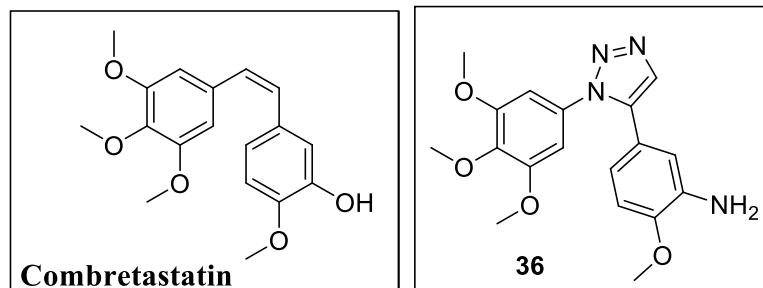
Obrázok 12. Štruktúra antimikrotubulárneho činidla **35** syntetizovaného pomocou Click chémie.

³⁷ Kumar, A.; Ahmad, I.; Chhikara, B. S.; Tiwari, R.; Mandal, D.; Parang, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 1342-1346.

³⁸ Dumontet, C.; Jordan, M. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 790-803.

³⁹ Stefely, J. A.; Palchaudhuri, R.; Miller, P. A.; Peterson, R. J.; Moraski, G. C.; Hergenrother, P. J.; Miller, M. J. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3389-3395.

Odlo a kolektív pripravili 1,5-disubstituované 1,2,3-triazolové analógy Combretastatinu A. (Obr. 13) Zlúčenina **36** inhibuje polymerizáciu tubulínu s $IC_{50} = 4.8 \mu M$.⁴⁰



Obrázok 13. Vľavo je Combretastatin. Vpravo je štruktúra antimikrotubulárnej látky **36** pripravenej pomocou Click chémie ako derivát Combretastatinu.

5 Teoretická časť – Organická syntéza

Navrhnutá príprava látok **8** je na nasledujúcej schéme. (Schéma 2)

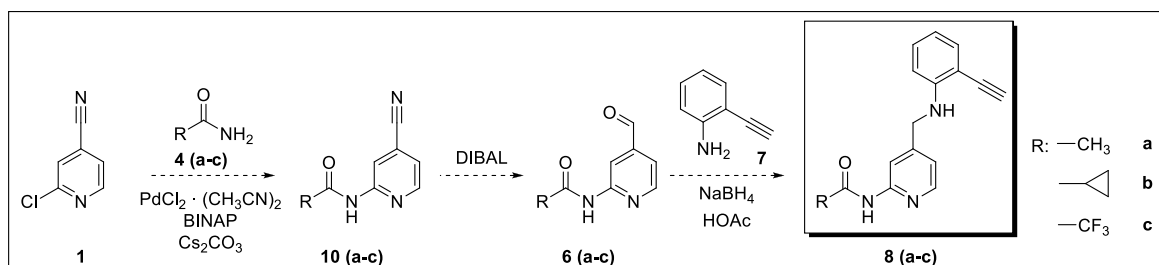


Schéma 2. Prvý návrh syntézy alkínového ligandu **8**.

K danému návrhu sme našli nasledujúce poznatky z literatúry.

5.1 K predpokladanej syntéze *N*-(4-kyanopyridín-2-yl)acetamidu (10a)

Požadovaná couplingova reakcia už bola na substráte **1** opísaná. Autori ako ligand využili (5-difenylfosfanyl-9,9-dimetyl-xantén-4-yl)difenylfosfán. (Schéma 4) Reakčnú

⁴⁰ Odlo, K.; Hentzen, J.; Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A. B. S. M.; Sylte, I.; Skrede, M.; Flørenes, V. A.; Hansen, T. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4829-4838.

zmes zahrievali pomocou mikrovlnného žiarenia na 150 °C počas 1 h v prítomnosti katalyzátora Pd₂dba₃ a získali požadovaný produkt **10a** v 54 % výťažku po FLC čistení.⁴¹

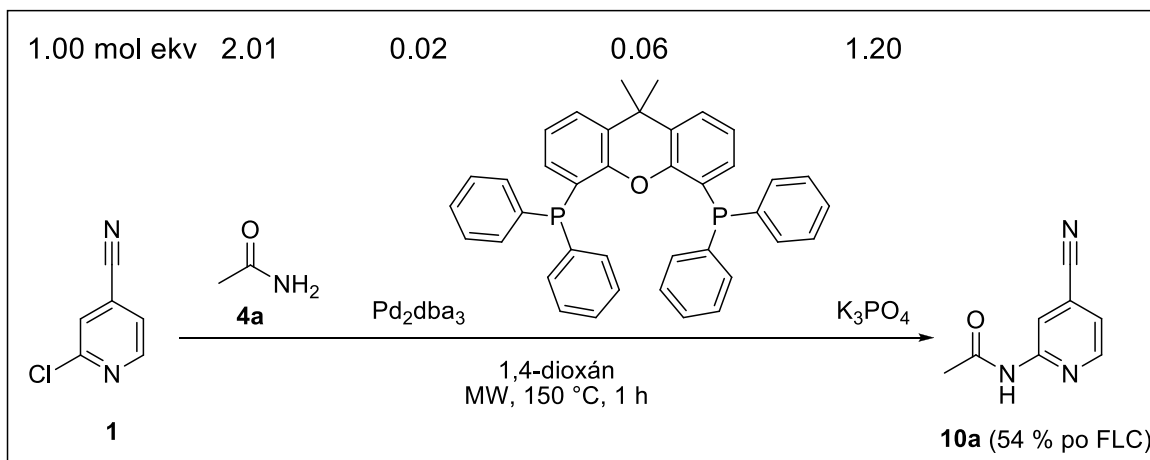


Schéma 4. Syntéza *N*-(4-kyanopyridín-2-yl)acetamidu **10a**.

5.2 K návrhu syntézy *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acylamidov (**6** (a-c))

Reakcie na substrátoch **10(a-c)** neboli doposiaľ opísané. (Schéma 5)

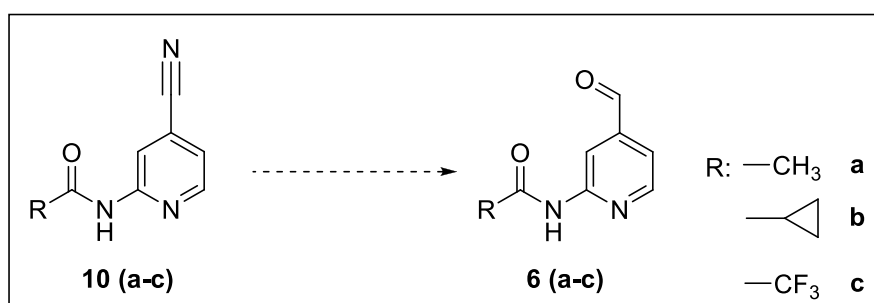


Schéma 5. Zamýšľaná príprava látky **6** (a-c).

Boli však opísané reakcie na pyridínoch, kde redukovali nitrilovú skupinu na aldehyd pomocou DIBAL-u. V literatúre je DIBAL najčastejšie využívané redukčné činidlo na štruktúrne podobných substrátoch k nášmu pyridínovému skeletu **10**. V Schéme 6 sa autorom podarilo zredukovať substrát **37** na aldehyd **39** vo výťažku 64 %.⁴²

⁴¹ Raqualia Pharma Inc. Patent: WO2013/161308 A1, **2013**.

⁴² Arienti, K. L.; Breitenbucher, J. G.; Buzard, D. J.; Edwards, J. P.; Hack, M. D.; Khatuya, H.; Kindrachuk, D. E.; Lee, A.; Venable, J. D. Patent: US2005/70550 A1, **2005**.

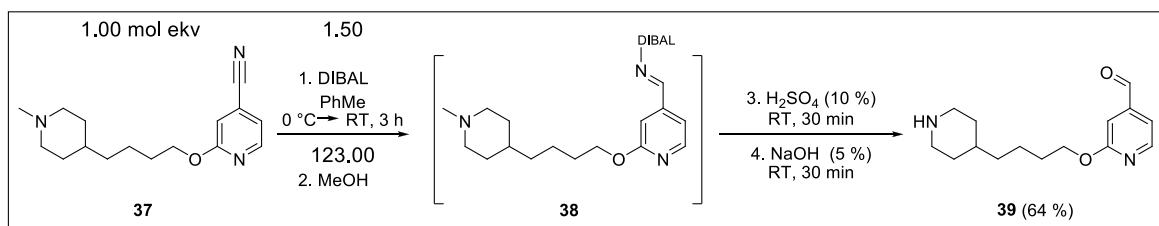


Schéma 6. Príprava aldehydu **39** z nitrilu **37**.

Zaujímavou redukcíu **40** pomocou DIBAL-u je reakcia v suchom toluéne pri nízkej teplote počas 2 h, kde autori získali látku **41** v 54 % výťažku. (Schéma 7)⁴³

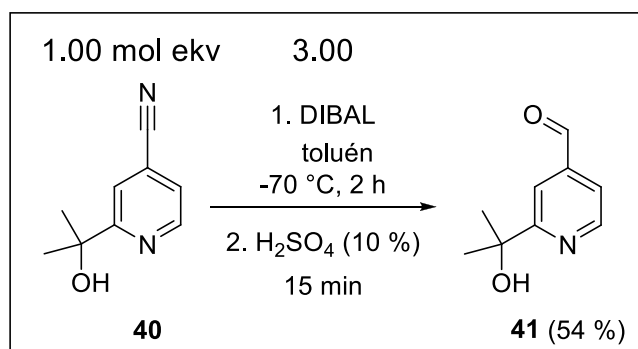


Schéma 7. Spôsob prípravy aldehydu **41**.

Inou metódou je redukcia pomocou kyseliny mravčej na Ra-Ni. Autori reakciu uskutočnili vo vode za refluxu počas 15 min a získali dobrý výťažok aldehydu **44**. (Schéma 8).⁴⁴

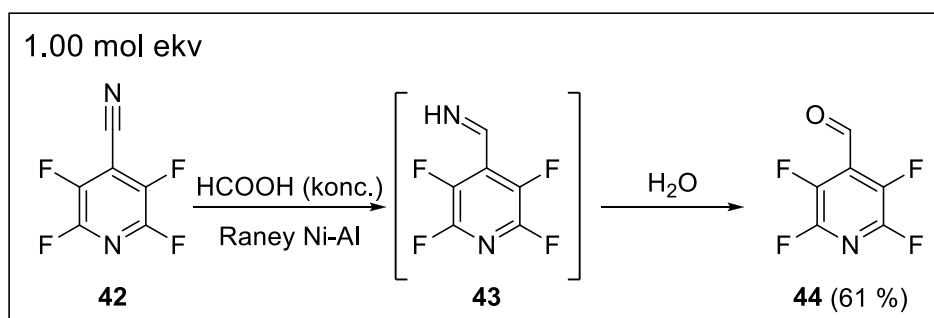


Schéma 8. Redukcia nitrilu **42** na aldehyd **44**.

Ďalšou reakciou, ktorou autori patentu pripravili amidový derivát zo štruktúrne podobného substrátu **46** (Schéma 9) bola hydrolýza 3-chlór-6-metoxy-1,5-naftyridín-4-karbonitrilu **45** na 3-chlór-6-metoxy-1,5-naftyridín-4-karboxamid **46** pomocou 10 % vodného roztoku hydroxidu sodného. Reakciu zahrievali na reflux počas 30 minút

⁴³ Pfizer Inc. Patent: WO2013/150416 A1, **2013**.

⁴⁴ Timperley, C. M.; Banks, R. E.; Young, I. M.; Haszeldine, R. N. *J. Fluor. Chem.* **2011**, 132, 541-547.

v inertnej atmosfére a následne kyslou hydrolyzou pripravili zlúčeninu **46** v 64 % výťažku po FLC čistení.

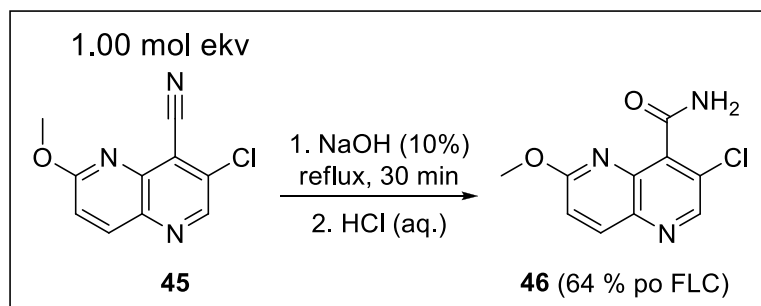


Schéma 9. Príprava amidu kyseliny **46**.

Pripravený amid **46** autori použili do reakcie so Swartzovým činidlom v THF. (Schéma 10) Reakciu uskutočnili pri RT počas 10 min a získali karbaldehydový derivát **47** v slabšom výťažku po FLC čistení.⁴⁵

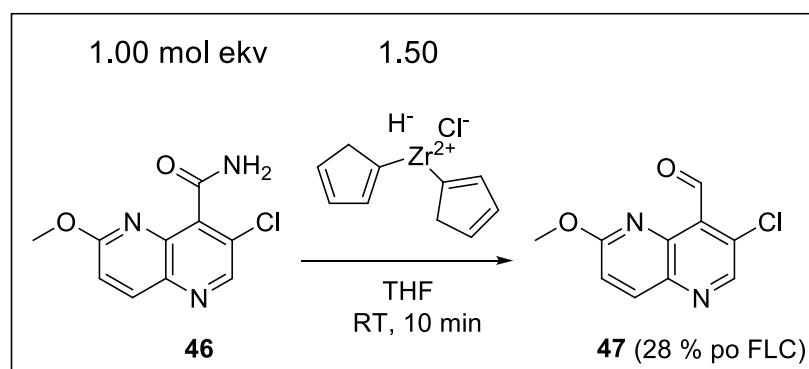


Schéma 10. Príprava karbaldehydového derivátu **47**.

5.3 K návrhu syntézy *N*-(4-((2-etylnylfenylamino)meyl)pyridín-2-yl)acylamidov (8 (a-c))

Reakcia na Schéme 11 nebola v literatúre opísaná. Napriek tomu boli opísané reakcie na podobne štruktúrnych derivátoch zlúčeniny **6 (a-c)**.

⁴⁵ Basilea Pharmaceutica AG; Patent: WO2011/73378 A1, 2011.

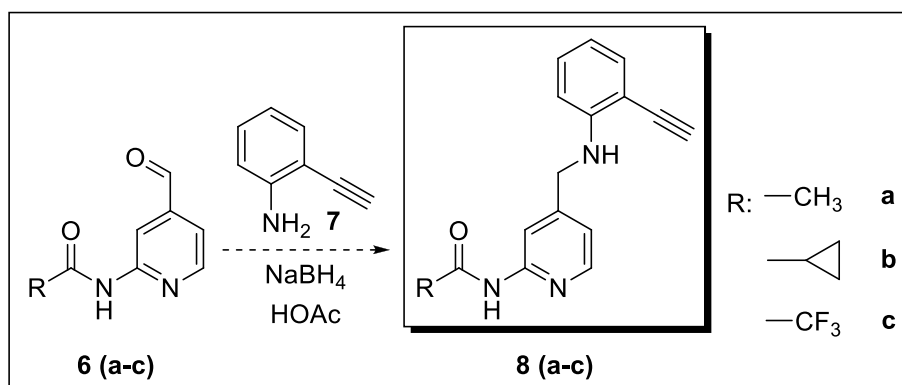


Schéma 11. Predpokladaná príprava produktu **8 (a-c)**.

Autori opísali reakciu na benzaldehydovom deriváte. (Schéma 12) Ku zmesi benzaldehydu **48** a derivátu anilínu **49** pridali tris(pentafluorofenyl)borán $(C_6F_5)_3B$ v etanole. Reakciu uskutočnili pri RT počas 15 min. V druhom kroku autori pridali k reakčnej zmesi redukčné činidlo $NaBH_4$ v etanole a reakciu miešali pri RT počas 25 min. Následne získali požadovaný produkt **50** v dobrom 75 % výťažku po FLC čistení.⁴⁶

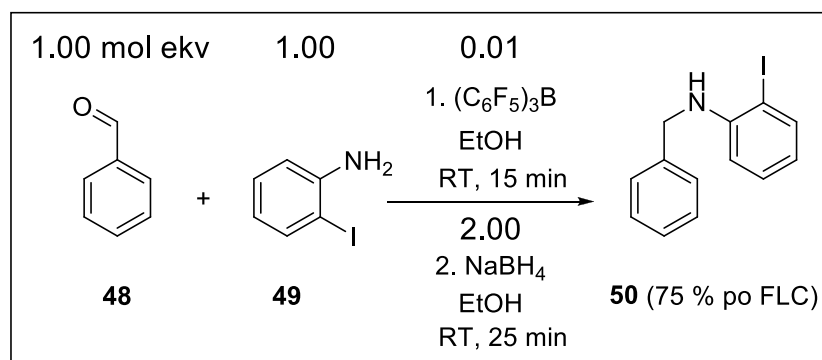


Schéma 12. Príprava aduktu **50**.

Autori uskutočnili aj Sonogashira cross-coupling na prípravu zlúčeniny **51** zo zlúčeniny *N*-benzyl-2-jódanilínu **50** pomocou bistrifenyľfosfínpaládium(II) chloridu, CuI a Et_3N v THF pri RT. (Schéma 13) V druhom kroku použili zmes trimetylsilylacetylénu v THF a získali zlúčeninu **51** v 94 % výťažku.

⁴⁶ Prajapati, S. K.; Gupta, K. K.; Babu, B. N. *J. Chem. Sci.* **2015**, 127, 1047-1052.

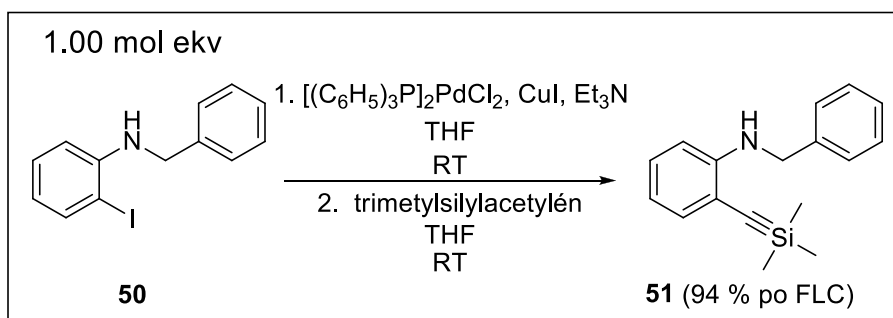


Schéma 13. Príprava alkínu **51** pomocou Sonogashira cross-couplingu.

Následne bola trimetylsilylová skupina odstránená pomocou K_2CO_3 v MeOH. (Schéma 14) Reakciu uskutočnili pri RT počas 3 h a získali požadovaný produkt **52** vo vynikajúcom 94 % výtŕažku po FLC čistení.⁴⁷

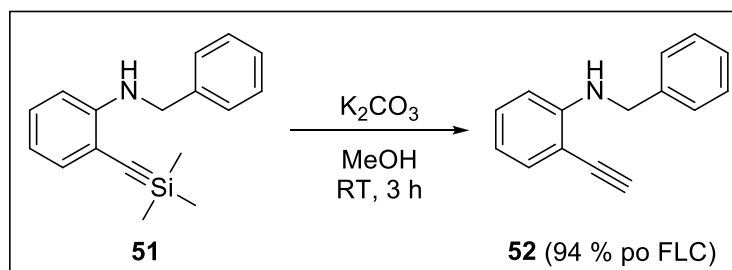


Schéma 14. Odstránenie TMS skupiny pri syntéze zlúčeniny **52**.

Pozoruhodnou je aj príprava zlúčeniny **55** (Schéma 15). K reakčnej zmesi *N*-(4-formylpyridín-2-yl)pivalamidu **53** v dichlórmetáne pridali etylpiperidín-4-karboxylát **54**, do vzniknutého roztoku prikvapávali HOAc a miešali pri RT počas 40 min. Potom do roztoku pridali $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ a zmes nechali miešať pri RT cez noc. Takto autori pripravili zlúčeninu **55** vo výbornom 98 % výtŕažku po FLC čistení.⁴⁸

⁴⁷ Anwar, U.; Fielding, M. R.; Grigg, R.; Sridharan, V.; Urch, C. J. *J. Organomet. Chem.* **2006**, 691, 1476-1487.

⁴⁸ Schering Corporation; Patent: WO2008/108957 A2, **2008**.

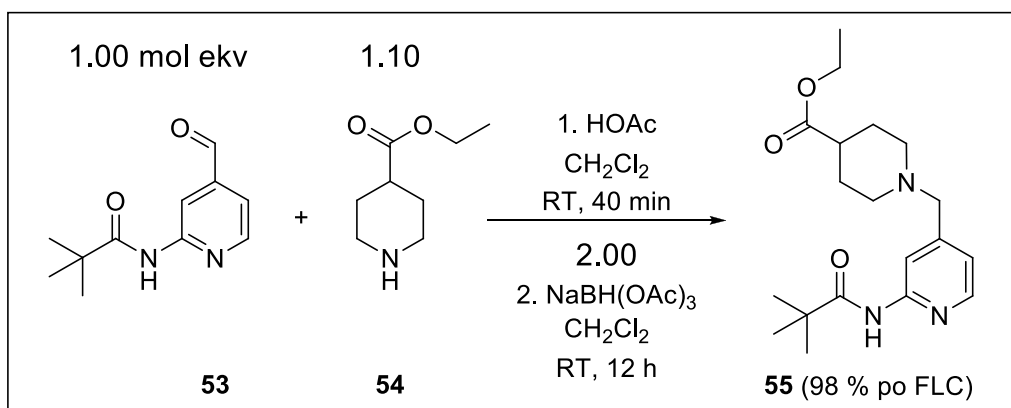


Schéma 15. Príprava zlúčeniny 55.

Ďalším postupom, ktorý autori uskutočnili na podobnom deriváte, ako je nami zamýšľaný **1**, je reakcia 2-chlór-3-metylizonikotínaldehydu **56** s cyklopropánamínom **57** v MeOH pri RT počas 4 h. (Schéma 16) . Potom k zmesi pridali NaBH₄ a reakciu nechali miešať pri RT počas nasledujúceho dňa. Reakciu ukončili pridaním 1 M vodného roztoku NaOH. Získali produkt *N*-((2-chlór-3-metylpyridín-4-yl)metyl)cyklopropánamín **58** v 79 % výtlačku po FLC čistení.⁴⁹

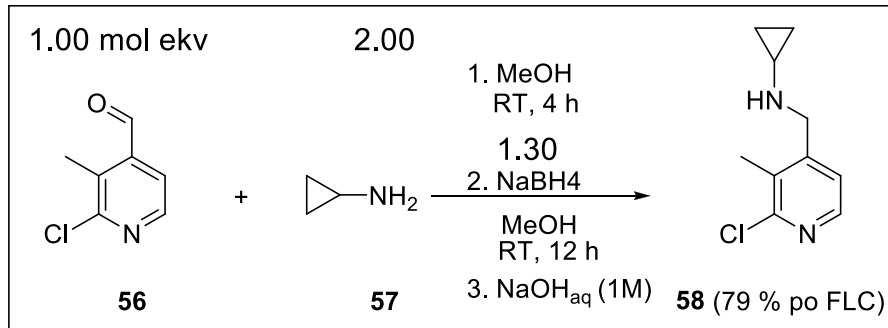


Schéma 16. Spôsob prípravy pyridínového derivátu **58**.

Zaujímavou prípravou pyridínového derivátu je aj aminácia izonikotínaldehydu **59** s 4-metoxyanilínom (**60**) v DCM pomocou Hantzschovho esteru (DTP). (Schéma 17) Autori uskutočnili reakciu s prídavkom katalytického množstva jódu pri RT počas 5 h a získali požadovaný produkt 4-metoxy-*N*-(pyridín-4-ylmetyl)anilín **61** vo vynikajúcom 97 % výtlačku po FLC čistení.⁵⁰

⁴⁹ Actelion Pharmaceuticals Ltd; Patent: WO2005/40120 A1, **2005**.

⁵⁰ Bachu, P.; Zhu, C.; Akiyama, T. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 3977-3981.

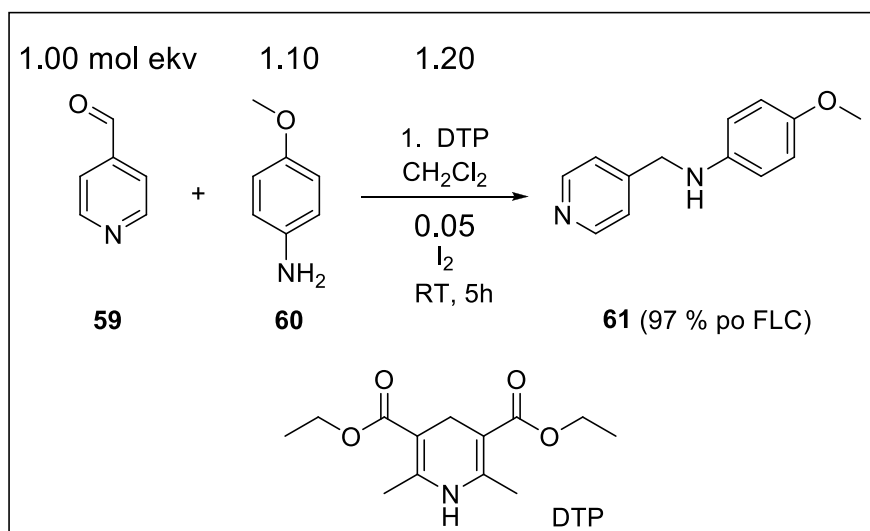


Schéma 17. Príprava zlúčeniny **61** reductívnou amináciou.

Autori opísali reductívnu amináciu katalyzovanú Bronstedovou kyselinou s benzotiazolínom ako vysoko efektívnym donorom vodíka. (Schéma 18) Reduktívna aminácia aldehydu **62** s amínom **63** prebieha v prítomnosti benzotiazolínu za katalýzy TFA. Reakcia poskytuje zodpovedajúci amín **64** v dobrom výťažku.⁵¹

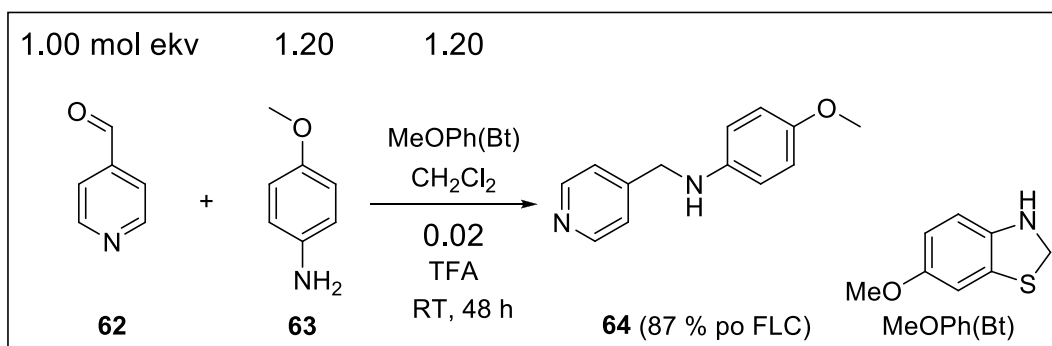


Schéma 18. Reduktívna aminácia aldehydu **62** s amínom **63**.

Ďalšou metódou reductívnej aminácie je príprava *N*-(pyridín-4-ylmetyl)anilínu **66**. (Schéma 19) Autori k izonikotínaldehydu (**62**) a anilínu (**65**) v MeOH pridali PTA (H₃PW₁₂O₄₀, phosphotungstic acid) a reakciu nechali prebiehať pri RT počas 10 min. Následne do reakcie pridali NaBH₄ a zmes nechali miešať pri RT ďalších 30 min. Autori získali predpokladaný produkt **66** v kvantitatívnom výťažku po FLC čistení.⁵²

⁵¹ Zhu, C.; Akiyama, T. *Synlett* **2011**, 9, 1251-1254.

⁵² Heydari, A.; Khaksar, S.; Akbari, J.; Esfandiyari, M.; Pourayoubi, M.; Tajbakhsh, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1135-1138.

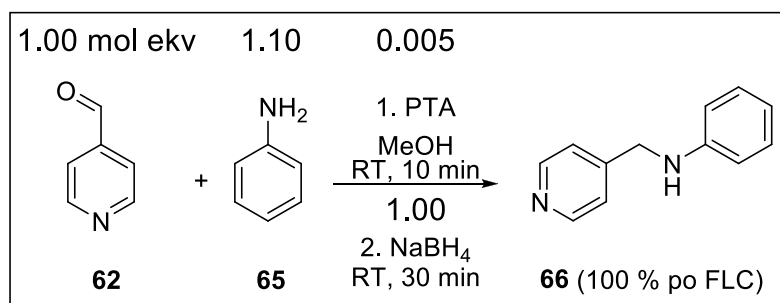


Schéma 19. Reduktívna aminácia aldehydu **62** s amínom **65**.

Autori patentu pripravili 3-(cyklopentyloxy)-*N*-((3,5-dichlórpyridín-4-yl)metyl)-4-metoxyanilín (**69**) reduktívnou amináciou 3,5-dichlórisonikotínaldehydu (**67**) s 3-(cyklopentyloxy)-4-metoxyanilínom (**68**) v toluéne. (Schéma 20) Následne k reakčnej zmesi pridali HOAc a Et₃N. Reakciu nechali miešať pri RT počas 2 h a potom do zmesi pridali NaBH₃CN v toluéne. Reakciu uskutočnili pri RT počas 1 h a získali produkt **69** v 82 % výťažku po FLC čistení.⁵³

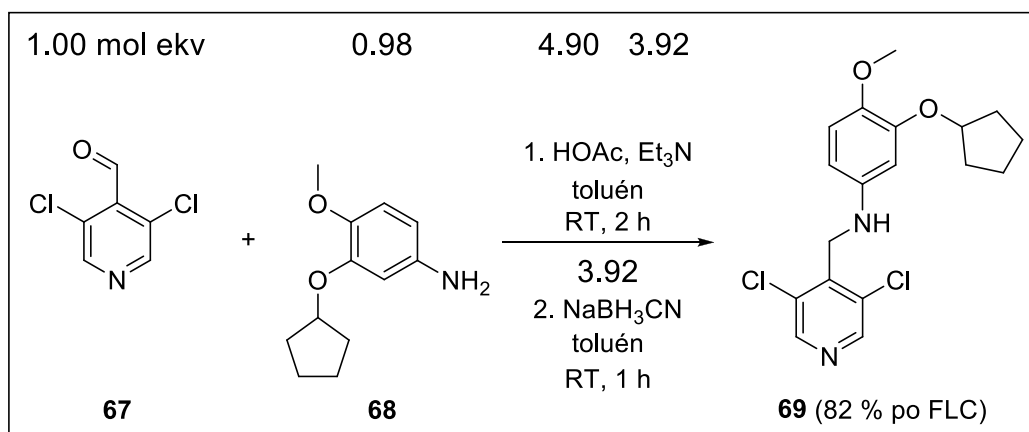


Schéma 20. Spôsob prípravy zlúčeniny **69** reduktívnou amináciou aldehydu **67**.

Inou metódou prípravy produktu **72**, je reakcia pyridínového derivátu aldehydu **70** s kyselinou antranilovou (**71**) za katalýzy HOAc v MeOH. (Schéma 21) Autori reakciu uskutočňovali pri 40 °C počas 12 h. V ďalšom kroku pridali do zmesi NaBH₃CN v MeOH a reakčnú zmes zahrievali na 40 °C počas 12 h. Produkt metyl 2-((2-brómpyridín-4-yl)metylamino)benzoát (**72**) sa takto podarilo pripraviť v 78 % výťažku po FLC čistení.⁵⁴

⁵³ Basilea Pharmaceutica AG; Patent: WO2009/106419 A1, **2009**.

⁵⁴ Huth, A.; Zorn, L.; Krueger, M.; Ince, S.; Thierauch, K. H.; Menrad, A.; Haberey, M.; Hess-Stumpp, H.; Patent: US2005/54654 A1, **2005**.

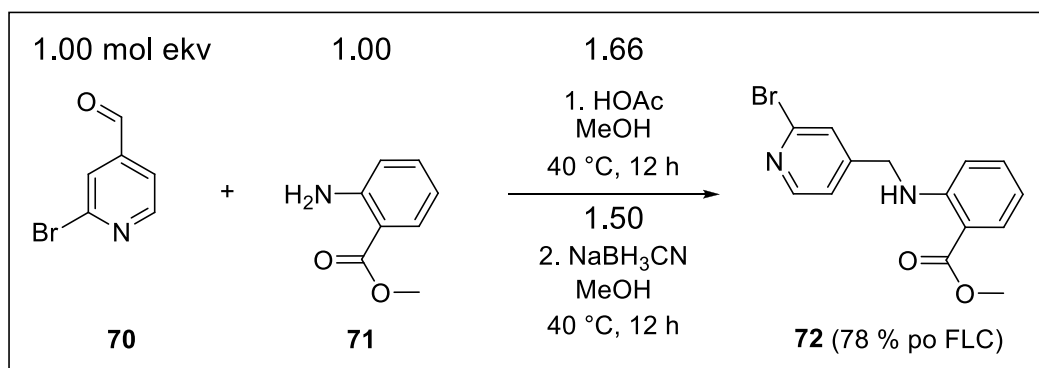


Schéma 21. Spôsob prípravy zlúčeniny **72** reduktívnou amináciou.

Ďalším postupom pre reduktívnu amináciu je reakcia znázornená v Schéme 22. Autori reakciu uskutočnili pomocou NaBH(OAc)₃ v DCM pri RT počas 12 h vychádzajúc z izonikotínaldehydu (**62**) a *tert*-butyl 4-aminobenzylkarbamátu (**73**). Takto pripravili *tert*-butyl-4-(pyridín-4-ylmethylamino)benzylkarbamát (**74**) v dobrom výťažku.⁵⁵

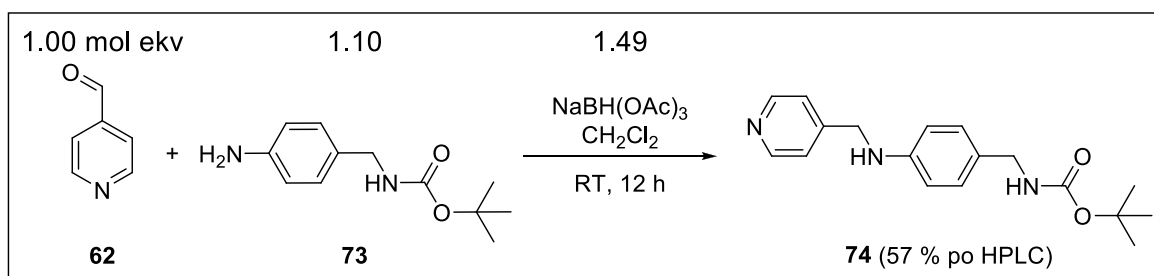


Schéma 22. Spôsob prípravy zlúčeniny **74** reduktívnou amináciou.

⁵⁵ Devgen NV; Patent: WO2005/82367 A1, 2005.

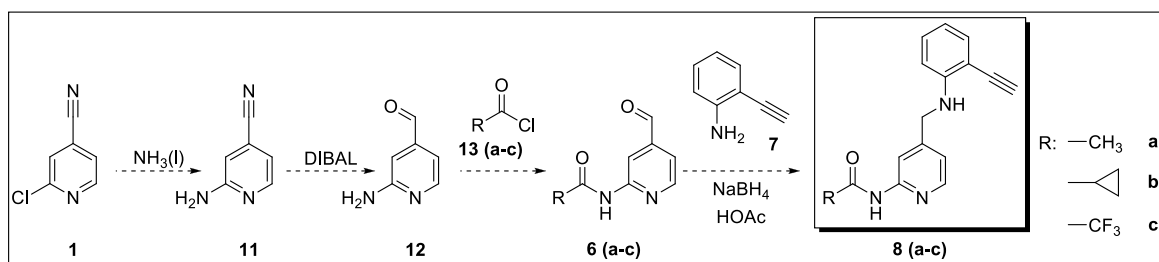


Schéma 3. Druhý návrh syntézy alkinového ligandu **8**.

5.4 K predpokladanej syntéze 2-aminoizonikotínnitrilu (**11**)

Reakcie na substráte **1** amináciou pomocou kvapalného amoniaku doposiaľ neboli v literatúre uskutočnené. (Schéma 23)

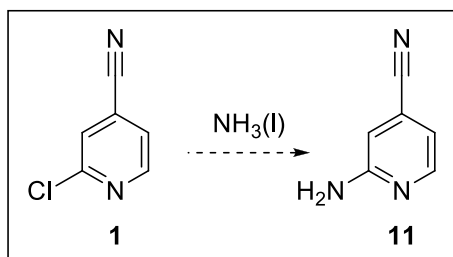


Schéma 23. Zamýšľaná príprava 2-aminoizonikotínnitrilu **11**.

Avšak boli opísané reakcie na štruktúrne podobných substrátoch, kde sa aminácia uskutočňovala pomocou amoniaku. (Schémy 24, 25)

Autori uskutočnili reakciu 2-chlór-5,6-dimetylpyridín-3,4-dikarbonitrilu (**75**) roztokom suchého amoniaku v *i*PrOH. (Schéma 24) Reakcia prebiehala pri 100 °C počas 7 h v autokláve a autori získali 78 % surového produktu 2-amino-5,6-dimetylpyridín-3,4-dikarbonitrilu (**76**).⁵⁶

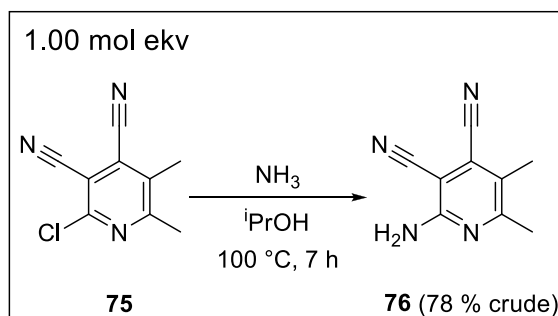


Schéma 24. Príprava zlúčeniny **76**.

⁵⁶ Maksimova, V. N.; Ershov, O. V.; Lipin, K. V.; Eremkin, A. V.; Nasakin, O. E.; *Russ. J. Org. Chem.* **2012**, 48, 426-429.

Ďalším spôsobom prípravy derivátov 2-aminopyridínov je reakcia 2-chlór-5,6,7,8-tetrahydrochinolín-3,4-dikarbonitrilu (**77**) v roztoku NH_3 v $i\text{PrOH}$ pri $100\text{ }^\circ\text{C}$ počas 7 h. (Schéma 25) Autori postupovali rovnakým spôsobom ako v predchádzajúcom prípade a získali surový produkt 2-amino-5,6,7,8-tetrahydrochinolín-3,4-dikarbonitril (**78**) v surovom 75 % výťažku.⁵⁶

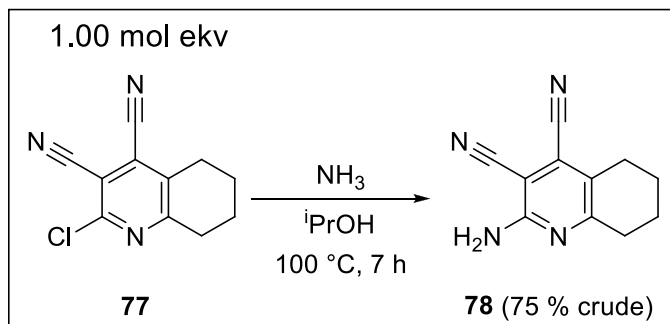


Schéma 25. Príprava zlúčeniny **78**.

Inou metódou syntézy zlúčeniny **11** je využitie cross-couplingovej reakcie, ktorá je opísaná v literatúre. (Schéma 26) Autori uskutočnili reakciu zmesi 2-chlór-4-pyridínkarbonitrilu **1** a benzofenónimínu **79**, ktorý je ekvivalentom amoniaku. Adukt benzofenónimínu **80** bol následne premenený na korešpondujúci primárny derivát 2-aminopyridínu pomocou roztoku HCl . Na túto reakciu môže byť použitý aj $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$. Autori pripravili 2-(difenylmetylénamino)-4-pyridínkarbonitril (**80**) reakciou 2-chlór-4-pyridínkarbonitrilu (**1**) s $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ v 1,4-dioxáne. Reakčnú zmes zahrievali na $80\text{ }^\circ\text{C}$ počas 5 h v inertnej atmosfére a kyslou hydrolyzou medziproduktu **80** získali 2-aminoizotikotínitril (**11**) v 72 % výťažku.⁴⁵

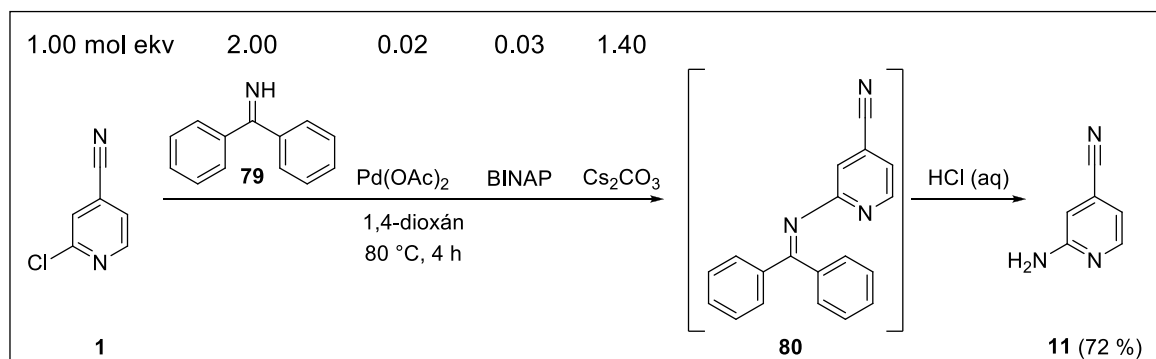


Schéma 26. Príprava primárneho amínu **11** cross-couplingovou reakciou z východiskového 2-chlór-4-pyridínkarbonitrilu (**1**).

Reakcia v Schéme 27 je opísaná v literatúre. Autori uskutočnili Buchwald - Hartwigov coupling s $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ a BINAP-om v 1,4-dioxáne. Reakčnú zmes nechali miešať pri 80°C počas 4 h v zatavenej ampuli, v inertnej atmosfére a získali 93 % surového produktu **81**.⁵⁷

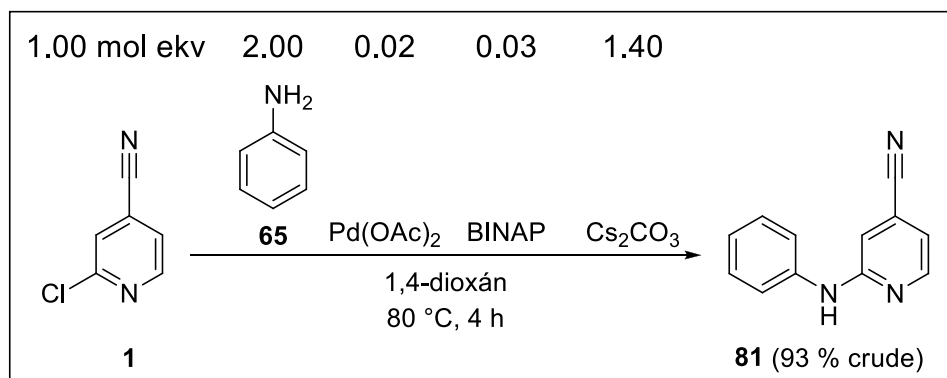


Schéma 27. Príprava zlúčeniny **81** Buchwald-Hartwig couplingom.

5.5 K predpokladanej syntéze 2-aminoizonikotínaldehydu (**12**)

Zamýšľaná reakcia zo Schémy 28 nie je doposiaľ v literatúre opísaná.

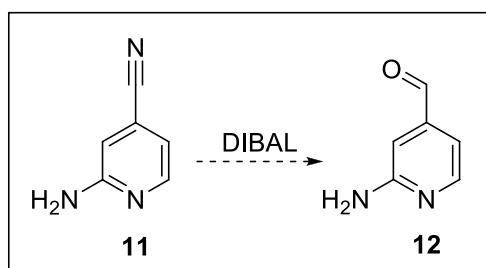


Schéma 28. Predpokladaná redukcia zlúčeniny **11** na 2-aminoizonikotínaldehyd (**12**).

V literatúre je však opísaná redukcia na podobnom deriváte **82**. (Schéma 29) Autori uskutočnili reakciu pomocou DIBAL-u v toluéne pri -15°C . Následne do reakčnej zmesi pridali vodný roztok HCl a získali zlúčeninu **83**.⁵⁸

⁵⁷ Guo, S.; Wang, Y.; Sun, C.; Li, J.; Zou, D.; Wu, Y.; Wu, Y. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 3233-3237.

⁵⁸ Frey, L. F.; Marcantonio, K.; Frantz, D. E.; Murry, J. A.; Tillyer, R. D.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 6815- 6818.

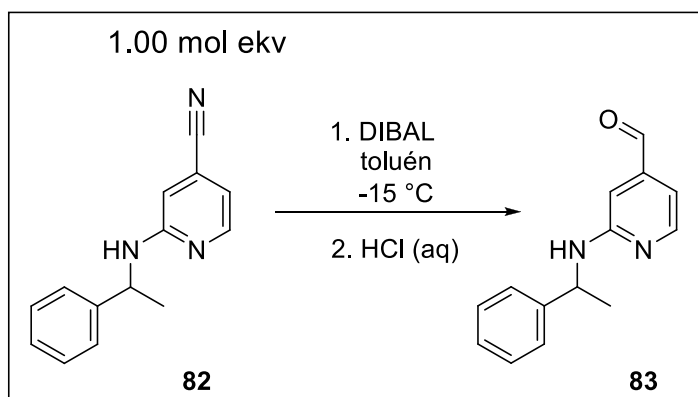


Schéma 29. Redukcia zlúčeniny **82**.

Autori patentu z reakčnej zmesi 1*H*-pyrolo[2,3-*b*]pyridín-4-karbonitrilu (**84**) v THF pripravili zlúčeninu 1*H*-pyrolo[2,3-*b*]pyridín-4-karbaldehyd (**85**) redukciou DIBAL-om v toluéne. (Schéma 30) Zmes ochladili na -78 °C, počas 1 h pridávali 1.00 ekv DIBAL-u. Následne reakciu miešali 2 h a potom k zmesi pridali ďalší 1.19 mol ekvivalent DIBAL-u. Počas nasledujúcich 2 h zmes zahrievali na 55 °C. Pri spracovaní reakciu ochladili na 5 °C, okyslili 2 M vodným roztokom HCl a zmes nechali miešať 15 min. Takto autori získali 72 % surového produktu **85**.⁵⁹

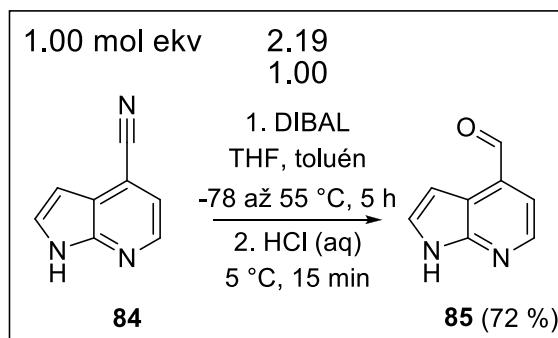


Schéma 30. Redukcia derivátu karbonitrilu **84** na derivát aldehydu **85**.

5.6 K predpokladanej syntéze *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acylamidov (6 (a-c))

Predpokladaný návrh syntézy nebol doposiaľ v literatúre opísaný. (Schéma 31)

⁵⁹ Wynne, G. M.; Doyle, K.; Ahmed, S.; Li, A. H.; Keily, J. F.; Rasamison, Ch. M.; Pegg, N. A.; Saba, I.; Thomas, C.; Smyth, D.; Sadiq, Sh.; Newton, G.; Dawson, G.; Crew, A. P.; Castelhana, A. L.; Patent: US2004/186124 A1, **2004**.

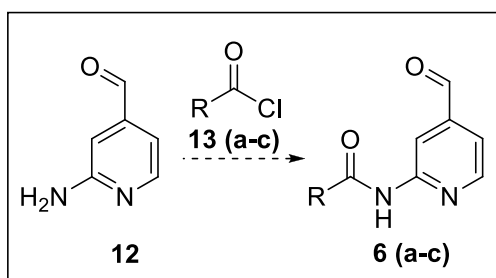


Schéma 31. Zamýšľaný spôsob syntézy *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acylamidov **6 (a-c)**.

V literatúre bol opísaný spôsob syntézy *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acetamidov z benzénových derivátov. Autori patentu uskutočnili acyláciu 4-chlórbenzoyl chloridu (**86**) s 3-aminobenzaldehydom (**12**) v zmesi DMF a DIEA. Reakčnú zmes zahrievali pomocou mikrovlnného žiarenia na 110 °C počas 10 min. (Schéma 32) Autori získali surový produkt 4-chlór-*N*-(3-formylfenyl)benzamid (**87**) v 85 % výťažku.⁶⁰

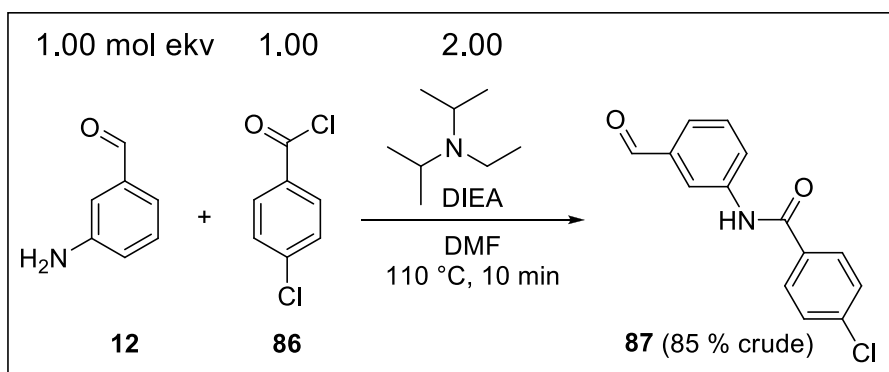


Schéma 32. Príprava zlúčeniny **87** acyláciou 3-aminobenzaldehydu (**12**).

Ďalšou reakciou, ktorú autori patentu uskutočnili je acylácia 3-amino-4-chlórbenzaldehydu (**88**) v DCM pri 0 °C, kedy bol pridaný DIEA a 5-metylizoxazol-3-karbonyl chlorid (**89**). (Schéma 33) Autori reakciu uskutočnili pri 0 °C počas 30 min. Potom ju nechali pri RT počas 1 h a získali produkt *N*-(2-chlór-5-formylfenyl)-5-metylizoxazol-3-karboxamid (**90**) v 26 % výťažku po FLC čistení.⁶¹

⁶⁰ Aventis Pharma S.A.; Patent: EP1746097 A1, 2007.

⁶¹ Amgen Inc.; Patent: US2008/221101 A1, 2008.

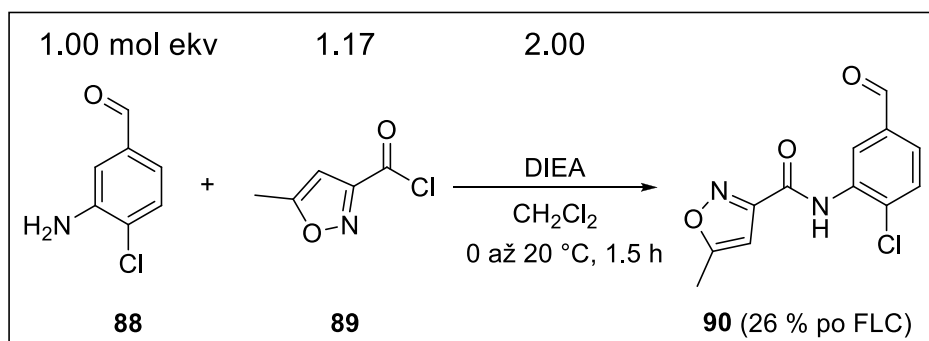


Schéma 33. Příprava zlučeny **90** acyláciou 3-amino-4-chlórbenzaldehydu (**88**).

5.7 K predpokladanej syntéze *N*-(4-((2-etynylfenylamino)metyl)-pyridín-2-yl)acylamidov (**8** (a-c))

Navrhnutý spôsob prípravy *N*-(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acylamidov **8(a-c)** reduktívnou amináciou z derivátov **6(a-c)**.

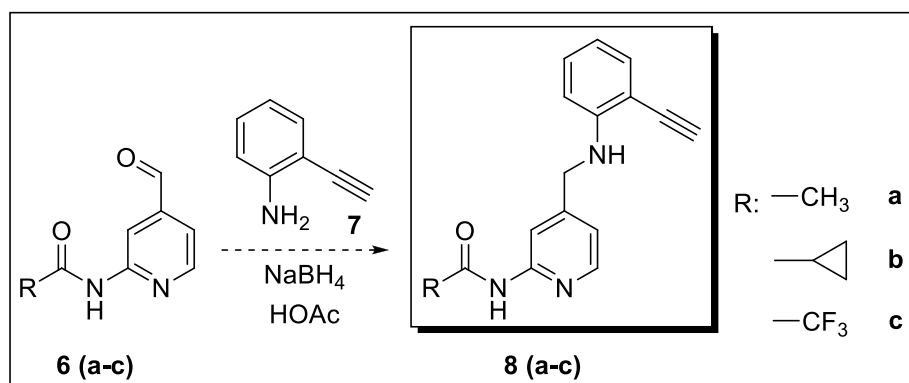


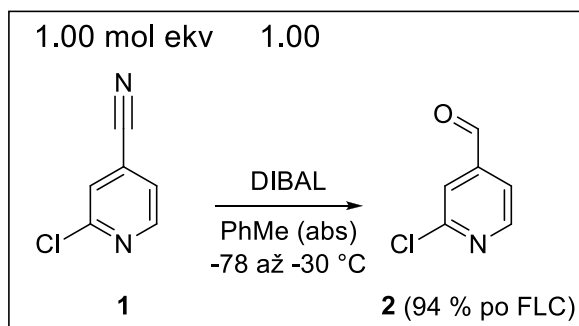
Schéma 34. Predpokladaná syntéza produktu **8(a-c)**.

6 Experimentálna časť

6.1 Metódy a použitý materiál

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

6.2 Príprava 2-chlórizonikotínaldehydu (2)

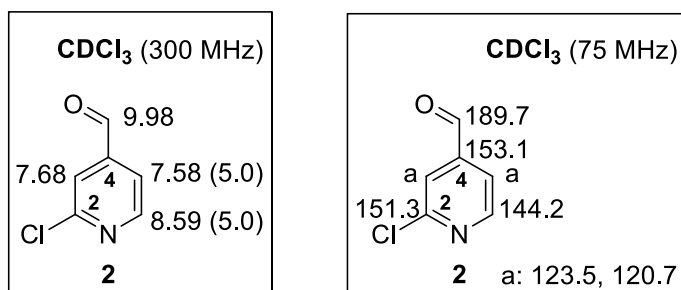


Roztok 2.00 g (14.49 mmol, 1.00 mol ekv) nitrilu **1** v 40 ml PhMe (abs) sme ochladili na -78 °C. Potom sme k nemu pri tej istej teplote počas 10 min prikvapkali 14.49 ml (14.49 mmol, 1.00 mol ekv) roztoku DIBAL-u (1.00 M v heptáne). Následne sme z reakcie odstránili chladiaci kúpeľ a vznik produktu sme priebežne monitorovali pomocou TLC analýzy. Pri -30 °C sme pozorovali úplnú konverziu východiskovej látky **1** a selektívny vznik novej škvrny menej polárneho produktu. Reakčnú zmes sme opätovne ochladili na

-78 °C a prikvapkali k nej 18 ml MeOH počas 5 min. Potom sme k reakcii pridali 15 ml 25 % roztoku vlnanu sodno-draselného spolu s 20 ml 10 % H₂SO₄ a zmes miešali počas 15 min. Výslednú zmes sme neutralizovali pomocou NaHCO₃ do bázického pH = 8. Mierne zakalený roztok sme prefiltrovali a filtrát extrahovali pomocou EA (3 x 50 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli 100 ml nasýteného roztoku NaCl a oddelenú organickú fázu sme sušili nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili za zníženého tlaku a surový produkt sme čistili pomocou FLC (SiO₂; H / EA). Získali sme 1.92 g (13.62 mmol, 94 %) aldehydu **2**.

Novosť: Látka **2** má v literatúre opísané len ¹H-NMR spektrum.⁶²

T.t.: 47.8 - 48.5 °C [EA].



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.98 (s, 1H, -CHO), 8.59 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.0 Hz, H-C(6)), 7.68 (s, 1H, H-C(3)), 7.58 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.0 Hz, H-C(5)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 189.7 (C=O), 153.1 (C(4)), 151.3 (C(2)), 144.2 (C(6)), 123.5 a 120.7 (C(3) a C(5)).

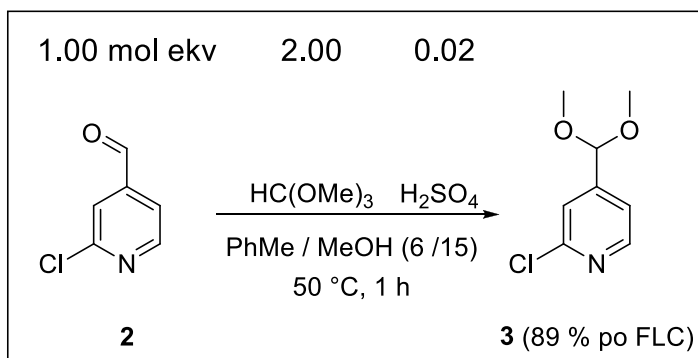
FT IR (neat, cm⁻¹): 3297(w), 3076(m), 2835(m), 2687(w), 2344(w), 2114(w), 1708(w), 1599(m), 1551(m), 1453(m), 1377(m), 1310(m), 1280(m), 1202(m), 1129(m), 1043(s), 1002(s), 914(m), 885(m), 835(s), 749(s), 688(s), 562(s), 489(m).

MS (ESI *m/z*, poz. mód): 174.0 (100 %) [M+MeOH+H]⁺, 301.0 (73 %).

Anal. Vypočítaný pre C₆H₄NOCl (141.00): C, 50.91; H, 2.85; N, 9.89. Nájdený: C, 50.84; H, 2.99; N, 9.82.

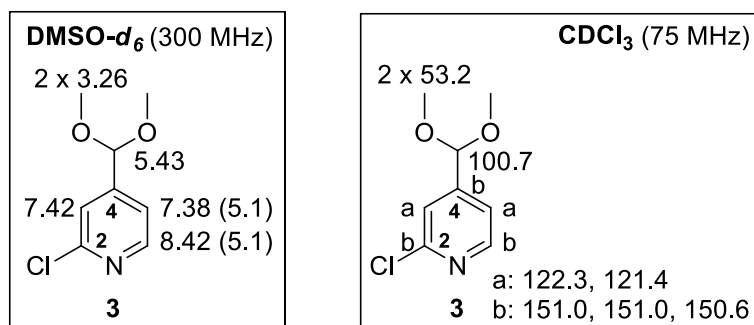
⁶² Allergan, Inc.; Patent: WO2008/11478 A2, 2008.

6.3 Príprava 2-chlór-4-(dimetoxymetyl)pyridínu (3)



K 1.50 ml MeOH a 600 μl PhMe sme pridali 300 mg (2.13 mmol, 1.00 mol ekv) aldehydu **2**. Potom sme k tomuto roztoku prikvapkali 467 μl (4.26 mmol, 2.00 mol ekv) CH(OMe)_3 a 2.3 μl (0.04 mmol, 0.02 mol ekv) H_2SO_4 (conc). Po 1 h zahrievania na 50°C sme pomocou TLC analýzy pozorovali úplnú konverziu východiskovej látky **2** a vznik škvŕny produktu. Pri spracovaní sme k reakčnej zmesi pridali 15 ml (10 %) NaOH a 20 ml nasýteného roztoku NaHCO_3 . Zmes sme extrahovali pomocou EA (3 x 20 ml). Spojenú organickú vrstvu sme sušili státím nad Na_2SO_4 . Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili za zníženého tlaku a zmes čistili pomocou FLC (SiO_2 ; H / EA). Získali sme 355 mg (1.90 mmol, 89 %) látky **3**.

Novosť: Látka **3** má v literatúre opísané ^1H -NMR spektrum.⁶³



^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.42 (d, 1H, $J(5,6) = 5.1$ Hz, H-C(6)), 7.42 (s, 1H, H-C(3)), 7.38 (d, 1H, $J(5,6) = 5.1$ Hz, H-C(5)), 5.43 (s, 1H, $-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 2 x 3.26 (s, 6H, 2 x $-\text{OCH}_3$).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 2 x 151.0 (C(2) a C(6)), 150.6 ($-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 122.3 a 121.4 (C(3)) a (C(5)), 100.7 (C(4)), 53.2 (2 x $-\text{OCH}_3$).

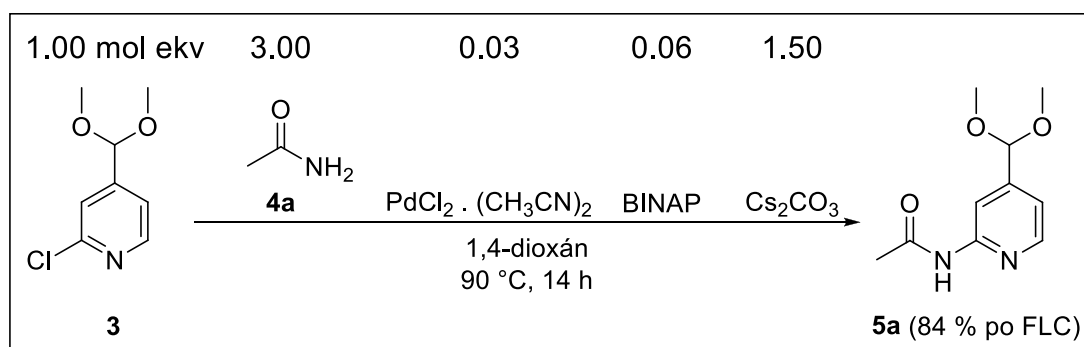
⁶³ Schmees, N.; Petrov, O.; Patent: US2008/242866 A1, 2008.

FT IR (neat, cm^{-1}): 2937(w), 2833(w), 1594(m), 1552(w), 1463(m), 1374(m), 1348(m), 1209(m), 1102(s), 1054(s), 988(s), 913(m), 883(m), 832(s), 758(s), 724(m), 686(m), 614(m), 558(w), 439(m).

MS (ESI m/z , poz. mód): 188.0 (100 %) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 301.0 (48 %), 381.0 (25 %).

Anal. Vypočítaný pre $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ (187.04): C, 51.21; H, 5.37; N, 7.47. Nájdený: C, 51.13; H, 5.53; N, 7.39.

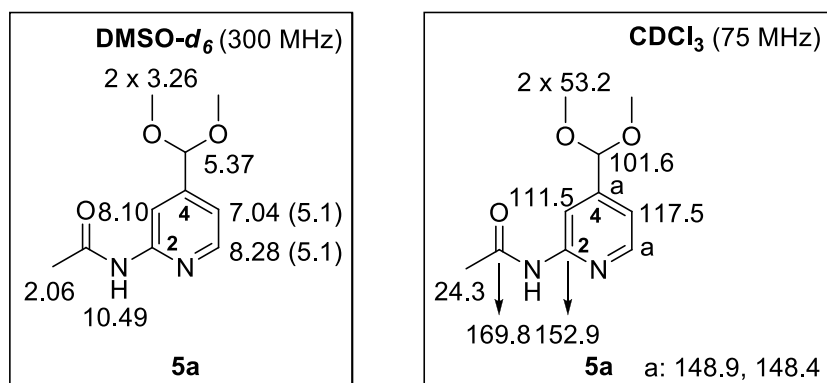
6.4 Príprava *N*-(4-(dimetoxymetyl)pyridín-2-yl)acetamidu (**5a**)



K 190 mg (1.02 mmol, 1.00 mol ekv) zlúčeniny **3** sme pridali 180 mg (3.05 mmol, 3.00 mol ekv) acetamidu **4a**, 7.90 mg (0.03 mmol, 0.03 mol ekv) $\text{PdCl}_2 \cdot (\text{CH}_3\text{CN})_2$, 38.0 mg (0.02 mmol, 0.06 mol ekv) BINAP-u a 496 mg (1.52 mmol, 1.50 mol ekv) Cs_2CO_3 . Potom sme do zmesi pridali 5 ml dioxánu a túto zahrievali na 90 °C počas noci. Nasledujúci deň sme pomocou TLC analýzy pozorovali ako dominantnú novú škvrnu produktu. K reakčnej zmesi sme priliali 50 ml nasýteného roztoku NaCl a zmes sme extrahovali pomocou EA (3 x 20 ml). Spojenú organickú vrstvu sme sušili státím nad Na_2SO_4 . Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili za zníženého tlaku a surový produkt sme čistili pomocou FLC (SiO_2 ; H / EA). Získali sme 181 mg (0.86 mmol, 84 %) látky **5a** spolu s 108 mg (0.58 mmol, 57 %) východiskového acetálu **3**.

Novosť: Látka **5a** nebola doposiaľ v literatúre opísaná.

T.t.: 97.7 - 98.4 °C [EA].



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.49 (s, 1H, -NH-), 8.28 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.1 Hz, H-C(6)), 8.10 (s, 1H, H-C(3)), 7.04 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.1 Hz, H-C(5)), 5.37 (s, 1H, -CH(OCH₃)₂), 2 x 3.26 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 2.06 (s, 3H, -COCH₃).

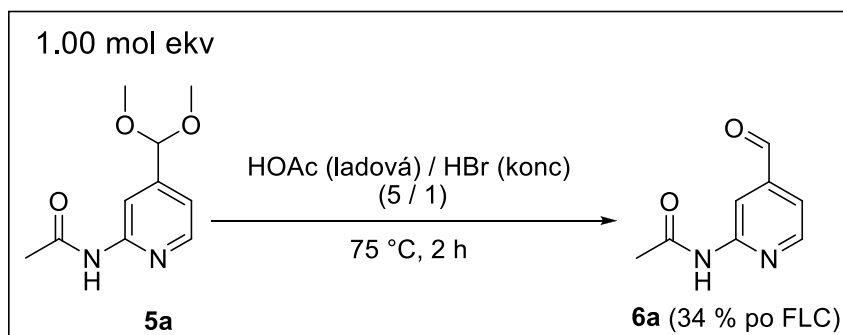
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.8 (C=O), 152.9 (C(2)), 148.4 a 148.9 (C(4)) a (C(6)), 117.5 (C(5)), 111.5 (C(3)), 101.6 (-CH(OCH₃)₂), 53.2 (2 x -OCH₃), 24.3 (-COCH₃).

FT IR (neat, cm⁻¹): 3240(w), 3202(w), 3131(w), 3059(w), 2991(w), 22936(w), 2888(w), 2827(w), 2084(w), 1925(w), 1669(m), 1609(m), 1570(s), 1535(s), 1442(m), 1407(s), 1275(s), 1234(m), 1196(m), 1159(s), 1100(s), 1046(s), 987(s), 964(s), 916(s), 887(s), 849(m), 809(s), 706(s), 610(s), 559(s), 474(m).

MS (ESI *m/z*, poz. mód): 211.1 (95 %) [M+H]⁺, 233.1 (100 %) [M+Na]⁺

Anal. Vypočítané pre C₁₀H₁₄N₂O₃ (210.10): C, 57.13; H, 6.71; N, 13.33. Nájdené: C, 57.08; H, 6.81; N, 13.28.

6.5 Príprava *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acetamidu (6a)

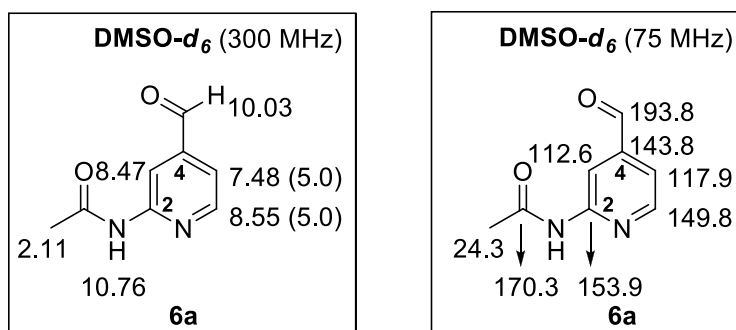


K roztoku 40 ml ľadovej HOAc a 8 ml HBr (konc) sme pridali 820 mg (3.90 mmol, 1.00 mol ekv) acetálu **5a**. Zmes sme zahrievali na 75 °C počas 2 h a následne sme ju nechali ochladiť na RT počas 2 h. Pomocou TLC analýzy sme pozorovali úplnú konverziu východiskovej látky za vzniku škvŕny novej zlúčeniny. Reakčnú zmes sme spracovali

pridaním 100 ml ľadového NaOH(aq, 20 %) roztoku. Zmes sme neutralizovali do bázického pH pridávaním tuhého NaHCO₃ a súčasne sme reakciu chladili pridávaním ľadu. Potom sme zmes nasýtili pridaním tuhého NaCl a extrahovali ju pomocou EA (3 x 80 ml). Spojenú organickú fázu sme sušili státím nad Na₂SO₄. Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili za zníženého tlaku. Získali sme 560 mg (3.41 mmol, 87 %) surového produktu **6a**, ktorý sme čistili pomocou FLC (SiO₂; H / EA). Získali sme 220 mg (1.34 mmol, 34 %) aldehydu **6a**.

Novosť: Látka **6a** nebola doposiaľ v literatúre opísaná.

T.t.: 135.2 – 136.4 °C [EA].



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.76 (s, br, 1H, -NH-), 10.03 (s, 1H, -CHO), 8.55 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.0 Hz, H-C(6)), 8.47 (s, 1H, H-C(3)), 7.48 (d, 1H, *J*(5,6) = 5.0 Hz, H-C(5)), 2.11 (s, 3H, -OCH₃).

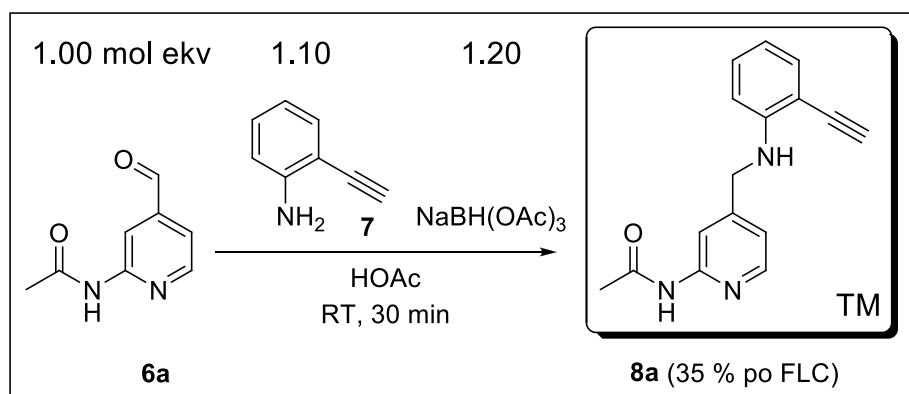
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 193.8 (-CH=O), 170.3 (-(C=O)NH-), 153.9 (C(2)), 149.8 (C(6)), 143.8 (C(4)), 117.9 (C(5)), 112.6 (C(3)), 24.3. (-COCH₃).

FT IR (neat, cm⁻¹): 3257(m), 3215(m), 3123(w), 3073(w), 2918(m), 2871(m), 2106(w), 1936(w), 1792(m), 1699(s, -CONH-), 1608(m), 1573(s), 1534(s), 1421(s), 1385(s), 1265(s), 1143(s), 992(m), 958(s), 896(m), 833(s), 789(m), 747(s), 682(m), 654(s), 601(s), 559(s), 450(s).

MS (ESI *m/z*, neg. mód): 163.0 [M-H]⁻.

Anal. Vypočítané pre C₈H₈N₂O₂ (164.06): C, 58.53; H, 4.91; N, 17.06. Nájdene: C, 58.46; H, 4.84; N, 17.20.

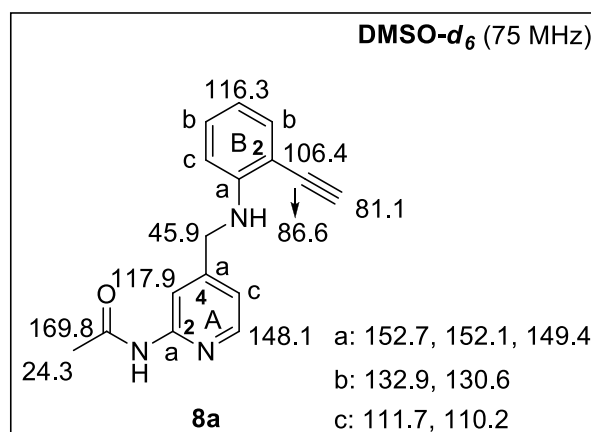
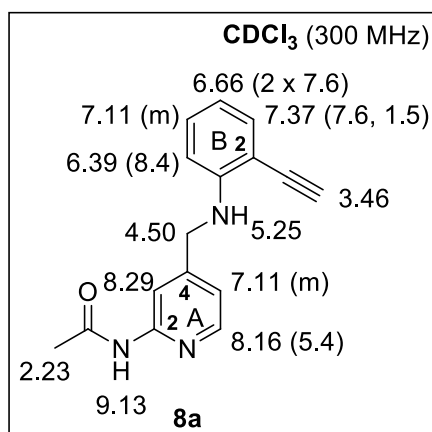
6.6 Príprava *N*-(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acetamidu (8a)



Zmes 190 mg (1.16 mmol, 1.00 mol ekv) zlučieniny **6a** a 149 mg (1.27 mmol, 1.10 mol ekv) 2-etynylanilínu **7** sme rozpustili v 1 ml ľadovej HOAc. Potom sme do reakčnej zmesi pridali roztok 53.0 mg (1.39 mmol, 1.20 mol ekv) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ v HOAc, ktorý sme pripravili reakciou NaBH_4 v 1 ml ľadovej HOAc pri 0 °C. Reakčnú zmes sme miešali pri RT počas 30 minút. Pomocou TLC analýzy sme pozorovali vznik novej látky a reakčnú zmes sme spracovali. Zmes neutralizovali ľadovým roztokom NaOH do bázického pH a roztok sme nasýtili pridaním tuhého NaCl. Reakčnú zmes sme extrahovali s EA (2 x 30 ml). Spojenú organickú vrstvu sme sušili státím nad Na_2SO_4 . Po odfiltrovaní sušidla sme filtrát zahustili za zníženého tlaku. Získali sme 450 mg surového produktu, ktorý sme čistili pomocou FLC (SiO_2 ; H / EA). Získali sme 109 mg (0.41 mmol, 35 %) požadovaného produktu **8a**.

Novosť: Látka **8a** nebola doposiaľ v literatúre opísaná.

T.t.: 98.5 – 99.7 °C [EA].



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.13 (s, 1H, -NH-), 8.29 (s, 1H, H-C_A(3)), 8.16 (d, 1H, *J*(A₅,A₆) = 5.4 Hz, H-C_A(6)), 7.37 (dd, 1H, *J*(B₃,B₄) = 7.6 Hz, *J*(B₃,B₅) = 1.5 Hz, H-C_B(3)), 7.11 (m, 2H, H-C_A(5) a H-C_B(5)), 6.66 (dd 1H, *J*(B₃,B₄) = *J*(B₄,B₆) = 7.6 Hz, H-C_B(4)), 6.39 (d, 1H, *J*(B₅,B₆) = 8.4 Hz, H-C_B(6)), 5.25 (s, 1H, -NH-), 4.50 (s, 2H, -H₂CNH-), 3.46 (s, 1H, HC::C-), 2.23 (s, 3H, H₃CCO-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.8 (-CONH-), 152.7, 152.1, 149.4 (C_A(2)), (C_A(4)), (C_B(1)), 148.1 (C_A(6)), 132.9 a 130.6 (C_B(3 a 5)), 117.9 (C_A(3)), 116.3 (C_B(4)), 111.7 a 110.2 (C_A(5) a (C_B(6))), 106.4 (C_B(2)), 86.6 (-C::CH), 81.1(HC::C-), 45.9(-CH₂NH-), 24.3 (CH₃CO-).

FT IR (neat, cm⁻¹): 3416(w), 3265(m), 3179(w), 2964(m), 2260(w), 1687(s, -CONH-) 1653(w), 1597(m), 1571(s), 1531(s), 1508(s), 1413(s), 1370(m), 1320(s), 1285(s), 1261(s), 1238(s), 1159(s), 1019(s), 96(m), 882(m), 831(s), 747(s).

MS (ESI m/z, poz. mód): 266.3 [M+H]⁺.

Anal. Vypočítané pre C₁₆H₁₅N₃O (265.12): C, 72.43; H, 5.70; N, 15.84. Nájdene: C, 72.38; H, 5.64; N, 15.95.

7 Diskusia

V bakalárskej práci sme sa zamerali na syntézu ligandov pre reakcie organických alkinov a azidov katalyzované biologickým cieľom. Na prípravu cieľovej zlúčeniny **8 (a-c)** sme navrhli dva možné syntetické postupy.

V prvom návrhu (Schéma 2) sme uvažovali prvotné zavedenie acylamidovej skupiny **10** a až následnú redukciu karbonitrilovej skupiny na aldehyd **6**, ktorý by následne reduktívnou amináciou poskytol cieľovú molekulu **8**. Isté pochybnosti vzbudzoval druhý syntetický krok, kde by mohla byť problematická selektívna redukcia nitrilovej funkčnej skupiny.

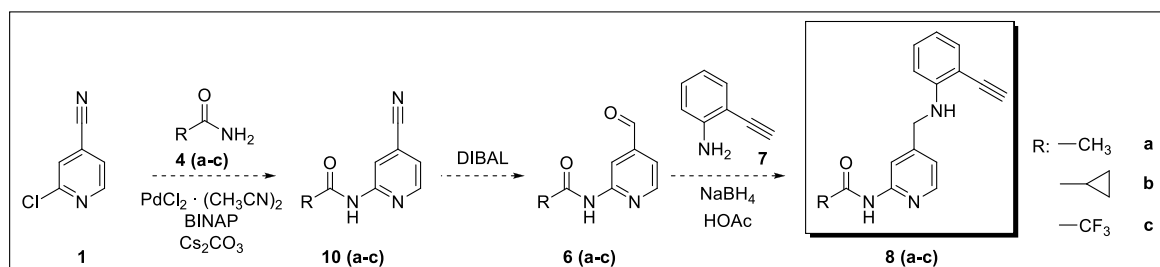


Schéma 2. Prvý návrh syntézy alkinového ligandu **8**.

V druhom syntetickom prístupe (Schéma 3) sme uvažovali substitúciu chloridového derivátu **1** na amínový derivát **11** a následnú redukciu karbonitrilovej skupiny na požadovaný aldehyd **12**. Potom by sme pomocou acylačného činidla zaviedli požadovaný amidový fragment a posledným krokom by bola reduktívna aminácia.

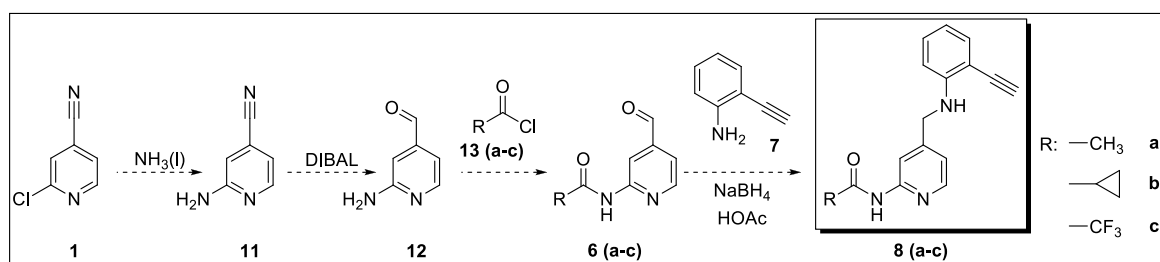


Schéma 3. Druhý návrh syntézy alkínového ligandu **8**.

Vzhľadom na jednoduchosť syntetických krokov sme dali prednosť druhému syntetickému postupu. Zistili sme však, že substitúcia chlóru zlúčeniny **1** na amín nie je synteticky schodná. Pokúsili sme sa substituovať chlór pomocou kvapalného amoniaku. Reakcia neposkytla požadovaný amín, ale viedla k vzniku 2-chlórizonikotínimidamidu. V prostredí vodného roztoku amoniaku pri vyššej teplote v autokláve sme izolovali hydrolyzovaný produkt 2-chlórizonikotínovú kyselinu.

Reakciu sme sa snažili katalyzovať aj meďnými soľami (Cu(II)), hlavné produkty reakcie sa však nezmenili a boli identifikované ako tie, získané v postupe bez katalýzy.

Náš predpoklad, ktorý vychádzal z možnosti nukleofilnej substitúcie chlóru na deaktivovanom pyridínovom skelete nevedol k želanej reakcii, z dôvodu nedostatočnej reaktivity halogénu v α polohe na pyridíne. Riešením by mohli byť extrémnejšie podmienky (vyššia teplota a tlak), ktoré sme pri daných laboratórnych podmienkach neuskutočňovali.

Vrátili sme sa k pôvodnému návrhu. (Schéma 2) Tu sa nám podarilo úspešne uskutočniť a optimalizovať amidový Buchwald-Hartwigov coupling a pripraviť amid **10a**. V prípade využitia 1.00 mol ekv acetamidu ako činidla, reakcia poskytovala len nízke výťažky (32 %). Ak sme uskutočnili reakciu s 3.00 mol ekv acetamidu, reakcia na **8a** poskytla uspokojivý 88 % výťažok. V druhom kroku pri príprave aldehydu **6** náš návrh zlyhal z dôvodu obávanej neselektivity reakcie. Reakcia s DIBAL-om na substráte **10a** viedla k neželaným rozkladným produktom.

Rozhodli sme sa preto prvý syntetický návrh upraviť. (Schéma 1) Na substráte **1** sme najprv uskutočnili redukciu pomocou DIBAL-u a získali sme aldehydový derivát **2** v 94 % výťažku.

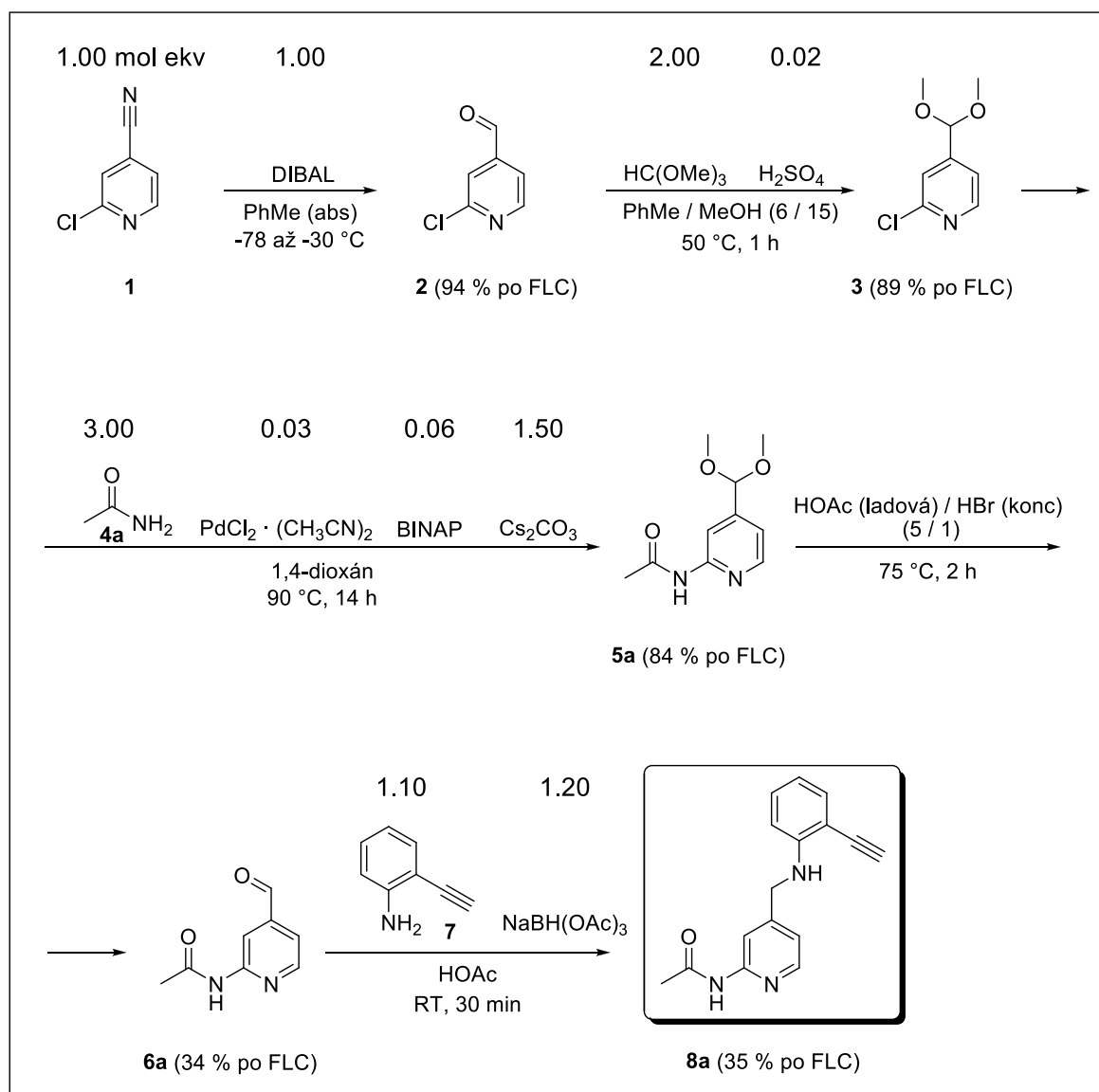


Schéma 1. Upravený úspešný návrh syntézy alkínu **8a**.

Problematický sa ukázal aj Buchwald-Hartwigov coupling na substráte **2**, ktorý priamo neposkytol produkt **6a**, ale pozorovali sme rozklad východiskového aldehydu **2**. Dôvodom je zrejme nekompatibilita aldehydickej funkčnej skupiny pri tejto reakcii. Problém sme sa snažili obísť chránením aldehydickej funkčnej skupiny cez acetál **3**. Ochranou aldehydovej funkčnej skupiny sme zabezpečili jej stabilitu voči reakčným podmienkam a získali sme nízke výťažky produktu **5a** (24%). Na dosiahnutie vyššieho výťažku bolo nevyhnutné okrem 3.00 mol ekv amidového činidla zvýšiť aj mólový

ekvivalent katalyzátora a ligandu. Ak sme použili 0.03 mol ekv $\text{PdCl}_2 \cdot (\text{CH}_3\text{CN})_2$ a 0.06 mol ekv ligandu BINAP-u, získali sme až 85 % produktu **5a** po FLC čistení. V štvrtom kroku sme aldehydovú skupinu obnovili ochránením z acetálu **5a** v zmesi HBr (konc) a ľadovej HOAc. Získali sme aldehyd **6a** v 34 % výťažku po FLC čistení. Reakciou kyslej hydrolýzy sa nám nepodarilo pripraviť aldehyd **6a**. Východisková látka **2** sa ukázala byť pomerne stabilná v kyslom prostredí. Dôvodom je zrejme protonizácia pyridínového skeletu, ktorý destabilizuje vytvorenie oxóniového kationu (vhodného tranzitného stavu) v para polohe na pyridíne. Posledným krokom pri príprave **8a** bola reduktívna aminácia acylamidového derivátu **6a** na alkín **8a**. Reakciu sme uskutočnili pomocou $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, ktorý sme pripravili pridaním NaBH_4 do zmesi ľadovej HOAc. Následne sme čerstvo pripravený roztok borohydridu pridali k zmesi **6a** a **7** v HOAc pri RT. Po FLC čistení sme získali 35 % požadovaného produktu **8a**.

8 Záver

V teoretickej časti práce sme opísali aplikácie *In-Situ* Click chémie pri vývoji inhibítorov s protirakovinovou aktivitou. Zamerali sme sa aj na opis využitia meďnej katalýzy v živých organizmoch s ohľadom na redukciu potenciálnej cytotoxicity. Pri navrhovaní syntetických postupov na prípravu požadovaného alkínového ligandu **8a** sme využili databázy Reaxys a SciFinder.

V experimentálnej časti bakalárskej práce sme sa zamerali na optimalizáciu a prípravu alkínu **8a**. Päťstupňovým postupom sa nám podarilo pripraviť ligand **8a** v celkovom 8 % výťažku. Táto zlúčenina bude využitá na prípravu požadovaného inhibítora, ako aj na *In-Situ* Click reakcie s počítačom navrhnutými azidmi. Všetkých päť pripravených zlúčenín (**2**, **3**, **5a**, **6a**, **8a**), z toho tri dosiaľ v literatúre neopísané (**5a**, **6a**, **8a**) sme charakterizovali pomocou fyzikálnych vlastností, ako aj pomocou spektrálnych metód.

Conclusion

In theoretical part, we have described the application of *In-Situ* Click chemistry in development of inhibitors with anticancer activity. We focused on describing the exploitation of copper catalysis in living organisms with regard on the reducing the potential cytotoxicity. In designing the synthetic pathways for the preparation of the required alkyne ligand **8a**, we used the Reaxys and SciFinder databases.

In experimental part of the bachelor work, we have focused on the optimization and preparation of alkyne **8a**. By five-step procedure, we synthesized the ligand **8a** in total 8 % yield. This compound will be subsequently used for the prepreparation of required inhibitor as well as for *In-Situ* reactions with computer designed azides. All prepared compounds (**2**, **3**, **5a**, **6a**, **8a**) of which three are not yet described in literature (**5a**, **6a**, **8a**) were characterized by their physical features as well as by spectral methods.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nie, J.; Li, J.-P.; Deng, H.; Pan, H.-C. *Chin. J. Anal. Chem.* **2015**, *43*, 609-617.
- [2] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 2004-2021.
- [3] Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [4] Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, 4905-4979.
- [5] Chemama, M.; Fonvielle, M.; Arthur, M.; Valéry, J. M.; Etheve-Quelquejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1929-1938.
- [6] Clavadetscher, J.; Hoffmann, S.; Lilienkamp, A.; Mackay, L.; Yusop, R. M.; Rider, S. A.; Mullins, J. J.; Bradley, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15662-15666.
- [7] Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [8] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [9] The Scripps Research Institute (TSRI); Patent US7375234 B2, **2008**.
- [10] Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.
- [11] Accenda Tech Co., Ltd.; Patent WO2011003365 A1, **2011**.
- [12] Technion Research & Development Foundation Limited; Patent WO2010113151 A1, **2010**.
- [13] Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [14] Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano Del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051-8056.
- [15] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [16] Agarwal, P.; Beahm, B. J.; Shieh, P.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11504-11510; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 11666-11672.
- [17] Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [18] Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Sletten, E. M.; Baskin, J. M.; Miller, I. A.; Agard, N. J.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 1821-1826.

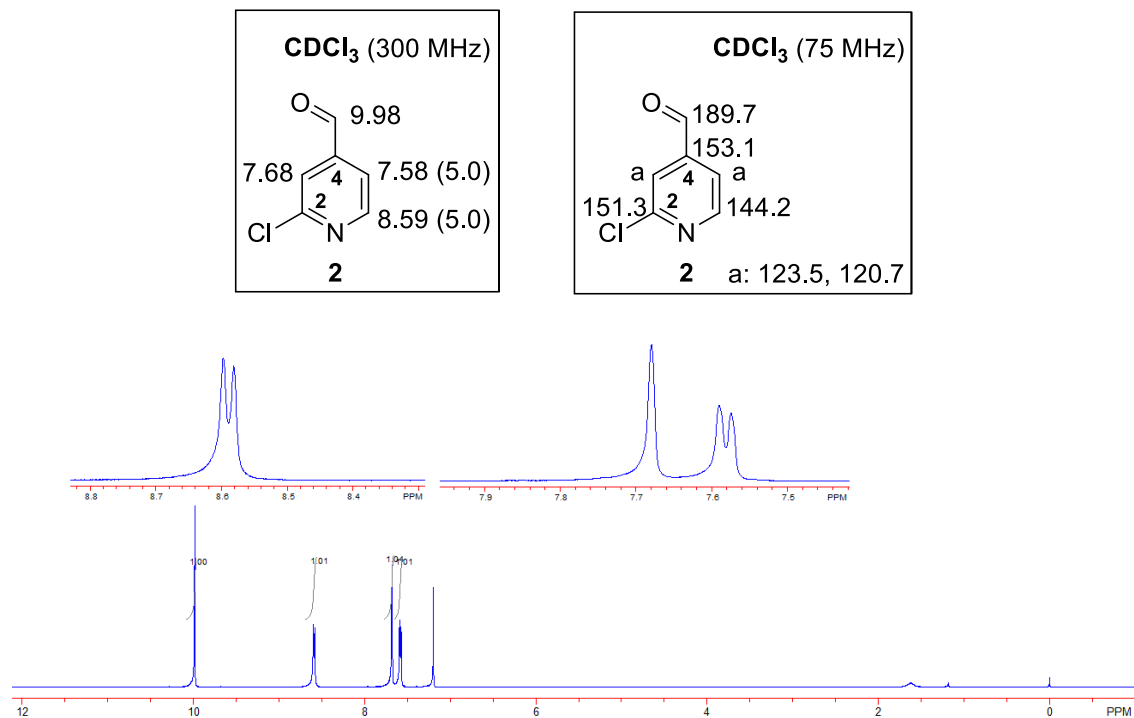
- [19] Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.
- [20] Uttamapinant, C.; Tangpeerachaikul, A.; Grecian, S.; Clarke, S.; Singh, U.; Slade, P.; Gee, K. R.; Ting, A. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852-5856.
- [21] Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5872-5876.
- [22] McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chemistry and Biology*. **2014**, 1075-1101.
- [23] Abet, V.; Mariani, A.; Truscott, F. R.; Britton, S.; Rodriguez, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 4474-4489.
- [24] Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J.-M.; Peng, L.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 438-444.
- [25] Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809-12818.
- [26] Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, 278-308.
- [27] Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053-1057.
- [28] Taylor, P.; Radic, Z. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 281-320.
- [29] Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435-1439.
- [30] Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H.; Kolb, H. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 116-120.
- [31] Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259-296.
- [32] Reddy, D. M.; Srinivas, J.; Chashoo, G.; Saxena, A. K.; Sampath Kumar, H. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1983-1991.
- [33] Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S. *J Med Chem.* **2003**, *46*, 5097-5116.
- [34] Chen, Y.; Lopez-Sanchez, M.; Savoy, D. N.; Billadeau, D. D.; Dow, G. S.; Kozikowski, A. P. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3437-3448.
- [35] Suzuki, T.; Ota, Y.; Ri, M.; Bando, M.; Gotoh, A.; Itoh, Y.; Tsumoto, H.; Tatum, P. R.; Mizukami, T.; Nakagawa, H.; Iida, S.; Ueda, R.; Shirahige, K.; Miyata, N. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562-9575.
- [36] Summy, J. M.; Gallick, G. E. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 337-358.

- [37] Kumar, A.; Ahmad, I.; Chhikara, B. S.; Tiwari, R.; Mandal, D.; Parang, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1342-1346.
- [38] Dumontet, C.; Jordan, M. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 790-803.
- [39] Stefely, J. A.; Palchaudhuri, R.; Miller, P. A.; Peterson, R. J.; Moraski, G. C.; Hergenrother, P. J.; Miller, M. J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3389-3395.
- [40] Odlo, K.; Hentzen, J.; Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A. B. S. M.; Sylte, I.; Skrede, M.; Flørenes, V. A.; Hansen, T. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4829-4838.
- [41] Raqualia Pharma Inc. Patent: WO2013/161308 A1, **2013**.
- [42] Arienti, K. L.; Breitenbucher, J. G.; Buzard, D. J.; Edwards, J. P.; Hack, M. D.; Khatuya, H.; Kindrachuk, D. E.; Lee, A.; Venable, J. D. Patent: US2005/70550 A1, **2005**.
- [43] Pfizer Inc. Patent: WO2013/150416 A1, **2013**.
- [44] Timperley, C. M.; Banks, R. E.; Young, I. M.; Haszeldine, R. N. *J. Fluor. Chem.* **2011**, *132*, 541-547.
- [45] Basilea Pharmaceutica AG; Patent: WO2011/73378 A1, **2011**.
- [46] Prajapati, S. K.; Gupta, K. K.; Babu, B. N. *J. Chem. Sci.* **2015**, *127*, 1047-1052.
- [47] Anwar, U.; Fielding, M. R.; Grigg, R.; Sridharan, V.; Urch, C. J. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 1476-1487.
- [48] Schering Corporation; Patent: WO2008/108957 A2, **2008**.
- [49] Actelion Pharmaceuticals Ltd; Patent: WO2005/40120 A1, **2005**.
- [50] Bachu, P.; Zhu, C.; Akiyama, T. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3977-3981.
- [51] Zhu, C.; Akiyama, T. *Synlett* **2011**, *9*, 1251-1254.
- [52] Heydari, A.; Khaksar, S.; Akbari, J.; Esfandyari, M.; Pourayoubi, M.; Tajbakhsh, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1135-1138.
- [53] Basilea Pharmaceutica AG; Patent: WO2009/106419 A1, **2009**.
- [54] Huth, A.; Zorn, L.; Krueger, M.; Ince, S.; Thierauch, K. H.; Menrad, A.; Haberey, M.; Hess-Stumpp, H.; Patent: US2005/54654 A1, **2005**.
- [55] Devgen NV; Patent: WO2005/82367 A1, **2005**.
- [56] Maksimova, V. N.; Ershov, O. V.; Lipin, K. V.; Eremkin, A. V.; Nasakin, O. E.; *Russ. J. Org. Chem.* **2012**, *48*, 426-429.
- [57] Guo, S.; Wang, Y.; Sun, C.; Li, J.; Zou, D.; Wu, Y.; Wu, Y. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3233-3237.
- [58] Frey, L. F.; Marcantonio, K.; Frantz, D. E.; Murry, J. A.; Tillyer, R. D.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 6815- 6818.

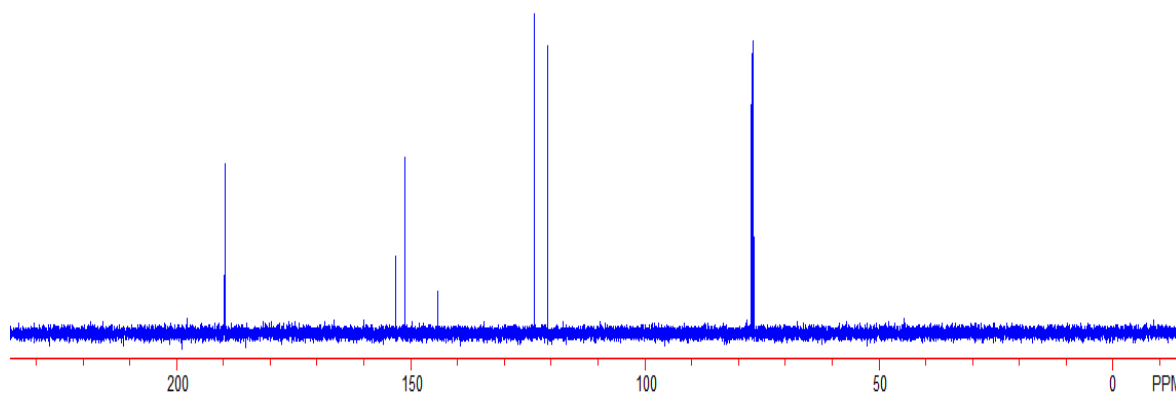
- [59] Wynne, G. M.; Doyle, K.; Ahmed, S.; Li, A. H.; Keily, J. F.; Rasamison, Ch. M.; Pegg, N. A.; Saba, I.; Thomas, C.; Smyth, D.; Sadiq, Sh.; Newton, G.; Dawson, G.; Crew, A. P.; Castelhana, A. L.; Patent: US2004/186124 A1, **2004**.
- [60] Aventis Pharma S.A.; Patent: EP1746097 A1, **2007**.
- [61] Amgen Inc.; Patent: US2008/221101 A1, **2008**.
- [62] Allergan, Inc.; Patent: WO2008/11478 A2, **2008**.
- [63] Schmees, N.; Petrov, O.; Patent: US2008/242866 A1, **2008**.

9 Prílohy

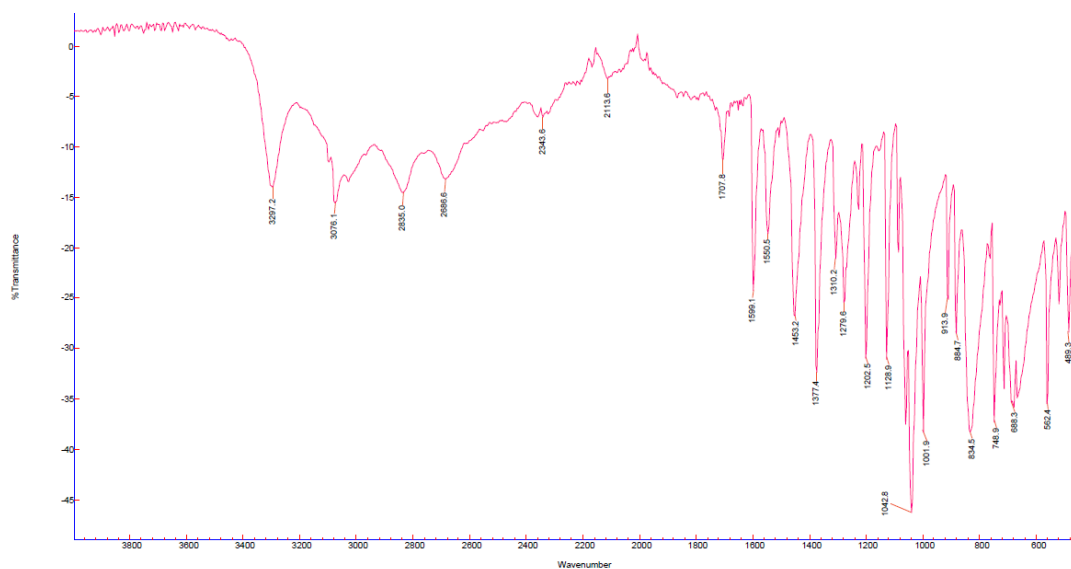
9.1 2-chlórizonikotínaldehyd (2)



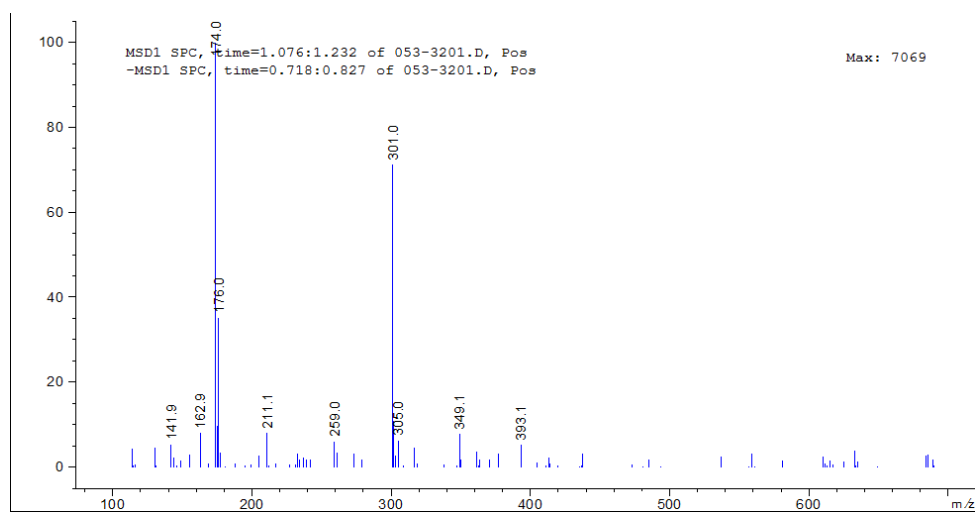
Obr. 14. ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) spektrum zlúčeniny 2.



Obr. 15. ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) spektrum zlúčeniny 2.

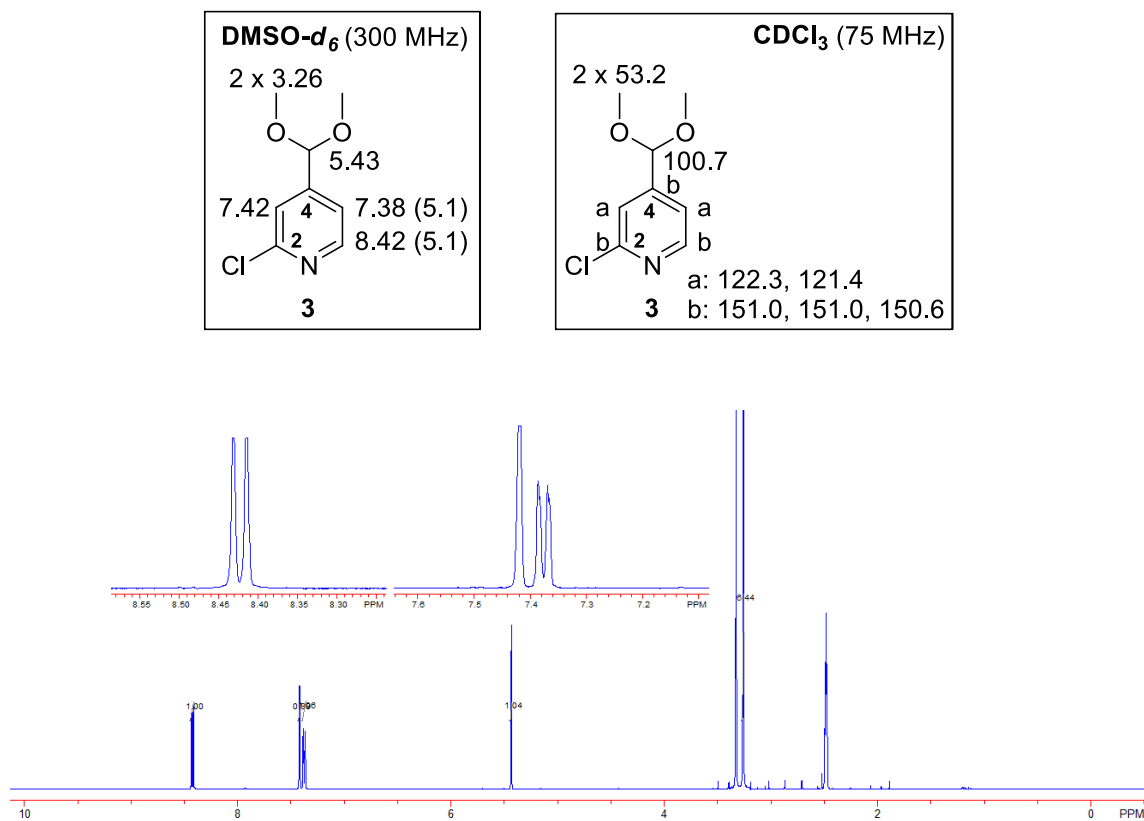


Obr. 16. IR (neat, cm⁻¹) spektrum zlúčeniny 2.

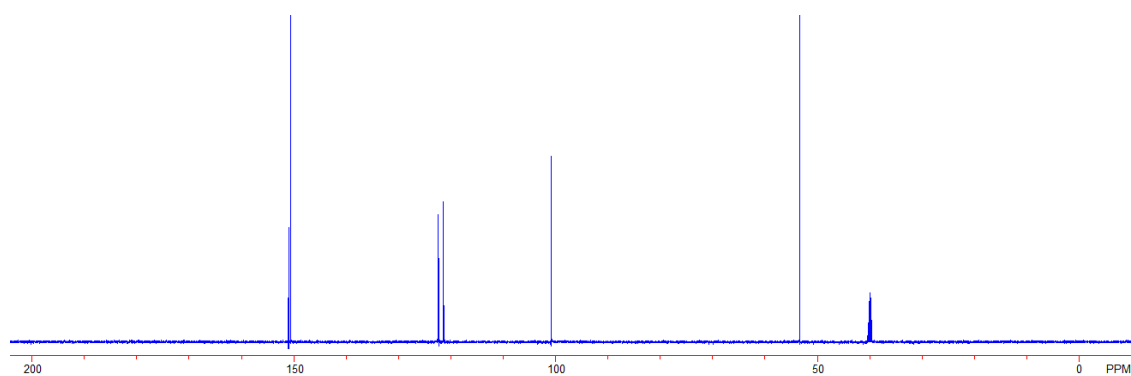


Obr. 17. MS (poz. mód) spektrum zlúčeniny 2.

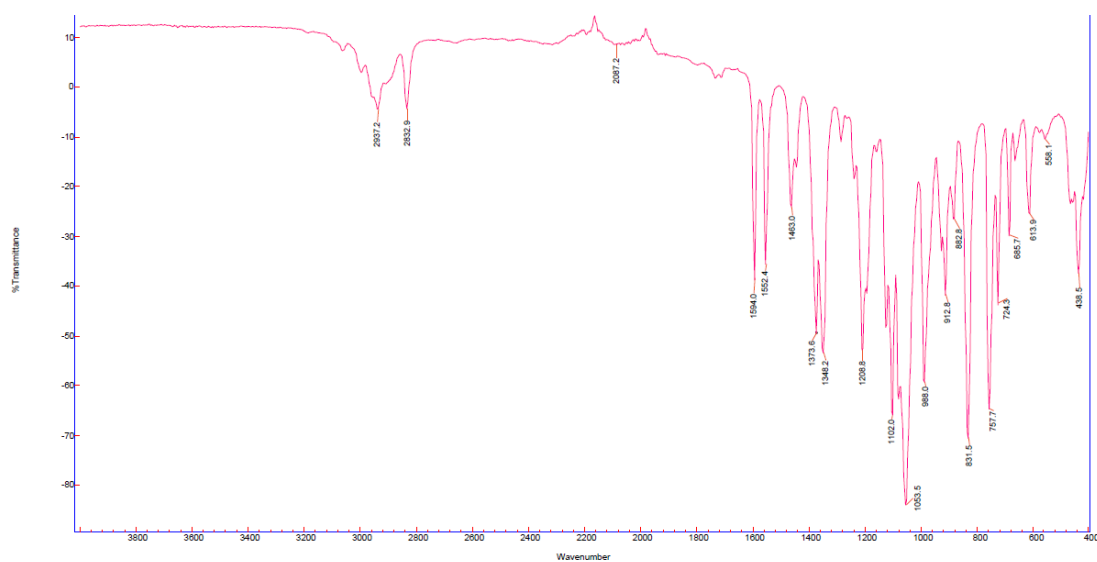
9.2 2-chlór-4-(dimetoxymetyl)pyridín (3)



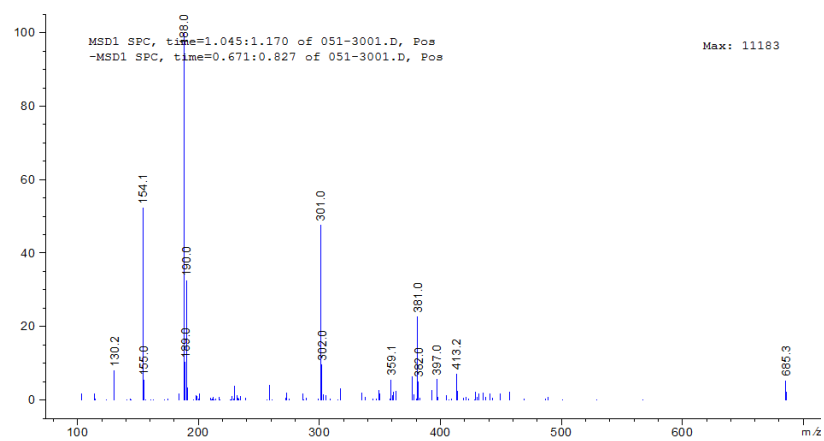
Obr. 18. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) spektrum zlúčeniny **3**.



Obr. 19. ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) spektrum zlúčeniny **3**.

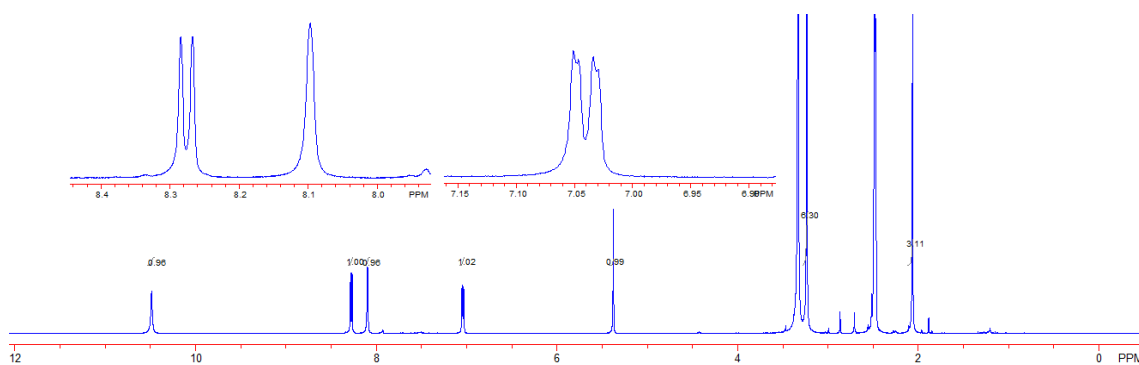
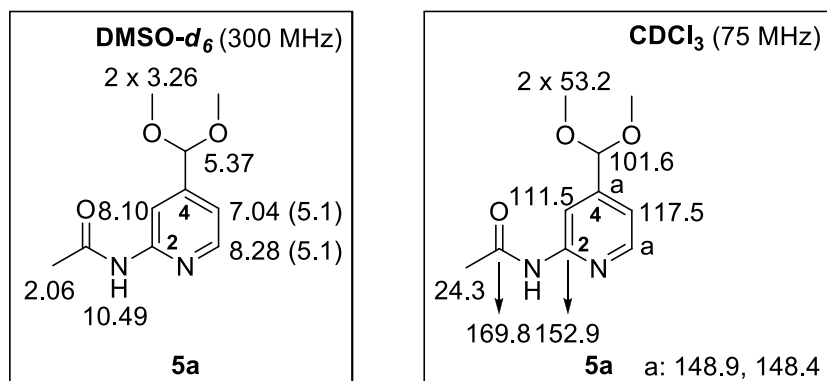


Obr. 20. IR (neat, cm⁻¹) spektrum zlúčeniny 3.

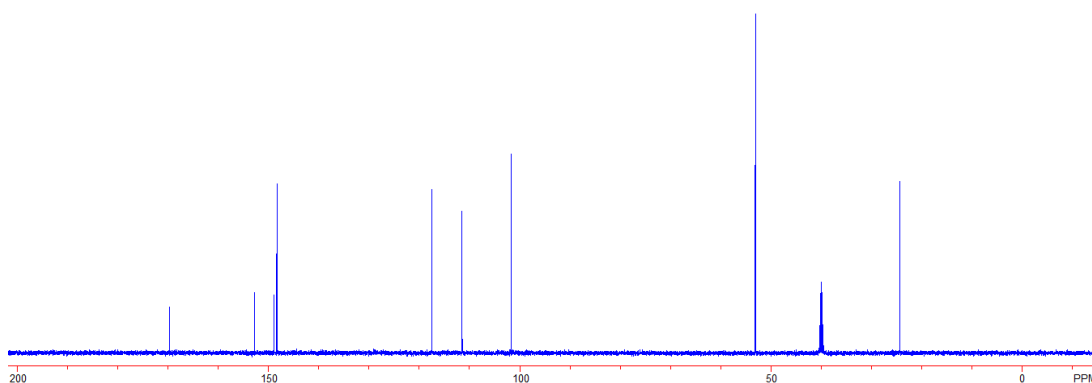


Obr. 21. MS (poz. mód) spektrum zlúčeniny 3.

9.3 *N*-(4-(dimetoxymetyl)pyridín-2-yl)acetamidu (5a)



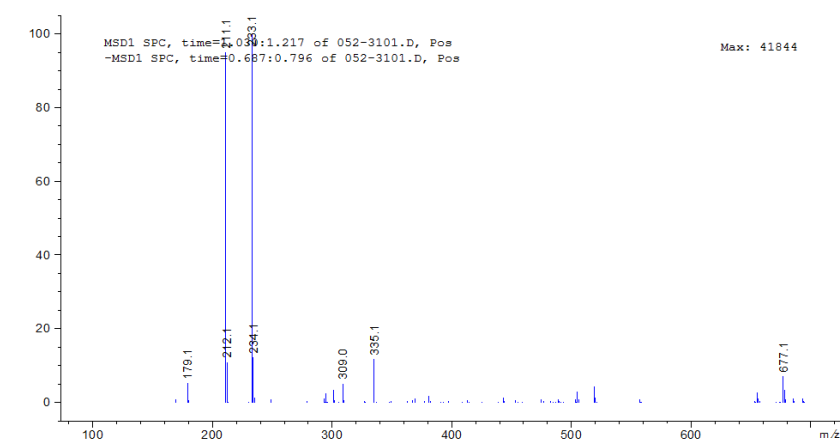
Obr. 22. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) spektrum zlúčeniny 5a.



Obr. 23. ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) spektrum zlúčeniny 5a.

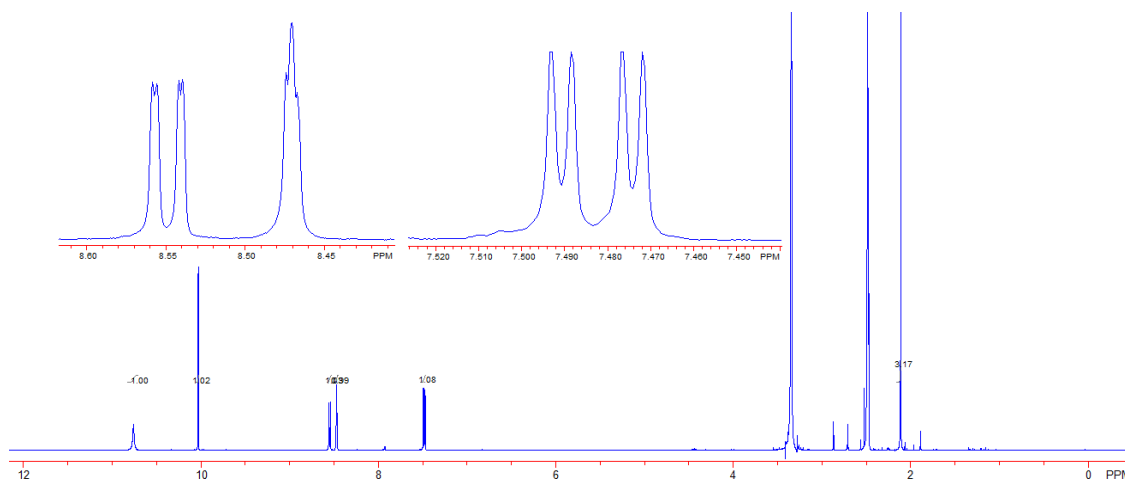
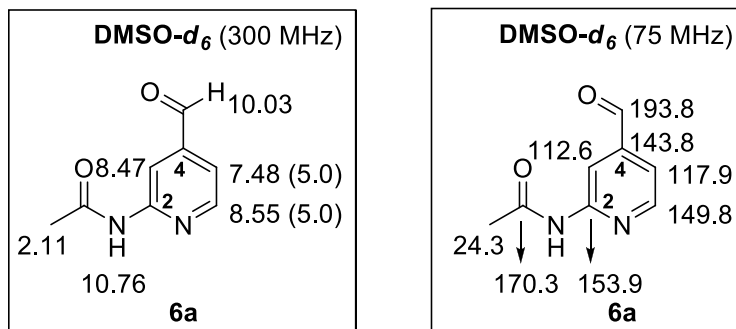


Obr. 24. IR (neat, cm⁻¹) spektrum zlúčeniny 5a.

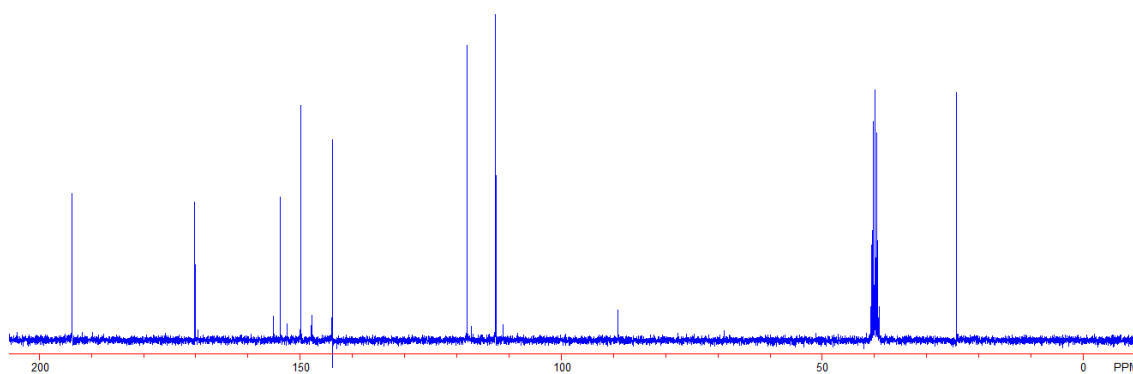


Obr. 25. MS (poz. mód) spektrum zlúčeniny 5a.

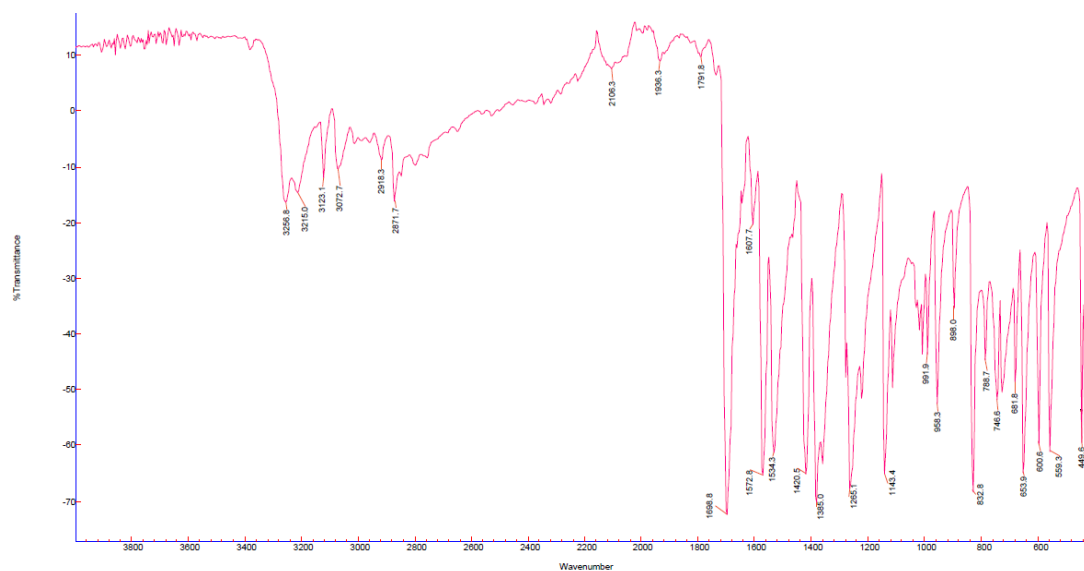
9.4 *N*-(4-formylpyridín-2-yl)acetamid (6a)



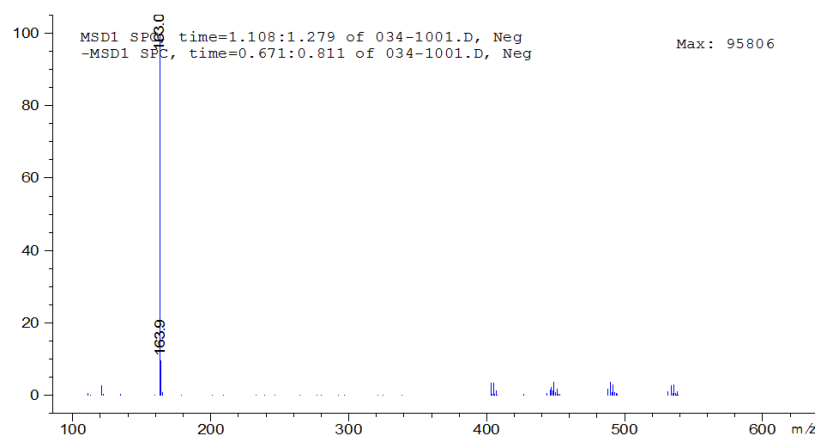
Obr. 26. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) spektrum zlúčeniny 6a.



Obr. 27. ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) spektrum zlúčeniny 6a.

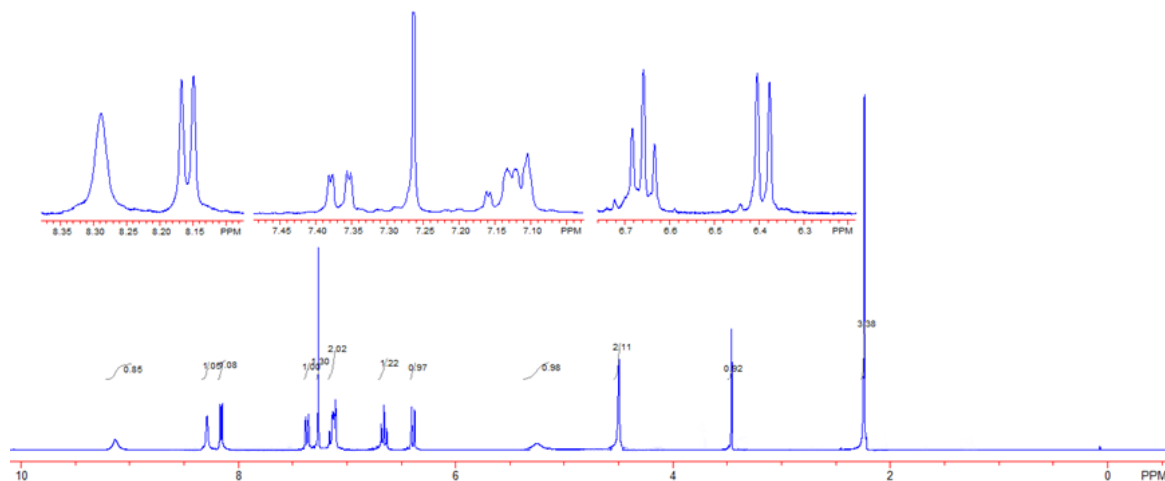
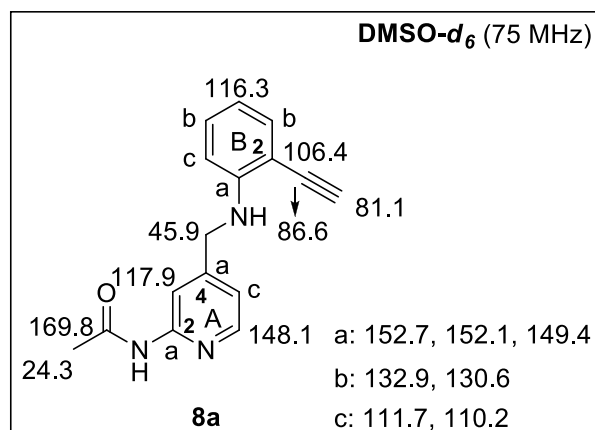
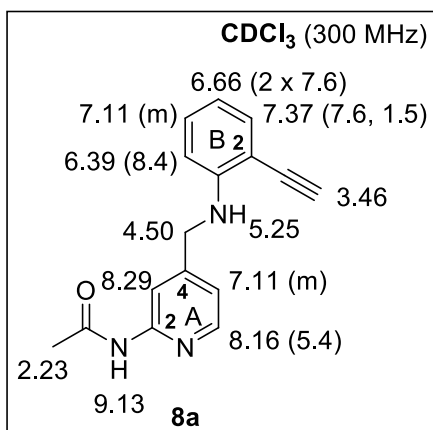


Obr. 28. IR (neat, cm^{-1}) spektrum zlúčeniny **6a**.

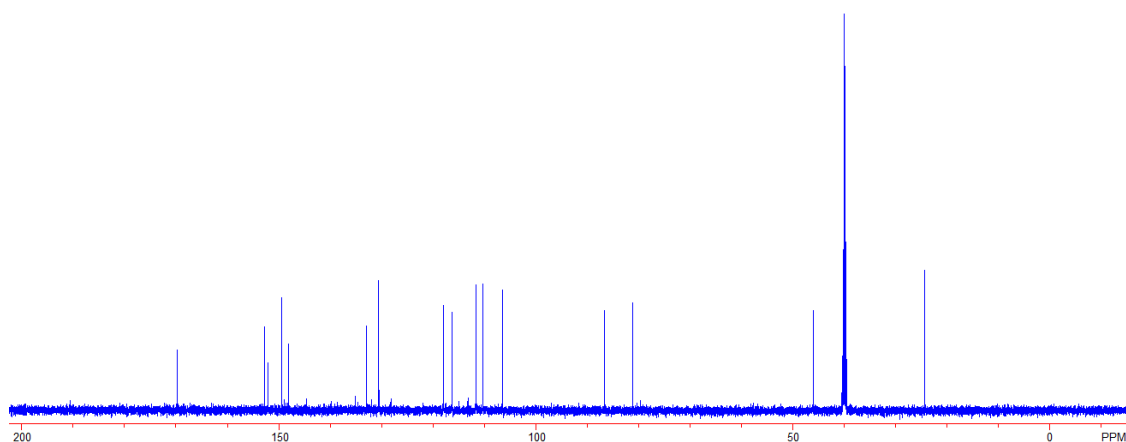


Obr. 29. MS (neg. mód) spektrum zlúčeniny **6a**.

9.5 *N*-(4-((2-etynylfenylamino)metyl)pyridín-2-yl)acetamidu (8a)



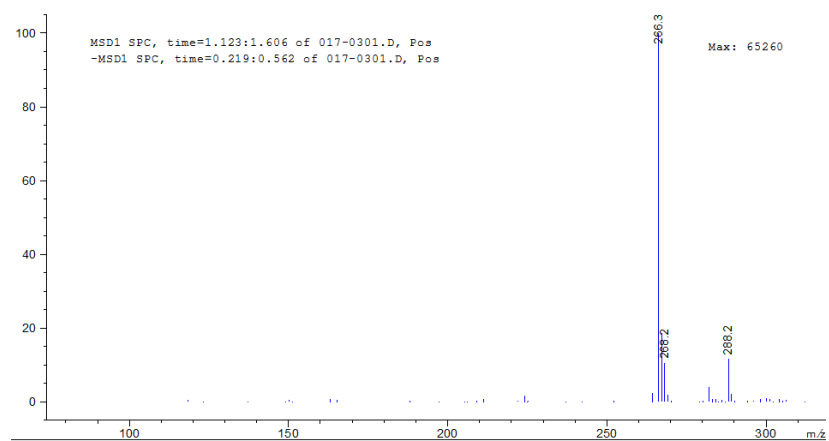
Obr. 30. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) spektrum zlučiny **8a**.



Obr. 31. ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) spektrum zlučiny **8a**.



Obr. 32. IR (neat, cm^{-1}) spektrum zlúčeniny **8a**.



Obr. 33. MS (poz. mód) spektrum zlúčeniny **8a**.