UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta

NÁVRH NOSNÝCH ŠTRUKTÚR, SYNTÉZA ORGANICKÝCH ANGIO- A KANCEROSTATÍK, STANOVENIE ICH BIOLOGICKEJ AKTIVITY

Lucia Kováčiková

Bratislava 2010

Návrh nosných štruktúr, syntéza organických angio- a kancerostatík, stanovenie ich biologickej aktivity

Dizertačná práca

Mgr. Lucia Kováčiková

Univerzita Komenského v Bratislave

Prírodovedecká fakulta Katedra organickej chémie

4.1.16 Organická chémia Organická chémia

Školiteľ: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Stupeň odbornej kvalifikácie: philosophiae doctor

BRATISLAVA 2010

Zadávací list dizertačnej práce

Školiace pracovisko: Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta

Meno a priezvisko doktoranda: Mgr. Lucia Kováčiková

Číslo a názov študijného odboru (-ov): 4.1.16 Organická chémia

Názov študijného programu: Organická chémia

Školiteľ doktoranda: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.

Pracovisko, na ktorom doktorand vykonáva doktorandské štúdium: Katedra organickej chémie

Dátum nástupu na štúdium: 2.9.2006

Doktorandské štúdium a vypracovanie dizertačnej práce je viazané na projekt (-y): APVV (APVT-20-031904) APVV (LPP-0153-06)

COST CM0602

Názov dizertačnej práce: Návrh nosných štruktúr, syntéza organických angio- a kancerostatík, stanovenie ich biologickej aktivity.

Cieľ práce: Syntéza a testovanie nových antineoplastických zlúčenín s vyhodnotením bioaktivít a predikcie mechanizmu ich biologického účinku. Zavedenie a optimalizácia *in vivo* antiangiogénneho CAM testovania. Design štruktúr nových oxo- a aza- antiangiogénnych VEGFR-2 inhibítorov, ich syntéza a bioevaluácia.Vývoj metodiky syntézy navrhnutého azidového ligandu pre *Clik chemistry* knižnicu.

Metodika práce: Návrh zlúčenín sme uskutočnili molekulovým modelovaním pomocou programu *DS Viewer* a dockovacím programom *Yasara* (Autodock 4). Zlúčeniny sme syntetizovali v chemickom laboratóriu pomocou metód opísaných v literatúre. Biologické testovanie sme robili na našom pracovisku pomocou CAM experimentu. Zlúčeniny s antineoplastickou aktivitou boli testované v NCI USA. Látky s antiangiogénnym účinkom boli testované na svoju inhibičnú enzymatickú aktivitu na Univerzite v Liege (Belgicko) ako aj komerčnou firmou v Nemecku (*ProQuinase*).

Navrhovaný rámcový obsah práce:

Antineoplastiká: syntéza, testovanie NCI, Compare systém NCI

Antiangiogeniká: vývoj CAM testu; analýza inhibítora 1Y6A; návrh, syntéza a testovanie oxo- a azaderivátov 1Y6A; syntéza azidového ligandu pre *Click chemistry* kombinatoriálnu knižnicu Termín ukončenia (odovzdania) dizertačnej práce:

Základná a ďalšia odporúčaná literatúra:

Harris, A.P.; Chueng, M.; Hunter III, R.N.; Brown, M.L.; Veal, J.M.; Nolte, R.T.; Wang, L.; Liu, W.; Crosby, R.M.; Johnson, J.H.; Epperly, A.H.; Kumar, R.; Luttrell, D.K.; Stafford J.A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1610-1619.

Graham, L. P.: An introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press, Oxford 2005.

Shoemaker, R.H. The NCI60 Human Tumour Cell Line Anticancer Drug Screen. *Nat. Rev.* **2006**, 6, 813-823. Ribatti, D. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2008**, 270, 181-224.

Richardson, M.; Singh G. *Curr. Drug Targets – Cardiovas. Haemat. Disorders* **2003**, *3*, 155-185. Remko M.: *Metódy výskumu a vývoja liečiv*, Slovac Academic Press, Bratislava **1999**.

Podmienky sprístupnenia dizertačnej práce po úspešnej obhajobe (licenčná zmluva):

Na uzatvorenie licenčnej zmluvy medzi doktorandom ako autorom školského diela a nadobúdateľom Univerzitou Komenského v Bratislave zastúpenou dekanom PriF UK sa:

- vyžaduje súhlas školiteľa, resp. iných autorov,
- nevyžaduje súhlas školiteľa, resp. iných autorov*
- V Bratislave

	Μ	leno a p	riezvisk	Podpis:	
Školiteľ doktoranda:	Doc. R	RNDr.	Andrej	Boháč,	
	PhD.				
Doktorand:	Mgr. Lu	icia Kov	váčiková		
Vedúci pracoviska, na ktorom	Doc. F	RNDr.	Martin	Putala,	
doktorand vykonáva doktorandské	PhD.				
štúdium:					

*nehodiace sa škrtnúť

Čestné vyhlásenie:

Čestne prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracovala samostatne a použitú literatúru uvádzam v zozname.

V Bratislave,

.....

Mgr. Lucia Kováčiková

...venované dedkovi...

Pod'akovanie:

V prvom rade ďakujem svojmu školiteľovi, doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. a Biomagi za odbornú pomoc, neoceniteľné rady a ústretovosť počas realizácie tejto dizertačnej práce. Ďakujem aj doc. RNDr. Marte Sališovej, CSc. a doc. RNDr. Margite Lácovej, CSc a celému kolektívu katedry organickej chémie.

Taktiež ďakujem kolektívu spektrálnych metód za nameranie NMR spektier. Prof. RNDr. Michalovi Zemanovi, DrSc. patrí vďaka za cenné rady pri uvádzaní biologických pokusov, ako aj všetkým ostatným kolegom a priateľom Lenke, Mirke, Saši, Silvii, Ľubovi, Majovi a Evičke, ktorí prispeli k realizácii mojej práce.

Poďakovanie za finančnú podporu patrí grantovej agentúre na podporu výskumu a vývoja APVV (APVT-20-031904), APVV (LPP-0153-06) a COST CM0602.

Poďakovanie za poskytnutie vzoriek klinických liekov Sutent a Nexavar patrí farmaceutickým firmám *Pfizer* a *Bayer*.

Ďalej ďakujem manželovi za porozumenie, optimizmus a dobrú náladu pri písaní mojej práce a všetkým známym za psychickú podporu.

V neposlednom rade moja vďaka patrí aj rodičom, starým rodičom a celej mojej rodine.

Abstrakt

KOVÁČIKOVÁ, Lucia: Návrh nosných štruktúr, syntéza organických angio- a kancerostatík, stanovenie ich biologickej aktivity. Dizertačná práca. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie. Školiteľ: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD. Bratislava: PriF UK, 2010, 155 s.

Cieľom dizertačnej práce je príprava a bioevaluácia nových typov antineoplastík optimalizáciou ich nosného skeletu, ktorý bol nedávno objavený v našej výskumnej skupine prostredníctvom biologického testovania nových zlúčenín na paneli 60 typov ľudských tumorových bunkových línií v NCI USA. Pripravené zlúčeniny sme testovali na antitumorovú aktivitu a vyhodnotením biotestov cez systém *Compare* sme navrhli predpokladaný mechanizmus ich biologického účinku.

V ďalšej časti práce sme sa zaoberali zavedením a optimalizáciou biologického *in vivo* CAM testovania na embryách prepelice japonskej zamerané na zistenie antiangiogénnej účinnosti nových zlúčenín.

Následne sme syntetizovali nové typy navrhnutých antiangiogénnych zlúčenín. Preštudovaním kryštálovej štruktúry VEGFR-2 receptora PDB: 1Y6A a jeho inerakcií ligand – proteín sme narhli nové inhibítory tohto receptora zavedením kyslíkatých substituentov do *para*-polohy aromatického jadra. Pomocou molekulového modelovania a výpočtových metód sme vybrali 5 vhodných typov kyslíkatých derivátov inhibítora 1Y6A (OH, OMe, OMOM, OCHO, OCONH₂). Nakoľko OCHO a OCONH₂ sú chemicky nestabilné zlúčeníny, rozhodli sme sa navrhnúť ich dusíkaté bioizostéry. Syntéza novonavrhnutých zlúčenín vychádza z pripravených prekurzorov organických azidov a arylizokyanátu, ktoré za Staudingerových podmienok cez aza-*Wittigovu* reakciu a následnú cyklizáciu dávajú požadované oxazolové deriváty. Následným syntetickým krokom je *Stilleho coupling*, ktorý dáva finálne deriváty inhibítora 1Y6A. Kyslíkaté deriváty boli testované na ich antiangiogénnu inhibičnú aktivitu.

Ďalším cieľovým typom zlúčenín bola príprava azidového ligandu arylaminooxazolu využiteľného pre *Click Chemistry* kombinatoriálnu knižnicu.

Kľúčové slová: antineoplastiká, antiangiogeniká, inhibítory angiogenézy, 1Y6A, oxazol, VEGFR-2, CAM Assay, Sutent, Nexavar.

Abstract

KOVÁČIKOVÁ, Lucia: Design of leading structures, synthesis organic angio- and cancerostatics, determination of biological activity. Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Organic Chemistry. Supervisor: Assoc. prof. RNDr. Andrej Boháč, PhD. Bratislava: PriF UK, 2010, 155 p.

The aim of my thesis was preparation and bioevaluation of new types of antineoplastic compouds possessing the leading structure discovered recently in our research group. Their anticancer activities were determined on the sixty human tumour cell lines assay in NCI USA. The bioactivities were evaluated. Prediction of responsible biological target was done *via* Compare analysis.

In the next part, we established and optimised biological *in vivo* CAM assay on Japanese quail embryos for determination of antiangiogenic activity.

Consequently, new types of designed antiangiogenic compound were synthesized. Studying interaction of ligand-proteine in VEGFR-2 complex PDB: 1Y6A, we design new derivatives of this inhibitor by implementation of several additional substituents. By molecular modelling we selected five appropriate oxygen derivates of 1Y6A inhibitor (OH, OMe, OMOM, OCHO, OCONH₂). Because OCHO and OCONH₂ substituents were unstable, we proposed their nitrogen bioisosters. All of the proposed compounds were synthesised from prepared organic azide precursors and arylisocyanate via aza-*Wittig* reaction and subsequent cyclisation to oxazol derivates. Final step of the synthesis was *Stille* coupling used for introduction of pyridyl group on phenyl ring. Obtained oxygen inhibitor candidates were screened on antiangiogenic activities. The results were evaluated and compared to clinical drugs Sutent and Nexavar.

Further, we developed synthesis of arylaminooxazole azide ligand required for *Click Chemistry* combinatorial library.

Key words: antineoplastics, antiangiogenics, inhibitors of angiogenesis, 1Y6A, oxazole, VEGFR-2 receptor, CAM assay, Sutent, Nexavar.

Predhovor

Vzhľadom na súčasný stav onkologických ochorení (druhá najčastejšia príčina smrti na Slovensku) je potrebné hľadať nové prístupy liečby tohto závažného ochorenia. Chemoterapia má za úlohu čo najúčinnejšie zasahovať nádorové bunky, ale dochádza tiež k poškodeniu zdravých buniek organizmu. Zníženie toxicity a rezistencia tumorových buniek vedie k potrebe hľadania novej liečby tumorov.

Vedomosti o štruktúre miesta účinku liečiva, medzimolekulových interakciách jednotlivých častí aktívneho miesta a molekulové modelovanie interakcií ligand – receptor urýchľujú vývoj nových liečiv. Tu je potrebné uplatniť znalosti niekoľkých vedných odborov (molekulová biológia, farmakológia, chémia, medicína...). Súčasná medicínska chémia je interdisciplinárnou vedou a spája poznatky organickej chémie a biologických vied. Cielený vývoj liečiv pomocou výpočtových metód a hľadaním ďalších nosných štruktúr vedie k vývoju kandidátov na liečivá ako základu pre produkciu nových liekov vo farmaceutickom priemysle.

OBSAH

1	G	afický abstrakt	
1.1	Sy	ntéza antineoplastických zlúčenín s pyranochromenónovým skeletom	
1.2	Vy	sledky antitumorových NCI testov	
1.3	Vy	voj CAM testu	
1.4	Ar	alýza inhibítora 1Y6A	
1.5	De	sign oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora	
1.6	Sy	ntéza oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora	
	1.6.1	Príprava alfa-azidocetofenónových prekurzorov	14
	1.6.2	Príprava designovaných oxazolových derivátov	
1.7	Те	stovanie oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora	
1.8	De	sign aza-inhibítorov VEGFR-2 receptora	
1.9	Sy	ntéza aza-inhibítorov VEGFR-2 receptoru	
	1.9.1	Príprava alfa-azidocetofenónových prekurzorov	
	1.9.2	Príprava designovaných oxazolových derivátov	
1.10	Az	idový ligand pre "Click chemistry" knižnicu	
2	Zo	znam použitých skratiek	
3	Úv	od a ciele dizertačnej práce	
4	Те	oretická časť	
4.1	Ar	tineoplastiká a ich testovanie	
4	4.1.1	Typy klinických antitumorových liečiv podľa mechanizmu ich účinku	
	a)	Alkylačné činidlá	
	b)	Interkalačné zlúčeniny (DNA/RNA antimetabolity)	
	c)	Látky s antitubulínovým mechanizmom účinku	
	d)	Inhibítory topoizomeráz I a II	
2	4.1.2	Schéma testovania zlúčenín v NCI	
2	4.1.3	Predskrining	
4	4.1.4	Testovanie - NCI 60 známe ako 5 Dose Panel Assay	
	a)	Dose Response Graph - koncentračno - aktivitný graf	
	b)	Mean Graphs – Priemerné diagramy	
	c)	In Vitro testovacie výsledky	
	d)	Dose Response Curves – Koncentračno - aktivitné krivky	
2	4.1.5	Program COMPARE	
4.2	Ar	tiangiogeniká	
2	4.2.1	Vlastnosti VEGFR-2 receptora	
4	4.2.2	Komplex PDB: 1Y6A	
2	4.2.3	Metodika prípravy nových derivátov inhibítora 1Y6A	
	a)	Reakcie α-halogénkarbonylových zlúčenín s močovinovými derivátmi	
	b)	Reakcie α-azidoacetofenónov s izo(tio)kyanátmi	

	c)	Iné typy reakcií	40
4.3	C	AM test	
	4.3.1	Chorioallantoická membrána (CAM) - vývoj, funkcia, testovací model	42
	a)	Opis CAM membrány	
	b)	CAM testovací model	
	c)	História použitia CAM modelu	
	d)	Zdroje CAMu	43
	e)	Kultivácie CAMu	44
	4.3.2	Inhibícia neovaskularizácie CAMu	
	a)	Aplikácie vzoriek na CAM	
	b)	Metódy vyhodnotenia CAM testu	45
5	E	xperimentálna časť	47
5.1	Sy	ntéza a výsledky biologických testov NCI USA	
	5.1.1	Syntéza zlúčenín s pyránochromenónovým skeletom	
	5.1.2	Výsledky biologických testov NCI USA	
	5.1.3	<i>Compare</i> porovnávacia analýza	59
5.2	A	ntiangiogeniká	
	5.2.1	Zavedenie antiangiogénneho testovania - CAM ASSAY	
	a)	Sutent – liekova forma	
	b)	sunitinib – volna baza lieku Sutent.	
	c) d)	Nexavar – nekova torma	00
	u) 5 2 2	Analýza inhibítora 1V6A	
	523	Návrh nových O N - inhibitorov odvodených od PDB: 1Y6A	
	524	Oxo-inhibitory VEGER-2 receptora	73
	•	Príprava 2-bróm-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanónu (9)	73
	•	Príprava 2-azido-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanonónu (10)	74
		Prínrava 2-azido-1-(3-bróm-4-(metoxymetyloxy)fenyl)etanónu (11)	75
		Prínrava 2-bróm-1-(3-bróm-4-metovyfenyl)etanónu (14)	78
		Prínrava 2-azido-1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanónu (17)	79
	b)	Syntéza navrhnutých zlúčenín obsahujúcich oxazolový heterocyklus	
	•	Prínrava izokvanátového prekurzoru (20)	80
		Prínrava n-MeQ- $(21a)$ a n-MQMQ- $(22a)$ derivátov arylamino-2-arylovazolov	83
		Príprava MeQ ₂ (23) a MeQMeQ ₂ (24) $1X6A$ derivátov stilleho couplingom	89
	521	Aza-inhibitory VEGER-2 receptora	
	a)	Syntéza alfa-azidocetofenónových prekurzorov	
	•	Príprava 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (27)	
	•	Príprava N-(4-acetyl-2-brómfenyl)formamidu (28)	
	•	Príprava 1-(4-amino-3-brómfenyl)-2-brómetanónu (29)	95
	•	Prínrava 1-(4-amino-3-brómfenyl)-2-azidoetanónu (20)	96
		$\mathbf{r} = (1, \dots, 1)$	

		Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)formamidu (31)	
		Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)pivalamidu (32)	
		Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)-2,2,2-trifluóracetamidu (33)	
		Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetamidu (34)	100
		Príprava 1-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)močovina (35)	101
		Príprava p-NHCHO- arylamino-2-aryloxazolu	102
		Príprava pivaloyl-NH- arylamino-2-aryloxazolu (37)	103
		Príprava pivaloyl-NH-1Y6A (38) Stilleho couplingom	105
		Príprava p-NHCOCF ₃ -arylamino-2-aryloxazolu (39a)	106
		 Príprava p-NHCOCF₃-1Y6A (40) Stilleho couplingom 	108
	5.2.2	2 Príprava azidového ligandu pre "Click" knižnicu	110
		Príprava etyl 2-chlór-3-oxo-propionátu (43)	110
		Príprava etyl-2-aminooxazol-5-karboxylátu (44)	111
		Príprava etyl-2-chlóroxazol-5-karboxylátu (45)	112
		Príprava etyl 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (46)	113
		• Príprava 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-metanolu (47)	114
		Príprava 5-(azidometyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amínu (49)	118
6	I	Diskusia a výsledky	120
6.1	S	yntéza a výsledky biologických testov NCI USA	120
	6.1.	Syntéza zlúčenín s pyránochromenónovým skeletom	120
	6.1.2	2 Výsledky biologických testov NCI USA	122
	6.1.	3 Výsledok <i>Compare</i> analýzy	123
6.2	A	Antiangiogeniká	124
	6.2.	Vývoj CAM testu	
	6.2.2	2 Analýza inhibítora 1Y6A	
	6.2.3	3 Návrh nových O, N - inhibitorov odvodených od 1Y6A	
	6.2.4	Synteza oxo-inhibitorov VEGFR-2 receptora	
	6.2.3	5 Synteza aza-innibitorov VEGFR-2 receptora	
	0.2.0 Svni	réza azidového ligandu	139
7	Syn	zza azidoveno ngandu	141 144
, 8	, S	u or an	
9	5	ummary	
10	I	۰ PRÍLOHA	

1 Grafický abstrakt

1.1 Syntéza antineoplastických zlúčenín s pyranochromenónovým skeletom



1.2 Výsledky antitumorových NCI testov

	priemerne	GI ₅₀ [uM] é, najlepšie a hodnoty	$TGI = GI_{100}$ $[uM]^{a/}$		
3b (Z: H, Y: AcO, R ₁ : F)	22.4	2.88	66.1	9.12	
$3g(Z: Me, Y: AcO, R_1: H)$	0.447	0.031	95.5	0.132	
3h (Z : Me, Y : AcO, R ₁ : F)	5.37	1.20	28.8	4.17	
7a (Z: H, Y: HO, R ₁ : H)	7.41	1.62	30.9	6.46	

Pomocou *Compare* analýzy, ktorá je založená na porovnaní experimentálych hodnôt GI_{50} všetkých bunkových línií z CC60 testu s hodnotami GI_{50} štandardých činidiel z databázy NCI USA, sme našli koreláciou medzi našou najlepšou zlúčeninou **3g** a látkami s typickými antitubulínovými interakciami.

1.3 Vývoj CAM testu



	Konc. látky	Obsah DMSO	PAZ	Počet embryí	Úhyn
	(µg/peletu)	(%)	(%)	na exp.	(%)
Sutent	1.5	0	3.5	10	0
sunitinib	2.0	0.1	3.9	14	21
Nexavar	3.0	0	3.0	12	20
sorafenib	4.0	0.1	4.1	18	17

Zavedenie CAM metodiky pomocou experimentov so štandardnými liečivami Sutent a Nexavar ako aj ich generickými bázami sunitinib a sorafenib.

1.4 Analýza inhibítora 1Y6A



Štruktúra a predpokladané interakcie inhibítora 1Y6A s VEGFR-2 proteínom.

1.5 Design oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora



Údaj v schéme kcal/mol predstavuje prediktívnu hodnotu väzobnej energie získanú po zadokovaní ligandu do štruktúry VEGFR-2 receptora. Prediktívne poradie je vyznačené číslami pod hodnotami energie.

1.6 Syntéza oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora

1.6.1 Príprava alfa-azidocetofenónových prekurzorov



1.6.2 Príprava designovaných oxazolových derivátov



1.7 Testovanie oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora



Hodnoty VEGFR-2 enzýmových inhibičných aktivít IC₅₀ testovaných zlúčenín: 1Y6A, oxo-deriváty 1Y6A (**23**, **24** a **25**), liečiv Sutentu a Nexavaru.

1.8 Design aza-inhibítorov VEGFR-2 receptora



Údaj v schéme s rozmerom kcal/mol predstavuje prediktívnu hodnotu väzobnej energie získanú po zadokovaní ligandu do štruktúry VEGFR-2 receptora. Prediktívne poradie je vyznačené číslami pod hodnotami energií.

1.9 Syntéza aza-inhibítorov VEGFR-2 receptoru



1.9.1 Príprava alfa-azidocetofenónových prekurzorov

1.9.2 Príprava designovaných oxazolových derivátov



* v priebehu reakcie sme pozorovali deformyláciu



1.10 Azidový ligand pre "Click chemistry" knižnicu



2 Zoznam použitých skratiek

1Y6A	PDB komplex, ktorého inhibítor sme pre zjednodušenie nazvali ako										
	1Y6A (N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-5-(3-(pyrid-2-yl)fenyl)-										
	oxazol-2-amín)										
60CC	60 typov tumorových bunkových línií (60 cancer cell lines)										
abs	absolútny, suchý										
Ac ₂ O	acetanhydrid										
AcOH	kyselina octová										
AN	acetonitril										
Ar	argónová atmosféra										
ATP	adenozíntrifosfát										
Boc ₂ O	di-terc-butyl dikarbonát										
CAM	ChorioAlantoická Membrána (ChorioAllantoic Membrane)										
CSI	chlórsulfonylizokyanát										
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-én										
DCC	dicyklohexylkarbodiimid										
DCU	1,3-dicyklohexylmočovina (1,3-dicyclohexylurea)										
DMSO	dimetylsulfoxid										
DTP	Developmental Therapeutic Program										
EA	etylacetát										
EC	endoteliálne bunky										
ERKs	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases										
FLC	Flash Liquid Chromatography										
GI ₅₀	50% inhibicia rastu buniek (Growth Inhibition)										
Н	hexsol (zmes hexánov)										
HBA	vodíková väzba akceptorná (Hydrogen Bond Acceptor)										
HBD	vodíková väzba donorná (Hydrogen Bond Donor)										
HUVEC	ľudské endoteliálne bunky z ciev pupočníka (Human Umbilical Vein										
	Endothelial Cells)										
HV	vákuum olejovej vývevy ≤ 0.1 Torr (<i>High vacuum</i>)										
KDR	Kinase insert Domain - containing Receptor, synonymum pre VEGFR2										
LC ₅₀	50% smrtiaca koncentrácia (Lethal Concentration)										

MEC	metylcelulóza
MMPs	matrixové metaloproteinázy (Matrix Metalloproteinases)
MOM	metoxymetyl
MOMCl	metoxymetyl chlorid
MsCl	mezyl chlorid
MW	mikrovlnné žiarenie
NBS	N-brómsukcínimid
NCI USA	Národný onkologický inštitút v USA (National Cancer Institute)
PAZ	Percento Avaskulárnej Zóny
PBS	fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline)
pPPh ₃	polymérny trifenylfosfín
ру	pyridín
rt	teplota miestnosti (room temperature)
RVO	rotačná vákuová odparka
SAR	vzťah štruktúry a reaktivity (Structure Activity Relationship)
TFAA	anhydrid kyseliny trifluóroctovej
TGI	totálna inhibícia rastu (Total Growth Inhibition)
THF	tetrahydrofurán
T.t. (m.p.)	teplota topenia (melting point)
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor (Vascular Endothelial Growth
	Factor)
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VL	východisková látka
Xenograft	Xenos = cudzí; je štep napr. buniek ľudského tumoru inokulovaný do
	myšieho chvostu

3 Úvod a ciele dizertačnej práce

ÚVOD

Celosvetovo sú nádorové ochorenia jednou z hlavných príčin smrti. Na Slovensku sú zhubné nádory na druhom mieste v počte úmrtí hneď za srdcovo-cievnymi ochoreniami a počet nových ochorení stúpa. Ako vyplýva zo štatistík, vývoj nových liečiv v tejto oblasti je veľmi významný.

Medzi hlavné liečebné postupy onkologických ochorení patrí najmä chirurgický zákrok, liečba ožarovaním (rádioterapia) a chemoterapia. V prípade chemoterapie sa prevažne jedná o organické látky s jednoduchou alebo zložitou štruktúrou, schopné zastaviť nadmerné delenie tumorových buniek, alebo spôsobiť ich usmrtenie. Medicínska chémia sa zaoberá aj týmto typom výskumu. Organická chémia spolu s poznatkami molekulárnej biológie môže poskytnúť nové typy účinných liečiv, ktoré rozšíria terapeutické možnosti tohto dosiaľ nie úplne zvládnutého typu závažných ochorení.

Najnovšie trendy v medicínskej chémii preferujú cielené navrhovanie (*design*) nových liečiv uskutočňovaný modernými metódami, napr. za pomoci chemoinformatiky a výpočtových metód (*In Silico*) alebo pomocou cielených kombinatoriálnych knižníc (napr. *Click Chemistry*).

Liečba špecifickejšie zameraná na nádorové bunky môže ponúknuť lepšiu účinnosť a zároveň znížiť pozorované vedľajšie účinky. Pre rast nádorov alebo ich šírenie do rôznych častí organizmu je potrebná tvorba nových krvných ciest (angiogenéza), ktoré zároveň dodávajú kyslík a živiny. Ovplyvnenie tvorby týchto krvných ciev poskytuje ďalší prístup v boji proti tumorom. Ako sa zistilo na množstve nedávno uskutočnených klinických pokusov, inhibítory angiogenézy (antiangiogeniká) sú v kombinácii s chemoterapiou vhodné terapeutiká využiteľné pri spomalení, či zastavení rastu tumorov a ich metastáz. Ich toxicita je oproti bežným chemoterapeutikám nízka, pričom mechanizmus pôsobenia týchto látok na tumor je odlišný od klasickej chemoterapie.

V roku 2005 vedci z firmy *GlaxoSmithKline* identifikovali nový nanomolárny inhibítor **1Y6A**, ktorý bol účinný nielen v *in vitro*, ale aj na *in vivo* biologických testoch s

myším xenograftom ľudského tumoru.¹ Autori dokázali, že antitumorový účinok tejto látky je selektívne daný najmä jej antiangiogénnym pôsobením (inhibícia aktivácie endoteliálnych buniek) a nie cytostatickým účinkom na bunky tumoru. Antiangiogénna aktivita ($IC_{50} = 22$ nM) mnohonásobne prevyšuje antineoplastický účinok tejto látky ($IC_{50} = 4500$ nM) 1Y6A. Štúdium tohto inhibítora a jeho interakcií s proteínom otvára nové možnosti derivatizácie skeletu, a tým aj vznik nových potenciálnych antiangiogénnych liečiv.

CIELE DIZERTAČNEJ PRÁCE

- syntéza a testovanie nových antineoplastických zlúčenín
- vyhodnotenie bioaktivít a predikcia mechanizmu ich biologického účinku
- zavedenie a optimalizácia *in vivo* antiangiogénneho CAM testovania
- design štruktúr nových antiangiogénnych VEGFR-2 inhibítorov
- syntéza a bioevaluácia oxo- a aza- oxazolových zlúčenín s VEGFR-2 selektivitou
- vývoj metodiky syntézy navrhnutého azidového ligandu pre Clik chemistry knižnicu

¹ Harris, A.P.; Chueng, M.; Hunter III, R.N.; Brown, M.L.; Veal, J.M.; Nolte, R.T.; Wang, L.; Liu, W.; Crosby, R.M.; Johnson, J.H.; Epperly, A.H.; Kumar, R.; Luttrell, D.K.; Stafford J.A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1610-1619.

4 Teoretická časť

4.1 Antineoplastiká a ich testovanie

4.1.1 Typy klinických antitumorových liečiv podľa mechanizmu ich účinku

a) Alkylačné činidlá

Sú látky schopné alkylovať mnohé nukleofilné funkčné skupiny biomolekúl (napr. DNA a proteínov), ktoré sú prítomné v bunkách. Takéto látky blokujú bunkové funkcie vytváraním pevných kovalentných väzieb so zvyškami napr. amino, karboxylových, sulfanylových a fosfátových skupín biologicky významných molekúl. Patrí sem napr.: cisplatina, karboplatina, cyklofosfamid...^{2,3}



b) Interkalačné zlúčeniny (DNA/RNA antimetabolity)

Sú to ploché zlúčeniny maskujúce sa za purín alebo pyrimidín, ktoré v bunkách blokujú prepis DNA. Zasunutím sa do štruktúry DNA počas "S" fázy bunkového cyklu zastavujú normálne delenie buniek. Tiež ovplyvňujú RNA syntézu. Vzhľadom k svojej účinnosti, tieto látky sú najpoužívanejšie cytostatiká (napr. azatioprín, merkaptopurín...).^{4,3}



² Van der Wall, E.; Beijnen, J. H.; Rodenhuis, S. Canc. Treat. Rev. 1995, 21, 105-132.

³ Graham, L. P.: An introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press, Oxford 2005.

⁴ Lloyd, D. G.; Andrew, G. G.; Knox, J.S.; Fayne, D.; Meegan, M. J.; Oprea, T. I. *Drug Disc. Today* **2006**, *11*, 149-159.

c) Látky s antitubulínovým mechanizmom účinku

Sú to väčšinou alkaloidy, ktoré zastavujú polymerizáciu mikrotubúl počas bunkového delenia. Tieto polymérne štruktúry sú nevyhnutné pri delení buniek a bez nich k deleniu nedochádza. Najznámejšie sú vinka alkaloidy (*Vinca rosea* = zimozeleň; napr. vinkristín, vinblastín) a taxány (*Taxus baccata* = tis; napr. paklitaxel).^{5,3}



d) Inhibítory topoizomeráz I a II

Inhibítory topoizomeráz I (topotekan) a II (doxorubicín, etopozid, tenipozid) narúšajú prepis aj syntézu DNA.⁶



4.1.2 Schéma testovania zlúčenín v NCI

NCI (*National Cancer Institute*) v USA je svetovo najväčší ústav zameraný na boj s onkologickými ochoreniami. V jeho portfóliu je aj program na podporu vývoja terapeutík DTP (*Developmental Therapeutics Program*) umožňujúci *in vitro* aj *in vivo* testovanie nových

⁵ Risinger, A. L.; Giles, F. J.; Mooberry, S. L. Canc. Treat. Rev. 2009, 35, 255-261.

⁶ Lorusso, D.; Pietragalla, A.; Mainenti, S.; Masciullo, V.; Di Vagno, G.; Scambia, G. Crit. Rev. In Oncol. / Hematol. 2010, 74, 163-174.

antitumorových zlúčenín, prírodných extraktov a tiež identifikáciu mechanizmu biologického účinku nových látok. Týmto prístupom NCI napomáha vývoju nových nosných zlúčenín a podporuje vývoj kandidátov na liečivá. DTP zahŕňa primárne *in vitro* testovanie na paneli pozostávajúcom zo 60 typov línií ľudských tumorových buniek, ako aj možné následné komplikovanejšie testy ako napr. toxikologický test *hollow fiber assay* a *in vivo* testovanie ľudských tumorových xenograftov na hlodavcoch.

Pri navrhovaní štruktúr do NCI v USA je nutné sa zaregistrovať na príslušnej web stránke.⁷ Potom treba vyplniť on-line formulár pre každú navrhovanú štruktúru, ktorá má byť poslaná a testovaná v NCI. Takejto zlúčenine je priradený TID kód (Temporary Identification *Number*). Odborná komisia v NCI posúdi, či je daná zlúčenina svojou štruktúrou a poslaným zdôvodnením vhodná na antineoplastické testovanie. Látka, ktorá vyhovuje, je on-line odobrená na in vitro testovanie a priradia jej NSC kód. Schválené zlúčeniny je potrebné s príslušnými kódmi poslať na testovanie do USA (10 - 15 mg). Pod priradeným NSC kódom sú jednotlivé zlúčeniny testované, najskôr v jednoduchšom teste pri jednotnej koncentrácii 10⁻⁵ M (One Dose Assay) na celom 60 bunkovom paneli. Výsledné informácie o zlúčeninách sú dostupné pre registrovaných navrhovateľov on-line na ich personálnej web stránke v NCI. Ak je zlúčenina aktívna v teste s jednou koncentráciou, postupuje ďalej do zložitejšieho testu, ktorý sa robí pri piatich rôznych koncentráciach (Five Dose Assay) na tom istom paneli 60 ľudských tumotových bunkách. Ak sa aj v tomto teste jedná o zaujímavú zlúčeninu, testovanie sa opakuje. V prípade potvrdenej aktivity sa posiela návrh na ďalšie testy pre biologickú komisiu (Biological Evaluation Commitee) a v prípade jej súhlasu môže byť zlúčenina testovaná na akútnu toxicitu (hollow fiber assay) a následne nákladnejšími in vivo testami na ľudských xenograftoch na myšiach.^{8,9} (Schéma 1)

⁷ DTP Service Registration Page: http://dtp.nci.nih.gov/compsub/index.html (21.6. 2010)

⁸ NCI Flow Chart Screening Scheme http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/ACSP_FlowChart.pdf (17.6.2010)

⁹ https://dtp.nci.nih.gov/screening.html (20.6.2010)



DTP Anti-Cancer Screening Paradigm

Abbreviations: NFT = No further testing; BEC = Biological Evaluation Committee; MTD = Maximum tolerated dose; HFA = Hollow fiber assay

Schéma 1: Chronológia testovania zlúčenín v NCI USA.⁸

4.1.3 Predskrining

Zlúčeniny schválené komisiou v NCI je možné poslať na preskríning.

Starší (aplikovaný do roku 2007):

Navrhnuté experimentálne zlúčeniny boli podrobené testu pri jednej koncentrácii 5. 10^{-4} M na vyselektovaných 3 typoch ľudských bunkových tumorových líniách, ktoré sa výrazne líšia svojimi biologickými vlastnosťami (agresivitou, rýchlosťou rastu, metabolizmom...) a pokrývajú ca 95% pravdepodobnosť záchytu aktívnych zlúčenín, ktoré svojim účinkom majú šancu výrazne cytostaticky pôsobiť aj na ostatné tumorové línie v 60 bunkovom teste. Spomenuté tumorové bunkové línie sú *NCI-H406* (vybraná línia z nemalobunkového karcinómu pľúc), *MCF7* (línia tumoru prsníka) a *SF-268* (bunková línia tumoru CNS). Selekcia spomenutých troch línii bola uskutočnená na základe štatistického vyhodnotenia veľkého počtu dosiaľ testovaných experimentálnych zlúčenín v NCI na všetkých 60 ľudských tumorových bunkových líniách.

Nový test (One Dose Screening Assay):

Látky sú od roku 2007 štandardne testované pri jednej koncentrácii 10⁻⁵ M (*One Dose Assay*) na paneli 60 typov ľudských tumorových bunkových línií kultivovaných s látkou počas 48 h. Týmto spôsobom sa dajú rýchlo a účinne vyselektovať aktívne zlúčeniny z dostupných experimentálnych látok a extraktov z prírodných zdrojov.

4.1.4 Testovanie - NCI 60 známe ako 5 Dose Panel Assay

Tie zlúčeniny, ktoré vyhovejú daným hraničným inhibičným kritériám (je to napr. dobrá priemerná IC₅₀, ako aj priaznivý aktivitný profil pre jednotlivé línie), postupujú do ďalšieho testovania na tom istom 60 bunkovom paneli, avšak tentoraz s piatimi rôznymi koncentráciami (*Five Dose Assay*). Šesťdesiat bunkový skríning dáva kvantifikáciu účinku, selektivity a toxicity experimentálnych antineoplastík. Výsledky tohto testu majú rôznu podobu výstupov: "*Dose Response Graphs*", "*Mean Graphs*", "*In-Vitro Testing Results*" a "*Dose Response Curves*". ^{10,11,12,13,14}

¹⁰ NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screen https://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html (20.06.2010)

¹¹ Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, P.A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H.; Boyd, M.R. *Canc. Res.* **1988**, *48*, 589-601.

 ¹² Grever, M.R.; Schepartz, S.A.; Chabner, B.A. The National Cancer Institute: Cancer Drug Discovery and Development Program. *Seminars in Oncology* 1992, *19*, 622-638.

a) Dose Response Graph - koncentračno – aktivitný graf

"Dose Response Graph" predstavuje grafické vyjadrenie účinku testovaného cytostatika na jednotlivé typy tkanivových tumorov. Príklad je zobrazený na nasledujúcom obrázku. (Obr. 1) Grafy sú rozdelené podľa miesta pôvodu tumoru v organizme (napr. združené v jednom grafe sú bunky patriace 7 líniám melanómu, 5 líniám buniek tumorov vaječníkov...).



Obr. 1: Dose Response Graph: Účinok testovaného cytostatika na rôzne tumorové línie združené do grafov podľa miesta výskytu tumoru v organizme (podľa orgánov).

Grafy vyjadrujú dosiahnuté hodnoty biologického parametra GI (*Growth Inhibition*) od -100 až po +100 % pre účinok konkrétneho experimentálneho cytostatika pri jeho rôznych koncentráciách. Použité koncentrácie látky sú uvedené v logaritmickej mierke na x-ovej osi (-4 až -9 znamená koncentráciu látky 10⁻⁴ až 10⁻⁹ M). GI₀ znamená totálne zastavenie rastu sledovanej bunkovej kultúry (tiež nazvané TGI: *"Total Growth Inhibtion"*), GI₅₀ znamená spomalenie rastu bunkovej línie tumoru na polovicu pri danej koncentrácii látky vzhľadom na kontrolnú bunkovú líniu. GI₊₁₀₀ znamená, že sledovaná bunková kultúra rastie rovnako rýchlo ako referenčná (t.j. skúmaná látka pri danej koncentrácii nemá efekt na spomalenie rastu buniek tumoru). Záporné hodnoty vyjadrujú cytotoxicitu.

¹³ Boyd, M.R.; Paull, K.D. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. Drug Dev. Res. **1995**, 34, 91-109.

¹⁴ Shoemaker, R.H. The NCI60 Human Tumour Cell line Anticancer Drug Screen. Nat. Rev. 2006, 6, 813-823.

Mean Graphs – Priemerné diagramy

b)

Ďalším užitočným výstupom antineoplastickej aktivity z 60 bunkového testu je zobrazenie typu "*Mean Graphs*". (Obr. 2) Údaje zobrazujú vzťah špecifických koncentrácií GI_{50} pre jednotlivé bunkové línie ako odchýlku od priemernej koncentrácie GI_{50} (zvislá čiara) na všetkých skúmaných bunkových líniách.¹⁵



Obr. 2: *Mean Graph*: Vyjadrenie závislosti koncentrácie testovanej látky potrebnej na dosiahnutie biologického efektu GI_{50} , TGI, alebo LC_{50} (v obr. nevidno) pre jednotlivé bunkové línie tumorov (udáva selektivitu cytostatického aj cytotoxického účinku).

Hodnoty koncentrácie testovanej látky potrebnej na dosiahnutie definovaného biologického efektu (GI₅₀, TGI, alebo LC₅₀ - cytotoxicita) sú vyjadrené pre jednotlivé bunkové línie číselne ako koncentrácia v logaritmickej mierke (napr. < - 8.3 znamená koncentráciu potrebnú na dosiahnutie GI₅₀ nižšiu ako $10^{-8.3}$ M = 5. 10^{-9} M = 5 nM). Grafické vyjadrenie selektivity účinku pre jednotlivé bunkové línie je zobrazené horizontálnym stĺpcovým grafom, pričom vertikálna os pretínajúca horizontálne úsečky predstavuje celkovú priemernú koncentráciu GI₅₀ danej látky na všetky typy testovaných bunkových líniách. V dolnej časti obrázku sú vyjadrené logaritmické koncentrácie v číslach: priemerná hodnota koncentrácie látky na dosiahnutie biologického účinku na všetky línie predstavuje **MID**

¹⁵ https://dtp.nci.nih.gov/CompsubApp/ (20.01.2008)

parameter, **DELTA** vyjadruje maximálnu pozitívnu odchýlku účinku (t.j. o koľko rádov je látka selektívnejšia voči určitým tumorovým líniám oproti celkovému priemeru). Ako posledný je spomenutý parameter **RANGE** a znamená celkový rozptyl účinku experimentálnej látky okolo stredovej aktivity pre všetky testované bunkové tumorové línie a každý zo sledovaných biologických účinkov (GI₅₀, TGI, LC₅₀). (Obr. 3)



Obr. 3: Mean Graph: Vyjadrenie MID, DELTA a RANGE.

"*Mean Graph*" vyjadruje sledovania troch biologických parametrov: GI₅₀, TGI a LC₅₀ v grafických a číselných vyjadreniach. Na obrázku sú zobrazené tri priemerné hodnoty (vertikálne čiary v stredových poliach) ako aj odchýlky koncentrácii na dosiahnutie parametrov GI₅₀, TGI a LC₅₀ od koncentračných priemerov pre jednotlivé použité bunkové línie (stĺpce v horizontálnom usporiadaní sú parametrom selektivity). Zoznam použitých bunkových línii je uvedený skratkami v ľavej časti obrázku. Bunkové línie sú združené podľa pôvodu tumorov v ľudskom organizme. Parameter LC₅₀ znamená takú koncentráciu experimentálnej látky, ktorá spôsobí usmrtenie polovice rastúcej populácie buniek vzhľadom na referenčnú kultúru za sledovaný čas (LC znamená "*Lethal Concentration*").

c) In Vitro testovacie výsledky

Iným vyjadrením toho istého biologického účinku je "*In Vitro Testing Results"*. Tento výstup predstavuje číselné vyjadrenie biologického vplyvu experimentálneho liečiva v čase (t.j. na začiatku, ako aj po uplynutí testovaných 48 h) a pri rôznych koncentráciách. (Tab. 1)

Tab.1: "In-Vitro Testing	Results" - vyjadruje čís	selné vyhodnotenie	účinku piatich i	rôznych koncentrácií	jednej
experimentálnej látky na v	všetky testované ľudské	tumorové bunkové	línie.		

						Lo	og10 Cor	ncentration							
	Time			Mear	n Optica	l Densiti	es		Р	ercent G	Growth				
Panel/Cell Line	Zero	Ctrl	-8.3	-7.3	-6.3	-5.3	-4.3	-8.3	-7.3	-6.3	-5.3	-4.3	GI50	TGI	LC50
Leukemia CCRF-CEM K-562	0.150 0.361	0.426 1.883	0.403 2.093	0.403 2.138	0.396 2.108	0.152 0.651	0.120 0.286	92 114	92 117	89 115	1 19	-20 -21	1.38E-6 2.38E-6	5.42E-6 1.50E-5	> 5.00E-5 > 5.00E-5
Non-Small Cell Lung A549/ATCC EKVX HOP-62 HOP-92 NCI-H226	Cancer 0.354 0.505 0.249 0.569 0.774	1.110 1.299 0.598 0.840 1.477	1.075 1.366 0.619 0.856 1.452	1.085 1.464 0.645 0.857 1.441	1.071 1.478 0.611 0.798 1.385	0.588 1.162 0.383 0.490 1.031	0.217 0.486 0.059 0.163 0.438	95 108 106 106 96	97 121 113 106 95	95 122 104 84 87	31 83 38 -14 37	-39 -4 -76 -71 -43	2.51E-6 1.19E-5 3.32E-6 1.12E-6 2.70E-6	1.39E-5 4.52E-5 1.08E-5 3.61E-6 1.43E-5	> 5.00E-5 > 5.00E-5 2.95E-5 2.12E-5 > 5.00E-5
NCI-H23 NCI-H322M NCI-H460 NCI-H522	0.422 1.062 0.369 0.566	0.974 1.309 1.422 1.232	0.910 1.443 1.431 1.266	0.969 1.383 1.467 1.273	0.951 1.338 1.339 1.232	0.562 1.198 0.465 1.030	0.194 0.636 0.081 0.380	88 154 101 105	99 130 104 106	96 112 92 100	25 55 9 70	-54 -40 -78 -33	2.23E-6 5.65E-6 1.61E-6 7.78E-6	1.04E-5 1.89E-5 6.36E-6 2.39E-5	4.43E-5 > 5.00E-5 2.38E-5 > 5.00E-5

Z tabuľky je možné vidieť vplyv testovanej látky na % rastu jednotlivých bunkových líniách v závislosti od použitej koncentrácie testovaného cytostatika vzhľadom ku kontrólnym bunkovým tumorovým kultúram. Výsledným spracovaním je zistená koncentrácia testovanej látky na dosiahnutie definovaného biologického parametra GI₅₀, TGI alebo LC₅₀. Tieto parametre predstavujú vyjadrenie cytostatického účinku, ako aj cytotoxicity sledovanej experimentálnej zlúčeniny na jednotlivé bunkové línie.

Tabuľka 1 vyjadruje populáciu živých tumorových buniek v jednotlivých kultúrach (zistené kolorimetricky optickou hustotou po zafarbení kultúry živých buniek). Údaje sú v % rastu sledovaných buniek vzhľadom na kontrólnu kultúru (kultivovanú za tých istých podmienok bez testovanej látky). Uvedené parametre sa zisťujú na všetkých typoch tumorových bunkových líniách (zoznam v ľavej časti tabuľky) a to pri piatich koncentráciách experimentálnej látky rovnomerne rozložených v desať násobných zriedeniach od 5.10^{-5} M (50 µM) až po 5.10^{-9} M (5 nM). Molárne koncentrácie v tabuľke sú uvedené v logaritmickej miere ako -4.3, -5.3, -6.3, -7.3 a -8.3. Konkrétne hodnoty koncentrácie experimentálnej látky potrebnej na dosiahnutie sledovaných biologických parametrov, t.j. GI₅₀, TGI a LC₅₀ sa získavajú graficky extra-, alebo interpoláciou z nameraných hodnôt biologickej aktivity pre použité koncentrácie testovanej látky.

d) Dose Response Curves – Koncentračno - aktivitné krivky

Na rýchle vizuálne porovnanie aktivity a selektivity experimentálnej zlúčeniny naraz u všetkých testovaných 60 typoch tumorových bunkových línii slúži grafické vyjadrenie typu "Dose Response Curves". (Obr. 4)



Obr. 4: *Dose Response Curves* – je grafická závislosť hodnoty biologického parametra GI v závislosti od použitej koncentrácie testovanej zlúčeniny na všetkých typoch ľudských tumorových bunkových líniách použitých pri testovaní.

V prípade, že je testovaná látka cytostaticky selektívna voči určitej skupine tumorových bunkových líniách, je tento graf vhodný na rýchle vizuálne porovnanie (niektorá z línii grafu výraznejšie odskakuje od ostatných kriviek). Uvedené grafické vyjadrenie je tiež možné použiť na rýchle porovnanie biologickej aktivity rôznych testovaných experimentálnych látok navzájom, porovnaním tvarov takýchto grafov získaných pre jednotlivé experimentálne cytostatiká za rovnakých podmienok.

4.1.5 Program COMPARE

NCI USA program *COMPARE* je dostupný *on-line*¹⁶ a umožňuje porovnanie profilu napr. GI_{50} aktivít testovanej zlúčeniny¹⁷ s hodnotami GI_{50} štandardých činidiel z databázy (*STANDARD_AGENTS*) v NCI, ktorých mechanizmus a biologický cieľ (*target*) bol zistený. Porovnanie sa robí na základe zhody tvaru grafov a štatistického porovnania číselných údajov.¹⁸ Takýto výpočet umožní urobiť záver o pravdepodobnom mechanizme pôsobenia nového cytostatika na ľudské tumorové bunky.

¹⁶ DTP COMPARE: http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare.html (6.8.2010)

¹⁷ Publically Available Compounds by NSC number:

https://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/cancer_open_compounds.html (23.8.2010) ¹⁸AntiCancer Agent Mechanism Database:

https://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/standard mechanism.html (23.8.2010)

4.2 Antiangiogeniká

4.2.1 Vlastnosti VEGFR-2 receptora

VEGFR-2 receptor (tiež známy aj ako **KDR** alebo **Flk-1**) je považovaný za kľúčový receptor angiogenézy, ktorý sa nachádza na povrchu endoteliálnych buniek. Tieto bunky tvoria vnútornú výstelku ciev a sú zodpovedné za neovaskularizáciu (angiogenézu – vznik nových ciev z už existujúcich) napr. pri vaskularizácii tumorov. Inhibícia VEGFR-2 receptora predstavuje jeden z možných cieľov antiangiogénnej terapie.¹⁹

Funkčný VEGFR-2 receptor je homodimerický transmembránový receptor s tyrozínkinázovou aktivitou v jeho intracelulárnej časti.²⁰

Monomérna jednotka VEGFR-2 pozostáva z 1337 aminokyselinových zvyškov. KDR receptor sa skladá z 3 častí: extracelulárnej, membránovej a intracelulárnej.

Extracelulárna časť KDR receptoru pozostáva zo 745 aminokyselinových zvyškov zoskupených v 7-mich imunoglobulínu podobných podjednotkách a je väzobným miestom pre VEGF ligand. VEGF je proteínový cytokín – signálna molekula produkovaná napr. bunkami tumoru alebo lymfocytmi. Naviazaním VEGF na receptor dochádza k prenosu signálov do jadra bunky, pričom sa aktivuje skupina génov na tvorbu produktov potrebných pre rast, prežívanie a migráciu nových EC.

Transmembránová časť KDR receptoru sa skladá z 25 lipofilných aminokyselinových zvyškov, ktoré ukotvujú receptor v bunkovej membráne.

Intracelulárna časť receptoru sa skladá zo sekvencie 567 aminokyselín, pričom časť z nich (329 aminokyselín) tvorí enzymaticky aktívnu oblasť receptoru s TK (tyrozínkinázovou) aktivitou zodpovednou za prenos (transdukciu) VEGF signálu a následnú aktiváciu endoteliálnych buniek (expresia proteolytických enzýmov MMPs, proliferácia, prežívanie, migrácia, diferenciácia). (Obr. 5)

¹⁹ Remko M.: Metódy výskumu a vývoja liečiv, Slovac Academic Press, Bratislava 1999.

²⁰ a/ Cross, J. M.; Dixelius, J.; Matsumoto, T.; Claeson-Welsh, L. Trends Biochem. Sci. 2003, 28, 488-494.

b/ http://www.expasy.org/cgi-bin/aligner?P35968 (8.6.2010)



Obr. 5: Vľavo – štruktúra a zloženie monomérnej jednotky KDR receptora. Vpravo - priebeh dimerizácie a aktivácie VEGFR-2 receptora vplyvom naviazania sa VEGF ligandu. Stabilizácia diméru nastáva väzbou na VEGF a tiež interakciou s 7. Ig fragmentom extracelulárnej časti VEGFR-2 receptora. Uvažuje sa aj o prekríženej konformácii KDR receptora (ďalšia stabilizácia a aktivácia diméru, viď posledná štruktúra vpravo).

Aby bola intracelulárna časť VEGFR-2 receptora schopná fungovať s TK enzymatickou aktivitou, je potrebný vznik diméru (aktivácia cez zmenu konformácie proteínu). Dimér vzniká pri naviazaní VEGF na domény podobné imunoglobulínu č. 2, 3 a vzájomnou interakciou domén č. 7 dvoch interagujúcich extracelulárnych častí monomérov receptorov nachádzajúcich sa blízko seba v bunkovej membráne. Ide o tzv. ligandom podmienenú dimerizáciu (*ligand-induced dimerization*). Voľné extracelulárne časti VEGFR-2 majú voči sebe relatívne nízku afinitu a za normálnych okolností nedimerizujú. Naviazanie VEGF na imunoglobulín podobné domény 2 a 3 jedného receptoru zvýši afinitu k druhej extracelulárnej časti voľnej monomérnej jednotky. Keď sa dva receptory spájajú, ich Ig-podobné domény 7 umiestnené tesne pri membráne sa k sebe priblížia a stabilizujú dimér cez interakcie medzi nimi. Toto upevní celý komplex, no v niektorých prípadoch sa pozorovalo aj prekríženie komplexu, čo by mohlo poukazovať na nejakú úlohu imunoglobulínu podobnej domény 4 (ďalšie homotypické interakcie ako stabilizácia komplexu a tvorba rigidného systému). (Obr. 5)²¹

²¹ Ruch, C.; Skiniotis, G.; Steinmetz, M.O.; Walz, T.; Ballmer-Hofer K. Struct. Biol. 2007, 14, 249 – 250.

4.2.2 Komplex PDB: 1Y6A

História objavu



z farmaceutickej firmy GlaxoSmithKline z USA testovali kolekciu domácich zlúčenín a identifikovali 2-anilíno-5-fenyloxazol (T1) ako nový nosný skelet vhodný pre optimalizáciu inhibičnej aktivity pomocou SAR štúdie.¹ Autori zistili, že zlúčenina T1 má KDR enzýmovú inhibičnú VEGF aktivitu $IC_{50} = 1200$ nM (KDR).

Pričom bunková inhibícia VEGF aktivovaných HUVEC buniek mala hodnotu $IC_{50} = 3000$ nM.

Optimalizácia inhibičnej aktivity oxazol-2-amínov



Najprv autori optimalizovali KDR inhibičnú aktivitu hľadaním vhodnej substitúcie na anilínovom aromatickom kruhu. Najlepšia inhibícia sa dosiahla v prípade zavedenia MeO- skupiny na C-(2') a etylsulfónovej skupiny na C-(5') v zlúčenine T2. Z uskutočnenej röntgenovej štruktúrnej analýzy vyplynulo, že MeOskupina interaguje v malom lipofilnom vrecku aktívneho miesta

KDR receptora a etylsulfónová skupina sa viaže akceptornou vodíkovou väzbou cez koncovú amóniovú časť bočného reťazca aminokyseliny Asn923. Enzymatická KDR inhibícia dosiahla v tomto prípade hodnotu $IC_{50} = 50$ nM a v prípade inhibovania HUVEC buniek to bolo $IC_{50} =$ 290 nM.



Ďalšia optimalizácia inhibičnej aktivity bola uskutočnená na skelete T2 zavedením substituentov na fenyl nachádzajúci sa na oxazole v pozícii C-(5). Zistilo sa, že zavedením pyrid-2-ylovej skupiny do polohy C-(3''), došlo k zlepšeniu KDR enzymatickej inhibície na hodnotu $IC_{50} = 22$ nM a inhibícia HUVEC buniek sa zmenila na úroveň $IC_{50} = 370 \text{ nM}$.

²² PDB Protein Data Bank: http://www.pdb.org/pdb/home/home.do (7.7.2010)
• <u>Röntgeno-štruktúrna analýza komplexu KDR – 1Y6A</u>

Na identifikáciu pôsobenia organického inhibítora v KDR proteíne bola uskutočnená X-ray štruktúrna analýza. Zistilo sa, že zlúčenina **1Y6A** sa viaže v tomto proteíne v jeho aktívnom mieste čiastočne v ATP väzobnej pozícii. Z kryštálovej štruktúry komplexu KDR / **1Y6A** vyplynulo, že pyrid-2-ylová skupina zaujíma v kryštálovej mriežke komplexu viaceré konformácie. Rotácia arylového substituenta na oxazole v pozícii C-(5) umožňuje natočenie pyrid-2-ylovej skupiny *syn* alebo *anti* vzhľadom na anilínový fragment molekuly **1Y6A**. Existencia dvoch konformérov v kryštálovej štruktúre svedčí o existencii podobných interakcií s dvomi blízkymi lipofilnými vreckami v terciárnej štruktúre KDR receptora.

Obr. 6: Vľavo: röntgenová štruktúra komplexu KDR – **1Y6A**, vpravo: dve v kryštále s KDR existujúce konformácie **1Y6A** s vyznačenými neväzbovými interakciami so zvyškami aminokyselín z VEGFR-2 proteínu.

• Syntéza organického inhibítora 1Y6A (PDB)

(Obr. 6)

Pri syntéze zlúčeniny (pre zjednodušenie nazývanej nižšie **1Y6A**) autori vychádzali z dibróm derivátu acetofenónu **53**, ktorý sa dá pripraviť priamou bromáciou acetofenónu pomocou Br₂ v CCl₄.²³ Ďalšou východiskovou látkou bola zlúčenina **55**, ktorej nemetylovaný prekurzor je komerčne dostupný (Sigma-Aldrich). Zlúčenina **55** sa z neho dá pripraviť metyláciou fenolického HO po predchádzajúcom chránení NH₂ skupiny acetylom. Deprotekcia derivátu acetanilidu poskytuje látku **55**, z ktorej sa pripravil izotiokyanát **56**. Azid **54**, ako aj izotiokyanát **56** boli použité do ďalšieho syntetického kroku bez izolácie. Produkt **57** bol pripravený v 36 % výťažku a použitý na syntézu požadovaného finálneho produktu **1Y6A** pomocou *Stilleho* couplingu s Bu₃Snpy v 51% výťažku.¹ (Schéma 2)

²³ Rosenmund, K.W.; Pfroepffer, K. Chem. Ber. 1957, 90, 1922-1926.



Schéma 2: Syntéza KDR inhibítora 1Y6A.

• Testovanie in vivo aktivity 1Y6A

Pre *in vivo* testovanie na tumorových xenograftoch u myší bol vybraný pyrid-2-ylový derivát oxazolu **1Y6A**. Najlepšiu rozpustnosť vo vode (> 10 mg/ml) mala zlúčenina **1Y6A** v podobe jej mono- a bismezylátovej soli.

In vivo účinnosť bola testovaná na schopnosti inhibítora **1Y6A** spomaliť progresiu ľudského tumoru hrubého čreva (HT 29) u laboratórnej myši. Bismezylát oxazolu **1Y6A** bol podávaný orálne (rozpustený vo vode) raz za deň v dávke 30 a 100 mg látky / kg zvieraťa. V priebehu 26 dní bola pozorovaná regresia tumoru o 43 a 55 % vzťažne oproti kontrole, pričom nebola pozorovaná strata telesnej hmotnosti alebo iné toxické príznaky.

Zistilo sa, že samotná cytostatická aktivita **1Y6A** voči proliferácii tumorových HT29 buniek bola nízka a mala hodnotu $IC_{50} = 4500$ nM, čo svedčí o selektivite pôsobenia látky **1Y6A** hlavne cez jej antiangiogénny účinok ($IC_{50} = 22$ nM) a nie vďaka priamemu pôsobeniu na bunky tumoru.¹

<u>Závery ohľadom inhibítora 1Y6A</u>

Výskum firmy GlaxoSmithKline viedol k objaveniu nového typu antiangiogeník na báze 2-anilíno-5-fenyloxazolu (**T1**), ktorý má priamy inhibičný účinok na VEGFR-2 receptor. Optimalizáciou zlúčenín tohto typu sa podarilo vyvinúť nanomolárne účinný inhibítor **1Y6A** $IC_{50} = 22$ nM. Bola potvrdená jeho priama interakcia s KDR proteínom pomocou röntgenoštruktúrnej analýzy. Inhibítor **1Y6A** bol účinný nielen v *in vitro* biologických testoch, ale jeho aktivita bola dokázaná aj na *in vivo* testoch s myším xenograftom ľudského tumoru. Autori dokázali, že antitumorový účinok tejto látky je spôsobený najmä jej antiangiogénnym pôsobením (inhibícia aktivácie endoteliálnych buniek) a nie cytostatickým účinkom na bunky tumoru. Antiangiogénna aktivita mnohonásobne prevažuje antineoplastický účinok **1Y6A**.

4.2.3 Metodika prípravy nových derivátov inhibítora 1Y6A

Nakoľko je metodika prípravy známeho inhibítora 1Y6A v literatúre opísaná, vypracovali sme návrh podobnej syntetickej cesty pre jeho *para* substituované deriváty. Zaujal nás stupeň vybudovania oxazolového skeletu, ktorý poskytoval nižšie výťažky.¹

Z dostupnej literatúry sme našli niekoľko typov reakcií, ktoré opisujú prípravu zlúčenín s oxazolovým kruhom.

a) Reakcie α-halogénkarbonylových zlúčenín s močovinovými derivátmi

Reakciou metyl 2-bróm-3-oxopropionátu **58** s močovinou **59** v DMF pri 110 °C je možné pripraviť metyl 2-aminooxazol-5-karboxylát **60** v 48 % výťažku.²⁴ (Schéma 3) Iní autori opisujú tento typ reakcie v acetóne pri rt alebo aj refluxe počas 1 h so 42 % výťažkom.²⁵ Známe sú aj reakcie metyl 2-chlór-3-oxopropionátu s močovinou v H₂O za refluxu, pričom vzniká ten istý oxazolový produkt.²⁶ *N*-Substituované močoviny poskytujú *N*substitované 2-aminooxazoly.²⁷



Schéma 3: Reakcia metyl 2-bróm-3-oxopropionátu 58 s močovinou 59 za vzniku 5- substituovaného regioizoméru oxazolu 60.

²⁴ Jung, F. H.; Pasquet, G.; Lambert-van der Brempt, Ch.; Lohmann, J.-J. M.; Warin, N.; Renaud, F.; Germain, H.; De Savi, Ch.; Roberts, N., Johnson, T.; Dousson, C.; Hill, G. B.; Mortlock, A. A.; Heron, N.; Wilkinson, R. W.; Wedge, S. R.; Heaton, S. P.; Odedra, R.; Keen, N. J.; Green, S.; Brown, E.; Thompson, K.; Brightwell, S. J. Med. Chem. 2006, 49, 955-970.

²⁵ Lipinski, Ch. A.; Blizniak, T. E.; Craig R. H. J. Org. Chem. **1984**, 49, 566-570.

²⁶ Lange, U. E. W.; Backfisch, G.; Delzer, J.; Geneste, H.; Graef, C.; Hornberger, W.; Kling, A.; Lauterbach, A.; Subkowski, T.; Zechel, Ch. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1379-1382.

²⁷ Matulenko, M. A.; Lee, Ch.-H.; Jiang, M.; Frey, R. R.; Cowart, M. D.; Bayburt, E. K.; DiDomenico, Jr., S.; Gfesser, G. A.; Gomtsyan, A.; Zheng, G. Z.; McKie, J. A.; Stewart, A. O.; Yu, H.; Kohlhaas, K. L.; Alexander, K. M.; McGaraughty, S.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Marsh, K. C.; Snyder, R. D.; Diehl, M. S.; Kowaluk, E. A.; Jarvisaand, M. F.; Bhagwat, S.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3705-3720.

Podľa patentovej literatúry z močoviny **59** a brómacetofenónu **61** sa dá v DMF s MW žiarením pripraviť 5-(3-brómfenyl)oxazol-2-amín **62**, no s nízkym výťažkom.²⁸ (Schéma 4)



Schéma 4: Reakcia brómacetofenónu 61 s močovinou.

Ako sme podľa inej literatúry zistili, tak práve reakciou substituovaných α -brómacetofenónov 61 s tiomočovinovými zlúčeninami 63 za refluxu v EtOH vzniká opačný 4-substituovaný regioizomér oxazolu (tiazolu) 64 ako požadovaný 5-regioizomér.^{29,30} (Schéma 5)



Schéma 5: Reakcia brómacetofenónu 61 s *N*-substituovanou tiomočovinou za vzniku 4-substituovaného regioizoméru tiazolu 64.

Tiež sme našli reakcie α -brómacetofenónov **61** s močovinovými zlúčeninami, ktoré v DMF pri 100 °C počas 24 h poskytujú 2,4-regioizoméry oxazolových derivátov.³¹

b) Reakcie α-azidoacetofenónov s izo(tio)kyanátmi

Ďalším možným spôsobom prípravy oxazolov sú reakcie α-azidoacetofenónov s izokyanátmi. Známe sú reakcie s PPh₃ v dioxáne pri 100 °C počas 25 min so 78 % výťažkom³² alebo s Bu₃P v CH₂Cl₂ pri rt počas 16 h.³³

Častejšie opísanými sú reakcie s izotiokyanátmi s PPh₃ v dioxáne pri 90-100 °C vo výťažkoch 75 – 95 % 5-substituovaných oxazolových produktov.^{34,35} V poslednom období sa

²⁸ Pharmagene Laboratories Limited: Patent WO2005/12263A1.

²⁹ Bursavich, M. G.; Parker, D. P.; Willardsen, J. A.; Gao, Z.-H.; Davis, T.; Ostanin, K.; Robinson, R.; Peterson, A.; Cimbora, D. M.; Zhu, J.-F.; Richards, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1677-1679.

³⁰ Qui, X.-L.; Li, G.; Wu, G.; Zhu, J.; Zhou, L.; Chen, P.-L.; Lee, W.-H.; Chamberlin, A. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1757 – 1767.

³¹ Wang, G. T.; Wang, S.; Gentles, R.; Sowin, T.; Leitza, S.; Reilly, E. B.; Von Geldern, T. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 195 – 201.

 ³² AB Science; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Institut Curie *Patent:* WO2005/40139 A2, 2005.

³³ Molina, P.; Fresneda, P. M.; Almendros, P. *Synthesis* **1993**, *1*, 54 – 56.

využíva aj polymérny pPPh₃ v dioxáne so zahrievaním kvôli pravdepodobnej l'ahšej separácii.²⁹ Taktiež sú tieto typy reakcií robené pri rt s PPh₃ v CH₂Cl₂.^{36,37,1}

Z literatúry je známy mechanizmus reakcie, kedy aza-Wittigovou reakciou z azidov **65** s izotiokyanátom a následnou cyklizáciou intermediátu **67** vznikajú zlúčeniny s 2,5-oxazolovým cyklom **68**.³⁸ (Schéma 6)



Schéma 6: Mechanizmus vzniku 5-substituovaných oxazolov (68).

c) Iné typy reakcií

Známe sú aj prípravy oxazolov reakciami α-diazokarbonylových zlúčenín **64** s kyanamidmi **65** za katalýzy $Rh_2(OAc)_4$ v CH_2Cl_2 počas 1 h zahrievania.³⁹ (Schéma 7)



Schéma 7: Reakcia α-diazokarbonylových zlúčenín 69 s kyanamidmi 70 za katalýzy Rh₂(OAc)₄.

Reakcia *N*-substituovaných α -aminoacetofenónov **72** a *N*-(dichlórmetylén)-*N*-dimetylamínium chloridov **73** s HClO₄ v AN počas 3 h za refluxu taktiež poskytuje oxazolové zlúčeniny.⁴⁰ (Schéma 8)

³⁴ a/ Dhar, T. G. M.; Quo, J.; Shen, Z.; Pitts, W. J.; Gu, H. H.; Chen, B.-Ch.; Zhao, R.; Bednarz, M. S.; Iwanowicz, E. J. Org. Lett. **2002**, *4*, 2091 – 2094. b/ Dhar, T. G. M.; Shen, Z.; Gu, H. H.; Chen, P.; Norris, D.; Watterson, S. H.; Ballentine, S. K.; Fleener, C. A.; Rouleau, K. A.; Barrish, J. C.; Townsend, R.; Hollenbaugh, D. L.; Iwanowiczet, E. J. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2003**, *13*, 3557 – 3560.

³⁵ Ouyang, X.; Piatnitski, E. L.; Pattaropong, V.; Chen, X.; He, H.-Y.; Kiselyov, A. S.; Velankar, A.; Kawakami, J.; Labelle, M.; Smith, L.; Lohman, J.; Lee, S. P.; Malikzay, A.; Fleming, J.; Gerlak, J.; Wang, Y.; Rosler, R. L.; Zhou, K.; Mitelman, S.; Camara, M.; Surguladze, D.; Doodyb, J. F.; Tumab, M. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1191 – 1196.
³⁶ Zeevaart, J. G.; Wang, L.; Thakur, V. V.; Leung, Ch. S.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; Bailey, Ch. M.;

³⁰ Zeevaart, J. G.; Wang, L.; Thakur, V. V.; Leung, Ch. S.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; Bailey, Ch. M.; Domaoal, R. A.; Anderson, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9492 – 9499.

³⁷ Froeyen, P. Phosph., Sulfur and Silicon and the Related Elements **1991**, 60, 81 – 84.

³⁸ Dhar, T. G. M.; Shen, Z.; Guo, J.; Liu, Ch.; Watterson, S. H.; Gu, H. H.; Pitts, W. J.; Fleener, C. A.; Rouleau, K. A.; Sherbina, N. Z.; McIntyre, K. W.; Witmer, M. R.; Tredup, J. A.; Chen, B.-Ch.; Zhao, R.; Bednarz, Cheney, D. L.; MacMaster, J. F.; Miller, L. M.; Berry, K. K.; Harper, T. W.; Barrish, J. C.; M. S.; Hollenbaugh, D. L.; Iwanowicz, E. J. J. Med. Chem. 2002, 45, 2127-2130.

³⁹ Fukushima, K.; Ibata, T. *Heterocycles* **1995**, *40*, 149 – 154.

⁴⁰ Moschny, T.; Hartmann, H. Helv. Chim. Acta **1999**, 82, 1981 – 1993.



Schéma 8: Reakcia *N*-substituovaných α-aminoacetofenónov 72 a *N*-(dichlórmetylén)-*N*-dimetylamínium chloridu 73 s HClO₄.

Aj reakciou chloridu kyseliny dietylkarbámovej **75** s aminopropínom **76** a následnou kyslo katalyzovanou cyklizáciou je možné pripraviť 5-substituovanú oxazolovú zlúčeninu **78**.⁴¹ (Schéma 9)



Schéma 9: Reakcia chloridu kyseliny dietylkarbámovej 75 s aminopropínom 76 a následnou kyslo katalyzovanou cyklizáciou.

Uvedené reakcie vzniku oxazolov z literatúry dokumentujú, že najvhodnejšou z hľadiska uskutočnenia je reakcia α -azidoacetofenónov s príslušnými izo(tio)kyanátmi za prítomnosti PPh₃, pričom vznikajú požadované 5-substituované oxazolové zlúčeniny. (Schéma 6)

⁴¹ Eloy, F.; Deryckere, A. Chim. Therapeut. **1973**, *8*, 437 – 446.

4.3 CAM test

4.3.1 Chorioallantoická membrána (CAM) - vývoj, funkcia, testovací model

a) Opis CAM membrány

CAM je skratka pre chorioallantoickú membránu obklopujúcu vyvíjajúce sa vtáčie embryo. Je to extraembryonálna membrána tvoriaca sa v štvrtom dni inkubácie a vzniká fúziou chorionu a allantoisu. (Obr. 7)



Obr. 7: Štruktúra vtáčieho embrya a vývoj chorioallantoickej membrány (CAM).

Rýchla tvorba ciev v CAM membráne prebieha v období medzi 4. – 10. dňom vývoja embrya. Vývoj CAMu a jeho vaskularizácia umožňuje embryiu výmenu plynov a živín až do vyliahnutia. V priebehu vývoja sú u embryí sliepky definované 3 fázy rastu:

- do 5. 7. dňa sa vytvára kapilárna sieť pučaním ciev
- 8. 12. deň zahŕňa fázu rastu ciev
- posledná fáza je spojená už len s miernou zmenou cievneho systému a táto sa končí pred vyliahnutím

Embryonálny vývin trvá u embryí sliepok 21 dní, v prípade prepelíc je táto doba kratšia a predstavuje 16-18 dní.^{42,43}

⁴² Ausprunk, D.; Knighton, D.; Folkman, J. Dev. Biol. **1974**, *38*, 237 - 249.

⁴³ Zemanová, D.; Zeman, M. *Hydinárska veda* **1992**, *27*, 34 – 39.

b) CAM testovací model

Testovací chorioallantoický membránový model (CAM) je používaný na pozorovanie angiogenézy a jej inhibície.^{44,45} Výhodou CAMu oproti iným *in vivo* cicavčím systémom (napr. rohovka zajaca, podkožné implantáty, tkanivá...) je jeho nízka cena, relatívna jednoduchosť uskutočnenia, absencia dospelého imunitného systému a biologická komplexita spojená s *in vivo* systémom.^{46,47}

c) História použitia CAM modelu

Počas rokov 2000-2005 bolo známych viac ako 700 publikácií o CAMe ako modelovom vzore hodnotenia angiogenézy. Doteraz je známych 3203 publikácii (z toho 269 u prepelíc, *databáza ScienceDirect*).⁴⁸ Aj napriek tomuto počtu, dosiaľ neexistuje úplne jednotný postup uskutočnenia tohto biologického testu a metodika jeho realizácie závisí od laboratória, v ktorom sa testovanie uskutočňuje.

Využívanie CAM modelu pri štúdiu angiogenézy opisujú prehľadné články, v ktorých sú uvedené vhodné podmienky na realizáciu tohto experimentu (rôzne kultivácie embryí, aplikácie vzoriek, výber vhodného veku embrya na podanie vzorky, čas vyhodnotenia účinku vzorky a metódy kvantifikácie uvedené nižšie):^{49,50,51,52}

d) Zdroje CAMu

Najbežnejšie používaným zdrojom CAMu sú embryá sliepky plemena *White Leghorn* a prepelice japonskej (*Japanese Quail*). (Obr. 8)

⁴⁴ Ribatti, D.; Vacca, A. Int. J. Biol. Markers 1999, 14, 207-213.

⁴⁵ Thompson, W.D.; Reid, A. Adv. Exp. Med. Biol. 2000, 476, 225-236.

⁴⁶ MacDonald, I.C.; Schmidt, E.E.; Morris, V.L.; Chambers, A.F.; Groom, A.C. *Microvasc. Res.* **1992**, *44*, 185-199.

⁴⁷ Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinners, B.; Kubai, L.; Akhtar, N. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 32-40.

⁴⁸ http://www.sciencedirect.com/ (25.8.2010)

⁴⁹ Ribatti, D. Int. Rev. Cell Mol. Biol. **2008**, 270, 181-224.

⁵⁰ a/ Ribatti, D.; Vacca, A.; Roncali, L.; Dammacco, F. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* **2000**, *1*, 73-82. b/ Ribatti, D.; Vacca, A.; Roncali, L.; Dammacco, F. *In. J. Dev. Biol.* **1996**, *40*, 1189-1197.

⁵¹ Richardson, M.; Singh G. Curr. Drug Targets – Cardiovas. Haemat. Disorders 2003, 3, 155-185.

⁵² a/ Parsons-Wingerter, P.; Chandrasekharan, U.M.; McKay, T.L.; Radhakrishnan, K.; DiCorleto, P.E.; Albarran B.; Farr A.G. *Microvasc. Res.* 2006, 72, 91-100. b/ Parson-Wingerter, P.; Elliot, K.E.; Farr, A.G.; Radhakrishnan, K.; Clark, J.I.; Sage, E.H. *Microvasc. Res.* 2000, 59, 221-232.



Obr. 8: Vľavo – pár prepelice japonskej (*Japanese Quail, Coturnix coturnix japonica*), v strede – prepeličie vajíčka a vpravo – vyvíjajúce sa 12 dňové embryo prepelice japonskej.

e) Kultivácie CAMu

Oplodnené vajíčka sliepky *White Leghorn* alebo prepelice japonskej sú umiestnené do inkubátora a udržiavané pri teplote 37 °C (u sliepok)⁴⁹ alebo 37.6 °C (u prepelíc)⁵² s vlhkosťou 60 - 80 %.

Pri **kultivácii** *in ovo* (v škrupine) sa na 3. – 4. deň z ostrej strany vajca odoberie 2 - 3 ml albumínu a následne sa vytvorí malý otvor v škrupine, ktorý sa prelepí lepiacou páskou. Medzi 4. až 10. dňom sa otvor zväčší a pridáva sa experimentálna vzorka. (Obr. 9, vľavo)



Obr. 9: Vľavo - kuracie embryá kultivované *in ovo* a vpravo - prepeličie embryá kultivované *ex ovo* (*Petriho* misky v tvare 6 - jamkových plátov).

Embryá **kultivované** *ex ovo* musia byť udržiavané v nádobách nahradzujúcich škrupinu vajíčka (napr. *Petriho* misky v tvare 6 – komorových plastových plátov). (Obr. 9, vpravo) **Slepačie vajíčka** sú vyklápané na 3. – 4. deň od začiatku inkubácie (optimum je 4.5 dňa, lebo embryá vyklápané do 3. dňa väčšinou neprežívajú).⁵¹ Dôležité je, aby bolo embryo umiestnené uprostred nenarušeného žĺtkového vaku s možnosťou dobrého pozorovania jeho

vývoja a ľahkosťou aplikácie experimentálnej vzorky.⁵³ U **prepelíc** je najvhodnejšia doba vyklápania 56 h od začiatku inkubácie.^{52a,43}

Výhodami kultivácie *ex ovo* sú: väčšia CAM plocha vhodná na testovanie s využitím väčšieho množstva vzoriek, možnosť pozorovania celého CAMu, jednoduchšie vyhodnocovanie i možnosť transiluminácie. Nevýhodou je absencia vápnika zo škrupiny pre ďalší vývoj skeletu, preto nedochádza k prežívaniu embryí až do vyliahnutia. Čiže je v tomto prípade aj nižšia miera prežívania embryí ako pri kultivácii *in ovo.*⁴⁹

4.3.2 Inhibícia neovaskularizácie CAMu

a) Aplikácie vzoriek na CAM

Najbežnejšie používané metódy aplikácie experimentálnych vzoriek na povrch CAMu zahrňovali tieto aplikácie: zaplavenie CAM povrchu roztokom,⁵¹ aplikácia roztoku do rôznych prstencov (silikónové, plastové, teflónové a sklené)⁵⁴ alebo postupným uvoľňovaním látky z nosiča umiestneného na povrch CAMu obsahujúceho experimentálnu látku (napr. MEC = metylcelulózové disky,⁵⁵ Elvax polyméry (*DuPont*TM *Elvax*® *ethylene vinyl acetate* (*EVA*)),⁵¹ hydron (materiál kontaktných šošoviek),⁵⁶ agarózové disky,⁵⁷ želatína,⁵⁸ Gelaspon,⁵⁹ filtračný papier,⁶⁰ Thermanox⁶¹. Pri aplikácii vzoriek je treba minimalizovať možné nešpecifické zápalové reakcie výberom vhodného nosiča.⁵¹

b) Metódy vyhodnotenia CAM testu

Vyhodnotenie CAM testu angiogenézy môže byť robené "priamym pozorovaním" alebo číselne pomocou doplnkového "skóre", a to ako "pozitívum, negatívum alebo

⁵³ Auerbach, R.; Kubai, L.; Kighton, D.; Folkman, J. Dev. Biol. 1974, 41, 391-394.

⁵⁴ Takigawa, M., Enomoto, M., Nishida, Y., Pan, H.-O., Kinoshita, A., Suzuki, F. *Canc. Res.* **1990**, *50*, 4131 - 4138.

⁵⁵ Wang, L.-L.; Li, J.-J.; Zheng, Z.-B.; Du, G.-J.; Li, S. Eur. J. Pharmacol. 2004, 502, 1 – 10.

⁵⁶ Bernardini, G.; Ribatti, D.; Spinetti, G.; Morbidelli, L.; Ziche, M.; Santoni, A.; Capogrossi, M. C.; Napolitano, M. J. Immun. Methods 2003, 273, 83-101.

⁵⁷ Mahboobi, S., Pongratz, H., Hufsky, H., Hockemeyer, J., Frieser, M., Lyssenko, A., Paper, D.H., Bürgermeister, J., Böhmer, F.-D., Fiebig, H.-H., Burger, A.M., Baasner, S., Beckers, T. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4535 - 4553.

⁵⁸ Kim H.K., Kang D.K., Kim H.Y., Kang S.S., Chang S.I. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2007**, *352*, 509-513.

⁵⁹ Belleri, M.; Ribatti, D.; Nicoli, S.; Cotelli, F.; Forti, L.; Vannini, V.; Stivala, L.A.; Presta, M. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1451 – 1459.

⁶⁰ Tong, Y.; Zhang, Y.; Lang, J.; Shi, Y.; Tan, W.; Li, M.; Zhang, Y.; Tong, L.; Lu, H.; Lin, L.; Ding, J. Eur. J. Pharm. 2004, 494, 101-109.

⁶¹ a/ Jung, M.; Tak, J.; Chung, W.-Y.; Park, K.-K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1227-1230. b/ http://www.nuncbrand.com/us/page.aspx?ID=226

problematickosť". Tieto "skóre" môžu byť vyjadrené ako jednoduché čísla "*Angiogenický koeficient*", t.j. súčet všetkých skóre (napr. 0-4) podelený počtom embryí. Stimulácia angiogenézy sa určuje pomocou: hustoty ciev sledovanej stereomikroskopom, tvorby nových ciev, vinutia ciev (stáčanie, skrútenie...), disorganizácie ciev, bodov vetvenia (*Branch points*) ako aj lúčovitého usporiadania ciev (*"spoke wheel"*).

Antiangiogenéza sa väčšinou vyjadruje pomocou zóny inhibície (avaskulárnej zóny). Ak má avaskulárna plocha veľkosť aspoň 3 mm v priemere, jedná sa o inhibíciu angiogenézy. Antiangiogenézu je možné taktiež vyhodnotiť pomocou priradenia skóre (napr. + do 4+, od najmenej viditeľného efektu + až po najvýraznejší inhibičný účinok ++++).⁵¹

5 Experimentálna časť

Použité metódy charakterizácie a úpravy zlúčenín:

Pred použitím sme rozpúšťadlá čistili štandardnými metódami uvedenými v literatúre.⁶² Reakcie, ktoré vyžadovali bezvodé podmienky sme uskutočnili pod Ar alebo N₂ atmosférou.

¹H, ¹³C NMR, spektrá boli merané na prístrojoch Varian Gemini (300 MHz a 75 MHz), Varian Mercury Plus (300 MHz) a Bruker (300 MHz). Chemické posuny sú udávané v ppm a ako vnútorný štandard bol používaný tetrametysilán (TMS). ¹⁹F-NMR (282 MHz) a HSQC 2D NMR sme použili na presné priradenie signálov finálnych produktov. Elementárne analýzy boli vykonané pomocou údajov získaných z prístroja Carlo Erba Science model 1106. MS spektrá boli merané pomocou prístroja Shimadzu LC MS-IT-TOF (Combined LC and MS system, LC/MS).

Priebeh reakcií sme sledovali TLC analýzou (Merck Silica gel 60 F₂₅₄), na vizualizáciu sme používali UV lampu 254 nm ako aj pary jódu. Na FLC analýzu sme používali silikagél Merck 60 (40-63µm). Teploty topenia sme merali na Koflerovom aparáte a nie sú korigované. Infračervené spektrá boli merané na prístroji FT-IR-ATR REACT IR 1000 (ASI Applied Systems) s diamantovou sondou a MTS detektorom.

⁶² Armarego, W. Purifications of Laboratory Chemicals, Buttleworth Heinemann, Burlington 2003.

5.1 Syntéza a výsledky biologických testov NCI USA

5.1.1 Syntéza zlúčenín s pyránochromenónovým skeletom



3-(Aryl)-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetáty (3a-3f)

Schéma 10: Syntéza zlúčenín s pyránochromenónovým skeletom 3 a-f ako aj ich vedľajších produktov 4 a-d, 5 a-c, 6b.

Metóda A: Zmes chromén-3-karbaldehydu 1 (20.0 mmol, 1.00 mol ekv) a príslušnej fenyloctovej kyseliny 2 (2a, 2b, 2d) (20.0 mmol, 1.00 mol ekv) v Ac₂O abs (10 ml) a AcONa abs (45.0 mg, 1.14 mmol, 0.06 mol ekv) sme nechali miešať 2 h pri teplote 60 - 70 °C. Po ochladení sme vypadnutý produkt 3 (3a, 3b, 3d) odfiltrovali, premyli Et₂O a prekryštalizovali z dioxánu.

Metóda B: Zmes chromén-3-karbaldehydu 1 (20.0 mmol, 1.00 mol ekv) a príslušnej fenyloctovej kyseliny 2 (2a, 2b, 2c, 2e) (20.0 mmol, 1.00 mol ekv) v Ac₂O abs (10 ml) a AcONa abs (10.0 mg, 0.72 mmol, 0.04 mol ekv) sme nechali ožarovať mikrovlnným žiarením pri 110 °C počas 30 min. Po ochladení sme vypadnutý produkt 3 (3a, 3b, 3c, 3e) odfiltrovali, premyli Et₂O a prekryštalizovali z dioxánu.

Metóda C: Zmes chromén-3-karbaldehydu **1** (500.0 mg, 2.87 mmol, 1.00 mol eq) a príslušnej fenyloctovej kyseliny **2** (**2a** - **2f**) (3.14 mmol, 1.09 mol ekv) v Ac₂O abs (1.5 ml) a AcONa abs (49.4 mg, 0.21 mmol, 0.07 mol ekv) sme nechali miešať 12-16 h pri teplote 100 °C pod Ar atmosférou. Po ochladení sme zrazeninu odfiltrovali, premyli EA (2 ml), prekryštalizovali z EA a získali produkt **3** (**3a** - **3f**). Po odparení rozpúšťadiel z filtrátu sme produkty **4** (**4a** -

4d) a 5 (5a - 5c) izolovali stĺpcovou chromatografiou na SiO₂ s použitím elučnej zmesi hexán / etyl acetát (3:1).

3-Fenyl-2-oxo-2*H***,5***H***-pyráno**[**3,2***-c*]chromén-**5**-yl acetát (3a)

Metódou A sme získali 81 %, metódou B 85 % a metódou C 11 % produkt **3a** ako žltú kryštalickú látku: mp 230–232 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₀H₁₄O₅ (334.3): C, 71.85; H, 4.22. Získané: C, 71.67; H, 4.24 %. IČ *v*(KBr): 1717, 1651, 1638, 1565, 1550, 1490, 1460, 1376, 1222, 1198, 1116, 1043, 1001, 949, 893, 783, 760 cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO*d*₆): δ 7.92 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, H-10) 7.71-7.68 (2H, m, H-2',6'), 7.48 (1H, ddd, *J* = 7.7, 7.0, 1.4 Hz, H-8), 7.51 (1H, s, H-4), 7.39 (1H, s, H-5), 7.41 -7.45 (3H, m, H-3',4',5'), 7.21 (1H, ddd, *J* = 7.7, 7.0, 0.8 Hz, H-9), 7.13 (1H, dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, H-7), 2.00 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.1, 159.8, 152.7, 150.1, 139.9, 134.5, 132.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.1, 124.7, 122.2, 122.1, 117.6, 114.5, 109.8, 91.3, 21.1.

3-(4-Fluórfenyl)-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát (3b)

Metódou A sme získali 60 %, metódou B 70 % a metódou C 61 % produkt **3b** ako žltú kryštalickú látku: mp 244–246 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₀H₁₃FO₅ (352.3): C, 68.18; H, 3.72. Získané: C, 68.41; H, 3.59 %. IČ *v*(KBr): 1721, 1644, 1601, 1559, 1509, 1459, 1370, 1269, 1235, 1154, 1038, 937, 837, 760 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.00 (s, 1H, H-4), 7.84-7.77 (m, 3H, H-10,2',6'), 7.45 (s, 1H, H-5), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 7.5, 1.6 Hz, H-8), 7.36 -7.25 (m, 3H, H-9,3',5'), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.3, 0.7 Hz, H-7), 2.02 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.0, 162.1, 159.3, 151.6, 151.6, 150.9, 139.2, 133.0, 130.6, 130.2, 123.9, 123.4, 122.4, 117.4, 117.4, 115.2, 114.0, 106.0, 89.2, 20.7.

3-(4-Metoxyfenyl)-2-oxo-2*H***,5***H***-pyráno**[**3,2***-c*]**chromén-5-yl acetát** (3c)

Metódou B sme získali 68 % a metódou C 54 % produkt **3c** ako žltú kryštalickú látku: mp 226–227 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₁H₁₆O₆ (364.4): C, 69.23; H, 4.43. Získané: C, 69.61; H, 4.59 %. IČ *v*(KBr): 1713, 1648, 1609, 1559, 1513, 1459, 1250, 1177, 1030, 941, 826, 760 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 7.92 (s, 1H, H-4), 7.78 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H-10), 7.75-7.68 (m, 2H, H-2',6'), 7.52 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 7.8, 1.5 Hz, H-8), 7.44 (s, 1H, H-5), 7.27 (ddm, 1H, *J* = 8.0, 7.8, w_{1/2} = 2.4 Hz, H-9), 7.19 (dm, 1H, *J* = 8.2, w_{1/2} = 2.4 Hz, H-7), 6.99-7.06 (m, 2H, H-3',5'), 3.80 (s, 3H, CH₃O), 2.01 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , δ): 169.1, 159.6, 159.5, 151.4, 150.1, 137.7, 132.7, 129.4, 129.4, 126.4, 124.7, 123.4, 122.3, 117.4, 114.2, 113.8, 113.8, 106.1, 89.3, 55.2, 20.8.

3-(3,4,5-Trimetoxyfenyl)-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát (3d)

Metódou A sme získali 53 % a metódou C 16 % produkt **3d** ako žltú kryštalickú látku: mp 175–180 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. $C_{23}H_{20}O_8$ (424.4): C, 65.09; H, 4.75. Získané: C, 65.33; H, 4.44 %. IČ *v*(KBr): 1733, 1648, 1555, 1462, 1374, 1331, 1239, 1192, 1127, 1003, 926, 764 cm^{-1.} ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.02 (s, 1H, H-4), 7.80 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.3 Hz, H-10), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.3, 1.3 Hz, H-8), 7.44 (s, 1H, H-5), 7.29 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.3, 1.0 Hz, H-9), 7.21 (dm, 1H, *J* = 8.1, w_{1/2} = 1.0, H-7), 7.08 (s, 2H, H-2',6'), 3.83 (s, 6H, 2 x CH₃O), 3.71 (s, 3H, CH₃O), 2.02 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.1,159.1, 152.5, 151.4, 150.5, 138.8, 138.0, 132.9, 129.5, 124.7, 123.4, 122.3, 117.3, 114.0, 105.8, 105.7, 89.1, 60.0, 55.9, 20.7.

3-(4-Nitrofenyl)-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát (3e)

Metódou B sme získali 72 % a metódou C (stačilo 10 min) 49 % **3e** ako žltú kryštalickú látku mp: 249–251 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₀H₁₃NO₇ (379.3): C, 63.33; H, 3.45; N, 3.69. Získané: C, 62.86; H, 3.90; N, 3.75 %. IČ *v* (nujol): 1763, 1734, 1639, 1601, 1547, 1517, 1346, 1216, 1139, 1110, 1042, 1000, 938, 852, 767, 738, 691, 621. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.36-8.30 (m, 2H, H-3',5'), 8.23 (s, 1H, H-4), 8.08-8.02 (m, 2H, H-2',6'), 7.83 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.6 Hz, H-10), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 7.5, 1.6 Hz, H-8), 7.46 (s, 1H, H-5), 7.30 (ddd, 1H, *J* 7.9, 7.5, 1.0 Hz, H-9), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.0 Hz, H-7), 2.02 (s, 3H, CH₃O).¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.1,158.9, 152.3, 151.9, 146.9, 141.5, 140.8,133.6, 129.1, 123.5, 123.4, 122.8, 122.5, 117.5, 113.8, 106.0, 89.1, 20.8.

3-[(4-Metylsulfonyl)fenyl]-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát (3f)

Metódou C (stačilo 10 min) sme získali 70 % produkt **3f** ako žltú kryštalickú látku: mp 240-242 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₁H₁₈O₇S (412.4): C, 61.16; H, 3.91; S, 7.77. Získané: C, 61.05; H, 4.36; S, 7.54 %. IČ *v* (nujol): 1755, 1733, 1646, 1556, 1292, 1219, 1194, 1148, 1044, 999, 925, 846, 765 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.04-8.00 (m, 4H, H-2',3',5',6'), 8.02 (s, 1H, H-4), 7.83 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.4 Hz, H-10), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 7.3, 1.4 Hz, H-8), 7.48 (s, 1H, H-5), 7.30 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 7.3, 0.8 Hz, H-9), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.2, 0.8 Hz, H-7), 2.02 (s, 3H, CH₃O). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.5, 159.9, 153.4, 151.6, 141.9, 140.6, 139.9, 133.3, 129.3, 127.4, 123.3, 122.8, 122.6, 118.1, 114.7, 110.2, 91.6, 43.9, 21.5.

<u>3-Fenyl-8,9-dimetyl-2-oxo-2,5-dihydropyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát</u> (3g) <u>a</u> <u>3-(4-fluórfenyl)-8,9-dimetyl-2-oxo-2,5-dihydropyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát</u> (3h)

Zlúčeniny **3g** a **3h** sme pripravili podľa vyššie uvedenej Metódy A, ale vychádzali sme z 6,7-dimetyl-4-oxo-4H-chromén-3-karbaldehydu a príslušnej fenyloctovej kyseliny (**2a**, **2b**).

3-Fenyl-8,9-dimetyl-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromén-5-yl acetát (3g)

Metódou A sme pripravili 74 % produktu **3g** ako žltú kryštalickú látku: mp 205–207 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₂H₁₈O₅ (362.4): C, 73.09; H, 4.97. Získané: C, 72.92; H, 5.01 %. IČ (KBr): 3541, 3034, 2917, 1725, 1714, 1646, 1551, 1502, 1357, 1227, 1187, 1136, 1024, 1001, 935, 912, 887, 783, 699, 521 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.92 (1H, s, H-1'), 7.74-7.70 (2H, m, H-2', 6'), 7.54 (1H, s,H-4), 7.48-7.40 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.39 (1H, s, H-5), 7.01 (1H, s, H-7), 2.27 (6H, s, 2 CH₃), 1.97 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.1, 159.4, 151.5, 149.9, 142.8, 139.6, 134.4, 131.8, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 123.9, 122.5, 118.1, 111.5, 109.0, 105.3, 89.5, 20.7, 19.8, 18.6.

3-(4-Fluórfenyl)-8,9-dimetyl-2-oxo-2H,5H-pyráno[3,2-c]-chromén-5-yl acetát (3h) Metódou A sme pripravili 73 % produkt **3h** ako žltú kryštalickú látku: mp 246–248 °C (EA). Elem. Anal. vypoč. C₂₂H₁₇FO₅ (380.4): C, 69.29; H, 4.47. Zistené: C, 69.47; H, 4.50 %. IČ (KBr): 3443, 2926, 2857, 1728, 1686, 1638, 1547, 1510, 1459,1377, 1357, 1303, 1233, 1163, 1105, 1051, 1030, 965, 893, 837, 774,663, 527 cm⁻¹; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.95 (1H, s, H-4), 7.77 (2H, ddd, *J* = 8.9, 7.7, 2.0 Hz, H-3′, 5′), 7.37 (1H, s, H-7), 7.54 (1H, s, H-1′), 7.29 (2H, ddd, *J* = 8.9, 7.4, 2.1 Hz,H-2′, 6′), 7.01 (1H, s, H-5), 2.48 (3H, s, CH₃), 2.25 (3H, s, CH₃), 2.00 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.6, 159.9, 150.9, 150.7, 142.0, 140.0, 134.9, 133.6, 131.9, 130.2, 130.1, 127.4, 122.3, 118.3, 115.3, 111.9, 109.0, 91.2, 20.8, 19.8, 18.6. Pri syntéze acetátov **3 (3a - 3d)** sme z filtrátov izolovali zlúčeniny **4 (4a - 4d)** ako vedľajšie produkty reakcie pomocou stĺpcovej chromatografie (Metóda C).

3-Fenyl-5-(2-hydroxybenzoyl)-2H-pyran-2-ón (4a)

Metódou C sme získali 5 % zlúčeniny **4a** ako žltú kryštalickú látku: TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.24$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{12}O_4$ (292.3): C, 73.97; H, 4.14. Získané: 73.74; H, 4.22 %. IČ *v*(KBr): 1650, 1575, 1470, 1412, 1356, 1290, 1228, 1125, 1007, 909, 756 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ OH nevidno, 8.08 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.7 Hz, H-13), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 7.0, 1.7 Hz, H-11), 7.51 (d, 1H, *J* = 8.6, H-10), 7.47 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 7.0, 1.1 Hz, H-12), 7.33-7.06 (m, 7H, H-4, 6, Ph).

3-(4-Fluórfenyl)-5-(2-hydroxybenzoyl)-2*H***-pyran-2-ón** (4b)

Metódou C sme získali 2 % zlúčeniny **4b** ako žltú kryštalickú látku: mp 290-292 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:3): $R_f = 0.22$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{11}FO_4$ (310.1): C, 69.68; H, 3.57. Získané: C, 69.18; H, 3.47 %. IČ v(KBr): 1721, 1509, 1462, 1262, 1223, 1119, 1073, 1019, 799, 744, 694 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.89 (br s, 1H, OH), 8.09 (dd, 1H, J = 8.0, 1.7, H-13), 7.81 (ddd, 1H, J = 8.5, 7.1, 1.7 Hz, H-11), 7.77 (d, 1H, J = 0.9, H-4), 7.60 (d, 1H, J = 0.9, H-6), 7.57 (d, 1H, J = 8.5, H-10), 7.51 (ddd, 1H, J = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, H-12), 7.32-7.25 (m, 2H, H-2',6'), 7.25-7.17 (m, 2H, H-3',5'). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 175.1, 167.5, 161.6, 156.4, 155.2, 134.6, 134.0, 131.8, 131.6, 130.1, 126.0, 125.3, 123.0, 119.0, 118.5, 115.5.

5-(2-Hydroxybenzoyl)-3-(4-metoxyfenyl)-2*H*-pyran-2-ón (4c)

Metódou C sme získali 1 % zlúčeniny **4c** ako žltú kryštalickú látku: mp 235-238 ° C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.19$. Elem. Anal. vypoč. $C_{19}H_{14}O_5$ (322.3): C, 70.80; H, 4.38. Získané: C, 70.53; H, 4.64 %. IČ *v*(KBr): 1725, 1515, 1468, 1274, 1230, 1121, 1081, 1025, 799, 748 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.73 (br s, 1H, OH), 8.09 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.7 Hz, H-13), 7.81 (ddd, 1H, *J* = 8.5, 7.1, 1.7 Hz, H-11), 7.72 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz, H-4), 7.57 (d, 1H, *J* = 8.5, 1.0 Hz, H-10), 7.55 (d, 1H, *J* = 0.9, H-6), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, H-12), 7.17-7.12 (m, 2H, H-2',6'), 6.98-6.92 (m, 2H, H-3',5'), 3.77 (s, 1H, CH₃O). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 175.1, 167.8, 158.6, 156.2, 155.0, 134.5, 130.5, 130.2, 129.0, 127.4, 125.9, 125.2, 122.9, 119.1, 118.4, 113.9, 54.9.

5-(2-Hydroxybenzoyl)-3-(3,4,5-trimetoxyfenyl)-2H-pyran-2-ón (4d)

Metódou C sme získali 5 % zlúčeniny **4d** ako žltú kryštalickú látku: mp 230-233 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:2): $R_f = 0.26$. Elem. Anal. vypoč. $C_{21}H_{18}O_7$ (322.1): C, 70.80; H, 4.38. Získané: C, 70.35; H, 4.51 %. IČ *v*(KBr): 1655, 1578, 1466, 1412, 1354, 1285, 1227, 1123, 1003, 903, 756 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ OH nevidno, 8.27 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.6 Hz, H-13), 8.18 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz, H-4), 7.67 (ddd, 1H, *J* = 8.6, 7.0, 1.6 Hz, H-11), 7.46 (d, 1H, *J* = 0.7 Hz, H-6), 7.43 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 7.0, 0.9 Hz, H-12), 7.38 (dd, 1H, *J* = 8.6, 0.9 Hz, H-10), 6.48 (s, 2H, H-2',6'), 3.89 (s, 3H, CH₃O), 3.80 (s, 6H, 2 x CH₃O).

<u>3-(Aryl)-5-hydroxy-pyráno[2,3-b]chromen-2)-óny</u> (5a – 5c)

Metóda A: Zlúčeninu **3a** (10.0 mmol) sme rozpustili v AcOH (10 ml) a nechali zahrievať 1 h pri 60 °C. Po ochladení sme odfiltrovali žltú zrazeninu, premyli Et₂O a kryštalizovali z toluénu alebo AcOH.

Metóda B: Zlúčeninu 5 (5a - 5c) sme izolovali ako vedľajší produkt pri syntéze acetátov 3 (3a - 3c) pomocou FLC chromatografie (Metóda C).

5-Hydroxy-3-fenylpyráno[2,3-b]chromen-2(10aH)-ón (5a)

Metódou A sme získali 77 % a metódou B 2 % zlúčeniny **5a** ako žltú kryštalickú látku: mp 256-258° C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.62$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{12}O_4$ (292.3): C, 73.97; H, 4.14. Získané: C, 74.18; H, 4.16 %. IČ *v*(KBr): 3450, 3060, 1731, 1715, 1645, 1610, 1557, 1489, 1460, 1371, 1355, 1316, 1296, 1271, 1233, 1204, 1180, 1113, 1037, 1019, 951, 912, 785, 759, 737 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.12 (1H, s, OH), 7.89 (1H, dd, *J*=7.7, 1.5 Hz, H-6), 7.51–7.47 (2H, m, H-2', 6'), 7.42 (1H, ddd, *J*= 8.2, 7.1, 1.5 Hz, H-8), 7.41–7.37 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.21 (1H, ddd, *J* = 7.6, 7.4, 1.0 Hz, H-7), 7.17 (1H, dd, *J*= 8.2, 1.0 Hz, H-9), 7.15 (1H, s, H-4), 6.73 (1H, s, H-10a). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.4, 151.8, 150.3, 139.4, 134.4, 132.5, 128.6, 128.3, 128.0, 125.0, 122.8, 122.6, 122.1, 117.7, 114.3, 107.5, 96.9, 30.7.

3-(4-Fluórfenyl)-5-hydroxypyráno[2,3-b]chromen-2(10aH)-óne (5b)

Metódou B sme získali 4 % zlúčeninu **5b** (spracovanie opísané vyššie) ako žltú kryštalickú látku: mp 260-262 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.52$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{11}FO_4$

(310.3): C, 69.68; H, 3.57. Získané: C, 69.44; H, 3.79 %. IČ v(KBr): 3450, 1730, 1715, 1645, 1615, 1557, 1485, 1375, 1355, 1298, 1271, 1230, 1204, 1180, 1040, 1025, 951, 918, 785 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ OH nevidno, 7.72 (dd, 1H, J = 7.7, 1.5 Hz, H-6), 7.65-7.58 (m, 2H, H-2', 6'), 7.56 (s, 1H, H-4), 7.53 (ddd, 1H, J = 8.3, 7.4, 1.5 Hz, H-8), 7.33-7.24 (m, 2H, H-3',5'), 7.28 (dd, 1H, J = 8.3, 1.1 Hz, H-9), 7.23 (ddd, 1H, J = 7.7, 7.4, 1.1 Hz, H-7), 6.90 (s, 1H, H-10a).

5-Hydroxy-3-(4-metoxyfenyl)-pyráno[2,3-*b*]chromen-2(10a*H*)-óne (5c)

Metódou B sme získali 2 % zlúčeniny **5c** ako žltú kryštalickú látku: mp 260-262 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): R_f = 0.34. Elem. Anal. vypoč. C₁₉H₁₄O₅ (322.3): C, 70.80; H, 4.38. Získané: 70.63; H, 4.52 %. IČ *v*(KBr): 3440, 1728, 1720, 1651, 1615, 1559, 1480, 1375, 1358, 1292, 1277, 1206, 1188, 1025, 955, 919, 780 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ OH nevidno, 7.77-7.70 (m, 1H, H-6), 7.60-7.45 (m, 3H, H-8,2',6'), 7.50 (s, 1H, H-4), 7.32-7.30 (m, 1H, H-9), 7.23 (ddm, 1H, *J* = 7.6, 4.4 Hz, H-7), 7.03-7.01 (m, 2H, H-3',5'), 6.90 (s, 1H, H-10a), 3.81 (s, 3H, CH₃O). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.6, 159.5, 151.3, 149.8, 137.0, 132.5, 129.2, 126.3, 124.8, 123.1, 122.3, 117.6, 114.6, 113.8, 107.2, 93.1, 55.2.

5-Metoxy-3-(4-fluórfenylpyráno/2,3-b]chromen-2(10aH)-ón (8b)

Zlúčeninu **8b**, ktorá vzniká z látky **5b**, sme izolovali pomocou FLC s použitím elučnej zmesi EA/hexán (1:2). Získali sme 5% žltej kryštalickej látky: mp 160-164 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:2): $R_f = 0.66$. Elem. Anal. vypoč. $C_{20}H_{15}FO_4$ (338.3): C, 71.00; H, 4.47. Získané: C, 71.18; H, 4.33%. IČ *v* (KBr): 1717, 1644, 1605, 1555, 1509, 1462, 1370, 1262, 1231, 1157, 1069, 1022, 968, 907, 841, 760 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.92 (s, 1H, H-4), 7.55 – 7.84 (m, 2H, H-2',6'), 7.75 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.5 Hz, H-6), 7.51 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 7.5, 1.5 Hz, H-8), 7.35 – 7.27 (m, 2H, H-3',5'), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.5, 0.9 Hz, H-7), 7.19 (dd, 1H, *J* = 8.3, 0.9 Hz, H-9), 6.29 (s, 1H, H-10a), 3.89 (dq, 1H, *J* = 9.8, 7.0 Hz, CH₂), 3.78 (dq, 1H, *J* = 9.8, 6.9 Hz, CH₂), 1.13 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

<u>3-Aryl-5-hydroxy-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromen-2-óny</u> (7a – 7f)



Schéma 11: Hydrolýza acetátov 3 na príslušné alkoholy 7.

Metóda A: Zmes acetátu **3a** (0.41 mmol, 1.00 mol ekv) a kyseliny *p*-toluénsulfónovej (15.0 mg, 0.09 mmol, 0.22 mol ekv) v 50 ml zmesi dioxán–voda (3:1) sme zahrievali 2 h pri teplote 50 °C. Po ochladení sme produkt **7a** odfiltrovali, premyli Et₂O a kryštalizovali z dioxánu.

Metóda B: Zmes acetátu **3 (3b - 3f)** (0.41 mmol, 1.00 mol ekv) a vody (0.5 ml, 27.8 mmol, 67.80 mol ekv) v 0.5 ml THF sme nechali miešať 15 h pri rt. Potom sme pridali EA (20 ml) a zmes sme extrahovali H₂O (3 x 20 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali, EA odparili pomocou RVO a surový produkt kryštalizovali z dioxánu.

5-Hydroxy-3-fenyl-2H,5H -pyráno[3,2-c]chromen-2-ón (7a)

Metódou A sme získali 74 % produktu **7a** ako žltú kryštalickú látku: mp 150–151 °C (dioxán). TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.62$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{12}O_4$ (292.3): C, 73.97; H, 4.14. Získané: C, 74.19; H, 4.13 %. IČ *v*(KBr): 3381, 3030, 1760, 1705, 1639, 1610, 1546, 1464, 1371, 1352, 1220, 1191, 1175, 1042, 1018, 973, 933, 899, 758, 696 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.87 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.7 Hz, H-10), 7.71–7.66 (2H, m, H-2',6'), 7.49 (1H, s, H-4), 7.44 -7.39 (4H, m, H-9, 3', 4', 5'), 7.13 (1H, ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.0 Hz, H-8), 7.07 (1H, d, *J* = 8.1, H-7), 6.43 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-5), 3.51 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, OH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.3, 159.7, 152.6, 139.7, 134.8, 134.4, 132.3, 128.2, 127.9, 125.2, 124.8, 124.5, 122.0, 121.9, 117.5, 114.4, 109.6, 91.1.

3-(4-Fluórfenyl)-5-hydroxy-2H,5H -pyráno[3,2-c]chromen-2-ón (7b)

Metódou B sme získali 78 % produktu 7**b** ako žltú kryštalickú látku: mp 290 °C dec. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.52$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{11}FO_4$ (310.3): C, 69.68; H, 3.57. Získané: C, 69.41; H, 3.36 %. IČ v(nujol): 3388, 1702, 1636, 1548, 1301, 1266, 1156, 1038,

983, 840, 761 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.88 (s, 1H, H-4), 7.83-7.77 (m, 2H, H-2',6'), 7.74 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-7), 7.73 (dd, 1H, J = 7.8, 1.7 Hz, H-10), 7.47 (ddd, 1H, J = 8.3, 7.3, 1.7 Hz, H-8), 7.36-7.23 (m, 2H, H-3',5'), 7.17 (ddd, 1H, J = 7.8, 7.3, 1.1 Hz, H-9), 7.12 (dd, 1H, J = 8.3, 1.1 Hz, H-7), 6.43 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-5). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 162.1, 159.8, 152.7, 150.1, 139.7, 132.4, 130.9, 130.2, 123.7, 122.2, 122.1, 117.6, 115.2, 114.4, 109.7, 91.2.

5-Hydroxy-3-(4-metoxyfenyl)- 2H,5H -pyráno[3,2- c]chromen-2-ón (7c)

Metódou B sme získali 98 % produktu 7**c** ako žltú kryštalickú látku: mp 235-238 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.34$. Elem. Anal. vypoč. $C_{19}H_{14}O_5$ (322.3): C, 70.80; H, 4.38. Získané: C, 70.59; H, 4.09 %. IČ ν (nujol): 3346, 1725, 1645, 1602, 1552, 1513, 1288, 1245, 1184, 1113, 1044, 1021, 979, 902, 879, 842, 767, 735, 687 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.80 (s, 1H, H-4), 7.76-7.69 (m, 2H, H-2',6'), 7.72 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-7), 7.72 (dd, 1H, J = 7.8, 1.1 Hz, H-10), 7.46 (ddd, 1H, J = 8.3, 7.4, 1.7 Hz, H-8), 7.17 (ddd, 1H, J = 7.8, 7.4, 1.1 Hz, H-9), 7.12 (dd, 1H, J = 8.3, 1.1 Hz, H-7), 7.05-6.99 (m, 2H, H-3',5'), 6.42 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-5), 3.81 (s, 3H, CH₃O). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.8, 159.4, 152.4, 149.2, 138.1, 132.1, 129.2, 129.2, 126.6, 124.2, 121.9, 121.9, 117.4, 114.5, 113.7, 113.7, 109.7, 91.2, 55.1.

5-Hydroxy-3-(3,4,5-trimetoxyfenyl)- 2H,5H -pyráno[3,2-c]chromen-2-óne (7d)

Metódou B sme získali 80 % produktu **7d** ako žltú kryštalickú látku: mp 219-221 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.21$. Elem. Anal. vypoč. $C_{21}H_{18}O_7$ (382.4): C, 65.96; H, 4.74. Získané: C, 65.67; H, 4.44 %. IČ *v*(nujol): 3432, 1725, 1645, 1587, 1561, 1332, 1294, 1233, 1121, 1041, 999, 877, 821, 764 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.93 (s, 1H, H-4), 7.75 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, H-7), 7.72 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.6 Hz, H-10), 7.48 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 7.4, 1.0 Hz, H-8), 7.18 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 7.4, 1.0 Hz, H-9), 7.13 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.0 Hz, H-7), 7.08 (s, 2H, H-2',6'), 6.42 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, H-5), 3.83 (s, 6H, CH₃O), 3.71 (s, 3H, CH₃O). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.7, 152.6, 152.5, 149.8, 139.5, 137.9, 137.9, 132.4, 129.9, 124.4, 122.1, 117.6, 114.5, 109.7, 105.7, 91.3, 60.1, 56.0, 56.0.

5-Hydroxy-3-(4-nitrofenyl)-2*H*,5*H* -pyráno[3,2-*c*]chromen-2-ón (7e)

Metódou B sme získali 70 % produktu 7e ako žltú kryštalickú látku: mp 192-195 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.24$. Elem. Anal. vypoč. $C_{18}H_{11}NO_6$ (337.3): C, 64.10; H, 3.29; N, 4.15. Získané: C, 63.63; H, 3.57; N, 4.28 %. IČ ν (nujol): 3538, 1737, 1698, 1636, 1546,

1518, 1346, 1325, 1221, 1156, 1039, 974, 855, 776 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.34-8.28 (m, 2H, H-3',5'), 8.12 (s, 1H, H-4), 8.08 -8.02 (m, 2H, H-2',6'), 7.82 (d, 1H, J = 6.6 Hz, OH), 7.76 (dd, 1H, J = 7.9, 1.5 Hz, H-10), 7.51 (ddd, 1H, J = 8.3, 7.4, 1.5 Hz, H-8), 7.19 (ddd, 1H, J = 7.9, 0.9 Hz, H-9), 7.14 (dd, 1H, J = 8.3, 7.4, 0.9 Hz, H-7), 6.46 (d, 1H, J = 6.6 Hz, H-5). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.3, 153.0, 151.5, 146.9, 142.0, 141.1, 133.0, 130.2, 129.2, 123.5, 122.5, 122.2, 117.7, 114.3, 109.7, 91.2.

5-Hydroxy-3-[(4-metylsulfonyl)fenyl]-2H,5H-pyráno[3,2-c]chromen-2-ón (7f)

Metódou B sme získali 26 % 7**f** ako žltú kryštalickú látku: mp 181-183 °C. TLC (SiO₂, EA/hexán 1:1): $R_f = 0.31$. Elem. Anal. vypoč. $C_{19}H_{14}O_6S$ (370.1): C, 61.61; H, 3.81; S, 8.66. Získané: C, 61.49; H, 3.51; S, 8.29 %. IČ v(nujol): 3424, 1729, 1644, 1604, 1593, 1553, 1486, 1409, 1296, 1270, 1203, 1142, 1090, 1041, 988, 958, 845, 766 cm⁻¹. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.05 (s, 1H, H-4), 8.02-7.96 (m, 4H, H-2',3',5',6'), 7.80 (d, 1H, J = 7.0 Hz, H-7), 7.76 (dd, 1H, J = 7.7, 1.6 Hz, H-10), 7.50 (ddd, 1H, J = 8.3, 7.4, 1.6 Hz, H-8), 7.19 (ddd, 1H, J = 7.7, 7.3, 1.0 Hz, H-9), 7.14 (d, 1H, J = 7.0 Hz, H-5), 3.26 (s, 3H, SO₂CH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.5, 152.9, 151.2, 141.5, 140.1, 139.4, 132.9, 128.9, 126.9, 122.8, 122.4, 122.2, 117.7, 114.3, 109.7, 91.2, 43.5.

5.1.2 Výsledky biologických testov NCI USA

Pripravené zlúčeniny sme poslali na testovanie antineoplastickej aktivity do NCI USA.⁹ Vybrané zlúčeniny boli najskôr odoslané na *in vitro One-dose* pre-skríning na 60 typoch ľudských tumorových bunkových líniách (60CC) pri jednej koncentrácii 10⁻⁵ M počas 48 h. Dve zlúčeniny **3a** a **6a** boli testované ešte starším pre-skríningom na troch tumorových líniách pri koncentrácii 5.10⁻⁴ M počas 48 h.

				Priemerný	Najlepšie	Najhoršie	Ďalšie
Zlúčenina	\mathbf{R}^{1}	Y	Z	rast	Hodnoty	hodnoty	testovanie
				(%)	(%)	(%)	
3a	Н	OAc	Н	a/			Ν
3b	4-F	OAc	Н	78.60	-35.40	112.40	60CC
3c	4-OMe	OAc	Н	92.46	-25.88	117.55	Ν
3d	3,4,5-(OMe) ₃	OAc	Н	73.73	53.68	114.98	N

Tabuľka	2:	Výsled	iky (One-	dose	pre-	skrín	ing	testu	na	60	CC	pri	konc	entrác	ii	10^{-5}	М.	Výsledo	k t	estov	je
v priemer	né %	% rastu	tumo	orovy	ých b	uniel	< všet	tkýc	h 60	bunl	kový	ich tu	ımo	rový	ch líni	ách	voč	i kor	ntrole (1	00 9	%).	

3e	4-NO ₂	OAc	Н	88.96	20.28	134.68	Ν
3g	Н	OAc	Me	10.92	-42.23	74.46	60CC
3h	4-F	OAc	Me	59.03	-7.18	119.78	60CC
7a	Н	OH	Н	b/			60CC
7b	4-F	OH	Н	75.59	3.53	112.87	Ν
7c	4-OMe	OH	Н	106.91	81.55	160.79	Ν
7e	4-NO ₂	ОН	Н	86.11	-13.61	142.44	Ν
7f	4-SO ₂ Me	ОН	Н	91.23	-3.93	114.24	Ν

^a/ a ^b/ starší typ pre-skríningu na 3CC pri konc. 10⁻⁴ M. Látky postupujú do ďalšieho testovania, ak je aspoň jedna hodnota rastu pod 32 %: ^a/ NCI H460 - NSCLC (rast 33 %), MCF7 – tumor prsníka (96 %), SF-268 – nádor CNS (107 %); ^b/ NCI H460 (2 %), MCF7 (17 %), SF-268 (25 %).

Priemerný rast: priemerné % rastu na všetkých typoch 60CC s danou zlúčeninou pri konc. 10⁻⁵ M oproti 100 % samotných 60CC (kontrola).

Najlepšie a najhoršie hodnoty: hraničné hodnoty % rastu získané na daných typoch 60CC pri *One-dose* konc. 10⁻⁵ M príslušnej látky

N: No Further Screening – nepostupuje do ďalšieho testovania pri viacerých koncentráciách na paneli 60 ľudských tumorových bunkových líniách od 10⁻⁴ M do 10⁻⁹ M

Negatívne hodnoty (záporné čísla) v tabuľke vyjadrujú cytotoxický efekt testovanej látky.

Zlúčeniny 3-(4-fluórfenyl)-5-(2-hydroxybenzoyl)-2H-pyran-2-ón (**4b**), 3-(4-fluórfenyl)pyráno[2,3-b]chromen-2-óny **5b** a **6b** boli neaktívne; **4b** (rast buniek oproti kontrole 117 %), **5b** (105 %) a **6b** (98 %).

Anti-tumorová aktivita bola zaznamenaná pri 12 zlúčeninách obsahujúcich 3fenylpyránochromen-2-ónový skelet (**PYCHRONES:** pyráno-chromenóny) (**3a-3e**, **3g**, **3h**, **7a-7c**, **7e** a **7f**). (Obr. 10)



Obr. 10: Štruktúra 12 testovaných 3-fenylpyráno[3,2-*c*]chromen-2(5*H*)-ónov.

Na základe výsledkov pred-testovania na 60CC vyplýva, že aktivita 3fenylpyráno[3,2-*c*]chromen-2(5*H*)-ónov klesá, ak je substituent R¹ v *para* polohe na Ar-C(3) iný ako vodík. Najlepšiu aktivitu mali zlúčeniny **3g**, **3h**, **3b** a **7a**. Nahradením 4-H za 4-F viedlo k zníženiu priemernej inhibičnej aktivity napr. GI₅₀: 11 % **3g** v porovnaní s 59 % pre fluórovaný **3h**. Antitumorová aktivita pri tomto type nosných zlúčenín klesá so zväčšujúcim sa objemom R¹ substituentov v *para* polohe bez ohľadu na ich elektronické vlastnosti. (Tabuľka 2)

Aktívne zlúčeniny **3g**, **3h**, **3b** a **7a** z *One-dose* pre-skríningu postúpili do testu s 5 rôznymi koncentráciami opäť na paneli 60CC. (Tabuľka 3)

		GI ₅₀ [uM]				
Štruktúra	priemerne	é, najlepšie a	najhoršie	$TGI = GI_{100} \left[\mu M\right]^{a/}$		
		hodnoty				
3b	22.4	2.88	66.1	9.12		
3g	0.447	0.031	95.5	0.132		
3h	5.37	1.20	28.8	4.17		
7a	7.41	1.62	30.9	6.46		

Tabuľka 3: Výsledky 5-Dose testu na 60CC. Hlavným výstupom tohto testovania je priemerná GI_{50} hodnota na všetkých 60 tumorových líniách uvedená v μ M koncentrácii.

^{a/} uvedené sú len najlepšie hodnoty

Zlúčenina **3g** bola najaktívnejšia. Štruktúra obsahuje nesubstituovanú fenylovú skupinu v polohe C(3) a dve pre pozorovanú aktivitu významné metylové skupiny v C(8) a C(9) . (Tabuľka 2) Táto látka má sub-mikromolárnu priemernú GI_{50} aktivitu na všetkých typoch 60CC a na niektoré konkrétne tumorové bunkové línie (napr. Leukemia, NSCLC, Melanome) vykazuje nanomolárnu aktivitu GI_{50} : 31 nM. (Tabuľka 3)

5.1.3 Compare porovnávacia analýza

Mechanizmus antitumorového účinku zlúčeniny 3g nie je dosiaľ známy. Zistili sme, že jeho inhibičné vlastnosti pravdepodobne vyplývajú z inhibičnej interakcie na tubulíny. Predpokladaný mechanizmus sme zistili štatistickým porovnaním profilu GI_{50} hodnôt zlúčeniny 3g na všetkých daných tumorových bunkových líniách (niečo ako daktyloskopická stopa) s profilom štandardných anti-tumorových zlúčenín ktorých mechanizmus antitumorového účinku je experimentálne dokázaný (*Compare analysis software*). *Compare* *analysis software* je dostupný *on-line.*¹⁶ Analýza je založená na porovnaní našich experimentálych hodnôt GI_{50} zo všetkých bunkových línií z CC60 testu s hodnotami GI_{50} štandardých činidiel z databázy (*STANDARD_AGENTS*) v NCI. Našli sme koreláciu medzi našou najlepšou zlúčeninou a látkami s typickými antitubulínovými interakciami napr. **rhizoxin** s korelačným koeficientom (0.597), **maytansine** (0.438), **paclitaxel** (0.400), **S-trityl-L-cysteine** (0.374), **vinblastine sulfate** (0.358). Zoznam liečiv a ich kandidátov so známym antitubulínovým mechanizmom sú verejne dostupne v NCI.

5.2 Antiangiogeniká

5.2.1 Zavedenie antiangiogénneho testovania - CAM ASSAY

Počas testovania antineoplastických zlúčenín v NCI USA sme na našej katedre zavádzali aj testovanie antiangiogénnych typov zlúčenín na CAM membráne embryí prepelice japoskej.

Oplodnené prepeličie vajcia sme uložili na alkoholom denzifikované podnosy, ich škrupiny sme očistili nastriekaním 70 % EtOH, vajcia uložili do termostatu BIOS Midi (Praha), nechali ich inkubovať pri teplote 37.8 °C a vlhkosti 60-70 %. Po 52-54 h (2.25 dňové embryá, E2.25) inkubácie sme škrupinu opäť dezinfikovali 70 % EtOH. Povrch vajca sme otvorili pomocou chirurgických nožníc tak, že sme najprv porušili škrupinu vpichom ostrej špičky nožníc na boku vajca a následne sme strihaním urobili otvor ca do polovice priemeru vajca. Pri otváraní škrupiny sme vždy zachovali polohu vajca tak, ako bolo uložené v termostate BIOS pri jeho prvotnej inkubácii. Túto polohu sme označili nalepením malej nálepky na vrchnú stranu vajca. Po vyklopení obsahu vajec do 6 jamkovej plastovej platne (priemer jamky 35 mm) s vrchnákom (Sarstedt, Nemecko a Orange Scientific, Belgicko) sme pokračovali v inkubácii embryí za tých istých podmienok (teplota a vlhkosť), ako tomu bolo pri vajciach, ale tentoraz v inom biotermostate dezinfikovanom predtým UV žiarením. Pokiaľ sme vyklápali pred uplynutím 52 h, zárodok nebol dostatočne vyvinutý a obyčajne došlo k úhynu počas jeho inkubácie. Keď sme vyklápali neskôr, žltkový vak bol krehký a dochádzalo k jeho poškodeniu a premiešaniu s bielkom, čo tiež viedlo k úhynu embryí. Vyklopené vajcia teda nesmeli byť poškodené ani znečistené (napadané časti škrupiny), lebo potom počas inkubácie dochádzalo k neželaným infekciám. Takýto materiál sme radšej aspirovali pomocou vákua.

Po následných 79 h (celkovo E5.5) inkubácie sme na zvyšné embryá s priemerom CAMu 1.0 - 1.5 cm aplikovali vzorku látky v MEC nosiči (peleta z 1 % metylcelulózy), ktorú sme vyrobili z 10 µl roztoku po jeho vysušení na teflónovej platni v sterilnom boxe. Embryá sme fotografovali po 24 (E6.5) a 48 h (E7.5) od aplikácie vzorky. Po 48 h sme pod CAM injektovali intralipózu (20 % sójová emulzia) kvôli lepšej vizualizácii avaskulárnej zóny. Každú činnosť (vyklápanie, aplikácia aj fotenie) sme uskutočňovali v sterilných podmienkách v laminárnom boxe (Fatran) s prúdením vzduchu vyhriatom na ca 36 °C.

Vyhodnotenie inhibície angiogenézy sme robili priradením číselnych hodnôt: **3** bol najlepšie pozorovaný inhibičný efekt, čiže jasne vybielené miesto v širšom okolí pelety; **2**

jasne vybielené v okolí pelety, **1** miesto bez ciev len pod peletou a pri **0** nebol pozorovaný žiadny efekt. Získali sme aj prístup k presnejšej metodike vyhodnotenia plôch avaskulárných zón pomocou digitálnej fotografie a programu *ImageJ*.⁶³ V počítači sme z nasnímaných fotografií vypočítali plochu avaskulárnej zóny (vybielené miesto) v mm², ktorá v pomere k celkovej viditeľnej CAM ploche v mm² x 100 poskytuje údaj PAZ (Percento Avaskulárnej Zóny). (Obr.11)



Obr. 11: Vyhodnotenie avaskulárnych zón pomocou počítačového programu ImageJ.

Zavedenie CAM metodiky sme uskutočnili na klinických liečivách Sutente a Nexavare. Zisťovali sme rozdiel medzi liekovou formou (soľ aktívnej bázy liečiva sunitinib L-malát, resp. sorafenib tozylát), ako aj ich izolovanou aktívnou bázou (sunitinib, sorafenib). Izolovanou bázou sme sa zaoberali preto, lebo táto je z hľadiska štruktúry viac podobná organickým zlúčeninám pripravovaným v laboratóriách.

Z uskutočnených pokusov uvádzame len vzorové experimenty:

a) Sutent – lieková forma

V termostate sme nechali inkubovať 113 vajec (100 %) pri teplote 37.5 °C a vlhkosti 60-70 %. Po 54 h (E2.25) sme v sterilnom boxe vyklopili 65 vajec (58 %) do 6-jamkových plastových plátov. Tieto sme potom umiestnili do iného termostatu a nechali inkubovať pri konštantných podmienkach (teplota 37.8 °C a vlhkosť 60 - 70 %). Po ďalších 79 h inkubácie (E5.5), keď mal v priemere CAM 1.0 - 1.5 cm, sme na povrch CAM memebrány aplikovali vzorku látky obsiahnutú v 1 % MEC pelete na povrch 58 vhodných embryí (51 %) (tie ktoré

⁶³ Program ImageJ, National Institutes of Health, USA: http://rsb.info.nih.gov/ij/ (4.7.2010)

prežili, resp. mali vyvinutý CAM). Kontrólne pelety z MEC nosiča sme pripravili z 10 µl kvapiek roztoku 1 % metylcelulózy v PBS po ich vysušení v sterilnom boxe. Pelety obsahujúce experimentálnu látku sme pripravili tak, že sme adekvátne množstvo Sutentu rozpustili v 1 % MEC roztoku v PBS (GIBCO). Postup na prípravu peliet s aktívnou látkou a kontrólnych peliet bol v ďalšom rovnaký. Pripravenú peletu s aktívnou látkou, ako aj kontrólnu peletu sme umiestnili uprostred vyvíjajúceho sa CAMu a embryo sme nechali ďalej inkubovať za rovnakých podmienok. Embryá sme fotografovali po 48 h inkubácie. Pre ľahšie vyhodnotenie avaskulárnych zón sme pred fotením pod CAM aplikovali intralipózu (mlieku podobnú suspenziu, ktorá vizuálne odfiltrovala všetko rušivé pod CAM membránou).

Na experiment sme použili komerčne dostupný Sutent (sunitinib L-malát získaný od firmy *Pfizer*) v koncentráciách 1.5 (S1.5), 1.1 (S1.1) a 0.4 (S0.4) µg látky v peletách z 1 % MEC-u. Navážili sme 0.5 mg rozdrvenej tabletky komerčného Sutentu obsahujúceho 109 709 ng aktívnej zložky sunitinibu (resp. 146 628 ng sunitinib L-malátu) a rozpustili sme ho v 734 µl 1 % MECu v PBS (GIBCO), pričom sme získali roztok 150 ng sunitinibu / µl. Z toho roztoku sme na teflónovej platni urobili 13 ks 10 µl kvapiek, ktoré sme sušili 1 h pri 36 °C v sterilnom boxe s laminárnym prúdením. Získali sme pelety obsahujúce 1.5 µg sunitinibu / peletu (**S1.5**). Pelety sme aplikovali na 10 embryí. Zo zvyšného roztoku **S1.5** sme odobrali 200 µl (30 000 ng / 200 µl), zriedili ho so 67 µl 1 % MECu (30 000 ng / 267 µl = 112 ng / µl) a z tohto roztoku urobili 13 ks 10 µl peliet s obsahom 1.1 µg sunitinibu / peletu (**S1.1**). Vysušené pelety sme aplikovali na 10 embryí. Z roztoku (**S1.5**) sme nakoniec odobrali 100 µl (15 000 ng / 100 µl), zriedili ich 300 µl 1 % MECu (15 000 ng / 400 µl = 38 ng / µl) a urobili sme 13 ks 10 µl peliet obsahujúcich 0.4 µg sunitinibu / peletu (**S0.4**). Tieto pelety sme aplikovali na 9 embryí. Na prípravu kontrólnych peliet sme použili priamo roztok 1 % MECu v PBS a z neho urobili 35 peliet každú z 10 µl tohto roztoku spôsobom uvedeným vyššie.

Po 48 h inkubácie embryí so sunitinibom nedochádzalo k výraznému úhynu embryí, čiže látka pri danej koncentrácii nie je pre embryo toxická. Inhibičná aktivita (PAZ) Sutentu so znižujúcou sa koncentráciou klesá. (Tabuľka 4)

	S1.5	S1.1	S0.4
	(sunitinib 1.5 µg / peletu)	(sunitinib 1.1 µg / peletu)	(sunitinib 0.4 µg / peletu)
Počet embryí na exp.:	10	10	9
Úhyn _{48h} [%]:	0	10	11
PAZ [%]:	3.5	1.9	1.4

Tabul'ka 4: Vyhodnotenie experimentu so Sutentom.

Tento experiment ukázal, že Sutent obsiahnutý v 1 % MEC pelete inhibuje novotvorbu ciev a veľkosť PAZ závisí od jeho koncentrácie. Obsah 1.5 µg sunitinibu z tabletky Sutentu v 1 % MEC pelete bol najlepšie pozorovateľný, pričom úhyn embryí bol nízky. DMSO nebolo treba použiť vzhľadom na dostatočnú rozpustnosť Sutentu pri prípave peliet v 1% MEC PBS roztoku. Pokiaľ sme použili viac ako 2.5 µg sunitinibu z tabletky Sutentu dochádzalo k zvýšenému úhynu embryí.

b) sunitinib – voľná báza lieku Sutent

Od výrobcu dodaného Sutentu (sunitinib L-malát, *Pfizer*) sme izolovali jeho bázu sunitinib po rozpustení lieku v EA a jeho extrakcii s roztokom Na₂CO₃. Následne sme organickú fázu extrahovali s vodou, oddelili, vysušili státím nad MgSO₄ a prchavé podiely odstránili pomocou RVO za vákua. Zvyšok sme dosušili pomocou HV. Získanú bázu sme identifikovali pomocou ¹H-NMR(CDCl₃) a použili do CAM experimentov.

V termostate sme nechali inkubovať 162 oplodnených vajec (100 %) pri teplote 37.8 °C a vlhkosti 60-70 %. Po 54 h (E2.25, 2.25 dňové embryá) sa nám podarilo v sterilnom boxe s laminárnym prúdením vyklopiť do 6-jamkových plastových plátov 114 vajec (70 %). Tieto sme umiestnili do ďalšieho sterilného termostatu a nechali ich inkubovať pri tých istých podmienkach. Po nasledovných 79 h inkubácie (E5.5), keď mal CAM v priemere 1.0 -1.5 cm, sme aplikovali sunitinib v 1 % MEC pelete na celkovo 81 vhodných embryí (50 %). Pelety so vzorkou sme umiestnili uprostred vyvíjajúceho sa CAMu a nechali ich ďalej inkubovať za tých istých podmienok. Následne sme embryá fotografovali po 48 h inkubácie. Pri vyhodnotení avaskulárnych zón sme po 48 h pod každý CAM aplikovali ca 1.5 ml intralipózy.

Na experiment sme pripravili pelety z 1 % MEC s koncentráciou 2.0 µg látky / peletu. Nakoľko samotná báza Sutentu je menej rozpustná v 1 % MECu ako jej pôvodná soľ, pri zarábaní roztokov sme kvôli rozpustnosti použili DMSO. Nakoľko sme chceli vedieť vplyv DMSO, použili sme aj jeho rôzny obsah v peletách.

Do plastovej nádobky sme navážili 0.3 mg bázy sunitinibu, k nej sme pridali 15 μ l DMSO a za miešania sme postupne pridávali 1 485 μ l 1 % MECu (c = 200 ng / μ l). Z tohto roztoku sme urobili 20 ks 10 μ l peliet každá s obsahom 2.0 μ g sunitinibu / peletu s 1.0% DMSO (**B1**). Podobne sme postupovali aj pri príprave ostatných peliet. Menili sme len objemy DMSO a 1% MECu v PBS, pričom koncentrácia látky zostala zachovaná (2.0 μ g / peletu).

B.5 (0.5 % DMSO): 0.3 mg bázy, 7.5 mcL DMSO, 1493 μl 1% MEC
B.4 (0.4 % DMSO): 0.3 mg bázy, 6.0 mcL DMSO, 1494 μl 1% MEC
B.3 (0.3 % DMSO): 0.3 mg bázy, 4.5 mcL DMSO, 1496 μl 1% MEC
B.2 (0.2 % DMSO): 0.3 mg bázy, 3.0 mcL DMSO, 1497 μl 1% MEC
B.1 (0.1 % DMSO): 0.3 mg bázy, 1.5 mcL DMSO, 1499 μl 1% MEC
B.0 (bez DMSO): 0.3 mg bázy, 0.0 mcL DMSO, 1500 μl 1% MEC

	Kon	Konštantná koncentrácia 2 µg bázy sunitinibu / peletu						
Počet embryí na exp.:	15	14	15	14	15	14	12	
	B1	B.5	B.4	B.3	B.2	B.1	B.0	
Obsah DMSO [%]:	1.0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	
Úhyn _{48h} [%]:	93	36	33	50	20	21	33	
PAZ [%]:	toxic	2.8	2.7	3.0	3.1	3.9	3.1	

Tabuľka 5: Vyhodnotenie experimentu so sunitinibom – izolovanou bázou Sutentu

V prípade čistého sunitinibu (báza lieku Sutent) sme pozorovali dobrý antiangiogénny efekt v pelete z 1 % MECu s obsahom < 0.5 % DMSO. Pokiaľ bol obsah DMSO 1 % prejavila sa zvýšená rýchlosť uvoľňovania bázy, čo spôsobilo po 48 h vysoký úhyn embryí (93%). Najlepšiu inhibičnú aktivitu sme pozorovali vtedy, keď bol obsah DMSO 0.1 %. V tomto prípade sa potvrdilo, že na pozorovanie maximálneho antiangiogénneho efektu (plocha avaskulárnej zóny) je potrebný aj optimálny obsah DMSO. (Tabuľka 5)

c) Nexavar – lieková forma

V termostate sme nechali inkubovať čerstvo oplodnené vajcia pri teplote 37.8 °C a vlhkosti 60 – 70 %. Po 54 h (E2.25, 2.25 dňové embryá) sme v sterilnom boxe vajcia vyklopili do 6-jamkových plastových plátov s vrchnákom. Pláty sme umiestnili do ďalšieho sterilného predhriateho termostatu a nechali ich inkubovať pri tých istých podmienkach. Po ďalších 79 h inkubácie (E5.5) sme na embryá aplikovali peletu z 1 % MEC obsahujúcu Nexavar, ako aj kontrólne pelety a embryá nechali ďalej inkubovať. Embryá sme fotografovali po 48 h inkubácie po nastreknutí intralipózy pod CAM memebránu. Výsledok sme vyhodnotili počítačom tak, že sme zistili plochu priemernej avaskulárnej zóny v každom experimente a tieto navzájom porovnali.

Navážili sme 2.0 mg materiálu z rozdrvenej tablety Nexavaru (od firmy *Bayer*), pričom 1.66 mg tablety obsahuje 1.00 mg aktívneho sorafenibu, resp. 1.37 mg soli sorafenib tozylátu. K 2.0 mg naváženého materiálu z tablety (obsahuje 1 204 820 ng sorafenibu) sme pridali 3.0 ml 1% MEC (c = 402 ng sorafenibu z tabelty Nexavaru, resp 487 ng sorafenib tozylátu / μ l) a dobre zhomogenizovali, nakoľko sorafenib nie je úplne rozpustný v samotnom 1 % MECu. Z tejto zmesi sme urobili 20 ks 10 μ l peliet (4.0 μ g / peletu = MN4). Vysušené pelety sme aplikovali na 13 embryí. Zo zvyšného roztoku MN4 sme odobrali 1.0 ml, zriedili ho s 333 μ l 1 % MECu a z tohto roztoku (301.6 ng / μ l) urobili 20 ks 10 μ l peliet (3.0 μ g / peletu = MN3). Aplikovali sme ich na 12 embryí. Z roztoku MN4 sme nakoniec odobrali 600 μ l, zriedili so 600 μ l 1 % MECu (c = 201 ng / μ l) a urobili sme 20 ks 10 mcL peliet (2.0 μ g / peletu = MN2). Tieto sme aplikovali na 18 embryí.

Po 48 h inkubácii embryí so sorafenib tozylátom nedochádzalo k výraznému úhynu embryí. Hodnoty PAZ sú podobné, čiže sorafenib tozylát má v rozmedzí 2-4 µg veľmi dobre pozorovateľný efekt. (Tabuľka 6)

	MN4	MN3	MN2
	(sorafenib 4.0 µg / peletu)	(sorafenib 3.0 µg / peletu)	(sorafenib 2.0 µg / peletu)
Počet embryí na exp.:	13	12	18
Úhyn _{48h} [%]:	13	20	5
PAZ [%]:	2.6	3.0	2.7

Tabul'ka 6: Vyhodnotenie experimentu s Nexavarom.

Hoci sorafenib tozylát nie je úplne rozpustný v 1% MEC v PBS, zistili sme, že nie je potrebné DMSO, lebo efekt je výrazný pri koncentáciách 2-4 µg sorabenibu aj bez neho. Najvýraznejší antiangiogénny efekt sme pozorovali pri 3 µg sorafenib tozylátu (PAZ 3.0). (Tabuľka 6)

d) Sorafenib – izolovaná báza z tabletky Nexavaru

V termostate sme nechali inkubovať 142 vajec (100 %) pri teplote 37.8 °C a vlhkosti 60 - 70 %. Po 54 h (E2.25, 2.25 dňové embryá) sme v sterilnom boxe s laminárnym prúdením vyklopili 114 vajec (80 %) do 6-jamkových plastových plátov s vrchnákom. Pláty sme opäť umiestnili do termostatu a nechali inkubovať pri tých istých podmienkach. Po ďalších 79 h inkubácie (E5.5), keď mal CAM v priemere 1.0 - 1.5 cm, sme na jeho povrch aplikovali vzorku látky v 1 % MEC pelete na celkovo 87 embryí (61 %). Pelety so vzorkami sme umiestnili uprostred vyvíjajúceho sa CAMu a nechali embryá ďalej inkubovať. Po 48 h od inkubácie sme aplikovali pod CAM intralipózu a potom sme každé embryo 2 x vyfotili. Vyhodnotenie sme uskutočnili podobne ako v predošlých prípadoch pomocou *software ImageJ*.

Z komerčne dostupného Nexavaru (fy *Bayer*), obsahujúceho sorafenib tozylát, sme bázickou extrakciou v EA izolovali voľnú bázu sorafenib (postup ako pri izolácii sunitinibu zo Sutentu). Z izolovaného sorafenibu sme navážili 0.3 mg a pridali sme k nemu 3.8 µl DMSO, k takto pripravenému roztoku sme za stáleho miešania postupne pridávali 746 µl 1 % MECu (c = 400 ng bázy / 1 µl). Z tohto roztoku sme urobili 21 ks 10 µl peliet (4.0 µg / peletu s obsahom 0.51 % DMSO = **4B5**). Ostatné koncentrácie DMSO v pelete sme získali s rôznym prídavom DMSO ako aj rôznym objemom 1 % MEC v PBS (viď text nižšie). Vysušené pelety sme následne aplikovali na inkubované embryá (E5.5).

4B5 (0.51% DMSO): 0.3 mg bázy, 3.8 μl DMSO, 746 μl 1 % MEC v PBS **4B2** (0.21% DMSO): 0.3 mg bázy, 1.6 μl DMSO, 748 μl 1 % MEC v PBS **4B1** (0.11% DMSO): 0.3 mg bázy, 0.8 μl DMSO, 749 μl 1 % MEC v PBS **4B0** (0.07% DMSO): 0.3 mg bázy, 0.5 μl DMSO, 750 μl 1 % MEC v PBS

Opäť sa potvrdilo, že na najlepšie pozorovateľný efekt je potrebné len malé množstvo DMSO (0.11 %) s PAZ 4.1. V tomto experimente sme zaznamenali zvýšený úhyn embryí pri

vyššom obsahu DMSO (0.51 %), ale aj takmer pri jeho nulovom obsahu (0.07 %). (Tabuľka 7)

	4 μg sorafenibu / peletu						
Počet embryí na exp.:	17	18	18	16			
	4B5	4B2	4B1	4B0			
Obsah DMSO [%]:	0.51	0.21	0.11	0.07			
Úhyn _{48h} [%]:	47	22	17	44			
PAZ [%]:	1.1	2.2	4.1	1.4			

Tabul'ka7: Vyhodnotenie experimentu so sorafenibom – izolovanou bázou Nexavaru.

Z množstva uskutočnených experimentov možno zhrnúť, že na CAM teste v tomto usporiadaní je vzťah medzi PAZ a vizuálnou aktivitou nasledovný:

Tabuľka 8: Pozorovaná inhibičná aktivita v závislosti od PAZ

PAZ: 0.6 – 1.5	aktivita je slabá
PAZ: 1.6 – 2.5	aktivitu vidno
PAZ: 2.6 – 4.6	aktivita je dobre viditeľná
PAZ: > 4.7	aktivita je excelentná

Uvedené experimenty demonštrujú, že v prípade lepšie rozpustných inhibítorov ako sú napr. soli sunitinib L-malát (Sutent), resp. sorafenib tozylát (Nexavar) je možné pri ich koncentráciách 1-3 µg / peletu z 1 % MEC v PBS bez prídavku DMSO priamo pozorovať silný antiangiogénny účinok v uvedenom CAM experimente (1.5 µg aktívnej zložky zo sunitinib L-malátu (PAZ 3.5) a 3.0 µg aktívnej zložky zo sorafenib tozylátu (PAZ 3.0)). V tomto prípade sa javí Sutent oproti Nexavaru v CAM experimente ca 2 x aktívnejší.

V prípade **horšie rozpustných inhibítorov** napr. voľných báz sunitinib a sorafenib, ktoré sú aktívnou zložkou liečiv (Sutent, resp. Nexavar) a sú svojou chemickou podstatou bližšie organickým kandidátom na liečivá (t.j. nie sú vo forme soli) sme pozorovali, že na dosiahnutie dobrého vizuálneho antiangiogénneho účinku v CAM teste je potrebný malý 0.1 % prídavok DMSO v pelete, ktorý zabezpečí optimálne uvoľňovanie týchto horšie rozpustných inhibítorov. Silný antiangiogénny účinok v uvedenom CAM experimente (PAZ ca 4) sme dosiahli pri 2.0 µg sunitinibu resp. 4.0 µg sorafenibu za prítomnosti 0.1 % DMSO. Všimli sme si, že vizuálny efekt najmä v prípade sorafenibu je silne závislý od obsahu DMSO v pelete. Pokiaľ DMSO nebol prítomný v peletách PAZ poklesol na hodnoty 1.4 (sorafenib), resp. 3.0 (sunitinib). To znamená, že pri sorafenibe, inak silnom angiogénnom inhibítore bol vizuálny efekt slabý. Preto v snahe predísť falošne negatívnym výsledkom CAM testu pre organické zlúčeniny je v prípade nových látok treba optimalizovať obsah DMSO v pelete. V prípade sorafenibu stačilo, ak sme do pelety pridali 0.1 % obsah DMSO a antiangiogénny efekt bol veľmi dobre pozorovateľný. V prípade, že sme použili (v snahe o dosiahnutie dobrej rozpustnosti organických látok v zmesiach s vodu) vysoký obsah DMSO v pelete (napr 7.5 %), často aj pri silných inhibítoroch (sunitinib, sorafenib) sme nepozorovali dobrý vizuálny antiangiogénny efekt. Existuje preto na vhodné uvoľňovanie látky z MEC nosiča optimálna koncentrácia DMSO. Nové látky musia byť testované jednak na ich vhodnú koncentráciu do pelety, ako aj na obsah DMSO v MEC nosiči.

5.2.2 Analýza inhibítora 1Y6A

V pôvodnej literatúre, kde autori navrhli, optimalizovali a pripravili inhibítor **1Y6A** bola dokázaná priama interakcia tohto inhibítora s KDR proteínom pomocou röntgenoštruktúrnej analýzy (PDB: 1Y6A). Zistili, že samotný inhibítor vytvára s proteínom neväzbové interakcie pomocou vodíkových väzieb: HBA cez N z oxazolu a HBD pomocou NH skupiny s aminokyselinou Cys917 (NH, CO), ako aj HBA cez O etylsulfónovej skupiny s Asn921.¹

Nakoľko nás štruktúra a vlastnosti tohto inhibítora zaujali, uskutočnili sme analýzu jeho neväzbových interakcii s aminokyselinovými zvyškami VEGFR-2 proteínu pomocou programu *DS Viewer*. Potvrdili sme, že dusík z oxazolu a susedná ArNH skupina poskytujú HBA a HBD s Cys917 (-CON<u>H</u>- a C=<u>O</u>) a kyslík etylsulfónovej skupiny dáva HBA s Asp921(-CON⁺H₃). Ďalej sme zistili, že aromatické jadro v C(5) polohe oxazolu prispieva σ,π interakciou s Val846, samotný oxazol je v σ,π interakcii s metylovou skupinou Leu1033 a MeO- skupina poskytuje malú lipofilnú interakciu s Lys918. (Obr. 12)



Obr. 12: Vľavo komplex VEGFR-2 receptora s inhibítorom z databázy PDB: 1Y6A a analýza jeho interakcií s proteínom.

Z tejto detailnejšej analýzy nám vyplynulo, že v molekule sa nachádzajú aj voľné miesta vhodné pre ďalšie možné substitúcie, ktoré by otvárali nové možností prípravy derivátov tohto inhibítora 1Y6A. Vhodnou substitúciou je možné zaviesť také skupiny, ktoré by svojimi novými neväzbovými interakciami prispeli k vylepšeniu inhibičných vlastností.

5.2.3 Návrh nových O, N - inhibítorov odvodených od PDB: 1Y6A

Vychádzajúc z röntgeno-štruktúrnej analýzy komplexu PDB: 1Y6A inhibítora s VEGFR-2 proteínom a hľadania vhodnej substitúcie, sme objavili malé polárne vrecko v blízkosti benzénového jadra viazaného v C(5) polohe oxazolu, na ktoré sme navrhli nové substituenty tak, aby prídavnými interakciami vylepšili inhibičnú aktivitu derivátov 1Y6A. (Obr. 13)



Obr. 13: Inhibítor 1Y6A a analýza jeho interakcií s VEGFR-2 proteínom v blízkosti malého polárneho vrecka.

Pomocou molekulového modelovania (programom *DS Viewer*) sme navrhli zavedenie kyslíkatých subtituentov (-OH, -OMe, -OMeOMe, -OCOH a -OCONH₂) do *para* polohy na benzénovom jadre 1Y6A. Zistili sme však, že skupina OMeOMe je príliš objemná a koncová CH₃ už zasahuje hlboko do polárneho vrecka a zavadzia si tak s aminokyselinovými zvyškami. (Obr. 14)



Obr. 14: Interakcie navrhnutých derivátov inhibítora 1Y6A s VEGFR-2 proteínom v blízkosti malého polárneho vrecka.

Derivát *p*-HO-1Y6A významne prispieva HBA s Lys866(NH_3^+) a tiež možnou silnou iónovou interakciou fenolického iónu s týmto AMK zvyškom vďaka blízkemu pyridylu, ktorý dokáže urobiť intramolekulovú deprotekciu kyslého fenolického vodíka. Deriváty *p*-MeO-a *p*-MeOMeO-1Y6A prispievajú taktiež vodíkovou väzbou HBA s Lys866 a lipofilnou interakciou CH₃ skupín s aromatickým jadrom Phe1045. (Obr. 15)



Obr. 15: Predpokladané interakcie *para* substituovaných O-derivátov **1Y6A** s AMK zvyškami polárneho vrecka.

Keďže v prípade MOMO-derivátu podľa predikcie koncová -CH₃ skupina presahuje polárne vrecko a priestorovo si môže vadiť s fenylom z Phe1045, rozhodli sme sa navrhnúť podobné, ale menej objemné skupiny. Zavedením HCOO- skupiny a jej redukciou na
HOCH₂O- by sme získali analóg MOMO- skupiny, pričom H by nebol tak stéricky náročný ako je CH₃ skupina v MOMO. Skupiny -CHO aj -CONH₂ viazané cez kyslík na Ar jadro by mali poskytnúť HBA s Lys866(NH₃⁺). Amidická skupina -CONH₂ má potenciál poskytnúť aj HBD s Glu883(COO⁻).

Predpokladali sme však chemickú nestabilitu derivátov -CHO aj -CONH₂ viazané cez kyslík na aromatike. Preto kvôli vyššej stabilite sme sa rozhodli viazať tieto skupiny aj cez N v podobe ArNHCHO a ArNHCONH₂. Kyslík formylovej a amidickej skupiny by tak mohli poskytnúť HBA s Lys866(NH₃⁺) a OCONH₂ aj HBD s Glu883(COO⁻). (Obr. 16) Vplyvom bázických vlastnosti blízkej pyridylovej skupiny by mohlo dôjsť k odštiepeniu amidického vodíka a preferovania enolickej formy ArN=CHO⁻ aj ArN=CNH₂O⁻, čím by sa umožnila HBA a zároveň aj iónová interakcia s Lys866(NH₃⁺).



Obr. 16: Predpokladané interakcie *para* substituovaných N-derivátov 1Y6A s AMK zvyškami polárneho vrecka.

Výpočtami väzbových energií pomocou dokovacieho programu *Yassara (Autodock 4)* sme získali poradie najvhodnejších *para* substituovaných derivátov 1Y6A. Energeticky najvýhodnejším by mal byť –OMe (-58.66 kcal/mol) a –OH derivát (-57.32 kcal/mol), najmenej výhodný –OMOM (-52.62 kcal/mol) kvôli predpokladaným stérickym problémom v porovnaní so samotnémým inhibítorom 1Y6A (-53.57 kcal/mol). (Obr. 17)



Obr. 17: Prediktívne poradie a hodnoty väzobnej energie získané po zadokovaní O-derivátov do VEGFR-2 receptora.

Pri dusíkatých derivátoch najlepším bol -NHCONH₂ (-57.1 kcal/mol), -NHCHO (-55.2 kcal/mol) a nakoniec nie veľmi výhodný NH₂ derivát (-50.6 kcal/mol) v porovnaní s pôvodným 1Y6A (-53.57 kcal/mol). (Obr. 18)



Obr. 18: Prediktívne poradie a hodnoty väzobnej energie získané po zadokovaní N-derivátov do VEGFR-2 receptora.

5.2.4 Oxo-inhibítory VEGFR-2 receptora

a) Syntéza alfa-azidocetofenónových prekurzorov

• Príprava 2-bróm-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanónu (9)



K roztoku 4-hydroxyacetofenónu **8** 10.00 g (73.40 mmol; 1.00 mol ekv) v 100 ml zmesi CHCl₃ / MeOH (85:15) sme prikvapkávali bróm 8.00 ml (156.10 mmol; 2.10 mol ekv) ako roztok v 100 ml zmesi CHCl₃ / MeOH (85:15) pri teplote -30 °C (EA/ N₂ (l)) počas 3.5 h pod Ar. Reakčnú zmes sme nechali miešať cez noc, kedy teplota vystúpila na +10 °C. Rozpúšťadlá sme odparili pomocou RVO, zvyšok sme opätovne rozpustili v CHCl₃ (100 ml) a extrahovali s H₂O (3 x 50 ml). Počas extrakcie sme na stenách deliaceho lievika pozorovali bielu zrazeninu, ktorú sme rozpustili v EA a pridali k roztoku CHCl₃. Zmiešané organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, prefiltrovali, rozpúšťadlá odparili pomocou RVO.

Surový produkt sme kryštalizovali zo zmesi H / EA 1/1 (2 x) a získali sme 12.9 g (43.80 mmol, 59.8 %) tmavofialovej kryštalickej látky.

2-Bróm-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanón (9): Tt: 144.0-145.3 °C [H / EA]²³

¹**H NMR** (300MHz, **DMSO-***d*₆, LK-65-07K3): δ 11.44 (br s, 1H, OH), 8.15 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.88 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.6 Hz, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 7.07 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.6 Hz, H-C(5)), 4.84 (s, 2H, -COCH₂-). ¹**H NMR** (300MHz, **CDCl**₃): δ 8.17 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.89 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)), 7.11 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 6.18 (br s, 1H, OH), 4.37 (s, 2H, COCH₂).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3344 (s, OH), 3089 (w), 2943 (w), 1672 (s, C=O), 1592 (s), 1566 (s), 1509 (m), 1420 (w), 1352 (w), 1270 (s), 1191 (s), 1041 (m), 1014 (m), 909 (w), 824 (m), 767 (w), 665 (m).

• Príprava 2-azido-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanonónu (10)



K zmesi 2-bróm-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanónu **9** 1.00 g (3.40 mmol, 1.00 mol ekv) a NaN₃ 280.0 mg (4.40 mmol, 1.30 mol ekv) sme pridali DMSO abs (10 ml). Reakčnú

zmes sme nechali miešať pod Ar pri rt cez noc. Potom sme k nej pridali H₂O (100 mL) a extrahovali EA (3 x 50 ml). Spojené EA vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl (3 x 50 ml), organickú fázu oddelili, vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a stopy prchavých podielov odstránili pomocou HV. Surový produkt **10** sme prečistili trituráciou s Et₂O (odstránenie stôp DMSO) a získali sme tehlovočervenú kryštalickú látku (0.83 g, 3.20 mmol, 95.3 %).

2-Azido-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanón (10): Tt: 124.5-127.5 °C [triturované Et₂O]. **Elem. Anal.** vypoč. C₈H₆BrN₃O₂ (256.06): C, 37.53; H, 2.36; Br, 31.21; N, 16.41. Získané: C, 37.28; H, 2.44; Br, 31.56; N, 16.39 %.

¹**H NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-146-09): δ 11.43 (br s, 1H, OH), 8.07 (d, 1H, J(2,6) =DMSO-d₆ 2.2 Hz, H-C(2)), 7.81 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.2 Hz, H-0 127.7 C(6), 7.05 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 4.80 (s, 2H, COCH₂). 116.9 193.0 55.0 ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-146-09C2): 193.0 (C=O), 160.0 134.0 HO 160.0 110.8 Br (C4-O), 134.0 (C2), 130.3 (C1), 127.7 (C6), 116.9 (C5), 110.8 (C3), LK-146-09C2 55.0 (CH₂N₃).





FT IR (solid, cm⁻¹): 3151 (s, OH), 2959 (m), 2928 (m), 2896 (m), 2110 (s, N₃), 1725 (m), 1675 (s, C=O), 1593 (s), 1506 (m), 1410 (m), 1350 (m), 1298 (s), 1213 (s), 1124 (m), 1072 (m), 1040 (m), 951 (m), 900 (m), 816 (m), 744 (m), 674 (m).

• Príprava 2-azido-1-(3-bróm-4-(metoxymetyloxy)fenyl)etanónu (11)



Ku zmesi hydroxyazidu **10** 830.0 mg (3.20 mmol, 1.00 mol ekv) a K₂CO₃ 580.0 mg (4.20 mmol, 1.30 mol ekv) v acetóne abs (20 mL) sme prikvapkávali chlór(metoxy)metán 0.32 ml (0.34 g, 4.20 mmol, 1.30 mol ekv) pri rt pod Ar. Reakčnú zmes sme nechali miešať pri rt počas 30 min, následne sme prchavé látky odparili pomocou RVO, k surovému produktu sme pridali H₂O (50 ml) a zmes extrahovali EA (3 x 20 mL). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, EA odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 890.0 mg (3.00 mmol, 92.7 %) žltej kryštalickej látky. Produkt sme použili do nasledujúcej reakcie bez ďalšieho čistenia (v niektorých prípadoch sme použili na čistenie FLC (SiO₂, H / EA 2/1)).

2-Azido-1-(3-bróm-4-(metoxymetyloxy)-fenyl)etanón (11): Tt: 74.2-75.0 °C [FLC]. **Elem. Anal.** vypoč. C₁₀H₁₀BrN₃O₃ (300.11): C, 40.02; H, 3.36; Br, 26.63. Získané: C, 40.30; H, 3.51; Br, 26.79.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-147-09): δ 8.15 (d, 1H, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.94 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 7.34 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 5.42

(s, 2H, OCH₂O), 4.86 (s, 2H, COCH₂), 3.41 (s, 3H, OCH₃). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-147-09C): 192.2 (C=O), 157.1 (C4-O), 132.9 (C2), 129.2 (C1), 129.1 (C6), 115.2 (C5), 111.9 (C3), 94.4 (OCH₂O), 56.1 (CH₂N₃), 54.4 (OCH₃).





FT IR (solid, cm⁻¹): 3073 (w), 2959 (m), 2930 (m), 2103 (m, N₃), 1684 (s, C=O), 1593 (s), 1492 (s), 1441 (m), 1251 (s), 1201 (s), 1144 (s), 1082 (s), 1042 (s), 973 (s), 824 (m), 766 (m), 680 (m).

• Príprava 1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanónu (13)



Zmes LiClO₄ abs 4.55 g (42.80 mmol, 2.00 mol ekv) v Ac₂O 2.0 ml (2.32 g, 22.50 mmol, 1.05 mol ekv) sme miešali pod Ar pri 60 °C cez noc. Po ochladení sme k zmesi prikvapkávali za stáleho miešania 1-bróm-2-metoxybenzén **12** 2.7 ml (4.00 g, 21.50 mmol, 1.00 mol ekv) a následne sme reakčnú zmes zahrievali pri 100 °C počas 72 h. Po ochladení sme k zmesi pridali EA (100 ml) a extrahovali nasýteným roztokom K₂CO₃ (50 ml) a H₂O (3 x 50 ml). Organickú vrstvu sme vysušlili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, EA odparili pomocou RVO a zvyšok sme dosušili pomocou HV. Získali sme 3.64 g (15.9 mmol, 73.9 %) svetlohnedej kryštalickej látky.

1-(3-Bróm-4-metoxyfenyl)etanón (13): Tt: 78.7-81.3 °C [triturované Et₂O] (lit. 84-85 °C [petroléter]⁶⁴)

⁶⁴ Marsi, L. K.; Oberlander, E.J. J. Chem. Soc. 1973, 1, 202-204.

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-AC-27-09): δ 8.17 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.92 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 6.94 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 2.56 (s, 3H, COCH₃).⁶⁵



• Príprava 2-bróm-1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanónu (14)



K roztoku metoxybrómacetofenónu **13** 1.00 g (4.40 mmol, 1.00 mol ekv) v CCl₄ (12 ml) sme za chladenia (0 °C) prikvapkávali Br₂ 290.0 μ l (910.0 mg, 5.70 mmol, 1.30 mol ekv) počas 30 min. Následne sme reakčnú zmes refluxovali 2 h a nakoniec pri rt nechali miešať cez noc. Prchavé látky sme odparili pomocou RVO, zvyšok rozpustili v EA (50 ml) a extrahovali nasýteným roztokom K₂CO₃ (30 ml) a H₂O (3 x 20 ml). Organickú vrstvu sme vysušlili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, EA odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali 1.15 g (3.70 mmol, 84.9 %) hnedej kryštalickej látky.

2-Bróm-1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanón (14): Tt: 106.7 - 107.7 °C [trit. Et₂O] (lit. 108 – 110 °C)⁶⁶



¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-163-09): δ 8.19 (d, 1H, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.95 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 6.96 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 4.38 (s, 2H, COCH₂), 3.98 (s, 3H, OCH₃).⁶⁷

• Príprava 2-azido-1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanónu (15)



Reakciu sme uskutočnili z 430.0 mg (1.40 mmol, 1.30 mol ekv) dibrómmetoxyacetofenónu **14**. Postup sme použili ako je uvedené vyššie pre prípravu 2-azido-1-(3-bróm-4hydroxyfenyl)etanónu (**15**). Získali sme 330.0 mg (1.20 mmol, 87.3 %) oranžovej kryštalickej látky.

2-Azido-1-(3-bróm-4-methoxyfenyl)etanonón (15): Tt: 98.5 – 101.0 °C [FLC] (známa látka, ale v databáze *Reaxys* nie je uvedená ani Tt ani spektrá)⁶⁸

Elem. Anal. vypoč. C₉H₈BrN₃O₂ (270.08): C, 40.02; H, 2.99; Br, 29.59. Získané: C, 40.31; H, 3.16; Br, 29.35.

¹**H NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK=165-09): δ 8.12 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.87 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 6.96 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 4.50 (s, 2H, COCH₂), 3.98 (s, 3H, OCH₃). ¹³**C-NMR** (75 MHz, CDCl₃, LK-XX1C): 190.8 (C=O), 160.4 (C4-O), 133.5 (C2), 129.2 (C1), 128.3 (C6), 112.4 (C5), 111.4 (C3), 56.6 (OCH₃), 54.6 (CH₂N₃).

⁶⁷ Yagoub, A. K.; Iskander, G. M. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: Org. and Bioorg. Chem., **1980**, 2405 – 2407.

⁶⁸ Yadav, J. S.; Reddy, P. T.; Hashim, S. R. Synlett, 2000, 7, 1049–1051.



FT IR (solid, cm⁻¹): 2928 (m), 2848 (m), 2107 (m, N₃), 1668 (s, C=O), 1591 (s), 1496 (s), 1430 (m), 1305 (m), 1264 (s), 1151 (m), 1052 (s), 1015 (s), 900 (w), 816 (m), 764 (m), 683 (m).

b) Syntéza navrhnutých zlúčenín obsahujúcich oxazolový heterocyklus

• Príprava izokyanátového prekurzoru (20)

Syntéza 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyanilínu (19)



5-(Etylsulfonyl)-2-metoxyanilín (19) sme pripravili z komerčne dostupného 2amino-4-(etylsulfonyl)fenolu 16 v troch stupňoch (N-acylácia (17), O-metylácia (18), Ndeacylácia (19)) s celkovým výťažkom 80 %.⁶⁹

⁶⁹ Pripravené podľa postupu opísaného v diplomovej práci Mgr. Lucie Lintnerovej 2008, Bratislava, PRIF UK.

Tt: 102-103 °C; ¹**H** NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , MM-79A2-08): δ 7.08 (d, 1H, J(4,6) = 1.9 Hz, H-C(6)), 7.00 (d, 1H, J(4,6) = 1.9 Hz, H-C(4)), 6.99 (s, 1H, H-C(3)), 5.26 (s, 2H, NH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.11 (q, 2H, $J(CH_2, CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.07 (t, 3H, $J(CH_3, CH_2) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂CH₂). ¹**H** NMR (300 MHz, CDCl₃, MM-211A-10): δ 7.27

(d, 1H, J(3,4) = 8.5 Hz, J(4,6) = 2.2 Hz, H-C(4)), 7.17 (d, 1H, J(4,6) = 2.2Hz, H-C(6)), 6.87 (d, 1H, J(3,4) = 2.2 Hz, H-C(3)), 4.05 (br s, 2H, NH₂), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.07 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.25 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , MM-186c-10): 149.8 (C2-O), 138.4 (C1-N), 130.0 (C5), 116.2, 111.4 and 109.9 (C3, C4, C6), 55.6 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂), 7.4 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).





FT IR (solid, cm⁻¹): 3459 (m, NH₂), 3080 (w), 2944 (m), 2843 (w), 1616 (m), 1579 (m), 1505 (m), 1458 (m), 1426 (m), 1288 (s), 1229 (m), 1139 (s), 1075 (m), 1047 (m), 1019 (m), 920 (w), 875 (m), 819 (m), 720 (s).

Syntéza 4-(etylsulfonyl)-2-izokyanáto-1-metoxybenzénu (20)



K ľadom vychladenému roztoku 20 % COCl₂ v toluéne 8.0 ml (10.5 mmol, 3.20 mol ekv) sme prikvapkávali počas 30 min 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyanilín (**19**) 1.00 g (4.6 mmol, 1.00 mol ekv) rozpustený v EA abs (10 ml). Následne sme reakčnú zmes relfuxovali počas 3

h. Potom sme odparili EA aj prebytočný fosgén pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 1.09 g (4.50 mmol, 98.2%) hnedej kryštalickej látky. Produkt, je citlivý na vlhkosť, a preto sme ho použili do nasledujúcej reakcie bez ďalšieho čistenia (čistotu látky sme potvrdili pomocou NMR).

4-(Etylsulfonyl)-2-izokyanáto-1-metoxybenzén (20): Tt: 101.8-104.3 °C

Elem. Anal. vypoč. C₁₀H₁₁NO₄S (241.26): C, 49.78; H, 4.60; S, 13.29. Získané: C, 50.35; H, 4.17; S, 12.86.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-151-09): δ 7.74 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(3,5) = 2.3 Hz H-C(5)), 7.53 (d, 1H, *J*(3,5) = 2.3 Hz, H-C(3)), 7.37 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(6)), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂), 1.08 (t, 3H, J(CH₃,CH₂) = 7.4 Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>). ¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-IZOK): δ 7.71 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz,

 $J(3,5) = 2.3 \text{ Hz, H-C}(5)), 7.52 \text{ (d, 1H, } J(3,5) = 2.3 \text{ Hz, H-C}(3)), 7.03 \text{ (d, 1H, } J(5,6) = 8.7 \text{ Hz, H-C}(6)), 4.04 \text{ (s, 3H, OCH}_3), 3.09 \text{ (q, 2H, } J(CH_2,CH_3) = 7.4 \text{ Hz, SO}_2CH_2), 1.26 \text{ (t, 3H, } J(CH_3,CH_2) = 7.4 \text{ Hz, SO}_2CH_2\underline{CH}_3).^{13}C-NMR \text{ (DMSO-}d_6, \text{ LK-IZOK3C}): 152.3 \text{ (N=C=O), } 151.5 \text{ (C1-O), } 130.0 \text{ (C2-N), } 129.0 \text{ (C4), } 122.5 \text{ (C5), } 117.3 \text{ (C3), } 110.8 \text{ (C6), } 56.3 \text{ (OCH}_3), 49.6 \text{ (SO}_2CH_2), 7.3 \text{ (SO}_2CH_2\underline{CH}_3).$





FT IR (solid, cm⁻¹): 3072 (w), 2987 (w), 2232 (s, N=C=O), 1597 (w), 1512 (m), 1460 (m), 1298 (m), 1260 (m), 1130 (m), 1082 (m), 1020 (m), 880 (w), 821 (m), 738 (m), 662 (w).



• Príprava p-MeO- (21a) a p-MOMO- (22a) derivátov arylamino-2-aryloxazolov

K zmesi polymérneho pPPh₃ (781.3 mg, 1.25 mmol, 1.50 mol ekv) a izokyanátu **20** (200.3 mg, 0.83 mmol, 1.00 mol ekv) v CH₂Cl₂ abs (10 ml) sme za chladenia (0 °C, ľadový kúpeľ) prikvapkávali počas 1 h 4-substituovaný 2-azido-1-(3-brómfenyl)etanón (**15** alebo **11**) (0.83 mmol, 1.00 mol ekv) rozpustený v CH₂Cl₂ abs (5 ml). Reakčnú zmes sme nechali miešať cez noc, pričom teplota vystúpila na rt. Polymérny PPh₃O sme zo zmesi odfiltrovali, premyli EA a filtrát sme odparili pomocou RVO a HV. Surovú zmes sme čistili pomocou stĺpcovej chromatografie na SiO₂ s eluentom H / EA (1/1), pričom sme získali požadované produkty oxazol-2-amíny (**21a** alebo **22a**) ako aj príslušné polárnejšie močovinové deriváty (**21b** alebo **22b**). (Tabuľka 9)

R	Oxazolový derivát	Močovinový derivát
	(%)	(%)
Me	11	63
MOM	34	28

Tabuľka 9: Výťažky oxazolových (21a a 22a) a močovinových derivátov (21b a 22b)

5-(3-Bróm-4-(metoxy)fenyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amín (21a) Biela kryštalická látka 175.0 mg (0.37 mmol, 63.4 %), Tt: 85.0 - 87.0 °C [FLC: SiO₂, H / EA 1/1].

Elem. Anal. vypoč. C₁₉H₁₉BrN₂O₅S (467.33): C, 48.83; H, 4.10; Br, 17.10; S, 6.86. Získané: C, 48.55; H, 4.30; Br, 17.25; S, 6.57.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-166-09F2): δ 9.79 (br s, 1H, NH), 8.84 (d, 1H, *J*(4',6') = 2.2 Hz, H-C(6')), 7.92 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.66 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)), 7.56 (s, 1H, H-C(oxazol)), 7.55 (dd, 1H, *J*(3',4') = 8.7 Hz, *J*(4',6') = 2.2 Hz, H-C(4')), 7.33 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.28 (d, 1H, *J*(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.26 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.3, SO₂CH₂), 1.18 (t, 3H, *J*(CH₃,CH₂) = 7.3, SO₂CH₂<u>CH₃</u>).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , LK-166-09F2C): 155.7 (C2°), 154.6 (C4-O), 151.5 (C2′), 142.8 (C5°), 130.1 (C1′), 128.8 (C5′), 127.3 (C2), 123.5 (C1 alebo C6), 122.3 a 122.1 (C4′ alebo C4°), 121.7 (C1 alebo C6), 115.6 (C6′), 113.3 (C5),

111.3 (C3), 110.9 (C3'), 56.4 a 56.3 (2 x OCH₃), 49.8 (SO₂CH₂), 7.4 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

FT IR (solid, cm⁻¹): 2925 (m), 1728 (w), 1621 (m), 1579 (m), 1494 (s), 1437 (w), 1368 (w), 1307 (m), 1262 (s), 1124 (s), 1089 (m), 1047 (m), 1017 (m), 929 (w), 796 (m), 735 (m), 683 (w).

5-(3-Bróm-4-(metoxymetyloxy)fenyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amín

(22a) Biela kryštalická látka 132.0 mg (0.27 mmol, 32.0 %), Tt: 176.0 - 178.0 °C [FLC].
Elem. Anal. vypoč. C₂₀H₂₁BrN₂O₆S (497.36): C, 48.30; H, 4.26; Br, 16.07; S, 6.45. Získané: C, 48.15; H, 4.45; Br, 16.22; S, 6.72.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-148-09F1): δ 9.75 (br s, 1H, NH), 8.78 (d, 1H, *J*(4',6') = 2.2 Hz, H-C(6')), 7.87 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.57 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)), 7.52 (s, 1H, H-(C-ox)), 7.50

(dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(4')), 7.30 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.27 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 5.33 (s, 2H, OCH₂O), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.43 (s, 3H, CH₂O<u>CH₃</u>), 3.20 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$, SO₂CH₂), 1.12 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$, SO₂CH₂<u>CH₃</u>).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-148-09F1C): 155.7 (C2°), 152.0 (C4-O), 151.3 (C2′), 142.6 (C5°), 130.0 (C1′), 128.6 (C5′), 127.1 (C2), 123.2 a 123.1 (C6 alebo C1), 122.2 a 122.0 (C4′ alebo C4°), 116.6 (C5),

115.5 (C6'), 112.5 (C3), 110.7 (C3'), 94.5 (OCH₂O), 56.2 (OCH₃), 55.9 (CH₂O<u>CH₃</u>), 49.6 (SO₂CH₂), 7.3 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3393 (m, NH), 3072 (w), 2945 (w), 2844 (w), 1618 (s), 1579 (s), 1524 (m), 1486 (s), 1431 (m), 1344 (w), 1302 (m), 1264 (s), 1140 (s), 1123 (s), 1077 (m), 1039 (m), 979 (m), 918 (w), 826 (w), 716 (m), 681 (w).

1-(2-(3-Bróm-4-metoxyfenyl)-2-oxoetyl)-3-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)močovina

(21b) Žltá kryštalická látka, Tt: 171.0 - 176.0 °C [FLC: SiO₂, H / EA 1/1].

Elem. Anal. vypoč. C₁₉H₂₁BrN₂O₆S (485.35): C, 47.02; H, 4.36; Br, 16.46; S, 6.61. Získané: C, 46.86; H, 4.23; Br, 16.57; S, 6.84.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-166-09): δ 8.68 (br s, 1H, NH), 8.64 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.17 (d, 1H, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 8.05 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)),

7.43 (t, 1H, $J(NH,CH_2) = 5.3$ Hz, NH), 7.42 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(4')), 7.27 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.22 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 4.76 (d, 2H, $J(CH_2,NH) = 5.3$ Hz, $CO\underline{CH_2}NH$), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂), 1.08 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂CH₃);





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-166-09C): 193.7 (CH₂C=O), 159.4 (C4-O), 155.1 (NH-C=O), 151.0 (C2'), 132.5 (C2), 130.0, 129.9 (C1' alebo C1), 129.6 (C6), 128.9 (C5'), 121.6 (C4'), 116.6 (C6'), 112.5 (C5),

111.0 (C3), 110.6 (C3'), 56.8 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 49.7 (SO₂CH₂), 46.4 (C=O<u>CH₂</u>), 7.4 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

MS1: 485.0166 **[M-H]**⁻. **MS2** (485.0166): 485.0166(m); 452.9923(w); 269.9574(s); 239.0485(m); 210.0087(w). **MS3** (269.9574):254.9357(w).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3353 (br), 2939 (w), 2844 (w), 1684 (w), 1662 (m), 1592 (m), 1538 (m), 1496 (m), 1417 (m), 1297 (m), 1261 (s), 1206 (m), 1122 (s), 1084 (m), 1048 (m), 1010 (m), 926 (w), 816 (m), 722 (m), 675 (m).

1-(2-(3-Bróm-4-(metoxymetoxy)fenyl)-2-oxoetyl)-3-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)močovina (22b) Žltá kryštalická látka, Tt: 93.0 - 95.0 °C [FLC: SiO₂, H / EA 1/1]. **Elem. Anal.** vypoč. C₂₀H₂₃BrN₂O₇S (515.37): C, 46.61; H, 4.50; Br, 15.50; S, 6.22. Získané: C, 46.49; H, 4.38; Br, 15.73; S, 6.41.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-148-09VP2): δ 8.68 (br s, 1H, NH), 7.43 (t, 1H, J(NH,CH₂) = 5.3 Hz, NH), 8.64 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.19 (d, 1H, J(2,6) = 2.3 Hz, H-C(2)), 8.02

(dd, 1H, J(6,5) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.3 Hz, H-C(6)), 7.42 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(4')), 7.34 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.22 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 5.42 (s, 2H, OCH₂O), 4.67 (d, 2H, $J(CH_2,NH) = 5.3$ Hz, CO<u>CH₂NH</u>), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.43 (s, 3H, CH₂O<u>CH₃</u>), 3.14 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.08 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>);



(C4'), 116.6 (C6'), 115.2 (C5), 111.9 (C3), 110.5 (C3'), 94.4 (OCH₂O), 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂CH₃), 46.3 (C=O<u>CH₂</u>), 7.3 (SO₂CH₂CH₃).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3359 (br), 2940 (w), 1725 (m), 1682 (m), 1593 (m), 1538 (s), 1493 (m), 1417 (m), 1302 (m), 1261 (s), 1203 (m), 1122 (s), 1084 (m), 1041 (m), 1017 (w), 968 (m), 815 (w), 736 (m), 722 (m), 675 (w).

• Príprava MeO- (23) a MeOMeO- (24) 1Y6A derivátov Stilleho couplingom



Do zatavenej Pasteurovej pipety sme navážili príslušný 4-substituovaný oxazol-2amín (**21a** alebo **22a**) (0.20 mmol, 1.00 mol ekv), 2-(tributylstannyl)-pyridín (0.71 mmol, 3.60 mol ekv), tetrabutylammonium chlorid (0.44 mmol, 2.20 mol ekv), Pd(PPh₃)₄ (0.12 mmol, 0.06 mol ekv) a pridali sme acetonitril abs (0.7 mL). Po prefúknutí Ar a následným zatavením sme reakčnú zmes nechali zahrievať v olejovom kúpeli pri 100 °C počas 48 h. Potom sme k zmesi pridali EA (30 ml) a 1 M vodný roztok KF (20 ml) a nechali ju miešať 2 h pri rt. Organickú vrstvu sme oddelili a vodnú extrahovali EA (2 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl (2 x 20 ml), vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a HV. Surový produkt sme čistili pomocou FLC na silikagéli s EA ako eluentom.

N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-5-(4-metoxy-3-(pyrid-2-yl)fenyl)oxazol-2-amín (23) Biela kryštalická látka 43.0 mg (0.092 mmol, 63.2 %), Tt: 215-217 °C [FLC: SiO₂, EA]. Elem. Anal. vypoč. C₂₄H₂₃N₃O₅S (465.52): C, 61.92; H, 4.98; S, 6.89. Získané: C, 62.11; H, 5.10; S, 6.58.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-168-09B): δ 9.76 (br s, 1H, NH), 8.82 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.70 (m, 1H, H-C(3*)), 8.02 (d, 1H, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.95-7.78 (m, 2H, H-C(5*), H-C(4*)), 7.68

 $(dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)), 7.49 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.1 Hz, H-C(4')), 7.46 (s, 1H, H-C(oxazol)), 7.36 (m, 1H, H-C(4*)), 7.26 (d, 2H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5), J(3',4') = 8.7 Hz), H-C(3')), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.20 (q, 2H, J(CH_2,CH_3) = 7.3 Hz, SO_2CH_2), 1.12 (t, 3H, J(CH_3,CH_2) = 7.3 Hz, SO_2CH_2CH_3);$





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-168-09BC): 156.0 (C2°), 155.4 (C4), 154.4 (C1*), 151.3 (C2'), 149.3 (C3*), 144.0 (C5°), 135.9 (C5*), 130.0 (C1'), 128.9 (C5'), 128.7, 125.3 (C6), 124.8, 124.6, 122.2, 122.1 (), 120.7 (), 120.7 () 115.4 (C6'), 112.6 (C4), 110.7 (C3'),

56.2 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 49.7 (SO₂CH₂), 7.3 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

MS1: 466.117 [**M**+**H**]⁺. **MS2** (466.117): 470.118(s); 451.093(s); 420.076(m); 408.084(w); 373.116(w); 325.063(w); 301.112(w); 251.063(w); 213.085(w); 154.056(w). **MS3** (420.076): 420.076(s), 402.068(w); 357.027(w); 327.074(w); 226.092(w); 184.052(w).

MS1: 464.108 **[M-H]**⁻. **MS2** (464.108): 464.108(m); 449.066(s); 434.066(w); 406.071(w); 377.080(w); 341.065(w); 279.032(w); 235.040(w); 195.047(w); 169.046(w). **MS3** (434.066): 435.064(w); 406.070(s); 341.066(w); 297.082(w), 235.040(m); 195.047(w).

FT IR (solid, cm⁻¹): 2928 (m), 2848 (w), 1737 (w), 1613 (s), 1570 (s), 1498 (m), 1473 (m), 1422 (m), 1302 (m), 1265 (s), 1178 (w), 1139 (s), 1121 (s), 1085 (m), 1028 (m), 918 (w), 892 (w), 795 (m), 714 (m).

N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-5-(4-(metoxymetoxy)-3-(pyrid-2-yl)fenyl)oxazol-2amín (24) Biela kryštalická látka 39.3 mg (0.079 mmol, 78.6%), Tt: 68-71 °C [FLC: SiO₂, EA].

Elem. Anal. vypoč. C₂₅H₂₅N₃O₆S (495.55): C, 60.59; H, 5.08; S, 6.47. Získané: C, 60.27; H, 5.41; S, 6.20.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_{6} , LK-160-09): δ 9.78 (br s, 1H, NH), 8.81 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.72 (m, 1H, H-C(3*)), 8.01 (d, 1H, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.94-7.80 (m, 2H, H-C(5*), H-C(4*)), 7.66 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.2

Hz, H-C(6)), 7.48 (s, 1H, H-C(oxazol)), 7.48 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(4')), 7.38 (m, 1H, H-C(4*)), 7.34 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 7.26 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 5.29 (s, 2H, OCH₂O), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (s, 3H, CH₂O<u>CH₃</u>), 3.20 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.11 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-160-09C):
155.7 (C2°), 154.6 (C1*), 153.5 (C4-O), 151.5 (C2′-O), 149.5 (C3*), 144.0 (C5°), 136.2 (C5*), 130.0 (C1′), 129.0, 128.9 (C5′), 128.7, 125.4 (C6), 125.0, 124.5, 122.5 (C4*), 121.9 (C4′), 121.2, 116.0 (C5), 115.5 (C6′), 110.9

(C3'), 94.6 (<u>CH</u>₂OCH₃), 56.3 (OCH₃), 56.0 (CH₂O<u>CH₃</u>), 49.8 (SO₂CH₂), 7.4 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>). **MS1:** 496.129 [**M**+**H**]⁺. **MS2** (496.129): 497.125(m); 464.099(s); 436.105(w); 371.103(w); 255.096(m); 233.072(s); 167.062(w). **MS3** (464.099): 465.102(m), 418.060(w); 371.103(w); 328.101(w); 249.050(w); 223.672(m); 196.063(s); 167.062(w).

MS1: 494.120 **[M-H]**⁻. **MS2** (494.120): 494.117(s); 449.088(s); 434.065(w); 341.065(w); 298.066(w); 235.040(w); 195.048(w). **MS3** (449.088): 450.089(s); 406.071(w); 377.081(w); 341.065(w), 250.050(w); 235.040(m); 195.048(s); 169.045(w).

• Príprava HO-1Y6A (25) hydrolýzou MOMO-1Y6A (24)



K *p*-MOMO-1Y6A **24** 20.0 mg (40.4 μ mol, 1.00 mol ekv) v CH₂Cl₂ (2.0 mL) sme prikvapkávali roztok 30 % HCl v metanole (140 μ l). Reakciu sme nechali miešať 15 min pri rt. Následne sme k zmesi pridali nasýtený roztok K₂CO₃ (5.0 ml) a extrahovali ju EA (3 x 3 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 18.0 mg (40.0 μ mol, 98.7 %) bielej kryštalickej látky.

4-(2-(4-(Etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenol (25): Tt: 218-220 °C.

Elem. Anal. vypoč. C₂₃H₂₁N₃O₅S (451.49): C, 61.18; H, 4.69; S, 7.10. Získané: C, 61.00; H, 4.82; S, 7.29.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-161-09): δ OH (nevidno), 9.66 (br s, 1H, NH), 8.80 (d, 1H, J(4',6') = 2.3Hz, H-C(6')), 8.69 (ddd, $J(3^*,4^*) =$ 5.1 Hz, $J(3^*,5^*) = 1.8$ Hz, $J(3^*,6^*) =$ 0.9 Hz, H-C(3^*)), 8.31 (ddd, 1H,

 $J(5^*,6^*) = 8.4 \text{ Hz}, J(4^*,6^*) = 0.9 \text{ Hz}, J(3^*,6^*) = 0.9 \text{ Hz}, C(6^*)), 8.23 \text{ (d, 1H, } J(2,6) = 2.2 \text{ Hz}, H-C(2)), 8.13 \text{ (ddd, 1H, } J(5^*,6^*) = 8.4 \text{ Hz}, J(5^*,4^*) = 7.4 \text{ Hz}, J(3^*,5^*) = 1.8 \text{ Hz}, H-C(5^*)), 7.60 \text{ (dd, 1H, } J(5,6) = 8.6 \text{ Hz}, J(6,2) = 2.2 \text{ Hz}, H-C(6)), 7.53 \text{ (ddd, 1H, } J(4^*,5^*) = 7.4 \text{ Hz}, J(3^*,4^*) = 5.1 \text{ Hz}, J(4^*,6^*) = 0.9 \text{ Hz}, H-C(4^*)), 7.50 \text{ (d, 1H, } J(3',4') = 8.7 \text{ Hz}, J(4',6') = 2.2 \text{ Hz}, H-C(4')), 7.49 \text{ (s, 1H, H-C(oxazol))}, 7.28 \text{ (d, 1H, } J(3',4') = 8.7 \text{ Hz}, H-C(3')), 7.05 \text{ (d, 1H, } J(3',4') = 8.7 \text{ Hz}, J(3',4') = 8.7 \text{ Hz},$

J(5,6) = 8.6 Hz, H-C(5)), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂), 1.13 (t, 3H, *J*(CH₃,CH₂) = 7.4 Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>);





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d₆*, LK-161-09C):
158.3 (C4-O), 155.9 (C2°), 155.3 (C1*), 151.4 (C1'-O), 146.3 (C3*), 144.3 (C5°), 139.0 (C5*),
130.2 (C1'), 128.9 (C5'), 126.3 (C6), 122.9 (C4*), 122.2 (C4'), 121.8 (C2), 120.5 (C4°),
120.4 (C6*), 119.34 a 119.29 (C1 alebo C3),

118.6 (C5), 115.4 (C6'), 110.8 (C3'), 56.3 (OCH₃), 49.7 (SO₂CH₂), 7.4 (SO₂CH₂CH₃).

MS1: 451.095 [**M**+**H**]⁺. **MS2** (451.095): 452.099(s); 406.061(w); 359.103(w); 324.100(w); 237.048(w); 211.072(w); 183.082(w). **MS3** (359.103): 359.103 (s), 317.111(w); 253.071(w); 226.054(w); 211.071(w); 171.061(w).

MS1: 450.097 [**M-H**]⁻. **MS2** (450.097): 451.095; 390.074(w); 342.072(w); 314.077(w); 265.018(m); 236.014(w); 206.977(m); 170.055(m); 159.013(w). **MS3:** 436.075(m); 406.048(w); 362.046(w); 342.070(w), 314.080(m); 298.086(w); 265.016(s); 226.006(m); 206.977(s); 170.054(m); 159.013(m); 133.015(w).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3427 (w), 2958 (m), 2924 (m), 2856 (m), 1727 (m), 1596 (m), 1531 (w), 1484 (m), 1464 (m), 1397 (w), 1261 (m), 1103 (s), 1013 (m), 886 (w), 793 (w), 735 (m), 715 (w).

5.2.1 Aza-inhibítory VEGFR-2 receptora

a) Syntéza alfa-azidocetofenónových prekurzorov

• Príprava 1-(4-amino-3-brómfenyl)etanónu (27)



K roztoku 4-aminoacetofenónu (**26**) 5.00 g (37.0 mmol, 1.00 mol ekv) v toluéne abs 10 ml sme pri 40°C za miešania po častiach pridávali NBS (37.0 mmol, 1.00 mol ekv) a zmes sme po pridaní NBS zahrievali na 40 °C ešte 15 min. Priebeh reakcie sme kontrolovali pomocou TLC. Po ochladení zmesi na rt sme k nej pridali H₂O (100 ml) a extrahovali ju s EA (3 x 50 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a surový produkt sme dosušili pomocou HV. Produkt sme použili do nasledujúcej reakcie bez ďalšieho čistenia (v ďalšom kroku produkt vypadáva z reakčnej zmesi).



1-(4-Amino-3-brómfenyl)etanón (27)⁷⁰

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-221-09A): δ 8.05 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.72 (dd, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 6.74 (d, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 4.51 (br s, 2H, NH₂), 2.50 (s, 3H, COCH₃).

• Príprava N-(4-acetyl-2-brómfenyl)formamidu (28)



⁷⁰ Nakao, K.; Stevens, R.W.; Kawamura, K.; Uchida, Ch.; Koike, H.; Caron, S. Patent: US6608070 B1, 2003.

Roztok HCOOH 2.8 ml (70.2 mmol, 3.00 mol ekv) a Ac₂O 5.6 ml (58.5 mmol, 2.50 mol ekv) sme zahrievali 2 h pri 70 °C. Po ochladení formylačnej zmesi na rt sme k nej prikvapkávali aminoacetofenón **27** 5.00 g (23.4 mmol, 1.00 mol ekv) rozpustený v 10 ml THF abs. Reakčnú zmes sme nechali miešať 1 h pri rt. Pozorovali sme vznik bielej zrazeniny, ktorú sme po čase odsali, na frite ju premyli H₂O a vysušlili. Produkt sme prekryštalizovali z EA. Získali sme 3.15 g (13.0 mmol) bielej kryštalickej látky. Matečný lúh sme odparili do sucha, premyli Et₂O (3 x 10 ml) a získali 2.49 g (10.3 mmol) bielej kryštalickej látky ktorá podľa TLC bola zhodná s pozíciou produktu získaného po kryštalizácii. Celkový výťažok reakcie 5.64 g (23.3 mmol, 99.6 %).

N-(4-Acetyl-2-brómfenyl)formamid (28)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-222-10D): δ 8.57 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 8.56 (s, 1H, CHO), 8.19 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.9 Hz, H-C(2)), 7.91 (dd, 2H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, *J*(2,6) = 1.9 Hz, H-C(6); zároveň br s, 1H, NH), 2.59 (s, 3H, COCH₃).



• Príprava 1-(4-amino-3-brómfenyl)-2-brómetanónu (29)



Zmes formamidu **28** 1.00 g (4.13 mmol, 1.00 mol ekv) a $CuBr_2$ 1.94 g (8.69 mmol, 2.10 mol ekv) v 6 ml zmesi EA / MeOH (5 / 1) sme nechali miešať cez noc pri rt. Reakciu

sme kontrolovali pomocou TLC analýzy. Nakoniec sme k reakčnej zmesi pridali nasýtený roztok NaHCO₃ (50 ml) a túto sme extrahovali s EA (3 x 30 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a surový produkt dosušili pomocou HV. Po kryštalizácii v zmesi H / EA sme získali 690.0 mg (57.0 %, 2.36 mmol) bledoperleťovej kryštalickej látky. Na základe spekltier sme pozorovali, že pri tejto reakcii dochádza aj k odchráneniu formylovej skupiny pravdepodobne vplyvom vznikajúcej HBr. Zistili sme, že aj napriek tomu je nutné vychádzať z chráneného anilínu, lebo v opačnom prípade reakcia nie je selektívna a brómuje sa aj aromatické jadro.

1-(4-Amino-3-brómfenyl)-2-brómetanón (29) Tt: 116-117 °C [H/EA].

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-230-10A): δ 8.10 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.77 (dd, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 6.75 (d, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 4.69 (br s, 2H, NH₂), 4.33 (s, 2H, COCH₂Br).



• Príprava 1-(4-amino-3-brómfenyl)-2-azidoetanónu (30)



Reakciu sme uskutočnili z 300.0 mg (1.02 mmol) dibrómanilínu **29**. Postup sme použili ako je uvedené vyššie pre prípravu 2-azido-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanónu **10**. Získali sme 258 mg (1.01 mmol, 99.0 %) svetložltých kryštálov.

1-(4-Amino-3-brómfenyl)-2-azidoetanón (30) Tt: 148-150 °C [H/EA].

Elem. Anal. vypoč. C₈H₇BrN₄O (255.07): C, 37.67; H, 2.77; Br, 31.33. Získané: C, 37.99; H, 2.52; Br, 31.15.

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-232-10): δ 8.02 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.68 (dd, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 6.76 (d, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 4.70 (br s, 2H, NH₂), 4.44 (s, 2H, COCH₂N₃). ¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-232-10C): δ 7.93 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.66 (dd, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 6.81 (d, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 6.39 (br s, 2H, NH₂), 4.70 (s, 2H, COCH₂N₃).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-232-10CC): 190.7 (C=O),
150.9 (C4-N), 133.0 (C2), 128.9 (C1), 123.2 (C6), 113.9 (C5),
106.1 (C3), 53.7 (CH₂N₃).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3466 (m), 3340 (s), 2903 (w), 2105 (s, N₃), 1672 (m, C=O), 1601 (m), 1585 (s), 1424 (w), 1399 (m), 1355 (m), 1275 (m), 1211 (s), 1060 (m), 1047 (w), 949 (m), 896 (w), 805 (m), 674 (m).

• Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)formamidu (31)



Roztok HCOOH 2.8 ml (70.2 mmol, 3.00 mol ekv) a Ac₂O 5.6 ml (58.5 mmol, 2.50 mol ekv) sme zahrievali 2 h na 70 °C. Po ochladení formylačnej zmesi na rt sme z nej odobrali 165 μ l (HCOOH / Ac₂O, 3.00 / 2.50 mol ekv) a prikvapkali k roztoku aminoazidu **30** 109 mg (0.43 mmol, 1.00 mol ekv) v THF abs. Reakčnú zmes sme potom nechali miešať 1 h pri rt. Nakoniec sme odparili THF, tuhý zvyšok rozpustili v 10 ml EA a zmes sme extrahovali nasýteným roztokom NaHCO₃ (5 ml) a následne H₂O (2 x 5 ml). Organickú vrstvu sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšný podiel dosušili pomocou HV. Získali sme 121 mg (0.43 mmol, 99.4 %) žltej kryštalickej látky.

N-(4-(2-Azidoacetyl)-2-brómfenyl)formamid (31)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-235-10): δ 8.61 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 8.57 (s, 1H, CHO), 8.18 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.91 (br s, 1H, NH), 7.84 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 4.52 (s, 2H, COCH₂N₃).



• Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)pivalamidu (32)



K roztoku 91.0 mg (0.36 mmol, 1.00 mol ekv) aminoazidu (**30**) v 1.0 ml pyridínu abs. sme za chladenia pri -20 °C (l'ad / sol') prikvapkávali 87 μl pivaloyl chloridu (0.72 mmol, 2.00 mol ekv) a zmes následne nechali miešať 3 h. Potom sme k nej pridali 1 M HCl (až do neutrálneho pH) a zmes sme extrahovali s EA (3 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli H₂O (2 x 10 ml), oddelili, vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 98.0 mg (0.29 mmol, 80.6 %) žltej kryštalickej látky.

N-(4-(2-Azidoacetyl)-2-brómfenyl)pivalamid (32):

Elem. Anal. vypoč. C₁₃H₁₅BrN₄O₂ (339.19): C, 46.03; H, 4.46; Br, 23.56. Získané: C, 45.77; H, 4.59; Br, 23.48.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-256-10B): δ 9.04 (s, 1H, NH), 8.18 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.94 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 7.81 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 4.89 (s, 2H, COCH₂N₃), 1.27 (s, 9H, 3 x CH₃).



• Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)-2,2,2-trifluóracetamidu (33)



K 100.0 mg (0.39 mmol, 1.00 mol ekv) aminoazidu **30** rozpusteného v THF abs (2 ml) sme prikvapkávali 200.0 ul (300.0 mg, 1.43 mmol, 3.70 mol ekv) (CF₃CO)₂O a zmes sme potom nechali miešať 1 h pri rt. Následne sme k nej pridali 10 % roztok K₂CO₃ a extrahovali s EA (3 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme

odfiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO. Zvyšok sme dosušili pod HV. Získali sme 119.0 mg (0.34 mmol, 87.2 %) žltej kryštalickej látky.

N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)-2,2,2-trifluóracetamid (33)

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-250-10B): δ 11.50 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.91 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 7.70 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 4.89 (s, 2H, COCH₂N₃). ¹⁹**F-NMR** (282.2 MHz, DMSO-*d*₆, LK-250-10F): δ – 73.56 (s)



• Príprava N-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetamidu (34)



K 130.0 mg (0.51 mmol, 1.00 mol ekv) aminoazidu **30** sme pridali 500.0 μ l Ac₂O abs a roztok sme nechali stáť pri rt cez noc. Po TLC kontrole sme k reakčnej zmesi pridali 10 % roztok K₂CO₃ a extrahovali sme ju s EA (3 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 146.2 mg (0.49 mmol, 96.1 %) žltej kryštalickej látky.

N-(4-(2-Azidoacetyl)-2-brómfenyl)acetamidu (34)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-244-10): δ 8.57 (d, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, H-C(5)), 8.15 (d, 1H, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.85 (br s, 1H, NH), 7.81 (dd, 1H, *J*(5,6) = 8.7 Hz, *J*(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 4.51 (s, 2H, COCH₂N₃), 2.29 (s, 3H, COCH₃).



• Príprava 1-(4-(2-azidoacetyl)-2-brómfenyl)močovina (35)



K vychladenej zmesi 100.0 mg (0.39 mmol, 1.00 mol ekv) aminoazidu **30** v AN abs. sme prikvapkávali 70.0 μ l CSI (0.79 mmol, 2.0 mol ekv) a nechali miešať 1 h. Potom sme k zmesi pridali 10 ml H₂O a nechali miešať pri rt cez noc. Extrahovali sme ju s EA (3 x 10 ml), spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Trituráciou s CHCl₃ sme získali 64.0 mg (0.215 mmol, 55.0 %) oranžovej kryštalickej látky.

1-(4-(2-Azidoacetyl)-2-brómfenyl)močovina (35)

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-247-10B2): δ 8.34 (d, 1H, J(5,6) = 8.8 Hz, H-C(5)), 8.20 (s, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(2)), 7.86 (dd, 1H, J(5,6) = 8.8 Hz, J(2,6) = 2.1 Hz, H-C(6)), 6.73 (br s, 2H, NH₂), 4.83 (s, 2H, COCH₂N₃).



b) Syntéza navrhnutých aza derivátov obsahujúcich oxazolový heterocyklus

• Príprava p-NHCHO- arylamino-2-aryloxazolu



K zmesi polymérneho pPPh₃ 341.0 mg (0.55 mmol, 1.50 mol ekv) a formamidazidu **31** 103.0 mg (0.36 mmol, 1.00 mol ekv) v CH₂Cl₂ abs (10 mL) sme za chladenia (0 °C, ľadový kúpeľ) počas 1 h prikvapkávali izokyanát **20** 88.0 mg (0.36 mmol, 1.00 mol ekv) rozpustený v CH₂Cl₂ abs (2 ml). Reakčnú zmes sme nechali miešať cez noc, pričom teplota vystúpila na rt. Polymérny PPh₃ sme zo zmesi odfiltrovali, dobre premyli EA a filtrát odparili dosucha pomocou RVO a HV. Surovú zmes sme čistili pomocou stĺpcovej chromatografie na SiO₂ s eluentom H / EA (1/4), pričom sme získali odchránený nie úplne čistý produkt oxazol-2-amín **36a** 12.5 mg (0.028 mmol, 7.8 %) ako aj príslušný polárnejší močovinový derivát **36b** 44.2 mg (0.109 mmol, 30.3 %).

Pri reakcii dochádza k uvoľneniu formylovej skupiny z formanilidu 31.

5-(4-Amino-3-brómfenyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)oxazol-2-amín (36a)



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , K-237-10F3): δ 9.88 (br s, 1H, NH), 9.81 (br s, 2H, NH₂), 8.77 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.12 (d, 1H, J(5,6) = 8.6 Hz, H-C(5)), 7.92 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 7.60 (dd, 1H, J(5,6) =

8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 7.60 (s, 1H, H-C(ox)), 7.52 (dd, 1H, J(3',4') = 8.5 Hz, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(4')), 7.28 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$, SO₂CH₂), 1.12 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.3$, SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

1-(2-(4-Amino-3-brómfenyl)-2-oxoetyl)-3-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)močovina (36b)



¹**H-NMR** (300 MHz, LK-237-10F1, DMSO d_6): δ NH₂ nevidno, 8.67 (br s, 1H, NH), 8.64 (d, 1H, J (4',6') = 2.0 Hz, H-C(6')), 8.23 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(2)), 8.02 (dd, 1H, J(5,6) = 8.3 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)),

7.61 (d, 1H, J(5,6) = 8.3 Hz, H-C(5)), 7.43 (t, 1H, $J(NH,CH_2) = 5.1$ Hz, NH), 7.42 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.0 Hz, H-C(4')), 7.22 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 4.69 (d, 2H, $J(CH_2,NH) = 5.1$ Hz, CO<u>CH</u>₂NH), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.08 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂).

• Príprava pivaloyl-NH- arylamino-2-aryloxazolu (37)



Zmes polymérneho PPh₃ 275.0 mg (0.44 mmol, 1.50 mol ekv), pivaloylazidu **32** 98.0 mg (0.29 mmol, 1.00 mol ekv) a izokyanátu **20** 69.0 mg (0.29 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v CH₂Cl₂ abs (10 mL) a nechali miešať pri rt cez noc. Polymérny Ph₃PO sme následne zo zmesi odfiltrovali, dobre premyli EA a filtrát odparili dosucha pomocou RVO a zvyšok sme dosušili pomocou HV. Surový produkt sme čistili pomocou stĺpcovej

chromatografie na SiO₂ s eluentom H / EA (1/2), pričom sme získali produkt oxazol-2-amín (**37**) 66.0 mg (0.123 mmol, 42.4 %) a príslušný močovinový derivát v stopových množstvách.

<u>Poznámka:</u> Nakoľko sme najskôr nepozorovali vznik požadovaného produktu podľa pôvodného postupu **za chladenia** a pridávania: a) izokyanátu ku zmesi azidu, kedy vznikal neželaný otvorený močovinový derivát, b) azidu ku zmesi izokyanátu vznikala dominantne látka s izokyanátovým skeletom. Preto sme sa rozhodli odskúšať aj iné postupy z literatúry. Ak sme reakciu robili pri **90** °C počas 15 min pozorovali sme vznik dominantnej látky s izokyanátovým skeletom (len jedna aromatika), ale aj zvyšky po rozpade oxazolu. Vyššia teplota teda nie je vhodná pre daný oxazolový typ zlúčenín. Nakoniec sme uskutočnili reakciu, kedy sme všetky východiskové látky navážili a pridali CH_2Cl_2 abs. Jedine v tomto prípade sa nám podarilo pripraviť oxazolový produkt v doposiaľ najlepších výťažkoch (43 %).

N-(2-Bróm-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)fenyl)pivalamid (37) Tt: 187 – 190 °C [FLC, SiO₂ H/EA 1/2].



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-258-10F1): δ 9.81 (br s, 1H, NH), 9.01 (br s, 1H, NH), 8.78 (d, 1H, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(6')), 7.91 (d, 1H, J(2,6) = 1.4 Hz, H-C(2)), 7.66-7.54 (d, 1H, J(5,6) = 8.6 Hz, H-C(5)), 7.61 (dd, 1H, J(5,6) = 8.6 Hz, J(2,6)

= 1.4 Hz, H-C(6)), 7.63 alebo 7.58 (s, 1H, H-C(ox)), 7.51 (dd, 1H, J(3',4') = 8.6 Hz, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(4')), 7.28 (d, 1H, J(3',4') = 8.6 Hz, H-C(3')), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$, SO₂CH₂), 1.12 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.3$, SO₂CH₂CH₃).



¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d₆*, LK-258-10F1C): 176.3 (NHCO), 156.0 (C2°), 151.4 (C2′-O), 142.3 (C5°), 135.2 (C4-NH), 130.0 (C1′-NH), 128.5 (C5′), 128.3 (C1), 126.7 a 126.1 (C5 alebo C6), 123.3 (C2), 122.3 a

122.0 (C4' alebo C4°), 120.2 (C3), 115.6 (C6'), 110.8 (C3'), 56.2 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂), 40.3 – 38.3 (prekryv s DMSO, <u>C</u>(CH₃)₃), 26.9 (3 x CH₃), 7.2 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

• Príprava pivaloyl-NH-1Y6A (38) Stilleho couplingom



Do zatavenej Pasteurovej pipety sme navážili oxazol-2-amín (**37**) 66.0 mg (0.123 mmol, 1.00 mol ekv), 2-(tributylstannyl)pyridín 125.0 μ l (0.44 mmol, 3.60 mol ekv), Bu₄NBr 93.0 mg (0.27 mmol, 2.20 mol ekv), Pd(PPh₃)₄ 11.0 mg (0.007 mmol, 0.06 mol ekv) a pridali acetonitril abs (0.7 mL). Po prefúknutí Ar a následným zatavením sme reakčnú zmes nechali zahrievať v olejovom kúpeli na 100 °C počas 48 h. Po ochladení sme k zmesi pridali EA (30 ml) a 1 M vodný roztok KF (20 ml) a nechali ju miešať 2 h pri rt. Organickú vrstvu sme oddelili a vodnú premyli EA (2 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl (2 x 20 ml), vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a rozpúšťadlo odparili pomocou RVO. Zvyšok sme dosušili pomocou HV. Surový produkt sme čistili pomocou FLC na silikagéli s EA ako eluentom. Získali sme 49.4 mg (0.092 mmol, 74.8 %) bledej kryštalickej látky.

N-(4-(2-(5-(Etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenyl)pivalamid (38) Tt: 226 – 228 °C [FLC, SiO₂ EA].

Elem. Anal. vypoč. C₂₈H₃₀N₄O₅S (534.63): C, 62.90; H, 5.66; S, 6.00. Získané: C, 62.72; H, 5.78; S, 6.16.



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-260-10): δ 12.35 (br s, 1H, NH), 9.75 (br s, 1H, NH), 8.80 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.76 (ddd, 1H, $J(3^*,4^*) = 5.0$ Hz, $J(3^*,5^*) = 1.8$ Hz, $J(3^*,6^*) = 0.9$ Hz, H-C(3*)), 8.53 (d, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, H-

C(5)), 8.10-8.06 (m, 1H, H-C(6*)), 8.07 (d, 1H, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(2)), 7.74-7.64 (m, 1H, H-C(5*)), 7.68 (dd, 1H, J(5,6) = 8.7 Hz, J(2,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 7.60 (s, 1H, H-C(ox)), 7.55-7.48 (m, 1H, H-C(4*)), 7.51 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(4')), 7.28 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$, SO₂CH₂), 1.24 (s, 9H, 3xCH₃), 1.13 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.4$, SO₂CH₂D₁).



¹³C-NMR (DMSO-*d₆*, LK-260-10C): 176.3 (NHCO), 156.5 a 155.7 (C1* alebo C2°), 151.3 (C2′-O), 147.6 (C3*), 143.7 (C5°), 138.4 (C5*), 136.5 (C4-NH), 130.0 (C1′-NH), 128.5 (C5′), 128.3 (C1), 126.7 a 126.1 (C5 alebo C6), 123.3 (C2), 123.0 (C4*), 122.3 a

122.0 (C4' alebo C4°), 121.8 (C3), 120.2 (C6*), 115.5 (C6'), 110.8 (C3'), 56.2 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂), 39.6 (<u>C</u>(CH₃)₃), 27.2 (3 x CH₃), 7.3 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3419 (w), 2966 (m), 1733 (w), 1665 (w, C=O), 1619 (m), 1580 (s), 1508 (m), 1472 m), 1427 (m), 1408 (m), 1300 (m), 1262 (m), 1137 (m), 1122 (m), 1082 (m), 1024 (m), 917 (w), 797 (m), 715 (m).

• Príprava p-NHCOCF₃-arylamino-2-aryloxazolu (39a)



Zmes pPPh₃ 336.0 mg (0.68 mmol, 1.50 mol ekv), trifluóracetamidazidu (**33**) 156.6 mg (0.45 mmol, 1.00 mol ekv) a izokyanátu (**20**) 108.0 mg (0.45 mmol, 1.00 mol ekv) sme rozpustili v CH_2Cl_2 abs (10 mL) a nechali miešať pri rt cez víkend. Polymérny pPPh₃ sme zo zmesi odfiltrovali, dobre premyli EA a filtrát odparili dosucha pomocou RVO a zvyšok

dosušili pomocou HV. Surovú zmes sme čistili pomocou stĺpcovej chromatografie na SiO₂ s eluentom H / EA (1/2), pričom sme dostali nie úplne čistý produkt oxazol-2-amín (**39a**), ktorý sme následne čistili FLC na SiO₂ s eluentom H / EA (1/1). Takto sme získali 24.0 mg (0.044 mmol, 9.8 %) produktu (**39a**) a 14.0 mg (0.025 mmol, 5.6 %) močovinového derivátu (**39b**).

N-(2-Bróm-4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)fenyl)-2,2,2-trifluóracetamid (39a)



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-269-10S): δ 11.33 (br s, 1H, NH), 9.88 (br s, 1H, NH), 8.77 (d, 1H, J(4',6') = 2.2 Hz, H-C(6')), 7.99 (d, 1H, J(2,6) = 1.9 Hz, H-C(2)), 7.72 (s, 1H, H-C(ox)), 7.68 (dd, 1H,

 $J(5,6) = 8.4 \text{ Hz}, J(2,6) = 1.9 \text{ Hz}, \text{H-C}(6)), 7.54 \text{ (d, 1H, } J(5,6) = 8.4 \text{ Hz}, \text{H-C}(5)), 7.52 \text{ (dd, 1H, } J(3',4') = 8.6 \text{ Hz}, J(4',6') = 2.2 \text{ Hz}, \text{H-C}(4')), 7.28 \text{ (d, 1H, } J(3',4') = 8.6 \text{ Hz}, \text{H-C}(3')), 3.99 \text{ (s, 3H, OCH}_3), 3.21 \text{ (q, 2H, } J(\text{CH}_2,\text{CH}_3) = 7.3, \text{SO}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_3), 1.12 \text{ (t, 3H, } J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7.3, \text{SO}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_3).$



¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-269-10SC): 156.5 (C2°), 155.4 (q, 36.4 Hz, COCF₃), 151.6 (C2′-O), 142.1 (C5°), 132.0 (C4-N), 130.1 (C1′-NH), 129.8, 129.1, 128.5 (C5′), 126.5, 124.6, 122.6 a 122.5 (C4°

alebo C4'), 121.5 (C3), 116.0 (C6'), 114.3 (q, 247.8 Hz, CF₃), 111.0 (C3'), 56.4 (OCH₃), 49.8 (-SO₂CH₂), 7.4 (-SO₂CH₂<u>CH₃</u>). ¹⁹**F-NMR** (282.2 MHz, DMSO- d_6 , LK-269-10SF): δ – 74.06 (s).
N-(2-Bróm-4-(2-(3-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)ureido)acetyl)fenyl)-2,2,2-trifluóracetamid (39b)



¹**H-NMR** (300 MHz, LK-269-10F3, DMSO-*d*₆): δ 11.50 (br s, 1H, NH), 8.68 (br s, 1H, NH), 8.64 (d, 1H, *J* (4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.30 (d, 1H, *J*(2,6) = 1.9 Hz, H-C(2)), 8.07 (dd, 1H, *J*(5,6) =

8.3 Hz, J(2,6) = 1.9 Hz, H-C(6)), 7.68 (d, 1H, J(5,6) = 8.3 Hz, H-C(5)), 7.46 (t, 1H, $J(NH,CH_2) = 5.3$ Hz, NH), 7.42 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(4')), 7.22 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 4.73 (d, 2H, $J(CH_2,NH) = 5.3$ Hz, CO<u>CH</u>₂NH), 3.98 (s, 3H, O<u>CH</u>₃), 3.14 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂), 1.08 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.3$ Hz, -SO₂CH₂<u>CH</u>₃)



• Príprava p-NHCOCF₃-1Y6A (40) Stilleho couplingom



Do zatavenej Pasteurovej pipety sme navážili oxazol-2-amín **39a** 23.0 mg (0.044 mmol, 1.00 mol ekv), 2-(tributylstannyl)pyridín 46.0 µl (0.16 mmol, 3.60 mol ekv), Bu₄NBr

34.0 mg (0.097 mmol, 2.20 mol ekv), Pd(PPh₃)₄ 4.1 mg (0.0026 mmol, 0.06 mol ekv) a pridali AN abs (0.7 mL). Po prefúknutí Ar a následným zatavením sme reakčnú zmes nechali zahrievať v olejovom kúpeli na 100 °C počas 48 h. Po ochladení sme zmes naliali do EA (10 ml), pridali 1 M vodný roztok KF (10 ml) a nechali miešať 2 h pri rt. Organickú vrstvu sme oddelili a vodnú premyli EA (2 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme premyli nasýteným roztokom NaCl (2 x 10 ml), vysušili státím nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali, rozpúšťadlo odparili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Surový produkt sme čistili pomocou FLC na silikagéli s eluentom H / EA (1/4). Získali sme 7.3 mg (30 %) oranžovej kryštalickej látky, ale ¹H-NMR potvrdilo prítomnosť 3 látok, a to 58 % požadovaného produktu (**40**), 23 % východiskovej látky (**39a**) a 19 % zvyškov pyridylu.

N-(4-(2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-2-(pyrid-2-yl)fenyl)-2,2,2trifluóracetamid (40)



¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-270-10): δ 9.55 (br s, 1H, NH), 8.79 (d, 1H, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(6')), 8.64 (ddd, 1H, $J(3^*,4^*) = 4.9$ Hz, $J(3^*,5^*) = 1.9$ Hz, $J(3^*,6^*) = 0.9$ Hz, H-C(3*)), 7.93-7.85 (m, 1H, H-C(6*)), 7.81 (d, 1H, J(2,6) = 2.0 Hz,

H-C(2)), 7.47 (dd, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, J(4',6') = 2.3 Hz, H-C(4')), 7.57-7.44 (m, 1H, H-C(5*)), 7.40 (dd, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, J(2,6) = 2.0 Hz, H-C(6)), 7.34 (ddd, 1H, J(4*,5*) = 7.2 Hz, J(3*,4*) = 4.9 Hz, J(4*,6*) = 1.3 Hz, H-C(4*))), 7.29 (s, 1H, H-C(ox)), 7.26 (d, 1H, J(3',4') = 8.7 Hz, H-C(3')), 6.86 (d, 1H, J(5,6) = 8.5 Hz, H-C(5)), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$, SO₂CH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, $J(CH_3,CH_2) = 7.3$, SO₂CH₂CH₃).

5.2.2 Príprava azidového ligandu pre "Click" knižnicu

- a) Syntéza prekurzorov oxazolazidu
- Príprava etyl 2-chlór-3-oxo-propionátu (43)



K roztoku tBuOK 10.10 g (90.0 mmol, 1.00 mol ekv) v tBuOH abs 34.0 ml (36.0 mmol, 4.00 mol ekv) a Et₂O abs (50 ml) sme pri 0 °C (ľadový kúpeľ) prikvapkávali HCOOEt **42** 10.40 g (11.3 ml, 1.5 mol ekv) a etyl-2-chlóracetát **41** 11.40 g (10.0 ml, 1.00 mol ekv) rozpustených v Et₂O abs (50 ml). Reakčnú zmes sme miešali cez noc a teplotu sme nechali vystúpiť na rt. Následne sme vzniknutú soľ odfiltrovali, zrazeninu premyli Et₂O a rozpustili v H₂O. Vodný roztok sme okyslili pomocou 1 M HCl na pH = 4 a túto sme následne extrahovali s Et₂O (5 x 50 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, odfiltrovali a zahustili na RVO. Zvyšok sme dosušili pomocou HV. Získali sme 5.10 g (33.9 mmol, 38.0 %) mazľavej bielej látky.

Etyl 2-chlór-3-oxo-propionát (43)⁷¹



¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-95.824): δ 7.80 (s, 1H, <u>CH</u>-OH), 6.35 (br s, 1H, -OH), 4.28 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.2$ Hz, COOCH₂), 1.32 (t, 3H, $J(CH_2,CH_3) = 7.2$ Hz, COOCH₂<u>CH</u>₃). ¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.52 (d, 1H, J(CHO,CHCl) = 2.0Hz, CHO), 4.76 (d, 1H, J(CHO,CHCl) = 2.0 Hz, CHCl), 4.33 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂), 1.32 (t, 3H, $J(CH_2,CH_3) = 7.1$ Hz, COOCH₂<u>CH</u>₃).⁷¹

⁷¹ Yoffe, S. T.; Petrovsky, P. V.; Goryunov, Y. I.; Yershova, T. V.; Kabachnik, M. I. *Tertahedron* **1972**, *28*, 2783-2798.

• Príprava etyl-2-aminooxazol-5-karboxylátu (44)



K zmesi etyl 2-chlór-3-oxo-propionátu **43** 4.86 g (39.0 mmol, 1.00 mol ekv) a močoviny 2.15 g (42.9 mmol, 1.10 mol ekv) sme pridali H_2O (50 ml) a reakčnú zmes sme refluxovali počas 5 h. Po ochladení zmesi sme upravili pH na neutrálne s 5 % HCl a zmes sme extrahovali pomocou EA (5 x 50 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili státím nad Na₂SO₄, odfiltrovali a zahustili na RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Nečistoty sme odstranili trituráciou s EA a získali sme 3.25 g (20.8 mmol, 53.0 %) bledej kryštalickej látky.

Etyl-2-aminooxazol-5-karboxylát (44) Tt: 153 – 155 °C [EA] (lit. Tt: 155 °C [EtOH])⁷² ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.48 (s, 1H, H-Coxazol), 5.62 (br s, 2H, NH₂), 4.33 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂), 1.36 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂<u>CH₃</u>). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, LK-101.824): 163.0 (C=O), 158.4 (C2-NH₂), 136.9 (C5), 136.1 (C4), 61.3 (COOCH₂), 14.7 (COOCH₂CH₃).



FT IR (solid, cm⁻¹): 3343 (m, NH₂), 2982 (m), 1682 (s), 1609 (s), 1568 (m), 1494 (m), 1373 (m), 1325 (m), 1240 (s), 1171 (s), 1070 (m), 1019 (m), 952 (m), 871 (w), 746 (m).

⁷² Dornow, A.; Frese, A Archiv der Pharmazie **1953**, 286, 494 – 499.

Príprava etyl-2-chlóroxazol-5-karboxylátu (45)



K zmesi CuCl₂ abs 2.60 g (19.2 mmol, 1.5 mol ekv) v AN abs (40 ml) sme prikvapkávali ^tBuONO 2.28 ml (2.00 g, 19.2 mmol, 1.50 mol ekv). Následne sme počas zahrievania na 60 °C k zmesi pridávali po častiach etyl-2-aminooxazol-5-karboxylát **44** 2.00 g (12.8 mmol, 1.00 mol ekv). Potom sme zmes zahrievali na reflux ešte 2 h a nakoniec ju nechali ochladiť na rt v priebehu 30 min. K reakcii sme pridali EA (50 ml), H₂O (30 ml) a konc HCl (5 ml). Vodnú vrstvu sme extrahovali s EA (3 x 50 ml). Spojené organické vrstvy sme extrahovali nasýteným roztokom NaCl a následne organický podiel vysušili státím nad Na₂SO₄. Sušidlo sme odfiltrovali, zmes zahustili pomocou RVO a zvyšok dosušili pomocou HV. Získali sme 1.71 g (9.7 mmol, 78.0 %) zelenej olejovitej látky. ¹H-NMR potvrdilo štruktúru a dostatočnú čistotu pripravenej látky. Produkt sme použili do nasledujúcej reakcie bez čistenia, nakoľko sa tento teplom a na SiO₂ sa rozkladá.



Etyl-2-chlóroxazol-5-karboxylátu (45)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃, LK-103-08): δ 7.69 (s, 1H, H-Coxazol), 4.39 (q, 2H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂), 1.38 (t, 3H, J(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃). ¹**H-NMR** (300 MHz,

DMSO-*d*₆, LK-111-08B): δ 8.08 (s, 1H, H-Cox), 4.33 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂), 1.30 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂<u>CH₃</u>).⁷³

⁷³ Atkins, J. M.; Vedejs, E. Org. Lett. **2005**, 7, 3351 – 3354.

b) Syntéza designovaného oxazolazidu



• Príprava etyl 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (46)

K roztoku anilínu **19** 2.05 g (9.50 mmol, 1.00 mol ekv) v ¹PrOH abs (40 ml) sme prikvapkávali etyl-2-chlóroxazol-5-karboxylát **45** 1.67 g (9.50 mmol, 1.00 mol ekv) rozpustený v ¹PrOH abs (5 ml). Reakčnú zmes sme miešali pri rt počas 4 dní. Podľa TLC analýzy (aj NMR spektier) bola stále prítomná aj východisková látka (34 % anilínu), preto sme do zmesi pridali ďalší podiel etyl-2-chlóroxazol-5-karboxylátu 1.67 g (9.50 mmol, 1.00 mol ekv) rozpusteného v ¹PrOH abs a zmes sme miešali ďalšie 3 dni pri rt. Keď už nebol prítomný východiskový amín, z reakčnej zmesi sme odparili iPrOH. Zvyšok sme rozpustili v EA (50 ml), extrahovali nasýteným roztokom NaHCO₃ (30 ml) a H₂O (2 x 30 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a roztok zahustili pomocou RVO. Surový produkt sme dosušili pomocou HV a dostali sme tmavohnedú olejovitú látku, ktorú sme kryštalizovali zo smesi H / EA. Po čistení sme získali 2.06 g (5.8 mmol, 61.0 %) svetlohnedého kryštalického produktu.

<u>Poznámka</u>: Reakcia podľa literatúry bola uskutočnená na iných substrátoch v ⁱPrOH pri teplote 80 °C počas 5 h.¹ Tieto podmienky sú pre nás nevhodné, lebo tak činidlo, ako aj produkt sa pri vyššej teplote rozkladajú. Okrem toho vzniká aj otvorený vedľajší produkt, o ktorom sme si mysleli, že je intermediátom vedúcím k produktu. No ani napriek rôznym reakčným podmienkam sa nám nepodarilo túto látku premeniť na požadovaný produkt.

Etyl 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-karboxylátu (46) Tt: 142 – 143 °C [H/EA].

Elem. Anal. vypoč. C₁₅H₁₈N₂O₆S (354.38): C, 50.84; H, 5.12; S, 9.05. Získané: C, 50.63; H, 5.48; S, 9.27.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-113-08D): δ 10.32 (br s, 1H, NH), 8.66 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.3 Hz H-C(6)), 7.88 (s, 1H, H-Cox), 7.57 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.7 Hz, *J*(4,6) = 2.3 Hz H-C(4)), 7.29 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.7 Hz, H-C(3)), 4.29 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.3 Hz, SO₂CH₂), 1.29 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.1 Hz, COOCH₂<u>CH₃</u>), 1.11 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.3 Hz, SO₂CH₂<u>CH₃</u>).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LK-113-08DC): 158.7 (C=O),
157.1 (C2'), 152.3 (C2), 135.9 a 135.6 (C1 alebo C5'), 129.9 a
127.7 (C4' alebo C5), 123.7 (C4), 117.4 (C6), 111.2 (C3), 60.5 (COO<u>CH</u>₂), 56.2 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂), 14.1 (COOCH₂<u>CH</u>₃), 7.2 (SO₂CH₂<u>CH</u>₃).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3477 (w, NH), 2980 (w), 2944 (w), 1702 (m), 1610 (s), 1570 (s), 1492 (m), 1424 (w), 1373 (m), 1321 (m), 1265 (m), 1206 (w), 1140 (m), 1122 (s), 1084 (m), 1014 (m), 980 (w), 920 (w), 794 (w), 722 (m).

• Príprava 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-metanolu (47)



K vychladenej zmesi (0°C) ArNHoxazolesteru **46** 354.4 mg (1.00 mmol, 1.00 mol ekv) v THF abs 5.0 ml udržiavanej pod Ar sme každých 30 min prisypávali 19.0 mg LiAlH₄ (0.50 mmol, 0.50 mol ekv) až do hodnoty 3.00 mol ekv. Po poslednom pridaní sme reakčnú

zmes nechali miešať 1 h pri 0 °C. Následne sme zmes pomaly naliali do 25 ml vopred vychladeného nasýteného roztoku NH₄Cl a nechali miešať 10 min. Potom sme ju extrahovali s EA (4 x 10 ml). Spojené organické vrstvy sme vysušili stáním nad Na₂SO₄, sušidlo sme odfiltrovali a prchavé podiely odparili na RVO. Získaný surový produkt sme dosušili pomocou HV. Získali sme 197.0 mg produktu **47** (0.63 mmol, 63.0 %), ktorý sme čistili pomocou FLC na SiO₂ s EA ako eluentom.

2-(5-(Etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)oxazol-5-yl)-metanolu (47) Tt: 157 – 160 °C [acetón].

Elem. Anal. vypoč. C₁₃H₁₆N₂O₅S (312.34): C, 49.99; H, 5.16; S, 10.27. Získané: C, 50.19; H, 5.04; S, 10.46.

¹**H** NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , SK-red3): δ 9.53 (br s, 1H, NH), 8.75 (d, 1H, J(4,6) = 2.3 Hz, H-C(6)), 7.46 (dd, 1H, J(3,4) = 8.6 Hz, J(4,6) = 2.3 Hz, H-C(4)), 7.23 (d, 1H, J(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 6.88 (s, 1H, H-Cox), 5.23 (t, 1H, $J(CH_2,OH) = 5.5$ Hz, OH), 4.38 (d, 2H, $J(CH_2,OH) = 5.5$ Hz, <u>CH</u>₂OH), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂), 1.10 (t, 3H, $J(CH_2,CH_3) = 7.4$ Hz, SO₂CH₂<u>CH</u>₃).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LC-65-10C): 155.9 (C2'), 151.3
(C2), 145.6 (C5'), 130.0 (C1), 129.0 (C5), 123.2 (C4'), 122.0
(C4), 115.4 (C6), 110.7 (C3), 56.1 (OCH₃), 53.1 (CH₂OH) 49.6
(SO₂CH₂), 7.2 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3458 (s, NH), 3224 (w, OH), 3076 (w), 2944 (w), 2839 (w), 1622 (s), 1596 (s), 1575 (s), 1544 (m), 1488 (m), 1422 (m), 1364 (w), 1292 (s), 1267 (s), 1183 (w), 1136 (m), 1114 (s), 1085 (m), 1009 (m), 993 (m), 927 (w), 814 (m), 716 (m).

• Príprava 5-(chlórmetyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amínu hydrochloridu (48)



K alkoholu **47** 31.2 mg (0.10 mmol, 1.00 mol ekv) sme pridali 145 μl (238.0 mg, 2.00 mmol, 20.0 mol ekv) SOCl₂ a zmes sme zahrievali na 30 °C počas 16 h pod Ar atmosférou. Nadbytočný SOCl₂ sme odparili a zvyšok sme dosušili pomocou HV (pričom sme prchavé podiely vymrazovali pri -190 °C). Produkt je citlivý na vodu (a iné nukleofily), preto sme ho použili do nasledujúcich reakcií bez ďalšieho čistenia.

5-(Chlórmetyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amínu hydrochlorid (48)

¹**H** NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , LK-138-08): δ 10.05 (br s, 1H, NH), 8.63 (d, 1H, J(4,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 7.53 (dd, 1H, J(3,4) = 8.6 Hz, J(4,6) = 2.2 Hz, H-C(4)), 7.27 (d, 1H, J(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 7.17 (s, 1H, H-Cox), 4.90 (s, 2H, CH₂Cl), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (q, 2H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂), 1.10 (t, 3H, $J(CH_2,CH_3) = 7.3$ Hz, SO₂CH₂(H₃).







K chloridu **48** pripraveného z (0.10 mmol, 1.00 mol ekv) 31.2 mg alkoholu **47** sme pridali 195.0 mg (3.00 mmol, 30.00 mol ekv, počítané na alkohol) NaN₃ a 0.5 ml DMSO abs. Reakčnú zmes sme miešali pri rt počas 12 h (pri rt môže zmes po čase zatuhnúť). Výslednú zmes sme potom zriedili s H₂O (10 ml) a extrahovali EA (4 x 5 ml). Spojené organické vrstvy sme preextrahovali H₂O (3 x 5 ml), vysušili stáním nad Na₂SO₄, sušidlo odfiltrovali a prchavé podiely odparili na RVO. Surový produkt sme získali dosušením pomocou HV. Získali sme 22.0 mg (0.065 mmol, 65.0 %) požadovaného produktu.

5-(Azidometyl)-N-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenyl)-oxazol-2-amínu (49) Tt: 160 – 163 °C [FLC, H/EA 1/2].

Elem. Anal. vypoč. C₁₃H₁₅N₅O₄S (337.35): C, 46.28; H, 4.48; S, 9.50. Získané: C, 46.49; H, 4.30; S, 9.34.

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, LK-136-08): δ 9.75 (br s, 1H, NH), 8.73 (d, 1H, *J*(4,6) = 2.2 Hz, H-C(6)), 7.49 (dd, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, *J*(4,6) = 2.2 Hz, H-C(4)), 7.25 (d, 1H, *J*(3,4) = 8.6 Hz, H-C(3)), 7.10 (s, 1H, H-Cox), 4.53 (s, 2H, CH₂N₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (q, 2H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂), 1.10 (t, 3H, *J*(CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, SO₂CH₂CH₃).





¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, LC-136-08C): 156.8 (C2'), 151.6
(C2), 139.6 (C5'), 130.0 (C1), 128.7 (C5), 126.1 (C4'), 122.4
(C4), 115.9 (C6), 110.8 (C3), 56.2 (OCH₃), 49.6 (SO₂CH₂), 44.0
(CH₂N₃), 7.2 (SO₂CH₂<u>CH₃</u>).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3424 (m, NH), 2943 (w), 2841 (w), 2096 (m, N₃), 1621 (s), 1582 (s), 1536 (m), 1484 (m), 1433 (m), 1355 (w), 1306 (m), 1261 (m), 1209 (m), 1119 (s), 1085 (m), 1024 (m), 988 (w), 889 (w), 848 (w), 808 (m), 718 (m).

6 Diskusia a výsledky

6.1 Syntéza a výsledky biologických testov NCI USA

6.1.1 Syntéza zlúčenín s pyránochromenónovým skeletom

Jedným z cieľov dizertačnej práce bola príprava nových derivátov zlúčenín obsahujúcich antineoplasticky aktívny 3-arylpyránochromenónový skelet (L), ktorý bol nedávno indetifikovaný v našej výskumnej skupine pomocou biologického testovania na 60 typoch ľudských tumorových bunkových líniách v NCI USA. (Schéma 12, vľavo)

Navrhnuté zlúčeniny obsahujúce skelet **3** sme pripravili kondenzáciou derivátov kyseliny fenyloctovej a 4-oxo-4H-chromén-3-karbaldehydu **1**. Reakcia prebieha ako kondenzácia *Perkinovho* typu s následnou enolizáciou a intramolekulovou laktonizáciou za vzniku produktu **3**. Východiskový chromén-3-karbaldehyd **1** sme pripravili z komerčného *orto*-hydroxyacetofenónu za podmienok *Vilsmeier-Haackovej* formylácie. Vybrané deriváty fenyloctových kyselín sme získali z komerčných zdrojov (*Fluka, Aldrich*). Vybrali sme *para*-substituované (H-, 4-F, 4-MeO, 3,4,5-(MeO)₃, 4-NO₂ a 4-SO₂Me) deriváty kyseliny fenyloctovej dobre prenášajúce elektrónové efekty substituentov, vhodné na štúdium vzťahu štruktúra a biologická aktivita. (Schéma 12, vpravo) Vzhľadom na užitočnosť opísaného typu kondenzačnej reakcie a rôznorodosť produktov sme sa rozhodli preskúmať jej priebeh a zistiť štruktúry produktov, ktoré pri nej vznikajú.



Schéma 12: Vľavo – objavený nosný skelet (L) pomocou biologického testovania v NCI. Vpravo – návrh zlúčenín 3 s predpokladanou antineoplastickou aktivitou.

Navrhli sme syntézu 2-oxopyránochromén-5-yl acetátov **3** z chromén-3-karbaldehydu 1 a fenyloctových kyselín 2 v Ac₂O za katalýzy AcONa podľa postupu z predošlej publikácie v našej skupine Lácová a kol.^{74,75} Pokiaľ sme látky 1 a 2 zahrievali pri 60 - 80 °C počas 2 - 3 h (Metóda A), izolovali sme požadované produkty 3 v dobrých výťažkoch (49 – 81 %). Ak sme syntézu robili ožarovaním v mikrovlnnom reaktore pri teplote 80 °C (Metóda B), výťažky produktov 3 boli o niečo vyššie (68 - 85 %), ale skrátil sa reakčný čas na 30 min a poklesol obsah vedľajších produktov. Rozhodli sme sa preveriť profil reakcie a teplotnú stabilitu acetátov **3** zahrievaním zmesi látok **1** a **2** pri 100 °C počas 12 – 22 h v Ac₂O (Metóda C). (Tabuľka 10) Hlavnými produktami boli acetáty 3 vo výťažkoch 11 - 54 %, ale pozorovali sme aj vznik dvoch vedľajších produktov 3-fenyl-5-(2-hydroxybenzoyl)-2Hpyran-2-ónov (4) (1 - 5%) a prešmyknutých 5-hydroxy-3-fenylpyránochromen-2-ónov (5) (2 -4 %), ktoré sme izolovali pomocou FLC na SiO₂. Zlúčeninu **5a** sme pripravili aj priamo, zahrievaním acetátu 3a v AcOH pri 60 °C počas 1 h v 77 % výťažku. Zlúčeninu 6b sme izolovali stĺpcovou chromatografiou na SiO₂ v 5 % výťažku. Počas chromatografie sme pozorovali výmenu HO- skupiny v zlúčenine 5b za EtO- skupinu 6b. K adično-eliminačnej výmene dochádza pravdepodobne vplyvom stôp etanolu v eluente za možnej katalýzy SiO_2 , čo otvára ďalšie možnosti derivatizácie takýchto typov zlúčenín. Dokázali sme, že zlúčeninu **6b** je možné pripraviť aj z látky **5b** zahrievaním v EtOH za kalalýzy pTsOH. (Schéma 10)

Acetyloxy skupina v polohe C(5) 2-oxo-3-fenyl-pyránochromen-5-yl acetátov **3** ľahko podlieha nukleofilným substitúciám. Zistili sme, že sa acetáty **3** hydrolyzujú na alkoholy **7** už počas FLC na SiO₂. Preto sme navrhli podmienky premeny AcO-C(5) skupiny na príslušné alkoholy HO-C(5) **6**. Kyslo katalyzovaná reakcia acetátu **3a** v zmesi dioxán-voda (3:1) pri 50 °C počas 2 h poskytovala 74 % výťažok alkoholu **7a**. Hydrolýzou acetátov **3** v zmesi H₂O / THF (1:1) počas 15 - 20 h pri rt sme získali príslušné alkoholy **7** v 26 – 98 % výťažkoch. (Tabuľka 11)

⁷⁴ Lácová, M.; Stankovičová, H.; Boháč, A.; Kotzianová, B.*Tetrahedron* **2008**, *64*, 9646–9653.

⁷⁵ Lácová, M.; Gašparová, R.; Koiš, P.; Boháč, A.; El-Shaaer, H. M.; *Tetrahedron* **2010**, 66, 1410–1419.

R ₁	Н	F	MeO	3,4,5- (MeO) ₃	NO ₂	SO ₂ Me
Metóda A (%)	81	60	-	53	-	-
Metóda B (%)	85	70	68	-	72	-
Metóda C (%)	11	61	54	16	49	70

Tabuľka 10: Výťažky acetátov 3 s využitím rôznych metód ich prípravy.

Tabuľka 11: Výťažky hydroxy derivátov 7 po hydrolýze z acetátov 3.

	Н	F	MeO	3,4,5- (MeO) ₃	NO ₂	SO ₂ Me
Metóda A (%)	74	-	-	-	-	-
Metóda B (%)	-	78	98	80	70	26

Vyššie uvedenými metodikami sme pripravili 17 zlúčenín, pričom 14 z nich nie je doteraz opísaných v literatúre. Všetky zlúčeniny sme podrobne spektrálne charakterizovali. Pri kondenzáciách chromén-3-karbaldehydu 1 s kyselinou 4-fluórfenyloctovou 2b sme izolovali a štruktúrne identifikovali všetky reakčné intermediáty. Zistili sme tiež, že počas čistenia chromatografiou sa niektoré z týchto zlúčenín menia. Na základe získaných informácii sme navrhli a odskúšali podmienky na ich cielenú premenu. Uvedené metódy (napr. premena AcO-C(5) na HO-C(2), resp. HO na EtO-) umožňujú prípravu nových derivátov zlúčenín s identifikovaným skeletom. Pripravené látky sme použili na zistenie ich antineoplastických vlastností.

6.1.2 Výsledky biologických testov NCI USA

Všetkých 17 pripravených zlúčenín sme poslali na testovanie antineoplastickej aktivity do NCI USA. Vybrané zlúčeniny boli najskôr odoslané na *in vitro One-dose* preskríning na 60 typoch ľudských tumorových bunkových líniách pri jednej koncentrácii 10^{-5} M počas 48 h. Dve zlúčeniny **3a** a **7a** boli ešte testované starším pre-skríningom na troch tumorových líniách pri koncentrácii 5.10^{-4} M počas 48 h. Zistili sme, že vedľajšie produkty reakcie, 3-(4-fluórfenyl)-5-(2-hydroxybenzoyl)-2H-pyran-2-ón (**4b**), 3-(4-fluórfenyl)pyránochromen-2-ón (**5b**) a **6b** neboli aktívne; **4b** (rast buniek oproti kontrole 117 %), **5b** (105 %) a **6b** (98 %). Anti-tumorová aktivita bola zistená pri 12 produktoch obsahujúcich požadovaný 3-fenylpyránochromenónový skelet (**3a-3e**, **3f**, **3g**, **7a-7c**, **7e** a **7f**). Na základe výsledkov prvotných testov na 60CC sme zistili, že antitumorová aktivita derivátov tohto typu nosnej zlúčeniny klesá so zväčšujúcim sa objemom R¹ substituentov v *para* polohe bez ohľadu na ich elektronické vlastnosti.

Aktívne zlúčeniny **3g**, **3h**, **3b** a **7a** z prvotného testovania postúpili do testu s 5 rôznymi koncentráciami (*Five Dose Assay*) opäť na 60CC. Zlúčenina **3g** bola zo všetkých testovaných látok najaktívnejšia. Jej štruktúra obsahuje nesubstituovanú fenylovú skupinu v polohe C(3) a dve pre aktivitu významné metylové skupiny v polohách C(8) a C(9). Táto látka má submikromolárnu priemernú GI₅₀ aktivitu na všetkých typoch 60CC a na niektoré tumorové bunkové línie (napr. leukémia, NSCLC, melanóm) je účinná už dokonca v nanomolárnej koncentrácii GI₅₀: 31 nM. NCI zaslala návrh na testovanie uvedenej zlúčeniny do *BEC* (*Biological Evaluation Commitee*), kde sa rozhodne o jej ďalšom antineoplastickom testovaní na živých systémoch.

Pomocou testov v NCI na ľudských tumorových bunkách sa nám podarilo identifikovať niekoľko aktívnych zlúčenín obsahujúcih nedávno objavený nosný skelet (L). Z týchto zlúčenín jedna bola svojou aktivitou zaujímavá k ďalšiemu *in-vivo* testovaniu.

6.1.3 Výsledok Compare analýzy

Predpokladaný antitumorový mechanizmus účinku sme identifikovali štatistickým porovnaním (*Compare analysis*) profilu GI₅₀ hodnôt zlúčeniny **3g** na všetkých daných tumorových bunkových líniách (niečo ako daktyloskopicklá stopa) s profilmi štandardných anti-tumorových zlúčenín ktorých mechanizmus antitumorového účinku je dokázaný. Pomocou on-line dostupnej možnosti uskutočniť *Compare analysis* sme zistili podobnosť medzi zlúčeninou **3g** a látkami s typickými **antitubulínovými interakciami** napr. **rhizoxín** s korelačným koeficientom (0.597), **maytansín** (0.438), **paklitaxel** (0.400), **S-trityl-L-cysteín** (0.374) a **vinblastín sulfát** (0.358).

Takýmto spôsobom sa nám podarilo identifikovať predpokladaný mechanizmus antitumorového účinku najaktívnejšej zlúčeniny obsahujúcej nedávno objavený nosný skelet. Dá sa predpokladať, že mechanizmus účinku aj ostatných derivátov nosnej zlúčeniny bude podobný.

6.2 Antiangiogeniká

6.2.1 Vývoj CAM testu

Nakoľko ďalším cieľom dizertačnej práce bola príprava zlúčenín s antiangiogénnym biologickým účinkom, bolo potrebné mať prístup aj k takýmto druhom biologických testov. Tento typ testov nebol voľne ani komerčne dostupný. Preto sme sa rozhodli zaviesť na našom pracovisku testovanie na vtáčích embryách (CAM) s cieľom zabezpečiť dostupnosť testu na zistenie antiangiogénneho efektu novopripravených zlúčenín.

Počas zavádzania a optimalizácie CAM antiangiogénneho testovania sme najprv optimalizovali prípravu embryí a našli sme nasledovné podmienky na uskutočnenie experimentu. Čerstvé, oplodnené vajcia prepelice japonskej boli inkubované pri 37.8 °C a ca 60-70% vlhkosti. Overili sme, že optimálnym časom na vyklápanie predinkubovaných vajec bolo 52-54 h. Pokiaľ sme vyklápali skôr nebol zárodok pripravený na ďalší vývoj. Ak sme vyklápali neskôr, žltkový vak sa stával krehkejším a častejšie dochádzalo k jeho poškodeniu počas presunu z vajca do jamky plastového plátu. Pri vyklápaní vajec sme škrupinu dezinfikovali 70% EtOH a povrch vajca sme otvorili pomocou chirurgických nožníc tak, že sme najprv porušili škrupinu vpichom ostrej špičky nožníc a následne sme strihaním urobili otvor ca do polovice priemeru vajca. Po vyklopení obsahu vajec do 6 jamkovej plastovej platne (priemer jamky bol 35 mm) s vrchnákom (Sarstedt a Orange Scientific) sme pokračovali v inkubácii embryí za tých istých podmienok ako tomu bolo pri vajciach, len s tým rozdielom, že inkubácia bola uskutočnená v inom sterilizovanom biotermostate.

Následne sme optimalizovali najvhodnejší čas na aplikáciu aktívnej látky, keď CAM membrána mala priemer 1.0 - 1.5 cm. Zistili sme, že CAM dosiahol u väčšiny embryí tento priemer po 5.5 dni od počiatku inkubácie vajec. Potom sme sa zaoberali hľadaním podmienok na získanie najlepšieho antiangiogénneho vizuálneho efektu (mm² alebo PAZ). Zistili sme, že najlepším systémom na aplikáciu je peleta, ktorú sme pripravovali nanesením 10 µl roztoku z 1% MEC (metylcelulózy) v PBS (*Phosphate Buffered Saline*) na teflónovú platňu umiestnenú v sterilnom laminárnom boxe. Po 1 h sušením nanesených peliet pri teplote 36 °C sme získali polymérny materiál, ktorý sa podobá očnej šošovke s priemerom 4 mm. Takto pripravené pelety sa dali ľahko odobrať z teflónového povrchu pinzetou. Pelety s obsahom aktívnej látky sme pripravovali tak, že ak bolo treba, sme najprv látku rozpustili v príslušnom obsahu DMSO a k tomuto roztoku sme za miešania po častiach pridávali príslušný objem 1%

MEC roztoku v PBS, aby sme získali požadovanú finálnu koncentráciu látky v 10 µl takéhoto roztoku. Postup sušenia kontrólnych peliet bol zhodný s prípravou peliet s aktívnou látkou v laminárnom boxe uvedených vyššie. Nakoľko sme najprv neboli úspešní s vizuálne pozorovaným antiangiogénnym efektom experimentálnych či komerčne dostupných aktívnych látok, zaobstarali sme si klinicky overené liečivá Sutent a Nexavar. Tieto látky sme pre ich cenovú nedostupnosť vyžiadali priamo od farmaceutických firiem Pfizer a Bayer z USA. Na Sutente a Nexavare sme optimalizovali antiangiogénny test z hľadiska rôzneho typu nosičov (MEC, želatína, gelaspon, alginát, filtračný papier, sklo, kapilára, plastový prúžok alebo priame zalievanie embrya). Podľa literatúry sme skúšali rôzne spôsoby aplikácie vzorky na CAM membránu. Priamou aplikáciou (topicky) pri koncentrácii 1.0 µg Sutentu v PBS alebo v roztoku 1 % MEC na embryo sme nepozorovali výraznú redukciu cievneho systému CAM membrány. Pokiaľ sa použili vyššie koncentrácie, dochádzalo k úhynu embryí. Preto sme pristúpili k aplikácii aktívnych látok na nosiči s pomalým uvoľňovaním. Pripravili sme kapsule zo zmesi 1 % alginátu s obsahom 0.5 % - 2.8 % DMSO a 3.0 ug - 0.5 µg Sutentu. Kapsule sa vytvorili kvapkaním uvedených roztokov do roztoku CaCl₂. Takto pripravená zosieťovaná matrica však neumožnila uvoľnenie látky do okolia, len málokedy sme pozorovali výrazný antiangiogénny efekt, čo si vysvteľujeme tak, že až pri poškodení povrchu kapsule došlo k uvoľňovaniu látky do jej okolia (PAZ: 1.5 - 0.3 %). Aj keď sa tento nosič relatívne l'ahko pripravuje, nie je pre daný experiment použiteľný, lebo neumožní efektívne uvoľňovanie aktívnej látky do okolia nosiča. Nanášať látky sme skúšali aj pomocou iných nosičov: gelaspon, očná šošovka, plast, sklo a filtračný papier. Tieto buď poškodzovali membránu, alebo dávali falošnú inhibíciu, prípadne neumožnili efektívne uvoľňovanie látky z nosiča. Aplikácia vzorky v kapiláre bola mechanicky nevhodná, lebo bola ťažká a vnárala sa do embrya, pričom antiangiogénny efekt bol pozorovaný len niekedy.

Preto sme sa rozhodli pripraviť pelety (transparentné nosiče želatínovej konzistencie) z 2 % želatíny obsahujúce 3.0 - 1.0 μ g Sutentu. Takáto aplikácia už umožnila dobre pozorovať efekt tým, že sa v okolí pelety vytvorila počas 48 h avaskulárna zóna (PAZ: 2.2 - 0.3 % z celkovej plochy pozorovanej CAM memebrány). Zistili sme, že vyšší obsah želatíny (6 %) nebol vhodný na prípravu nosiča, lebo tento nemal dobré vlastnosti a bol príliš tuhý. Pelety s nižším obsahom želatíny (1 %) boli príliš krehké a nevhodné na aplikáciu.

Hľadali sme vhodné koncentrácie aktívnych látok, zisťovali sme rozdiel medzi liekovou formou (soľ aktívnej bázy liečiva sunitinib L-malát, resp. sorafenib tozylát), ako aj ich izolovanou aktívnou bázou (sunitinib, sorafenib). Izolovanou bázou sme sa zaoberali preto, lebo táto je z hľadiska štruktúry viac podobná organickým zlúčeninám pripravovaných

v laboratóriách. Na základe podmienok testovania báz (sunitinib, sorafenib) sme chceli poznať podmienky na testovanie aj iných organických inhibítorov. Zitili sme, že najvýhodnejším nosičom pre praktickú aplikáciu testu je 10 µl peleta z 1 % MECu v PBS. Pokiaľ bol obsah MEC pelety 0.5 %, boli príliš krehké a teda nevhodné na aplikáciu. Naopak 2 % a 3 % MEC roztoky boli príliš husté na vytvorenie peliet. Pri hľadaní vhodnej koncentrácie aktívnej látky v 1% MEC pelete sme pokusy vyhodnocovali aj z hľadiska toxicity a úhynu embryí. Nakoniec sme zistili, že pozorovaný antiangiogénny efekt závisí od rýchlosti uvoľňovania látky z pelety. V prípade optimálneho uvoľňovania sme dosiahli najlepšie výsledky v priebehu 48 h. Rýchlosť uvoľňovania inhibítora závisí od jeho koncentrácie, rozpustnosti, afinity k metylcelulóze a prípadného obsahu DMSO. Intenzita antiangiogénneho efektu závisí okrem uvedeného riadeného uvoľňovania aj od samotnej inhibičnej sily danej zlúčeniny. Z uvedeného vyplýva, že uskutočnenie CAM experimentu s jednotnou metodikou nie je možné. Každá testovaná látka musí byť minimálne optimalizovaná na jej vhodnú konecentráciu (kompromis efekt / úhyn) a ako sme neskôr zistili aj na obsah DMSO v pelete. Príliš vysoký obsah DMSO síce uľahčuje rozpustnosť látok vo fosfátovom pufri (PBS), ale tiež urýchľuje uvoľňovanie aktívnej látky z pelety a tým vplýva aj na zvýšenú toxicitu, úhyn embryí, či znížený efekt nevhodnou dobou uvoľňovania. Nízky obsah DMSO znižuje aj uvoľňovanie látky z pelety a ak je táto pomaly uvoľňovaná, rýchlosť antiangiogénneho pôsobenia je malá a tá je potom prekrytá rýchlosť ou natívnej neovaskularizácie CAM membrány. Z uvedeného vyplýva, že existuje najmä v prípade málo rozpustných – organických látok optimálny obsah DMSO na prejavenie sa maximálneho vizuálneho efektu. V poslednej fáze pri vyhodnocovaní pokusu sme tento ukončili po 48 h inkubácie s aktívnou látkou v MEC pelete. Kvôli optickému oddeleniu vrchných ciev CAM membrány od ciev vnútri, alebo na opačnej strane embrya sme pod CAM membránu vstrekli na konci experimentu 1-2 ml intralipózy (emulzia sójového oleja vo vode). Intralipóza, ktorá predstavuje mlieku podobnú kvapalinu, oddelila vrchnú časť CAM membrány od zvyšku embrya. Následne sme snímali z každého embrya 2 fotografie s vysokým rozlíšením, ktoré sme neskôr vyhodnocovali pomocou programu ImageJ.63 Vyhodnotenie pokusu sme robili tak, že sme počítačom zistili plochu vytvorenej avaskulárnej zóny. Avaskulárne oblasti z pokusu za rovnakých podmienok sa spriemerovali a priemerné hodnoty týchto plôch sme navzájom v rôznych experimentoch porovnávali.

Z optimalizácie experimentov **liekovej formy Sutentu**, ako aj jej **izolovanej bázy** (generika **sunitinibu**) vyplynulo, že najvýhodnejšie z hľadiska antiangiogénneho efektu a relatívne nízkej toxicity je použitie 1.5 μg Sutentu v 1 % MEC pelete z 10 μl bez DMSO (v

prípade Sutentu) a s optimom 0.1 % DMSO v prípade 2.0 µg sunitinibu, ktorý má oproti Sutentu nižšiu rozpustnosť.

Z optimalizácie experimentov **liekovej formy Nexavaru**, ako aj jej **izolovanej bázy** (generika **sorafenibu**) vyplynulo, že najvýhodnejšie z hľadiska antiangiogénneho efektu a relatívne nízkej toxicity je použitie 3.0 µg Nexavaru v 1% MEC pelete z 10 µl bez DMSO (v prípade Nexavaru) a s optimom 0.11% DMSO v prípade 4 µg sorafenibu, ktorý má oproti Nexavaru nižšiu rozpustnosť. Samotný Nexavar je však menej rozpustný ako Sutent.



Obr. 17: Obrázky CAM vaskulatúry (7.5 dňové embryá) s inhibičnou aktivitou (avaskulárne zóny) liečiv Sutentu a Nexavaru a ich izolovaných báz sunitinibu a sorafenibu.

Na záver tejto časti treba zdôrazniť, že na vizuálne pozorovanie inhibičného efektu v *in vivo* CAM usporiadaní treba zabezpečiť optimálne riadené uvoľňovanie látky z nosiča v priebehu 48 h. Rýchlosť uvoľňovania a antiangiogénny efekt závisí od **štruktúry látky**, jej **koncentrácie**, **inhibičnej sily**, **obsahu MEC** a koncentrácie **DMSO** v pelete. **Každú experimentálnu látku** treba testovať pri jej rôznej koncentrácii (napr. 5-1 µg) najlepšie v 1 **% MEC**, ako aj pri **rôznom obsahu DMSO** (napr. 3 – 0 %).

V tejto časti našej práce sa nám podarilo zaviesť CAM metodiku, získať praktickú skúsenosť s inkubáciou embryí za sterilných podmienok, aplikáciou vzoriek na rôznych nosičoch a zistili sme tiež význam obsahu DMSO pre pozorovanie antiangiogénneho efektu. Zaviedli sme jednak vizuálne komparatívne hodnotenie CAM testu, ako aj presnejšie vyhodnotenie pomocou počítačového spracovania nasnímaných digitálnych fotografií, porovnaním plôch avaskulárnej zóny k celkovej ploche pozorovaného embrya (PAZ: percento avaskulárnej zóny). Hoci zavádzanie *in vivo* CAM metodiky nebolo jednoduché (84 experimentov, každý ca 100 vajec), tento test je dôležitý a svojou *in vivo* komplexitou významný, lebo ak je pozorovaný dobrý antiangiogénny efekt na CAMe, s vysokou pravdepodobnosťou sa jedná o zlúčeninu, ktorá bude aktívna aj na vyšších *in vivo* systémoch.

Na základe množstva uskutočnených experimentov sme si dostatočne uvedomili, že pri testovaní nových zlúčenín treba dodržať postupnosť od *in vitro* testov na enzymatickú a bunkovú aktivitu, až po zložitejšie *in vivo* testy (napr. CAM a iné).

6.2.2 Analýza inhibítora 1Y6A

Objavenie a optimalizácia nového typu antiangiogeník na báze 2-anilíno-5fenyloxazolu, ktorý má priamy inhibičný účinok na tyrozínkinázovú časť VEGFR-2 receptora sa podarilo vyvinúť nanomolárne účinný inhibítor 1Y6A s enzymatickou aktivitou IC₅₀ = 22 nM a bunkovou IC₅₀ = 370 nM (HUVEC/VEGF). Následne bola dokázaná priama interakcia tohto inhibítora s KDR proteínom pomocou röntgeno-štruktúrnej analýzy (PDB: 1Y6A).¹

Nakoľko nás štruktúra a vlastnosti tohto inhibítora zaujali, uskutočnili sme analýzu jeho neväzbových interakcii s aminokyselinovými zvyškami VEGFR-2 proteínu. Zistili sme, že dusík z oxazolu a susedná ArNH skupina poskytujú HBA a HBD s Cys917 (-CON<u>H</u>- a C=<u>O</u>) a kyslík etylsulfónovej skupiny dáva HBA s Asp921(-CON⁺H₃). Aromatické jadro v C(5) polohe oxazolu prispieva σ , π interakciou s Val846, samotný oxazol je v σ , π interakcii s metylovou skupinou Leu1033 a MeO- skupina poskytuje malú lipofilnú interakciu s Lys918.



Pri syntéze inhibítora **1Y6A** autori v literatúre vychádzali z derivátu acetofenónu **53**, ktorý dával vznik príslušného acetofenónového azidu **54**. Ďalšou východiskovou látkou bol aromatický amín **55**, z ktorého pripravili izotiokyanát **56**. Azidový aj izotiokyanátový prekurzor bol použitý do ďalšieho syntetického stupňa, pričom vznikol oxazolový medziprodukt **57** v 36 % výťažku. Finálny inhibítor **1Y6A** pripravili pomocou *Stilleho* couplingu s Bu₃Snpy v 51 % výťažku.¹

Preštudovaním známeho nanomolárneho inhibítora **1Y6A** z hľadiska jeho interakcií v aktívnom mieste VEGFR-2 receptora a aj jeho syntézy, sme sa rozhodli navrhnúť a pripraviť jeho nové, vhodne substituované deriváty.

6.2.3 Návrh nových O, N - inhibítorov odvodených od 1Y6A

Analýzou inhibítora 1Y6A sme sa rozhodli vylepšiť jeho inhibičnú aktivitu zavedením substituentov s novými prídavnými neväzbovými interakciami. Z röntgeno-štruktúrnej analýzy sme zistili, že vhodné na substitúciu sa javí aromatické jadro v C(5) polohe oxazolu nakoľko sa nad ním nachádzajú vhodne usporiadané polárne aminokyselinové zvyšky tvoriace malé polárne vrecko. Metódami molekulového modelovania sme navrhli vhodnú *para*-substitúciu (OH, OMe, OMOM, OCHO a OCONH₂) benzénového jadra skeletu inhibítora 1Y6A. Polárne vrecko sme chceli využiť na zavedenie nových interakcií, ako aj na a overenie prediktívnych metód.

Kyslíkaté deriváty: Skupina HO- (O⁻) má prispieť svojou HBD a iónovou interakciou s Lys866(NH₃⁺), MeO- má prispieť HBA s Lys866(NH₃⁺), ako aj lipofilnou interakciou CH₃ skupiny s blízkym Phe1045. MOMO- skupina by mohla prispieť dvomi kyslíkmi cez HBA s Lys866(NH₃⁺). V prípade MOMO- však podľa predikcie koncová CH₃ skupina presahuje polárne vrecko a priestorovo si môže vadiť s fenylom z Phe1045. Zavedenie HCOO- skupiny a jej redukciou na HOCH₂O- skupinu by sme získali analóg MOMO- skupiny, pričom H by nebol tak stéricky náročný ako je CH₃ skupina v MOMO-. Skupiny -CHO aj -CONH₂ viazané cez kyslík na Ar jadro by mohli poskytnúť HBA s Lys866(NH₃⁺). Amidická skupina -CONH₂ má potenciál poskytnúť aj HBD s Glu883(COO⁻).

Dusíkaté deriváty: Keďže zoskúpenia ArOCOH a ArOCONH₂ naviazané cez kyslík na aromatické jadro by mohli byť chemicky nestabilné, rozhodli sme sa kvôli stabilite viazať tieto skupiny aj cez N v podobe ArNHCHO a ArNHCONH₂. Predpokladané interakcie: kyslík formylovej a amidickej skupiny by mohli poskytnúť HBA s Lys866(NH₃⁺) a OCONH₂ aj HBD s Glu883(COO⁻). Vplyvom bázických vlastnosti blízkej pyridylovej skupiny by mohlo dôjsť k odštiepeniu amidického vodíka za zvýraznenia enolickej formy formylovej ArN=CHO⁻ aj amidickej ArN=CNH₂O⁻ skupiny, čím by sa umožnila HBA a zároveň aj iónová interakcia s Lys866(NH₃⁺). (Obr. 19)



R	predpokladané interakcie	R	predpokladané interakcie
ОН	iónová O ⁻ Lys866(NH ₃ ⁺)	NH ₂	HBA Lys866(NH ₃ ⁺)
	HBA Lys866(NH ₃ ⁺)		
	HBD Glu883(COO ⁻)		
OMe	HBA Lys866(NH ₃ ⁺)	NHCHO	iónová ArN=CHO ⁻ Lys866(NH ₃ ⁺)
	lipofilné CH3 skupina		HBA Lys866(NH_3^+),
			HBD Glu883(COO ⁻)
OMeOMe	HBA Lys866(NH ₃ ⁺)	NHCONH ₂	iónová ArN=CNH ₂ O ⁻ Lys866(NH ₃ ⁺)
	lipofilné CH3 skupina		HBA Lys866(NH_3^+),
			HBD Glu883(COO ⁻)

Obr. 19: Navrhnuté *p*-substituované deriváty inhibítora 1Y6A s predpokladanými interakciami v aktívnom mieste receptora.

Výpočtami väzbových energií pomocou dokovacieho programu *Yassara* využívajúceho semiempirické *ab initio* výpočty sme získali poradie najvhodnejších *para* substituovaných derivátov 1Y6A. Pre kyslíkaté deriváty bol najvhodnejší MeO- derivát (-58.7 kcal/mol), potom OH- (-57.3 kcal/mol) a najmenej výhodným MOMO- derivát (-52.6 kcal/mol). Pri dusíkatých derivátoch najlepším bol -NHCONH₂ (-57.1 kcal/mol), -NHCHO (-55.2 kcal/mol) a nakoniec nie moc výhodný NH₂ derivát (-50.6 kcal/mol). V porovnaní so samotným inhibítorom 1Y6A, štyri z navrhnutých derivátov (OMe, OH, NHCONH₂ a NHCHO) by mali byť energeticky výhodnejšie.





V tejto časti sme molekulovým modelovaním a výpočtami potvrdili nové štruktúry derivátov inhibítora 1Y6A s výhodnou substitúciou v *para* polohe aromatického jadra, ktoré by svojimi novými predpokladanými interakciami s aminokyselinami objaveného polárneho vrecka mali prispieť k vylepšeniu inhibičnej aktivity VEGFR-2 receptora.

6.2.4 Syntéza oxo-inhibítorov VEGFR-2 receptora

Pre predikované nové deriváty sme navrhli syntetickú cestu podľa literatúry na prípravu inhibítora z komplexu PDB: 1Y6A. Najskôr sme pripravili prekurzory: azidové **15** a **11** a izokyanátový **20**, ktoré po reakcii s pPPh₃ poskytujú zlúčeniny s oxazolovým skeletom **21a** a **22a**. Zavedením pyridylovej skupiny pomocou *Stilleho couplingu* sme získali požadované deriváty MeO- **23** aj MOMO- **24** inhibítora 1Y6A.¹ Zitili sme, že *p*-HO-1Y6A **25** nie je možné pripraviť uvedeným postupom (nevznikal oxazolový heterocyklus), preto sme tento museli pripraviť hydrolýzou z pripraveného *p*-MOMO-1Y6A **24**.

a) Syntéza prekurzorov - a-azidoacetofenónových a izokyanátového

Bromáciou na aromatický skelet, aj do α -polohy 4-hydroxyacetofenónu **8** sme podľa literatúry²³ pripravili požadovaný dibrómderivát **9**. Autori používali elementárny Br₂, AcOK a ľadovú AcOH, ktorá v našom prípade príliš aktivovala acetofenón, pričom dochádzalo k prebrómovaniu jeho alifatickej časti. Preto sme postup modifikovali podľa literatúry,⁷⁶ kde je opísaná príprava 1-(5-bróm-4-etyl-2-hydroxyfenyl)etanónu v CHCl₃. My sme použili dvojnásobné množstvo Br₂ (2.10 mol ekv) a reakciu sme kvôli rozpustnosti a polarite robili v zmesi CHCl₃ / MeOH (85:15) od – 30 °C až do vystúpenia teploty na rt počas 20 h. Po

⁷⁶ Bennett, C. J.; Caldwell, S. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Duthie, G. G.; Hartley, R. C. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, *12*, 2079-2098.

kryštalizácii sme získali 60 % výťažok želaného dibrómovaného produktu 9. Ďalším krokom bola príprava 2-azido-1-(3-bróm-4-hydroxyfenyl)etanónu 10. Tento sme získali v 95 % výťažku podľa postupu opisujúceho prípravu 2-azido-1-(4-metoxyfenyl)-etanónu s NaN₃ v DMSO pri rt (lit. 93 %).⁷⁷

Druhým α -azidoacetofenónovým prekurzorom bol 2-azido-1-(3-bróm-4-(metoxymetoxy)fenyl)etanón **11**. Najskôr sme uskutočnili reakciu zavedenia MOM- skupiny pomocou NaH (1.1 mol ekv) v DMF (93 % podľa literatúry),⁷⁸ ale podľa TLC analýzy sme pozorovali 4 škvrny, použili sme preto alternatívny postup z tej istej literatúry, kde sme reakciu robili z hydroxyazidu **10** pomocou K₂CO₃ a MOMCl v acetóne počas 30 min. Takto sme získali 93 % výťažok požadovaného produktu **11** (lit. 86 %).⁷⁸

Tretím pripravovaným prekurzorom bol 2-azido-1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanón 15. Tento pripraviť priamo sa nám nepodarilo metyláciou 2-azido-1-(3-bróm-4hydroxyfenyl)etanónu 10 s K_2CO_3 abs a MeI v Et₂O abs. Preto sme navrhli novú cestu, kde prvým krokom bola acylácia aromatického jadra komerčne dostupného 1-bróm-2metoxybenzénu 12. Najprv sme pripravili acylačnú zmes zahrievaním LiClO₄ s Ac₂O pri 60 °C počas 20 h. Po jej ochladení sme pridali 1-bróm-2-metoxybenzén 12 a zmes sme zahrievali na 100 °C počas 72 h. Získali sme 1-(3-bróm-4-metoxyfenyl)etanón 13 v 74 % výťažku.⁷⁹ Tento sme následne brómovali do α-polohy. Pre bromáciu sme použili Br₂ (1.30 mol ekv) v CCl₄ za refluxu počas 2 h a získali sme 85 % 2-bróm-1-(3-bróm-4-metoxy-fenyl)etanónu Bromáciu sme robili podľa literatúry opisujúcej 14. prípravu 2-bróm-1-(4metoxyfenyl)etanónu.⁸⁰ Iné podmienky Br₂ / Et₂O alebo Br₂ / AcOH²³ sa ukázali byť ako menej vhodné, nakoľko bola v zmesi stále prítomná aj VL, alebo vznikali polymérne produkty. V prípade použitia AcOH v bromačnej zmesi, vznikali aj neželané dibrómované deriváty. Posledným krokom uvedenej syntézy bola príprava 2-azido-1-(3-bróm-4metoxyfenyl)etanónu 15, ktorý sme pripravili substitúciou brómu s NaN₃ v DMSO pri rt v 88 % výťažku podľa postupu uvedeného pri syntéze hyroxyazidového derivátu 10.

⁷⁷ Gong, P. K.; Blough, B. E.; Brieaddy, L. E.; Huang, X.; Kuhar, M. J.; Navarro, H. A.; Carroll, F. I. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3686-3695.

⁷⁸ Süsse, M.; Johne, S.; Hesse, M. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 457-470.

⁷⁹ Bartoli, G.; Bosco, M.; Marcantoni, E.; Massaccesi, M.; Rinaldi, S.; Sambri, L. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6331-6334.

⁸⁰ Kumari, S.; Parkash, S.; Goel, V. K. Ind. J. Chem. 1996, Org. Chem. Incl. Med. Chem., 35, 1329 – 1330.

• Pokusy o zavedenie CHO a CONH₂ skupín na fenolický kyslík azidu 10

Najskôr snažili zaviesť CONH₂ CSI sme skupinu pomocou sa (chlórosulfonylizokyanátu) podľa patentovej literatúry s využitím K_2CO_3 a hydroxyazidu (10) v acetóne abs. za chladenia počas 2 h a následnou hydrolýzou H₂O / HCl v MeOH pri 40 °C počas 1 h.⁸¹ Napriek tomu, že sme reakciu opakovali viackrát a optimalizovali, pozorovali sme stále len východiskovú zlúčeninu. Z dôvodu vysokej spotreby azidového prekurzora (10), sme sa rozhodli tieto reakcie robiť na modelovom substráte 4-brómfenole. Sledovaním reakcie na TLC platničke pred hydrolýzou sme sa rozhodli sledovať stabilitu produktu. V bázických roztokoch (10 % NaHCO₃ a K₂CO₃) dochádza k veľmi rýchlej hydrolýze produktu, státím reakčnej zmesi v kyslom roztoku je hydrolýza produktu pomalšia (10 % HCl) a po 1 h sa dá pozorovať už len VL. Vo vodnom roztoku dochádza k úplnej hydrolýze po 3 h. Takto sme zistili, že požadovaný produkt sa rozkladá v prítomnsoti vody a rýchlosť reakcie je takmer okamžitá v bázickom prostredí a pomerne rýchla aj v kyslom prostredí.

Skúšali sme zaviesť **CONH**₂ skupinu aj iným spôsobom. Nechali sme reagovať východiskovú látku s K₂CO₃ v acetóne, pričom sme za chladenia (-20 °C) počas 2 h pridávali COCl₂ (20% roztok v toluéne)⁸² a následne čpavkovú vodu. Pozorovali sme však tiež len prítomnosť VL.

Ďalej sme sa pokúsili zaviesť **CONH**₂ skupinu aj reakciou KNCO s HCl (g) v CH_2Cl_2 .⁸³ Získali sme CONH₂ produkt a VL (**10**) v pomere 1:1.

Ďalšou cieľovou molekulou bola zlúčenina s **CHO** skupinou na ArOH. Formylovaný derivát modelového 4-brómfenolu sa nám podarilo pripraviť pomocou HCOOH / DCC (3.0 / 3.3 ekv) pri rt počas 2h.⁸⁴ Problémy sme mali so separáciou zvyškovej DCU vznikajúcej z DCC. Ďalej sme chceli z CHO redukciou s NaBH₄ v MeOH pripraviť jeho OCH₂OH derivát.⁸⁵ Získali sme však len východiskový 4-brómfenol.

Uskutočnili sme aj reakciu s H₂CO (10.0 mol ekv) zatavenú do Pasteurovej pipety bez rozpúšťadla pri 130 °C počas 6 h. Napriek očakávanej formylácii na O, sme pozorovali

⁸¹ Tibotec Pharmaceuticals LTD. Patent: WO2005/58873 A1, 2005.

⁸² Pattison, V.A.; Colson, J.G.; Carr R.L.K. J. Org. Chem., **1968**, 33, 1084 – 1087.

⁸³ Modarresi-Alam, A. R.; Khamooshi, F.; Nasrollahzadeh, M.; Amirazizi, H. A. *Tetrahedron* 2007, 63, 8723-8726.

⁸⁴ Yasuhara, T.; Manse, Y.; Morimoto, T.; Qilong, W.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.; Muraoka O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2944–2946.

⁸⁵ Stevens, C. L.; Glinski, R. P.; Taylor, K. G.; Blumbergs, P.; Gupta, S. K. J. Am. Chem. Soc., **1970**, *92*, 3160–3168.

zavedenie formylovej skupiny aj na aromatické jadro a zaznamenali sme prítomnosť aj polymérnych produktov. Pri nižšom obsahu paraformaldehydu a nižšej teplote (90 – 110 °C) bola prítomná VL a aj ostatné produkty. Zatavili sme aj roztok formaldehydu 36 % a zahrievali sme zmes na 110 °C cez noc. V tomto prípade sme pozorovali len VL.

Pokúsili sme sa o reakciu benzyloxymetylchloridu s fenolickým kyslíkom. Hydrogenolýzou 10 % Pd/C/H₂ sme chceli pripraviť O-formylovaný derivát. Reakciou modelového substrátu 4-brómfenolu s K₂CO₃ (1.3 ekv), BnOCH₂Cl (1.7 mol ekv) v acetóne a následnou hydrogenolýzou sme získali olejovitú látku. Destiláciou na Buechi aparatúre s postupným zahrievaním do 100 °C nám z oleja vypadli kryštály BnOCH₂Ar produktu v 18 % výťažku. Hydrogenolýza BnOCH₂ skupiny s 10 % Pd/C, ako sme neskôr zistili, je nevhodná kvôli citlivosti oxazolového jadra, pričom dochádzalo za daných podmienok k jeho deštrukcii.

Pokúsili sme sa o množstvo syntetických ciest ako zaviesť na fenolický kyslík požadované CHO a CONH₂ skupiny tak, aby sme získali designované deriváty HCO-1Y6A a NH₂COO-1Y6A. Zistili a dokázali sme, že na našom substráte sú takéto skupiny veľmi nestabilné a aj keď sa nám podarilo ich reakciou zaviesť, dochádzalo k ich odštiepeniu už počas miernych podmienok spracovania reakčnej zmesi. Preto sme sa rozhodli, že tieto z hľadiska prídavných interakcií významné skupiny zavedieme do *para* polohy aromatického jadra 1Y6A **cez dusík**. Nevýhodou tohto rozhodnutia je, že treba uskutočniť totálnu syntézu celého skeletu.

Izokyanátovový prekurzor **20** sme pripravili z 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyanilínu **19**. Keďže východiskový 5-(etylsulfonyl)-2-metoxyanilín **19** je dostupný, ale finančne nákladný, rozhodli sme sa pripraviť ho z komerčne viac dostupného 2-amino-4-(etylsulfonyl)fenolu **16** v troch stupňoch (N-acylácia, O-metylácia, N-deacylácia) s celkovým výťažkom 80 % produktu **19**. Následne sme požadovaný izokyanát **20** pripravili z anilínu **19** reakciou s 20 % roztokom fosgénu v toluéne za refluxu v EA počas 3 h. Nakoľko presne tento typ izokyanátu **20** nie je známy, použili sme analogický postup z literatúry.⁸⁶

V časti prípravy prekurzorov sa nám podarilo pripraviť 3 nové doteraz neopísané zlúčeniny **10, 11 a 20**. Zistili sme, že pri bromácii do oboch polôh (na aromatiku a zároveň do α -polohy) hydroxyacetofenónu **8** v zmesi rozpúšťadiel CHCl₃ / MeOH (85:15) má dôležitú úlohu aj MeOH kvôli rozpustnosti a polarite. Pripravili sme hydroxy azidový prekurzor **10** a z neho aj MOMO-derivát **11**. MeO-derivát **15** sme pripravili novou syntetickou cestou

⁸⁶ Brown, R. J.; Annis, G.; Casalnuovo, A.; Chan, D.; Shapiro, R.; Marshall, W. J. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 4361 – 4376.

z východiskového *o*-brómanizolu (**12**). Vďaka množstvu uskutočnených experimentov zavedenia CHO a $CONH_2$ skupiny na modelový 4-Br-fenol sme zistili, že dochádza k hydrolýze vzniknutých produktov na východiskové látky. Kvôli nestabilite týchto produktov sme sa rozhodli tieto skupiny zaviesť cez N a pripraviť tak analógy prekurzorov-aminoazidov.

b) Syntéza navrhnutých O-zlúčenín obsahujúcich oxazolový heterocyklus

Pri syntéze oxazolových zlúčenín sme postupovali podľa reakcie autorov s využitím príslušného izotiokyanátu a PPh₃ v CH_2Cl_2 abs.¹ V našom prípade sme vychádzali z izokyanátu **20** a ako vhodnejší vzhľadom na jednoduchšiu separáciu sme použili polymérny pPPh₃.

Pri MOMO-deriváte azidu **11** sme použili najskôr klasický PPh₃ s výťažkom 29 % v prospech oxazolového produktu **22a**, avšak produkt bol aj napriek čisteniu pomocou FLC znečistený zvyškami PPh₃ a PPh₃O, preto sme museli tento produkt ešte prekryštalizovať a získali tak konečný 17 % výťažok oxazolu **22a**. Na reakciu sme použili aj Bu₃P namiesto Ph₃P, kvôli lepšej možnosti separácie. Po chromatografii sme v tomto prípade pozorovali len stopy produktu **22a**. Nakoniec sme zvolili polymérny pPPh₃, pričom sme po FLC dosiahli lepšie výťažky 34 % oxazolového produktu **22a** a 28 % výťažok otvoreného močovinového produktu **22b**.

Pri MeO-deriváte azidu **15** sme použili polymérny pPPh₃ a získali sme 11 % výťažok požadovaného oxazolového produktu **21a**, pričom dominantou látkou (63 %) bol otvorený močovinový derivát **21b**.

Uvedenou syntetickou cestou sme sa pokúsili z PPh₃ pripraviť aj OH-derivát, ale oxazolový produkt **25** a jeho močovinový derivát sme získali len v stopových množstvách. Preto sme zvolili iný postup, hydrolýzu už pripraveného finálneho *p*-MOMO-inhibítora **24**. Táto reakcia bola úspešná (text nižšie).

Z uskutočnených oxazolových reakcií vyplýva, že rektivita klesá od MOMO- 22a, MeO- 21a až po HO-derivát. Kyslík z MOM-skupiny pravdepodobne zvyšuje reaktivitu substrátu v porovnaní so samotnou CH₃ skupinou MeO derivátu.

Finálne inhibítory sme získali po reakcii (*Stilleho couplingu*) v zatavenej *Pasteurovej* pipete pri 100 °C počas 48 h.¹ Po FLC čistení na SiO₂ sme získali *p*-MeO-derivát **23** v 63 % a *p*-MOMO-derivát **24** inhibítora 1Y6A v 79 % výťažku.

Vzhľadom na neúspešnú prípravu HO-oxazolového skeletu z hydroxyazidu **10** za podmienok PPh₃ v CH₂Cl₂ abs, sme sa rozhodli jednoduchšou cestou pripraviť požadovaný HO-produkt. Hydrolýzou z už pripraveného inhibítora *p*-MOMO-1Y6A **24** v 30 % roztoku HCl v zmesi H₂O/MeOH (konc. HCl riedená s MeOH na 30% obsah HCl) pri rt počas 30 min podľa analogického postupu z literatúry⁸⁷ sme získali 98 % požadovaného finálneho *p*-HO-1Y6A inhibítora **25**.

V tejto časti sa nám podarilo pripraviť 7 doteraz neopísaných zlúčenín (**21a**, **21b**, **22a**, **22b**, **23**, **24** a **25**). Zaviedli sme využívanie pPPh₃ v reakcii prípravy oxazolových derivátov kvôli jednoduchej separácii Ph₃PO. *p*-MeO- **21a** aj *p*-MOMO- **22a** deriváty 1Y6A sme pripravili reakciou s pPPh₃ a následným *Stilleho couplingom*. Derivát *p*-HO-1Y6A **25** sme získali hydrolýzou z pripraveného *p*-MOMO-1Y6A **24**. Podarilo sa nám teda pripraviť 3 nové deriváty inhibítora 1Y6A (**23**, **24** a **25**).

6.2.5 Syntéza aza-inhibítorov VEGFR-2 receptora

a) Syntéza a-azidoacetofenónových prekurzorov

Nakoľko sa nám navrhnuté CHO- a -CONH₂ skupiny nepodarilo zaviesť cez –O, pripravili sme novú syntetickú cestu zavedenia týchto skupín cez -N.

Navrhnuté aza deriváty prekurzorov sme sa rozhodli pripraviť z východiskového 4aminoacetofenónu **26** jeho dvojnásobnou bromáciou podobne ako tomu bolo pri príprave dibrómhydroxy derivátu **9**. V tomto prípade sme však kvôli vyššej reaktivite aromatických amínov pozorovali vznik jediného, a to neželaného produktu 1-(4-amino-3,5-dibrómfenyl)etanónu. O zavedenie dvoch brómov do molekuly sme sa pokúšali aj na východiskovom formylom chránenom 4-aminoacetofenóne. Aj v tomto prípade sme získali len neželaný 1-(4amino-3,5-dibrómfenyl)etanón. Prednostne dochádzalo k odchráneniu formylovej skupiny vplyvom vznikajúcej HBr a teda následnej bromácii do oboch *orto* polôh na aktivovanom aromatickom systéme. Táto bromácia bola oveľa rýchlejšia ako je bromácia na alifatickom zvyšku takéhoto acetofenónu.

Vzhľadom na uvedené skutočnosti sme navrhli prípravu želaného dibrómhydroxyderivátu **29** z *o*-brómanilínu. Prvým krokom bolo zavedenie formylovej skupiny pomocou HCOOH / Ac₂O. Následne sme uskutočnili reakciu s BrCH₂COBr / AlCl₃, ale túto acyláciu sa nám nepodarilo uskutočniť a izolovali sme len VL. Zahrievaním na 80 °C v DMF cez noc

⁸⁷ Manabe, K.; Okamura, K.; Date, T.; Koga, K. J. Org. Chem., 1993, 58, 6692–6700.

dochádzalo pravdepodobne k acylácii na N, lebo v ¹H-NMR sme pozorovali zachovanú osubstitúciu.

Z predchádzajúcich skúseností sme sa rozhodli selektívne brómovať najskôr polohu na aryle a potom α -polohu acetofenónu **26**. Podľa postupu z patentovej literatúry⁸⁸ sme z 4aminoacetofenónu 26 a NBS v toluéne abs pri 40 °C počas 15 min pripravili požadovaný monobrómovaný derivát 27. Nakoľko jedným z cieľových inhibítorov mal byť Nformylovaný derivát inhibítora HCONH-1Y6A, rozhodli sme sa v tomto kroku zaviesť formylovú skupinu. Podľa patentovej literatúry (kde substrát bol 2-brómanilín).⁸⁹ sme si najskôr pripravili formylačnú zmes zahrievaním HCOOH a Ac₂O pri 70 °C počas 2 h, po jej ochladení sme pridali aminoacetofenón 27 a po 1 h pri rt sme pripravili N-(4-acetyl-2brómfenyl)formamid 28 v 99 % výťažku. Jeho selektívnou bromáciou s CuBr₂ došlo k zavedeniu brómu do α-polohy acetofenónu pri rt cez noc. Získali sme požadovaný dibróm derivát **29** v 57 % výťažku po kryštalizácii.⁹⁰ Za podmienok uvedenej reakcie však dochádza k odchráneniu formylovej skupiny vplyvom vznikajúcej HBr. Chránenie amino skupiny sa ukázalo byť dôležité, nakoľko pri bromácii neformylovaného 4-amino-3-brómacetofenónu 27 s CuBr₂ sme pozorovali vznik aj neželaného produktu brómovaného v oboch orto polohách na aromatickom jadre vedľa NH₂ skupiny.

Rovnakým postupom ako pri príprave hydroxy-azidu 10 sme s NaN₃ v DMSO počas 30 min pri rt získali 99 % požadovaného amino-azidového produktu 30.

Opätovnou formyláciou (ako v predchádzajúcich stupňoch reakcie) s HCOOH a Ac₂O sme získali 99 % výťažok -NHCHO azidu 31.

Pripravili sme aj azid s -CONH₂ skupinou 35 pomocou CSI v AN abs pri rt cez noc v 55 % výťažku po kryštalizácii.

Pripravené deriváty azidu -CHO 31 aj -CONH₂ 35 sme použili do ďalšieho syntetického stupňa – vytvorenie oxazolového jadra. Zistili sme, že v prípade použitia ArNHCHO azidového derivátu 31 dochádzalo k deprotekcii formylovej skupiny, pričom výťažok NH₂-oxazolového produktu 36a bol nízky (8 %). Pri azide s NHCONH₂ skupinou 35 sme nepozorovali vznik požadovaného produktu. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli zmeniť syntetickú stratégiu a pripraviť deriváty aminoazidu 30 s takými chrániacimi skupinami, ktoré by boli stabilitou vhodné pre nasledujúce dva reakčné stupne (zavedenie oxazolu a následne aj

 ⁸⁸ American Cyanamid Company *Patent:* US4404222A1, **1983**.
 ⁸⁹ Eisai RandD Management Co., Ltd. *Patent:* EP1832580 A1, **2007**.
 ⁹⁰ King, L. C.; Ostrum, G. K. *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 3459–3461.

pyridylu cez couplingovu reakciu). Z finálneho produktu by sme potom deprotekciou pripravili NH₂ derivát, ktorý by sme následne formylovali na p-NHCOH derivát a reakciou s KNCO / HCl pripravili aj p-NHCONH₂ derivát inhibítora 1Y6A.

Reakciou aminoazidu **30** v Ac₂O pri rt sme pripravili *N*-acetylovaný azid **34**. Podobným spôsobom, reakcia s $(CF_3CO)_2O$ v THF pri rt poskytovala -NHCOCF₃ derivát **33**. Z pivaloyl chloridu v pyridíne za chladenia počas 3 h sme pripravili NHCOC(CH₃)₃ produkt azidu **32** v 80 % výťažku.

Pokúšali sme sa pripraviť aj mezylovaný derivát s MsCl podľa rôznych postupov s použitím Et₃N,⁹¹ NaHCO₃ alebo pyridínu ako bázy⁹² a rozpúšťadiel AN, acetón príp. CH₂Cl₂. Aj napriek viacerým reakciám sa nám požadovaný produkt nepodarilo pripraviť. V reakcii Ms₂O a pyridínu v THF sme pozorovali len VL.⁹³ Neúspešné experimenty sme dosiahli aj pri pokuse o zavedenie Boc skupiny v reakcii s Boc₂O a pyridínom (DMAP) v THF.⁹⁴ S použitím silnej bázy DBU dochádzalo k odštiepeniu vodíkov aj z metylénu vedľa azidovej skupiny.

V tejto časti prípravy aza-azidových prekurzorov sme zistili, že kvôli vyššej reaktivite aromatických amínov (oproti fenolom) sme museli selektívne brómovať najskôr aromatické jadro a potom α -polohu N-chráneného aminoacetofenónu. Cielene pripravené azidy s NHCHO a NHCONH₂ skupinami neboli vhodné do nasledujúceho reakčného stupňa vybudovania oxazolového skeletu. Preto sme pripravili sériu ďalších troch azidov **32**, **33** a **34** s takými chrániacimi skupinami, ktoré by boli vhodnejšie do ďalšej reakcie. Podarilo sa nám pripraviť 8 doteraz v literatúre neopísaných zlúčenín (**28**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**, **34** a **35**).

b) Syntéza navrhnutých N-zlúčenín obsahujúcich oxazolový heterocyklus

Všetky pripravené deriváty aminoazidov **31**, **35**, **34**, **33** a **32**) (NHCHO, NHCONH₂, NHAc, NHCOCF₃ a NHCOC(CH₃)₃) sme použili do reakcie s izokyanátom **20** a pPPh₃ v CH₂Cl₂ pri rt cez noc. Len formylovaný **31**, pivaloyl **32** a trifluóracetylovaný-derivát **33** poskytovali oxazolové produkty reakcie. V prípade NHCHO azidu dochádzalo pri tejto reakcii k deprotekcii formylu, pričom sme pozorovali vznik oxazolu **36a** s Ar-NH₂ skupinou

⁹¹ Zarghi, A.; Praveen Rao, P. N.; Knaus, E. E. Bioorg. Med. Chem. 2007, 15, 1056 - 1061.

⁹² Lim, J.-O.; Jin, M.-K.; Ryu, H.Ch.; Kang, D. W.; Lee, J.; Pearce, L. V.; Tran, R.; Toth, A.; Blumberg, P. M. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 322 – 331.

⁹³ Suh, Y. G.; Oh, U. T.; Kim, H. D.; Lee, J. W.; Park, H. G.; Park, O. H.; Lee, Y. S.; Park, Y. H.; Joo, Y. H.; Choi, J. K.; Lim, K. M.; Kim, S. .; Kim, J. K.; Koh, H. J.; Moh, J. H.; Jeong, Y. S.; Yi, J. B.; Oh, Y. I. *Patent:* US2003/153596 A1, **2003.**

⁹⁴ Abdellatif, K. R. A.; Chowdhury, M. A.; Knaus, E. E. J. Heterocyc. Chem. 2008, 45, 1707 – 1710.

v 8 % výťažku. Najlepšie výťažky (43 %) sme dosiahli v prípade -NHCOC(CH₃)₃ oxazolového derivátu **37**. Tu sme odskúšali rôzne podmienky reakcie, ak sme pridávali východiskové látky (azid **32** a izokyanát **20**) do zmesi za chladenia (-20 °C) v rôznom poradí, dochádzalo k vzniku neželaného otvoreného produktu. Podľa literatúry sme urobili reakciu aj so zahrievaním na 90 °C v dioxáne, no očakávaný produkt sme nezískali. Ak sme reakciu uskutočnili pri rt zmiešaním všetkých látok naraz a rozpustením v CH₂Cl₂, získali sme dominantný oxazolový produkt **37** v 43 % výťažku.

Reakcia *Stilleho coupningu* v zatavenej *Pasteurovej* pipete pri 100 °C počas 48 h v prípade NH₂ derivátu **36a** nebola úspešná. Derivát NH**COCF**₃ oxazolu **39a** poskytoval nízky 30 % výťažok. Jedine s N-pivaloyl derivátom **37** sme po FLC čistení získali očakávaný produkt **38** v 75 % výťažku a dobrej čistote.

Problémom je však odchránenie pivaloylovej skupiny zo skeletu látky **38**. Podmienkami z literatúry kyslou katalýzou v MeOH (EtOH) so zahrievaním,⁹⁵ reakciou s Bu₄NBr v THF ani pomocou DIBALu sa nám dosiaľ nepodarilo pripraviť požadovaný derivát *p*-NH₂-1Y6A. Tento sme plánovali pripraviť aj oxidáciou pivaloylu na Boc skupinu a jeho následnou deprotekciou. Avšak oxidácia s MnO₂ v CH₂Cl₂ nebola úspešná, najprv sme pri rt nepozorovali zmenu, pokiaľ bola reakcia zahrievaná, pri vyšších teplotách dochádzalo k rozpadu oxazolového kruhu.

V tejto časti sme pripravili 8 doteraz neopísaných zlúčenín. Aj napriek 5 odskúšaným reakciám prípravy oxazolového skeletu s rôznymi chrániacimi skupinami na N, len 3 z nich poskytovali požadované oxazolové produkty **36a**, **37** a **39a**. Našli sme vhodné podmienky prípravy pivaloyl-oxazolového produktu **37** v 43 % výťažku. V couplingovej reakcii jedine pivaloyl-derivát **37** poskytoval želaný produkt **38** v 75 % výťažku. Doteraz sa nám nepodarilo odchrániť túto pivaloylovú skupinu. Preto prípravu *p*-NH₂, *p*-NHCHO a *p*-NHCONH₂ derivátov 1Y6A sa nám dosiaľ nepodarilo uskutočniť a táto oblasť zatiaľ ostáva otvorená pre ďalší výskum.

6.2.6 Testovanie O-derivátov 1Y6A

Počas nášho výskumu sme získali prístup aj k *in vitro* testovaniu zlúčenín na ich inhibičnú enzymatickú (VEGFR-2) a bunkovú (HUVEC) aktivitu.

⁹⁵ Kozikowski, A. P.; Ma, D.; Du, L.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 6666 – 6672.

Tak nesubstituovaný 1Y6A ako aj tri jeho navrhnuté a pripravené deriváty (MOMO, MeO, HO) boli testované na inhibíciu enzymatickej aktivity, pričom pre HO **25** a MeO **23** sme získali hodnoty IC₅₀: 12.8 a 14.7 nM vzťažne. Dosiahnutá aktivita samotného 1Y6A je 17.1 nM (lit. 22 nM).¹ Derivát MOMO-1Y6A **24** mal zhoršenú inhibičnú aktivitu (87.3 nM) pravdepodobne kvôli stéricky náročnej metoxymetyloxyskupine, ktorá si zavadzala v malom polárnom vrecku s Phe1045. Na porovnanie sme zistili aj IC₅₀ hodnoty klinických liekov Sutentu (31.2 nM) a Nexavaru (12.6 nM).



V spolupráci s kolegami z Belgickej *University of Liege* sme uskutočnili aj bunkové testy, ktoré potvrdili inhibíciu fosforylácie sekundárneho posla (ERK), ktorého mediátor je práve VEGF/VEGFR-2 signálna dráha. Experimentálne bolo dokázané, že naše 3 nové deriváty 1Y6A (**23, 24 a 25**) znižujú intenzitu fosfo-ERK signálov, čo bolo sledované *blot* analýzou. Fosforylácia ERK vedie k aktivácii jeho vlastnej kinázovej aktivity. V HUVEC bunkách bez VEGF nedochádza k fosforylácii ERK. Preto sme sledovali intenzitu fosfo-ERK signálov so zvyšovaním koncentrácie VEGF za prítomnosti našich inhibítorov. (Obr. 20)



Obr. 20: Vľavo: znižovanie intenzity p-ERK vplyvom aktívnej látky a vpravo: rovnaká intenzita signálov kontroly.

Možno zhrnúť, že sa nám v tejto časti podarilo navrhnúť a pripraviť 2 inhibítory **23** a **25** s výbornou enzymatickou aktivitou, ktoré sú z hľadiska inhibície VEGFR-2 rovnako alebo viac účinné ako je to v prípade liečiv Nexavar a Sutent.

Syntéza azidového ligandu

Identifikáciou 2-anilíno-5-fenyloxazolu ako nového nosného skeletu vhodného pre d'alšiu optimalizáciu inhibičnej aktivity pomocou SAR štúdie sme navrhli nahradiť benzénové jadro v polohe C(5)-oxazolu na za iný aromatický systém. Výmenou za triazolový kruh je možné "Click" reakciou príslušných ligandov azidov a alkínov spájať rôzne časti inhibítorov a pripraviť sériu nových derivátov potenciálnych inhibítorov. (Obr. 21)



Obr. 21: Vľavo – znázornené spajanie dvoch častí rôznych inhibítorov s využitím *Click* reakcie (modrým je vyznačený nami pripravovaný ligand azidu navrhnutý z inhibítora 1Y6A), vpravo – superimpozícia oboch inhibítorov s proteínmi s novonavrhnutým triazolovým kruhom.

Cieľom mojej práce počas 5 týždňovej COST CM0602 zahraničnej stáže v Strasbourgu bola príprava jednouhlíkatého arylaminooxazol-azidového a alkínového

ligandu. Nakoľko sa nám doteraz alkínový ligand nepodarilo pripraviť, uvádzam prípravu len azidového produktu 49.

Vychádzali sme z 2-aminooxazol-5-karboxylátu 44, ktorý sme pripravili podľa literatúry reakciou pripraveného etylchlórformylacetátu 43 s močovinou za refluxu v H₂O počas 5 h v 53 % výťažku.²⁶ Amino skupinu na oxazole sme substituovali podľa literárneho postupu (podobný substrát, ale iný regioizomér - 2-aminooxazol-4-karboxylát) za chlór diazotačnou reakciou s ^tBuONO a CuCl₂ v AN abs zahrievaním na 80 °C počas 2 h a získali sme produkt 45 s výťažkom 78 %.⁹⁶ Chlóroxazolový derivát 45 sme použili do reakcie so substituovaným anilínom 19. Táto reakcia bola kľúčová, nakoľko autori podľa literatúry reakciu anilínov s chlóroxazolovým derivátom uskutočňovali v ⁱPrOH pri 80 °C.¹ V našom prípade boli podmienky nevhodné, lebo dochádzalo tak k rozkladu chlórovaného činidla, ako aj oxazolového produktu. Okrem toho počas reakcie vznikal aj otvorený vedľajší produkt, ktorý sa nám napriek viacerým pokusom nepodarilo premeniť na požadovaný oxazol 46. Zjemnením reakčných podmienok (rt namiesto 80 °C) na úkor reakčného času (5-7 dní) a väčšieho množstva chlórovaného činidla (2.00 mol ekv) v ⁱPrOH sme dosiahli takmer úplnu konverziu VL 19, pričom želaný produkt 46 sme získali v 61 % výťažku po kryštalizácii.

Ďalším syntetickým krokom bola redukcia etylesterovej skupiny v C(2) polohe oxazolu 46 na príslušný alkohol 47. Ako sme pozorovali vo väčšine prípadov redukčných činidiel NaBH₄, LiAlH₄, DIBAL aj BH₃.THF dochádzalo prednostne k redukcii na oxazolovom skelete. Nakoniec sa nám podarilo pripraviť požadovaný alkohol 47 redukciou v THF s LiAlH₄ postupným pridávaním (6 x 0.5 mol ekv) každých 30 min za stáleho chladenia pri -20 °C v 63 % výťažku.⁹⁷

Z alkoholu 47 sme reakciou s SOCl₂ pri 30 °C cez noc získali chlórovaný derivát 48^{98} ktorý sme bez izolácie použili do posledného reakčného kroku prípravy azidu 49 s NaN₃ v DMSO pri rt. Takto pripravený azidový ligand (65% výťažok počítaný na alkohol) sme použili do "Click" reakcie a využili pri tvorbe *Click chemistry* kombinatoriálnych knižníc.

V tejto časti práce sa nám podarilo pripraviť 4 doteraz neopísané zlúčeniny 46, 47, 48 a 49. Optimalizovali sme reakciu prípravy ArNHoxazol-5-karboxylátu 46 s využitím miernych podmienok za vzniku jediného požadovaného produktu. Podarilo sa nám navrhnúť podmienky redukcie oxazolesteru postupným pridávaním činidla LiAlH₄ za vzniku alkoholu

 ⁹⁶ Hodgetts, K. J.; Kershaw, M. T. *Org. Lett.* 2003, *5*, 2911 – 2914.
 ⁹⁷ Aguado, A.; Boulos, J.; Carreras, A.; Montoya, A.; Rodriquez, J. J. *Heterocyc. Chem.* 2007, *44*, 1517 – 1520.

⁹⁸ Yamane, T.; Mitsudera, H.; Shundoh, T. Synthesis **2004**, *17*, 2825 – 2832.

47. Pripravený azidový ligand **49** bude ďalej slúžiť pri príprave nových inhibítorov VEGFR-2 receptora pomocou *Click chemistry* kombinatoriálnych knižníc.
7 Záver

Antineoplastiká:

Prostredníctvom biologického testovania v NCI USA bola v našej skupine objavená štruktúra nového nosného skeletu s antitumorovou aktivitou (L). Navrhli, pripravili a testovali sme sériu 17 zlúčenín skríningom v NCI USA. Z týchto látok, je 14 chemicky nových a doteraz neopísaných v literatúre. Skúmali sme antineoplastickú aktivitu týchto zlúčenín obsahujúcich substituenty vo vhodných polohách nosného skeletu tak, aby sa mohli prejaviť ich mezomérne elektronické vplyvy. Zistili sme, že zavedenie akceptorných aj donorných skupín v *para* polohe na Ph-C(3) acetátov **3** nie je z hľadiska zlepšenia antineoplastickej aktivity výhodné. Najlepším z hľadiska aktivity bol nesubstituovaný derivát **3g**. Zistili sme, že priemerná GI_{50} aktivita zlúčenín s HO-C(5) **7** a AcO-C(5) **3** je podobná pravdepodobne kvôli relatívne rýchlej hydrolýze AcO-C(5) derivátov vo vodnom prostredí, alebo interakčnej nevýznamnosti molekuly s biologickým cieľom v tejto časti molekuly. Pozorovali sme, že na zvýšenie aktivity má významný vplyv prítomnosť malých lipofilných Me-substituentov na inom aromatickom kruhu v polohe 8 a 9 produktov **3g** a **3h**.

Zo 17 testovaných zlúčenín (*One Dose Screening*), boli 4 aktívne (**3g**, **3h**, **3b** a **7a**) a postúpili do ďalšieho testu s ich rôznymi koncentráciami (*Five Dose Screening* 10^{-5} - $10^{-9}M$) na 60 ľudských tumorových bunkových líniách. V tomto teste sme zistili GI₅₀ inhibíciu rastu buniek v uM až nM škále. Najlepšia zo všetkých testovaných zlúčenín **3g** bola poslaná do BEC (*Biological Evaluation Commitee*) na rozhodnutie o jej ďalšom testovaní v *in vivo* experimentoch.

Pomocou programu *Compare* sa nám podarilo identifikovať možný antitubulínových mechanizmus pôsobenia tohto typu antineoplastických látok.

Antiangiogeniká:

Podarilo sa nám zaviesť CAM metodiku antiangiogénneho testovania na prepeličích embryách pomocou štandardných liečiv Sutent a Nexavar, ako aj na ich izolovaných generických bázach (sunitinib a sorafenib). Zoptimalizovali sme inkubáciu embryí za sterilných podmienok v biotermostate. Oskúšali sme vhodnú aplikáciu vzoriek na rôznych nosičoch, pričom ako najvhodnejšiu sme identifikovali metylcelulózovú peletu. Zistili a vysvetlili sme význam obsahu DMSO pre pozorovanie dobrého antiangiogénneho efektu.

Zaviedli sme vizuálne komparatívne hodnotenie CAM testu, ako aj presnejšie počítačové vyhodnotenie veľkosti plôch avaskulárnej zóny z digitálnych fotografií. Zavádzanie CAM metodiky bolo pracné a časovo náročné (84 experimentov každý týždeň, ca 100 vajec v jednom pokuse). Tento test je však významný jeho *in vivo* biologickou komplexitou. Ak je na CAM teste pozorovaný dobrý antiangiogénny efekt, jedná sa v takom prípade o zlúčeninu, ktorá bude pravdepodobne aktívna aj u zvierat, resp.na ľuďoch.

Analýzou komplexu PDB: 1Y6A a interakcií jeho inhibítora s VEGFR-2 proteínom sme identifikovali malé polárne vrecko v blízkosti voľnej *p*-polohy benzénového jadra arylamino-aryloxazolov. Pomocou molekulového modelovania a výpočtom väzbových energií sme ako vhodné substituenty zvolili -OH, -OMe a –OMOM skupiny. Vzhľadom na obavu, že -OMOM derivát bude svojou koncovou metylovou skupinou zasahovať príliš hlboko do tohto polárneho vrecka, sme ako alternatívu zvolili stéricky menej náročné -OCONH₂ a -OCHO skupiny. Pri syntéze sme zistili, že posledne spomenuté dva deriváty sú chemicky natoľko nestabilné, že nie je možné uskutočniť efektívne ich syntézu a ani testovanie. Preto sme navrhli stabilnejšie dusíkaté analógy inhibítora 1Y6A s -NHCHO a -NHCONH₂ skupinami.

Sytézu navrhnutých zlúčenín sme uskutočnili najprv prípavou azidových **10, 11 a 15** a izokyanátového **20** prekurzora. Zlúčeniny s oxazolovým heterocyklom sme pripravili reakciou jednotlivých organických azidov **11 a 15** a izokyanátu **20** a prítomnosti pPPh₃ v CH₂Cl₂. Následnou *Couplingovou* reakciou sme do takýchto molekúl zaviedli pyridylovú skupinu a pripravili tak požadované deriváty MeO-1Y6A **23** a MOMO-1Y6A **24**. Plánovaný HO-1Y6A derivát **25** sme pripravili hydrolýzou z MOMO-1Y6A **24**.

Všetky novopripravené kyslíkaté deriváty inhibítora 1Y6A (MOMO-, MeO- aj HO-) boli spolu s 1Y6A (H-), Sutentom a Nexavarom testované na inhibíciu enzymatickej VEGFR-2 aktivity. Stanovili sme aj IC₅₀ hodnoty štandardov Sutentu a Nexavaru, ktoré neboli v literatúre dostupné. Zistili sme, že inhibícia IC₅₀ VEGFR-2 enzymatickej aktivity je pre 1Y6A 17.1 nM, pre Sutent 31.2 a pre Nexavar 12.5 nM. Naše zlúčeniny HO-1Y6A **25** a MeO-1Y6A **23** mali IC₅₀ hodnoty 12.8 a 14.7 nM vzťažne. Derivát MOMO-1Y6A **24** mal zhoršenú inhibičnú aktivitu (IC₅₀ = 87.3 nM), čo potvrdilo predpokladaný problém so stérickou repulziou predikovaný tak molekulovým modelovaním, ako aj dockingovým skóre. Dizajnom a syntézou sa nám podarilo pripraviť deriváty inhibítora 1Y6A **23** a **25** s vylepšenou inhibičnou aktivitou oproti samotnému inhibítoru 1Y6A. Dôkazom inhibície VEGFR-2 receptoru bola tiež experimentálne stanovená inhibícia fosforylácie ERK signálneho proteínu, ktorý prenáša signál z VEGF aktivovaného VEGFR-2 receptora. Tieto testy na našich zlúčeninách boli robené v rámci COST spolupráce s Univerzitou v Belgickom Liege.

Pri *de novo* syntéze navrhnutých dusíkatých derivátov 1Y6A sme sa aj napriek snahe o použitie viacerých azidových prekurzorov (HCO-, Piv-, F₃CCO-, Ac- a H₂NCO-) **31**, **32**, **33**, **34** a **35** stretli s problémom, buď pri ich príprave alebo pri samotnej následnej syntéze oxazolového heterocyklu. Nakoniec sa nám úspešne podarilo pripraviť pivaloylový derivát PivNH-1Y6A **38**, no problémom zostalo odchránenie tejto skupiny a plánované zavedenie -NHCHO a -NHCONH₂ skupín na NH₂-1Y6A. Preto syntéza týchto derivátov inhibítora 1Y6A vyžaduje ďalšie výskumné úsilie.

V našej skupine sa zaoberáme aj prípravou *Click chemistry* knižníc farmakofórnych ligandov určených na identifikáciu účinných inhibítorov VEGFR-2 receptora. Dôležitou súčasťou tohto výskumu bola príprava N-arylaminooxazolmetylazidového ligandu **49**. V rámci COST spolupráce a STSM stáže v Strasbourgu sa nám podarilo vyvinúť vhodnú metodiku na syntézu požadovaného ligandu **49**. Kľúčovým pri syntéze bolo uvedomenie si vlastností a termickej nestability oxazolového intermediátu **46**, kde sa podarilo nájsť vhodné podmienky (rt, 7 dní) na jeho prípravu v 61 % výťažku a po kryštalizácii.

Pri syntéze antiangiogénnych zlúčenín sme pripravili 24 nových doteraz v literatúre neopísaných zlúčenín. Navrhli a syntetizovali sme inhibítory 1Y6A skeletu so substitúciou na fenyle v *para* polohe v snahe využiť na zlepšenie aktivity identifikované malé polárne vrecko. Biologickými testami v Nemecku (ProQuinase, GmbH; IC₅₀ VEGFR-2) sme potvrdili predpokladanú výbornú enzýmovú inhibíciu týchto derivátov **23** a **25**. Inhibítory, ktoré sme pripravili, mali inhibičnú aktivitu na úrovni klinických liečiv Sutentu a Nexavaru. Predikcie, ktoré sme realizovali až do podoby organických inhibítorov boli úspešne a nové zlúčeniny inhibujú VEGFR-2 receptor v nM koncetráciách **23**, **24** a **25**.

Výsledky nášho výskumu v oblasti vývoja nových antiangiogeník boli v roku 2009 ocenené farmaceutickou spoločnosťou Pfizer (1. cena - *Pfizer Research Award 2009*). Výsledky tohto výskumu boli tiež prezentované na zahraničných konferenciách v rámci projektu COST CM0602.

8 Súhrn

V našej výskumnej skupine bola objavená štruktúra nového nosného skeletu (L) s antitumorovou aktivitou prostredníctvom biologického testovania v NCI USA. Pripravili sme sériu 17 zlúčenín (14 z nich doteraz neopísaných v literatúre), ktoré boli testované skríningom v NCI USA. Z týchto 17 testovaných zlúčenín, boli 4 aktívne (**3g**, **3h**, **3b** a **7a**) a postúpili do ďalšieho testu s piatimi rôznymi koncentráciami (10^{-5} - $10^{-9}M$) na 60 ľudských tumorových bunkových líniách. V teste sme zaznamenali GI₅₀ inhibíciu rastu buniek v µM až nM škále. Zistili sme, že zavedenie akceptorných aj donorných skupín v *para* polohe na Ar-C(3) (**3**) nie je z hľadiska zlepšenia antineoplastickej aktivity výhodné, nakoľko najlepšiu aktivitu mal nesubstituovaný derivát **3g**. Tiež sme zistili, že priemerná GI₅₀ aktivita zlúčenín s HO-C(5) a AcO-C(5) je podobná pravdepodobne kvôli relatívne rýchlej hydrolýze AcO-C(5) derivátov vo vodnom prostredí. Pozorovali sme, že na zvýšenie aktivity má významný vplyv prítomnosť malých lipofilných Me-substituentov na inom aromatickom kruhu v polohe 8 a 9. Z hľadiska ďalšieho zlepšenia antineoplastickej aktivity by bolo vhodné preštudovať práve túto oblasť aromatického jadra.



Najlepšia zo všetkých testovaných zlúčenín **3g** bola poslaná do BEC (*Biological Evaluation Commitee*) na rozhodnutie o jej ďalšom testovaní v zložitejších *in vivo* experimentoch.

Pomocou programu *Compare*, porovnaním výsledkov našich experimentálnych látok a zlúčenín so známym mechanizmom účinku a ich koreláciou sa nám podarilo identifikovať možný antitubulínových mechanizmus pôsobenia tohto typu antineoplastických zlúčenín.

Podarilo sa nám zaviesť CAM metodiku antiangiogénneho testovania na prepeličích embryách pomocou štandardných liečiv Sutent a Nexavar, ako aj na ich izolovaných generických bázach (sunitinib a sorafenib). Zoptimalizovali sme inkubáciu embryí za sterilných podmienok v biotermostate. Pomocou rôznych metód aplikácie vzoriek sme ako najvhodnejšiu identifikovali metylcelulózovú peletu. Zistili a vysvetlili sme význam obsahu DMSO pre pozorovanie dobrého antiangiogénneho efektu.

Zaviedli sme vizuálne komparatívne hodnotenie CAM testu, ako aj presnejšie počítačové vyhodnotenie veľkosti plôch avaskulárnej zóny z digitálnych fotografií. Napriek náročnejšiemu zavádzaniu CAM metodiky, je tento test významný svojou *in vivo* biologickou komplexitou. Ak je na CAM teste pozorovaný dobrý antiangiogénny efekt, jedná sa v takom prípade o zlúčeninu, ktorá bude pravdepodobne aktívna aj na vyšších organizmoch.

Analýzou komplexu PDB: 1Y6A a interakcií jeho inhibítora s VEGFR-2 proteínom sme identifikovali malé polárne vrecko v blízkosti voľnej *p*-polohy benzénového jadra arylamino-aryloxazolov. Pomocou molekulového modelovania a výpočtom väzbových energií sme ako vhodné substituenty zvolili -OH, -OMe a –OMOM skupiny. Vzhľadom na predpokladanú objemnú -OMOM skupinu, ktorá zasahuje príliš hlboko do polárneho vrecka, sme ako alternatívu zvolili stéricky menej náročné -OCONH₂ a -OCHO skupiny. Pri syntéze sme zistili, že posledne spomenuté dva deriváty sú chemicky natoľko nestabilné, že nie je možné uskutočniť efektívne ich syntézu a ani testovanie. Preto sme navrhli stabilnejšie dusíkaté analógy inhibítora 1Y6A s -NHCHO a -NHCONH₂ skupinami.

Syntézu navrhnutých zlúčenín sme uskutočnili najprv prípavou azidových **10, 11** a **15** a izokyanátového **20** prekurzora a tieto následne použili do reakcie s pPPh₃ v CH₂Cl₂, pričom sme získali oxazolové produkty **21a** a **22a**. Následnou *Couplingovou* reakciou sme do molekúl zaviedli pyridylovú skupinu a pripravili tak požadované deriváty MeO-1Y6A **23** a MOMO-1Y6A **24**. Derivát HO-1Y6A **25** sme pripravili hydrolýzou z MOMO-1Y6A **24**.

Všetky pripravené kyslíkaté deriváty inhibítora 1Y6A (MOMO-, MeO- aj HO-) boli spolu s 1Y6A (H-), Sutentom a Nexavarom testované na inhibíciu enzymatickej VEGFR-2 aktivity (IC₅₀ hodnoty Sutentu a Nexavaru v literatúre nedostupné) v Nemecku (ProQuinase, GmbH; IC₅₀ VEGFR-2). Zistili sme, že inhibícia IC₅₀ VEGFR-2 enzymatickej aktivity je pre 1Y6A 17.1 nM, pre Sutent 31.2 a pre Nexavar 12.5 nM. Naše zlúčeniny HO-1Y6A **25** a MeO-1Y6A **23** mali IC₅₀ hodnoty 12.8 a 14.7 nM vzťažne. Derivát MOMO-1Y6A **24** mal zhoršenú inhibičnú aktivitu (IC₅₀ = 87.3 nM), čo potvrdilo predpokladaný problém so stérickou repulziou predikovaný molekulovým modelovaním a dockingom. Podarilo sa nám navrhnúť a pripraviť deriváty inhibítora 1Y6A **23** a **25**, ktoré sú aktívne na úrovni klinického lieku Sutent. Dôkazom inhibície VEGFR-2 receptora bola tiež experimentálne stanovená inhibícia fosforylácie ERK signálneho proteínu, ktorý je priamo spojený a prenáša signál z VEGF aktivovaného VEGFR-2 receptoru. Tieto testy na našich zlúčeninách boli robené v rámci COST spolupráce s Univerzitou v Belgickom Liege. Pri syntéze navrhnutých dusíkatých derivátov 1Y6A s použitím viacerých azidových prekurzorov (HCO-, Ac-, F₃CCO-, H₂NCO- a Piv) **31**, **32**, **33**, **34** a **35** sme zistili, že oxazolové produkty poskytujú len niektoré z nich. Nakoniec sa nám úspešne podarilo pripraviť pivaloylový derivát PivNH-1Y6A **38**, no problémom zostalo odchránenie tejto skupiny a plánované zavedenie -NHCHO a -NHCONH₂ skupín na NH₂-1Y6A. Syntéza týchto dusíkatých derivátov inhibítora 1Y6A vyžaduje ďalší výskum.

V našej skupine sa zaoberáme aj prípravou *Click chemistry* knižníc farmakofórnych ligandov určených na identifikáciu účinných inhibítorov VEGFR-2 receptora. Dôležitou súčasťou tohto výskumu bolo vyvinúť vhodnú metodiku prípravy N-arylaminooxazolmetylazidového ligandu **49**. Termická nestabilita oxazolového intermediátu **46** vyžadovala nájsť vhodné reakčné podmienky (rt, 7 dní) na jeho prípravu. Podarilo sa nám navrhnúť podmienky redukcie oxazolesteru postupným pridávaním činidla LiAlH₄ za vzniku alkoholu **47**. Pripravený azidový ligand **49** bude ďalej slúžiť pri príprave nových inhibítorov VEGFR-2 receptora pomocou *Click chemistry* kombinatoriálnych knižníc.

9 Summary

A new leading structure (L) has been recently discovered in our experimental group through antitumor activity screening on the sixty human tumour cell lines in NCI USA. Within this experimental work we prepared series of 17 selected derivatives possessing (L) structure that were tested in USA. Four from this compounds **3g**, **3h**, **3b** and **7a** active in prescreening (5.10^{-5} M) were further tested on Five Dose Screening $(10^{-5} - 10^{-9} \text{ nM})$ on 60 type of human cancer cell lines. We found out, that acceptor and donor groups present in *para* position on Ph-C(3) of **3** were not advantageous in term of enhancement of antineoplastic activity. Mean activity of AcO-C(5) and HO-C(5) was similar probably due to the hydrolysis AcO-C(5) in aqueous conditions.



The best activity compound **3g** with H in *para* position on Ph-C(3) has been delivered to the next step decision on BEC (Biological Evaluation Committee). Presence of small lipophilic Me substituents at C(8) and C(9) positions on the other aromatic ring significantly enhanced its antineoplastic activity. Following this fact and the results of SAR study of *p*-Ph-C(3) substitution is a good point for further scientific study.

A compare analysis allows us to proposed potential antitubuline mechanism of this kind of screened compounds.

In next part of this work, we established and studied the biological antiangiogenic activity *in vivo* CAM assay on Japanese quail embryos with standard drugs Sutent and Nexavar (and their sunitinib and sorafenib free bases). We optimized incubation of embryos in a sterile conditions in biotermostat and proved MEC (methylcellulose) pellets as optimal slow releasing vehicle for application of organic compounds. We found and explained the importance of DMSO in the pellets for better observation of antiangiogenic effect. Visual comparative evaluation and more accurately computer interpretation of CAM results were introduced. The measurement of avascular zones surfaces through computer based digital

picture processing has been implemented. CAM assay has an important predication value due to its *in vivo* complexity.

Interaction analysis ligand-proteine of the crystal complex structure PDB: 1Y6A (VEGFR-2 receptor) allowed us to identify new inhibitors by implementation of oxo substituents in para-position of phenyl group. Molecular modelling and *in Silico* methods selected five appropriate oxygen derivates of inhibitor 1Y6A (OH, OMe, OMOM, OCHO and OCONH₂). Because substituents OCHO and OCONH2 are unstable, we proposed their nitrogen substituted bioisosters.

Finally, we synthesized new types of designed antiangiogenic compounds. All proposed compounds were prepared from organic azide precursors **10**, **11** and **15** and arylisocyanate **20**. Further, reaction with pPPh₃ in CH₂Cl₂ by rt and subsequent cyclization to give appropriate oxazolic derivates **21a** and **22a**. Final step of synthesis was Stille coupling to provide derivates (MeO and MOMO) of inhibitor 1Y6A **23** and **24**. *p*-HO-1Y6A **25** was prepared by hydrolysis in 30 % HCl in MeOH of MOMO-1Y6A **24**.

1Y6A and all obtained derivates 23, 24 and 25 together with standard drugs Sutent and Nexavar were tested for their enzymatic KDR antiangiogenic activity. Inhibition was as follows: 1Y6A 17.1 nM, Sutent 31.2 nM, Nexavar 12.5 nM, MOMO-1Y6A 24 87.3 nM (worse inhibition activity regarding to the bulky MOMO- group predicted by molecular modelling and also docking), HO- 25 and MeO-1Y6A 23 12.8 and 14.7 nM were on the level of clinic drug Sutent. Derivates 23, 24 and 25 were also tested on inhibition of phosphorylation ERK signalling protein within our COST cooperating University in Liege, Belgium.



Synthesis of nitrogen derivates started from *m*-bromo-*p*-aminoacetophenone azide precursors (HCO-, Ac-, F_3 CCO-, H_2 NCO- and Piv) **31**, **32**, **33**, **34** and **35**. Only compound **31**, **33** and **35** provided the oxazole derivates **36a**, **37** and **39a**). Finally the pivaloylNHAr derivate **38** has been successfully prepared. The very problematic deprotection of the pivaloyl group from arylamine has been observed. Contemplated introduction of *p*-NHCHO and *p*-NHCONH₂ groups remains open for the further investigation.

We have been successful with the preparation of designed azide ligand of arylaminooxazole **49** useful for utilization in the *Click Chemistry* combinatorial library. We developed conditions for its synthesis. Thermal instability of the oxazole intermediate **46** required to use a mild reaction condition (7 days, rt) for the synthesis of ligand **49**.

Zoznam publikačnej činnosti:

- Kováčová, S.; Kováčiková, L.; Lácová, M.; Boháč, A.; Sališová, M. Microwave assisted one pot synthesis of 7-substituted 2-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetic acids as precursors of new anti-tumour compounds. *Chem. Papers* **2010** (DOI: 10.2478/s11696-010-0059-x)
- Kováčiková; L., Gašparová, R.; Boháč, A.; Ďurana, M.; Lácová, M. Synthesis of 3phenyl-2H,5H-pyrano[3,2-c]chromen-2-one derivatives and their antineoplastic activity. *Arkivoc Journal (Arkat USA, Inc.)* – opravené a preposlané editorovi po pozitívnych recenziách
- Kováčiková, L.; Boháč, A.; Sališová, M.; Lintnerová, L.; Hanquet, G.; Lambert, Ch. Discovery of a Small Oxyphilic Pocket of VEGFR-2 Tyrozine Kinase Synthesis and Evaluation of Potent KDR Inhibitors v príprave na publikovanie

Prezentácie výsledkov a ocenenie:

Pfizer Lectures 12.11.2009, Conference CENTER, Radisson Blu CARLTON Hotel, BA 1. Cena: Pfizer Research Award 2009

1/ Drug Discovery Chemistry. San Diego, 27.-29.4.2010. Kováčikova-Kušnierová, L.; Lintnerová, L.; Cehlárik, Ľ.; Čibová, A.; Sališová, M.; Hrčka, R.; Mikulec, M.; Vojtíčková, M.; Hanquet, G.; Boháč, A.: Fragment, Click Chemistry and Structure Based Approaches in Development of VEGFR-2 Tyrosine Kinase Inhibitors.

2/ Naše proteíny 2010- Štruktúra a funkcia. Bratislava, 16.3.2010. Kušnierová, L.; Lintnerová, L.; Boháč, A.; Sališová, M.: Structure Based Modelling in Development of Pharmacophoric Compouds.

3/ **Inhibitors of angiogenesis: design, synthesis and biological exploitation.** Favignana, 16.-18.11.2009. Kováčikova-Kušnierová, L.; Sališová, M.; Boháč, A.: Design, synthesis and biological evaluation of diarylaminooxazoles – potent KDR inhibitors.

4/ Angiogenesis and cancer: from basic mechanisms to therapeutic applications. Málaga, 12.-13.11.2008. Boháč, A.; Sališová, M.; Kušnierová, L.; Koiš, P.: Fragment based click chemistry ligands for development of potent organic KDR inhibitors.

5/ More Years Chirality in Chemistry and Medicinal Chemistry. Bratislava, 16.-19.10.2008 Lintnerová, L.; Kušnierová, L.; Kováčová, S.; Sališová, M.; Boháč, A.: Synthesis of new pharmacophoric fragments for KDR inhibition.

6/ 60. jubilejní sjezd asociací českých a slovenských chemických společností. Olomouc, 1.-4.9.2008. Kováčová, S.; Kušnierová, L.; Lintnerová, L.; Medveď, M.; Sališová, M.; Boháč, A.: Syntéza farmakofórových ligandov pre VEGFR-2 inhibíciu.

7/ **59. zjazd chemikov. Tatranské Matliare,** 2.-6.9. 2007 Kušnierová, L.; Kováčová, S.; Šebesta, M. Boháč, A. Lácová, M. Sališová, M.: New cancerostatic and anti-angiogenics possessing pyrano[3,2-c]chromen-2(5H)-one leading structure - the synthesis and biologicalactivity.

8/ Synthetic and Natural Compounds in Cancer Therapy and Prevention. Bratislava, 28.-30.3.2007 Kováčová, S.; Kušnierová, L.; Melicherčík, M.; Skoršepa, M.; Boháč, A.: Synthesis and biological activity of new cancerostatics and anti-angiogenic possesing pyrano[3,2-c]chromen-2(5H)-one leading structure.

9/ **Študentská vedecká konferencia 2007**. Bratislava, 18.4.2007. Kušnierová, L.; Kováčová, S.; Šebesta, M.; Lácová, M. Boháč, A.: Syntéza a biologická aktivita nových typov kancerostatík a nati-angiogeník obsahujúcich pyrano[3,2-c]chromén-2(5H)ónovú nosnú štruktúru.

10 PRÍLOHA



10.1 Grafický abstrakt ¹H-NMR spektier





