

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

**Syntéza prekursorov pre N-arylaminooxazolkarboxamidové VEGFR2
inhibítory obsahujúce močovinový, alebo jemu príbuzný fragment**

Bakalárska práca

Študijný program: Chémia
Študijný odbor: 4. 1. 14 Chémia
Školiace pracovisko: Katedra organickej chémie, PriF UK
Školiteľ: Mgr. Juraj Dobiaš
Konzultant: doc. RNDr. Andrej Boháč, PhD.



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

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

Názov: Syntéza prekursorov pre N-arylaminoxazolkarboxamidové VEGFR2 inhibitory obsahujúce močovínový, alebo jemu príbuzný fragment

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

Cieľ: diplomová práca je zameraná na literárny prehľad vlastností, syntézy a biologickej aktivity liečiva metformínu, na prehľad literatúry ohľadom vývoja nových VEGFR2 TK inhibítorov a na syntézu prekursorov N-arylaminoxazolkarboxamidových VEGFR2 inhibítorov s močovínovým, alebo jemu príbuzným fragmentom

Kľúčové

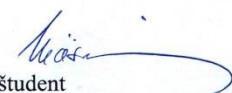
slová: metformín, rakovinové kmeňové bunky, syntéza

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

Dátum zadania: 14.03.2013

Dátum schválenia: 14.05.2014


doc. RNDr. Martin Putala, CSc.
vedúci katedry


študent


vedúci práce

Prehlásenie

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

V Bratislave, dňa 26. 05. 2014

podpis autora práce

Pod'akovanie

Chcel by som sa pod'akovať všetkým, ktorí mi akokoľvek pomohli pri spracovaní mojej bakalárskej práce. Moja veľká vďaka patrí najmä vedúcemu bakalárskej práce Mgr. Jurajovi Dobiašovi za odbornú pomoc a odovzdanie skúseností s prácou v organickom laboratóriu, ako aj doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, PhD. za pomoc pri riešení problémov a ľudský prístup. Ďakujem spoločnosti Biomagi za koncept DP a predpovedané štruktúry prekurzorov VEGFR2 inhibítorov. Ďalej ďakujem pani Mirke za priateľskú spoluprácu, ako aj ostatným pracovníkom Katedry organickej chémie PriF UK. Osobitné pod'akovanie patrí mojim najbližším, rodičom a priateľke za ich podporu a motiváciu počas celého štúdia.

Obsah

Abstrakt	7
1. Ciele bakalárskej práce	9
2. Grafický abstrakt k experimentálnej časti	10
3. Abstrakt ¹H-NMR spektier	11
4. Abstrakt ¹³C-NMR spektier	11
5. Použité skratky	12
6. Teoretická časť	13
6.1 Úvod	13
6.2 Vlastnosti metformínu	14
6.3 Príprava metformínu	15
6.4 Terapeutické možnosti a mechanizmus účinku metformínu	16
6.4.1 Rakovinové kmeňové bunky	16
6.4.2 Metformín a rakovina	18
6.4.3 Pozitívne prejavy pôsobenia metformínu	22
6.4.4 Nádorové ochorenia u diabetických pacientov	23
6.5 Príprava a štruktúrna charakterizácia arylbisguanidínov	24
6.5.1 Príprava 1-arylbisguanidínov (1-AB)	25
6.5.2 Príprava 1,5-diarylbisguanidínov (1,5-DAB)	25
6.5.3 Kryštálová štruktúra arylbisguanidínov	26
6.6 Vývoj vybraných VEGFR2 TK inhibítorov	28
7. Experimentálna časť	32
7.1 Materiál a použité metódy	32
7.2 Syntéza 1-(3-nitrofenyl)močoviny (2)	33
7.3 Syntéza 1-(3-aminofenyl)močoviny (3)	35
7.4 Syntéza počítačom predpovedaného VEGFR2 inhibítora (5)	38
8. Výsledky a diskusia	41
8.1 Syntéza 1-(3-nitrofenyl)močoviny (2)	42

8.2	Syntéza 1-(3-aminofenyl)močoviny (3)	43
8.3	Syntéza potenciálneho VEGFR2 inhibítora (5)	44
8.4	Syntéza 1-(5-amino-2-metoxifyenyl)-3-hydroxymočoviny (7)	46
8.5	Syntéza 2-metoxy-5-nitrofenylbisguanidínu (10)	47
8.6	Syntéza 2-metoxifyenylbisguanidínu (10a)	48
9.	Záver	49
10.	Prílohy	50

Abstrakt

Ivan Mäsiar: Syntéza prekursorov pre N-arylaminooxazolkarboxamidové VEGFR2 inhibítory obsahujúce močovinový, alebo jemu príbuzný fragment

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra organickej chémie
Bakalárska práca, 50 strán, 2014

Rakovinové kmeňové bunky (CSCs) sú bunky, ktoré sedia v porovnaní s diferencovanými bunkami na počiatku vývojovej hierarchie. Majú dve základné charakteristiky – samoobnoviteľnosť a schopnosť tvorby celého spektra nových tumorov. Vyznačujú sa vysokou rezistenciou voči známym druhom moderných liečiv. Metformín, starý antidiabetický liek z triedy bisguanidínov, je zaujímavý svojimi inhibičnými účinkami aj voči rastu CSCs. Prebiehajúce štúdie poukazujú na jeho synergické účinky v kombinácií s inými druhmi chemoterapie, pričom sa zameriava na inhibíciu CSCs. V našej výskumnej skupine sa venujeme aj vývoju nízkomolekulových VEGFR2 TK inhibítorov. VEGFR2 je tyrozín kinázový receptor, ktorý reguluje angiogézu, čiže rast cievneho systému potrebného pre rozvoj tumoru a tvorbu metastáz. V experimentálnej časti sme sa preto zamerali na syntézu prekursorov k predpovedaným VEGFR2 TK inhibítorom.

Kľúčové slová: metformín, rakovinové kmeňové bunky, syntéza, VEGFR2 inhibícia

Abstract

Ivan Mäsiar: Synthesis of precursors for N-arylaminooxazolecarboxamide VEGFR2 inhibitors containing urea or related fragment

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

Bachelor thesis, 50 pages, 2014

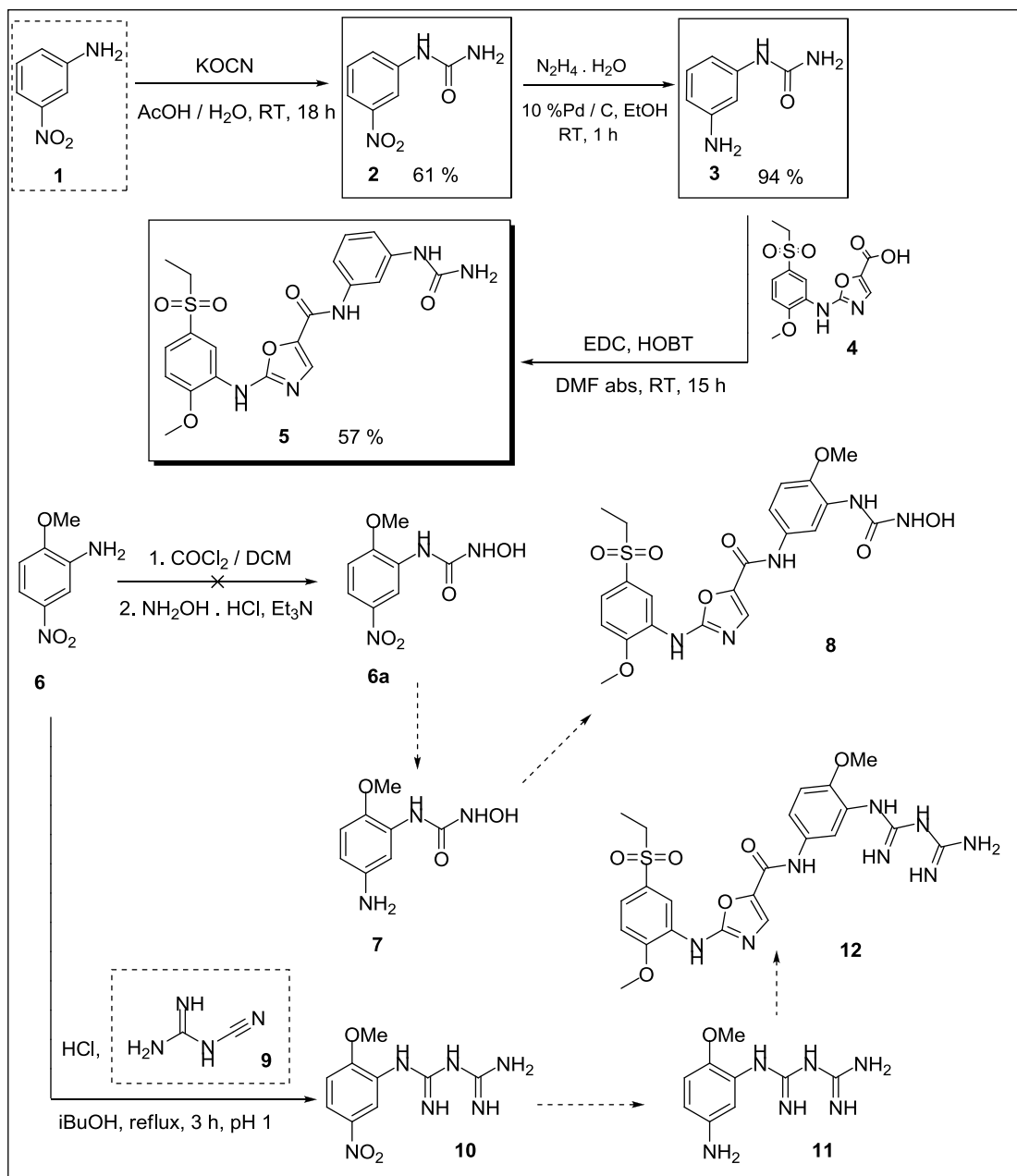
Cancer stem cells (CSCs) are cells that are at the beginning of the development hierarchy. They have two fundamental characteristics – self-renewal and ability to create whole spectrum of new tumour cells. They are characteristic with high resistance to common types of modern drugs. Metformin, an old anti-diabetic drug from class of biguanidines is interesting for its inhibition effects against the growth of CSCs. Ongoing studies suggest the synergistic effects in combination with other types of chemotherapy, focusing on the inhibition of CSCs. In our research group we also deal with the development of small-molecules - VEGFR2 TK inhibitors. VEGFR2 is a tyrosine kinase receptor which regulates angiogenesis, the growth of the vascular system that is required for tumour growth and metastasis. Therefore in our experimental part we focused on the synthesis of precursors of predicted VEGFR2 TK inhibitors.

Key words: metformin, cancer stem cells, synthesis, VEGFR2 inhibition

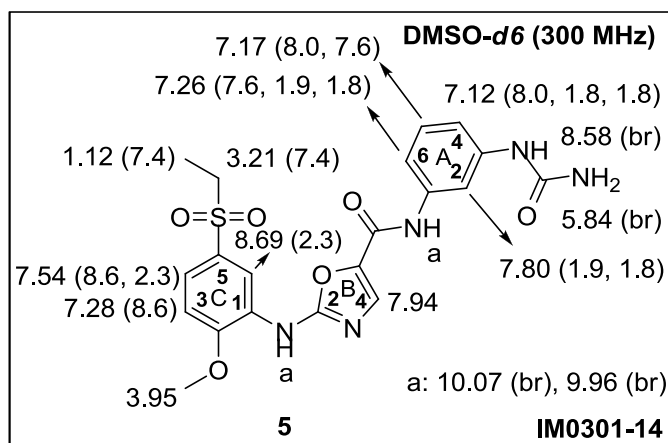
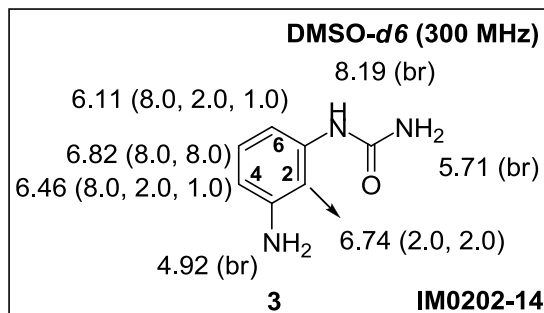
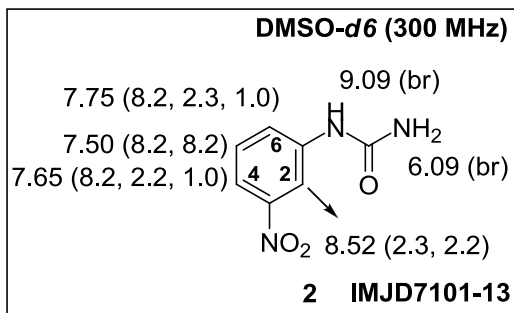
1. Ciele bakalárskej práce

- Spracovanie vybranej literatúry ohľadom vlastností, syntézy a biologickej aktivity liečiva metformínu.
- Spracovanie vybranej literatúry týkajúcej sa syntézy predpovedaných VEGFR2 tyrozín kinázových inhibítorov.
- Návrh metodiky syntézy intermediátov **2, 3, 7, 10, 11** a príprava niektorého z nich.
- Príprava potenciálneho VEGFR2 inhibítora **5** obsahujúceho močovinový fragment.

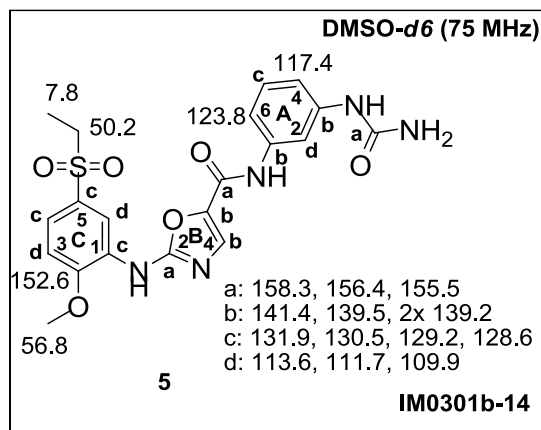
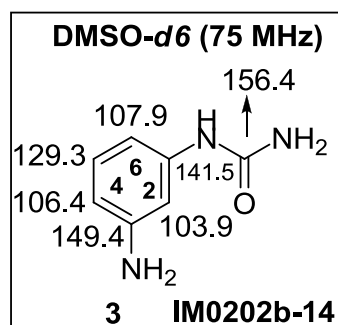
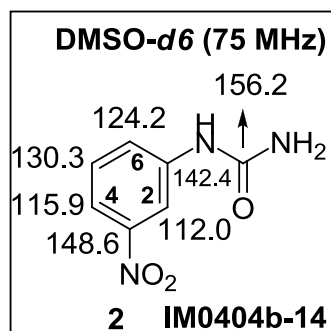
2. Grafický abstrakt k experimentálnej časti



3. Abstrakt ^1H -NMR spektier



4. Abstrakt ^{13}C -NMR spektier



5. Použité skratky

Abs	absolútny, suchý
AcOH	kyselina octová
DCM	dichlórmétán
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EA	etyl acetát
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylamínopropyl)karbodiimid
FLC	rýchla kvapalinová chromatografia (<i>Flash Liquid Chromatography</i>)
Hex	zmes hexánov
HOBT	hydroxybenzotriazol
HV	vákuum olejovej vývevy (<i>High Vacuum</i>)
IC₅₀	koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne aktivita receptora na polovicu (<i>Half Maximal Inhibition Concentration</i>)
IČ	infračervená spektroskopia
M. p.	teplota topenia (<i>Melting Point</i>)
MS (ESI⁺)	hmotnostná spektroskopia (<i>Mass Spectroscopy</i>) pozitívny mód
MW	molekulová hmotnosť (<i>Molecular Weight</i>)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
R_F	retenčný faktor
RT	laboratórna teplota (<i>Room Temperature</i>)
RVO	rotačná vákuová odparka
TLC	tenkovrstvová chromatografia (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMS	tetrametylsilán
UV	ultrafialové žiarenie („ <i>Ultraviolet</i> “)
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR2	transmembránový receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora, typ 2 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)

6. Teoretická časť

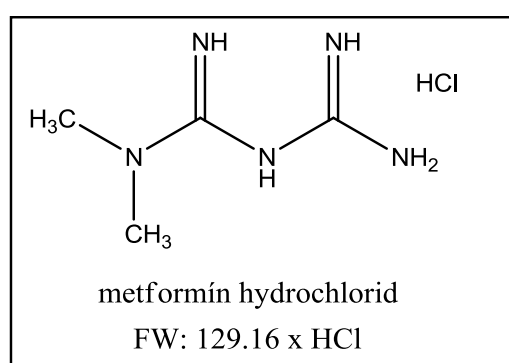
6.1 Úvod

V dnešnej dobe sa čoraz častejšie stretávame so širokým spektrom nádorových ochorení, ktoré je potrebné diagnostikovať v ranom štádiu a následne ich liečiť. Liečba rakoviny predstavuje vo väčšine prípadov komplikovanú a finančne náročnú oblasť modernej medicíny. Nádor sa pri svojom raste napája do existujúceho cievneho riečišťa pomocou tumorovej angiogenézy (tvorby nových ciev z už existujúcich ciev). Jedným z najdôležitejších tyrozínkinázových receptorov angiogenézy je receptor VEGFR-2, ktorého funkcia môže byť inhibovaná prostredníctvom nízkomolekulových zlúčenín.

Významnú úlohu pri rozvoji a recidíve nádorového ochorenia zohrávajú rakovinové kmeňové bunky (CSC), ktoré majú schopnosť samoobnoviteľnosti, ako aj tvorby celej škály diferencovaných tumorových buniek, čím zabezpečujú regeneráciu nádorových buniek. Metformín je jedným z liečiv, ktoré majú potenciál potlačiť rozvoj zhubných nádorov znížením aktivity týchto agresívnych buniek.

6.2 Vlastnosti metformínu

Metformín je **polárna zlúčenina** a patrí do skupiny antidiabetických bisguanidínov. V skutočnosti ide o 1,1-dimetylbisguanidín hydrochlorid. Samotný bisguanidín je polárnou zložkou, ktorá určuje vlastnosti celej molekuly – **vysoká rozpustnosť** v polárnych rozpúšťadlách (**H₂O**). Pôvodnou funkciou tohto bisguanidínového liečiva je liečba cukrovky „Diabetes mellitus“ typu 2, ktorá je charakterizovaná rezistenciou tkanív voči pôsobeniu inzulínu.¹ V súčasnosti prebiehajú mnohé štúdie, ktoré sa snažia dokázať jeho protirakovinový účinok. Štruktúrny vzorec metformínu môžeme vidieť na **Obrázku 1**.



Obrázok 1 Štruktúrny vzorec metformín hydrochloridu.

Fyzikálno-chemické a spektrálne údaje (voľná báza metformín):²

MW: 129.165 g/mol.

Mp: 127- 128 °C.

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 3.07 (s, 6H), 2.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.14 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.50 (m, 2H).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ 161.1, 158.5, 37.35.

logP (metformín hydrochlorid)³: - 2.64

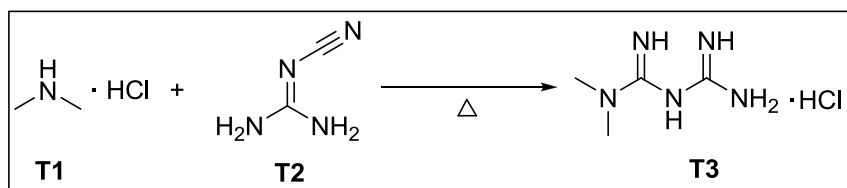
¹ Pollak, M. *Cancer. Prev. Res.* **2010**, 3, 1060–1065.

² Koh, M.; Lee J-Ch.; Min Ch.; Moon, A. *Bioorgan. Med. Chem.* **2013**, 21, 2305- 2313.

³ ALZA CORPORATION, WO2005/41923 A1 **2005**.

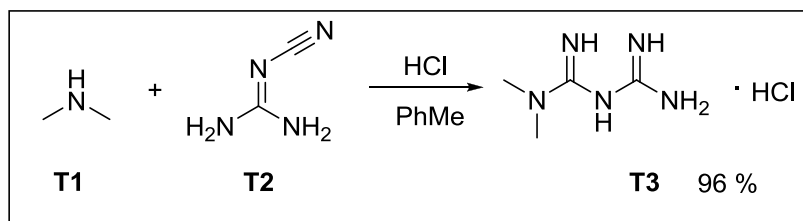
6.3 Príprava metformínu

Jeden z prvých postupov na prípravu metformínu (hydrochloridu) je známy od roku 1922.⁴ Zahrievaním dimetylamín hydrochloridu (**T1**) a dikyándiamidu (2-kyanoguanidínu) (**T2**) vzniká metformín hydrochlorid (**T3**). (Obrázok 1a)



Obrázok 1a. Syntéza metformín hydrochloridu.

Podobný modifikovaný spôsob na prípravu metformínu bol uverejnený v roku 2007.⁵ Ekvimolárne množstvá dimetylamínu (**T1**) a dikyándiamdu (**T2**) sú rozpustené v toluéne a po ochladení sa postupne pridáva ekvimolárne množstvo HCl. Zmes sa zahrieva. Po ochladení zmesi sa vyzráža metformín hydrochlorid (**T3**) v 96 % výťažku. (Obrázok 1b)



Obrázok 1b. Syntéza metformín hydrochloridu.

⁴ Werner, E. A.; Bell, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1922**, 121, 1790-1794.

⁵ William, A. *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*, **2007**, 3, 2208.

6.4 Terapeutické možnosti a mechanizmus účinku metformínu

6.4.1 Rakovinové kmeňové bunky

Najnovšie štúdie naznačujú, že **metformín potláča rakovinu spomaľovaním aktivity subpopulácie agresívnych buniek tumoru**. Tieto bunky sú nazývané aj **rakovinové kmeňové bunky („Cancer Stem Cells“, CSCs)**.⁶

Štúdia pochádzajúca zo Škótska poukázala na fakt, že metformín **redukuje incidenciu rakoviny o 15 - 20 % u diabetických pacientov** v porovnaní s diabetickými pacientmi, ktorí metformín neužívali. **Ochranná účinnosť** bola **závislá od dĺžky liečby a veľkosti dávky metformínu**, pričom bol pozorovaný klesajúci trend výskytu rakoviny v prípade jeho vyšších dávok a pri dlhšej dobe expozície diabetických pacientov.⁷ Hypotéza tumorogenézy rakovinových kmeňových buniek (CSCs) sa vyvinula na základe funkčnej heterogenity pozorovanej na ľudských nádorových bunkách. Na základe tejto hypotézy, CSCs sedia na začiatku vývojovej hierarchie a majú dve kľúčové charakteristiky – samoobnoviteľnosť a schopnosť tvorby celého spektra tumorov s rôznym fenotypom. V roku 1994, John Dick a kol. objavili hierarchiu a koncept CSCs. Pod populácia buniek primárnej ľudskej akútnej myeloidnej leukémie (CD34⁺/CD38⁺) bola definovaná ako populácia podporujúca vznik rakoviny.⁸

Signálna dráha mTOR je dôležitou signálnou dráhou, ktorá nie je regulovaná počas rastu tumoru a môže slúžiť ako terapeutický a preventívny cieľ. V roku 2005, Shaw a kol. poukázali na to, že **metformín vykonáva svoju funkciu cez aktiváciu LKB1/ AMPK dráhy, a tým nepriamo zabezpečuje inhibíciu komplexu mTORC1**.⁹ Na **Obrázku 2** môžeme vidieť zjednodušený model aktivácie LKB1/ AMPK dráhy.¹⁰ **ATM** je serín / treonínová kináza (**Ataxia telangiectasia mutated**).

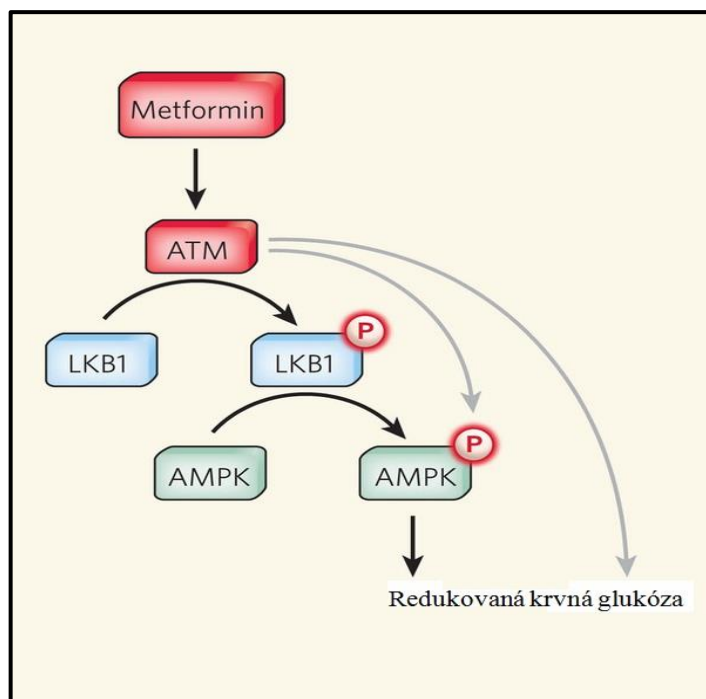
⁶ Bednar, F.; Simeone, D. M. *Cancer Prev. Res.* **2012**, 5, 351-354.

⁷ Evans, J. M.; Donnelly, L. A.; Emslie-Smith, A. M.; Alessi, Dr.; Morris, A. D. *British Medical Journal* **2005**, 330, 1304-1305.

⁸ Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M. A.; Dick, J. E. *Nature* **1994**, 367, 645-648.

⁹ Shaw, R. J.; Lamia, K. A.; Vasquez, D.; Koo, S. H.; Bardeesy, N.; Depinho, R. A.; Montminy, M.; Cantley, L. C. *Science* **2005**, 310, 1642-1646.

¹⁰ Shaw, R. J.; Cantley, L. C.; Ras, P. I. *Nature* **2006**, 441, 424-430.



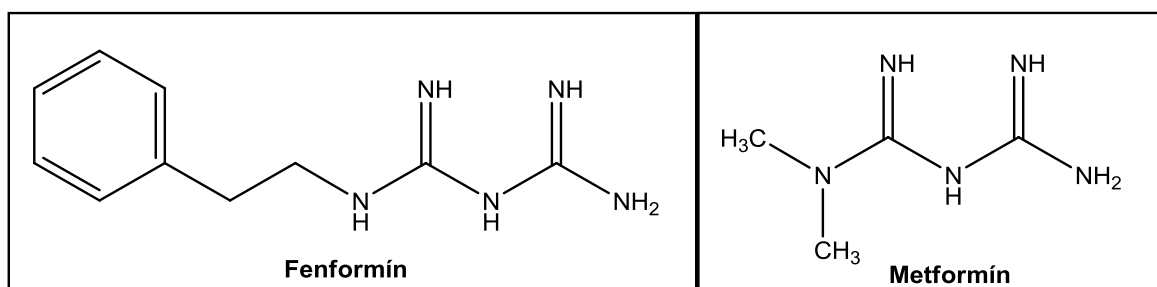
Obrázok 2 Aktivácia LKB1/AMPK signálnej dráhy metformínom.

Inhibícia rakovinových kmeňových buniek metformínom bola po prvýkrát preukázaná v roku **2009** v predklinických modeloch **rakoviny prsníka**. Táto štúdia poukázala na to, že metformín inhibuje vytváranie zhlukov v bunkových líniiach rakoviny prsníka, pričom bola dokázaná koncentračná závislosť. Navyše, Doxorubicin, štandardný komponent chemoterapie ukázal iba nepatrný vplyv na časť populácie rakovinových kmeňových buniek (definovaných pomocou markerov $CD44^{+}/CD24^{low}$), zatiaľ čo metformín samostatne, alebo v kombinácii s doxorubicínom účinne zredukoval počet prežívajúcich CSCs. Kombináciou týchto dvoch liečiv sa docielila odolnosť organizmu voči vplyvu CSCs dokonca aj po prerušení liečby.¹¹

¹¹ Iliopoulos, D.; Tschlis, P. N.; Struhl, K. *Cancer Res.* **2009**, 69, 7507–7511.

6.4.2 Metformín a rakovina¹²

V roku **1970**, prof. Vladimir Dilman rozvinul predstavu, že **antidiabetické bisguanidíny môžu byť sľubné protirakovinové lieky**. Použitím fenformínu, štruktúrne podobný metformínu (**Obrázok 3**), bola dosiahnutá tzv. „metabolická rehabilitácia“ rakoviny prsníka a hrubého čreva. **Fenformín vyvolal spomalenie recidív a znížil výskyt nových primárnych tumorov a predĺžil životnosť myši o 23 % a znížil výskyt nádoru až o 80 %.**¹³



Obrázok 3. Porovnanie štruktúrnych vzorcov fenformínu a metformínu.

Na začiatku roku **2000** odhalili Anisimove experimenty, že **sústavná liečba** geneticky modifikovanej **myši** obsahujúcej ľudský HER2 proteín (receptor ľudského epidermálneho rastového faktora – „Human epidermal growth factor receptor 2“, HER2) **metformínom, významne znižuje výskyt a veľkosť adenokarcinómu prsnej žľazy a zvyšuje priemernú latenciu tumoru.**¹⁴

Epidemiologické štúdie potvrdili, že žiadne iné antidiabetické lieky, len **metformín, významne znižuje výskyt rakoviny a predlžuje prežitie pacientov s cukrovkou diabetes mellitus typu 2.**¹⁵

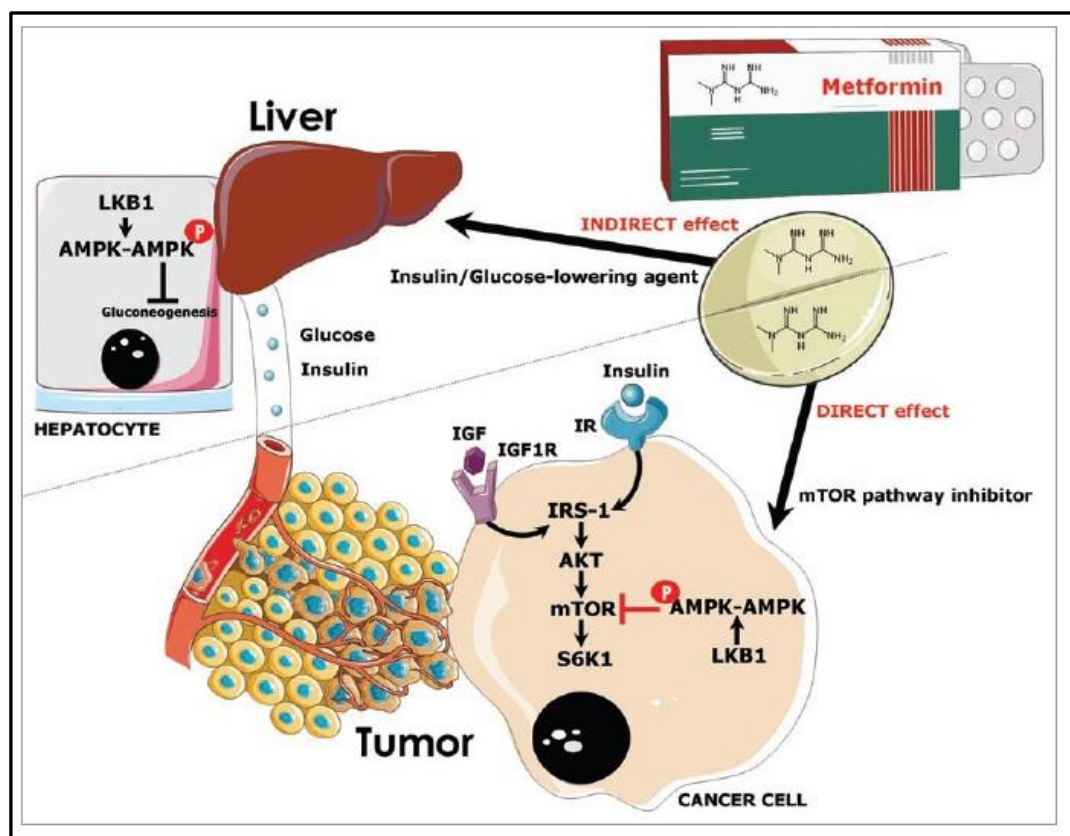
¹² Martin-Castillo, B.; Vazquez-Martin, A.; Oliveras-Ferraros, C.; Menendez, J. A. *Cell Cycle* **2010**, 9, 1057-64.

¹³ Dilman, V. M.; Anisimov, V. N.; *Gerontology* **1980**, 26, 241-246.

¹⁴ Anisimov, V. N.; Berstein, L. M.; Egormin, P. A.; Piskunova, T. S.; Popovich, I. G.; Zabezhinski, M. A.; Semenchko, A. V.; Tyndyk, M. L.; Yurova, M. N.; Kovalenko, I. G.; Poroshina, T. E. *Exp. Gerontol.* **2005**, 40, 685-93.

¹⁵ Bowker, S. L.; Majumdar, S. R.; Veugelers, P.; Johnson, J. A. *Diabetes Care* **2006**, 29, 254-258.

Koncepčne je **metformín** považovaný za „hybridnú pilulku“, ktorá fyzicky spája dva dlhotrvajúce účinky: 1/ trvalé znižovanie hladiny krvného inzulínu (čo je aj rastový faktor) a glukózy a 2/ okamžitej účinnosti tejto zlúčeniny na rakovinové bunky – potláčanie dráhy AMPK / mTOR / p70S6K1 a niekoľkých proteínových kináz súčasne, vrátane tyrozín-kinázových receptorov súvisiacich s rakovinou napr. HER2.¹⁶ (Obrázok 4)

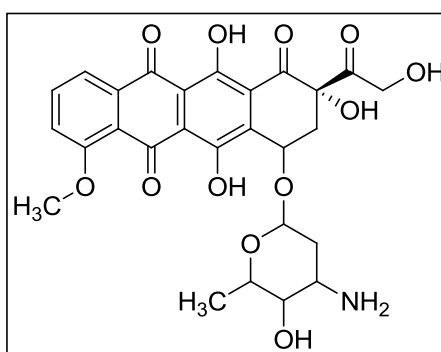


Obrázok 4 Priamy biologický účinok metformínu: **deaktivácia mTOR signálnej dráhy**. Nepriamy účinok metformínu: **znižovanie krvného inzulínu** a glukózy (v pečeni tlmí proces glukoneogenézy, tvorbu glukózy zo zásob v pečňových bunkách).

¹⁶ Zakikhani, M.; Dowling, R. J.; Sonenberg, N.; Pollak, M. N. *Cancer Prev. Res.* **2008**, 1, 369-375.

Púpavový fenomén - Nový liek, ktorý zabíja „koreň púpavy“ pod „pôdou rakoviny“

Štúdia Hirscha a kol. zistila, že chemoterapii (liečba doxorubicínom, **Obrázok 5**) nemá vplyv na formovanie samo obnoviteľných rakovinových kmeňových buniek, avšak tieto sú citlivé na pôsobenie metformínu. Nízke dávky metformínu (0.1 - 0.3 mM) nemali žiadny účinok na životaschopnosť populácii nekmeňových t.j. diferencovaných buniek tumoru. V súlade s „hypotézou púpavy“ (**Obrázok 6**) na efektívnu liečbu musia byť zasiahnuté oba typy buniek – deliace sa diferencované bunky ako aj rakovinové kmeňové bunky, čím by sa predišlo recidíve tumoru a tým aj návratu účinku rakoviny.¹⁷



Obrázok 5. Štruktúrny vzorec chemoterapeutika **doxorubicínu**.

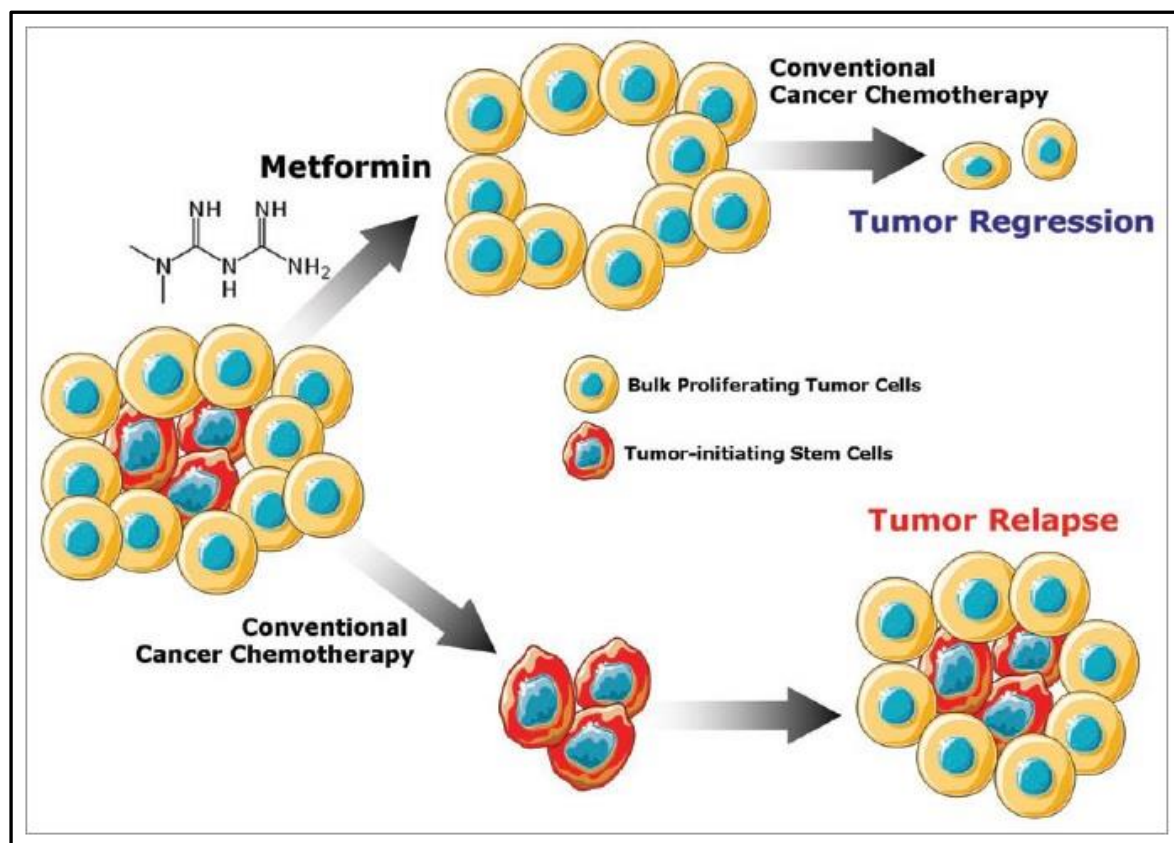
Bolo zistené, že kombinovaná liečba metformínom a cytotoxickým doxorubicínom znižuje veľkosť nádoru a zároveň predlžuje čas recidívy ochorenia. Takáto liečba je účinnejšia, ako liečba využívajúca samostatné lieky (synergický efekt). **Za potenciálny mitogén** (látka urýchľujúca delenie buniek) **kmeňových buniek prsníka je považovaný IGF-1** (proteín, ktorý je svojou štruktúrou podobný inzulínu – „**Insulin-like growth factor 1**“), ktorého zvýšené hladiny môžu vyvolať rozšírenie súboru kmeňových buniek prsníka.¹⁸

Všetky dôkazy naznačujú, že v kombinácii s konvenčnou terapiou sa môže preliečenie metformínom stať úspešnou terapeutickou stratégiou, ktorou by sa predišlo recidíve rakoviny a zvýšila by sa šanca na dlhodobé prežívanie onkologických pacientov. Schopnosť liečby rakoviny metformínom (napadne práve „korene púpavy“) by mohlo do značnej miery vysvetliť schopnosť štandardných klinických dávok metformínu významne zvýšiť rýchlosť kompletných odpovedí u diabetických pacientov s rakovinou

¹⁷ Jones, R.J.; Matsui, W.H.; Smith, B.D. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, 96, 583-585.

¹⁸ Li, X.; Lewis, M. T.; Huang, J.; Gutierrez, C.; Osborne, C. K.; Wu, M. F.; Hilsenbeck, S. G.; Pavlick, A.; Zhang, X.; Chamness, G. C.; Wong, H.; Rosen, J.; Chang, J. C. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, 100, 672-679.

prsníka užívajúcich metformín a súčasne neoadjuvantnú chemoterapiu (podpornú liečbu, ktorá sa podáva pred plánovanou chirurgickou liečbou alebo pred rádioterapiou). Cieľom je zmenšenie nádoru, aby bola operácia umožnená alebo uľahčená. Súčasne je cieľom aj zníženie rizika, že sa behom operácie uvoľnia nádorové bunky a rozšíria sa do iných tkanív alebo orgánov).¹⁹



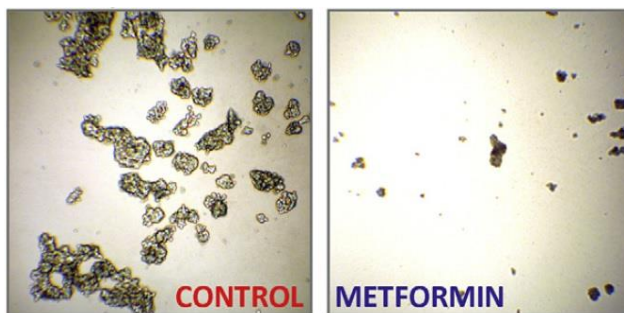
Obrázok 6. Schéma pôsobenia metformínu – púpavový fenomén.

Pri použití konvenčnej chemoterapie sa efektívne ničia diferencované rýchlo sa deliace nádorové bunky, zatiaľ čo rakovinové kmeňové bunky zostávajú nedotknuté. Tieto potom zaistujú opätovný návrat tumoru. **CSCs predstavujú koreň púpavy alebo tumoru**, pretože dokážu regenerovať tumor (teda nadzemnú časť púpavy). Pri liečbe metformínom v kombinácii s tradičnou cytotoxickou chemoterapiou, nie je **metformín schopný** zabíjať proliferujúce sa nádorové bunky, avšak je schopný **zameriť sa na ničenie alebo potlačenie aktivity rakovinových kmeňových buniek**, teda zdroja, z ktorého sa diferencované nádorové bunky vyvíjajú, čím sa zabráni recidíve nádoru.

¹⁹ Jiralerspong, S.; Palla, S. L.; Giordano, S. H.; Meric-Bernstam, F.; Liedtke, C.; Barnett, C. M.; Hsu, L.; Hung, M. Ch.; Hortobagyi, G. N.; Gonzalez-Angulo, A. M. *J. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 3297-3302.

6.4.3 Pozitívne prejavy pôsobenia metformínu

Efektívne znižovanie úmrtnosti na rakovinu prsníka závisí vo veľkej miere v schopnosti úspešne **zabraňovať** kritickému **prechodu z neagresívnej rakoviny** (non-invasive ductal carcinoma „**in situ tumor**“ – DCIS) **do života ohrozujúcej agresívnej rakoviny prsníka** (**invasive breast cancer** – IBC). Terapeutické stratégie vedú k zastaveniu rakoviny prsníka v nezhubnom stave.²⁰ **Metformínu môže spomaliť premenu invazívnych nádorov elimináciou alebo utlmením rakovinových kmeňových buniek.** CSCs sú schopné prežívať, bujnieť a vytvárať zhľuky buniek (kontrola). Na **Obrázku 7** vpravo môžeme vidieť pôsobenie metformínu na CSCs (vľavo je kontrola CSCs bez pôsobenia metformínu).



Obrázok 7. Inhibícia obnoviteľnosti a množenia sa CSCs metformínom.

Epidemiologické údaje poukázali na znížené riziko výskytu rakoviny a úmrtnosti u pacientov s cukrovkou typu 2, ktorí užívali metformín v porovnaní s tými, ktorí ho neužívali.²¹

²⁰ Espina, V.; Liotta, L.A. *Nat Rev Cancer* **2011**, 11, 68-75.

²¹ Vazquez-Martin, A.; López-Bonect, E.; Cufí, S.; Oliveras-Ferraro, C.; Del Barco, S.; Martín-Castillo, B.; Menéndez, J. A. *Drug Resistance Updates* **2011**, 14, 212-223.

6.4.4 Nádorové ochorenia u diabetických pacientov

Štúdie z roku 2013 poukazujú na úzku súvislosť medzi ochorením Diabetes mellitus (DM) a výskytom gastrointestinálnych zhubných nádorov.²² **Prieskum z 15 štúdií zahrňujúci celkovo 2,5 milióna pacientov ukázal na zvýšené riziko (+ 30 %) výskytu rakoviny hrubého čreva (colorectal cancer – CRC) súvisiacej s cukrovkou.** Doteraz získané údaje naznačujú, že **metformín**, liek určený na liečbu DM typu 2, **môže účinne znižovať takúto úmrtnosť u diabetických pacientov.** Aj u tohto typu nádorového ochorenia hrajú hlavnú úlohu rakovinové kmeňové bunky. Nielen, že majú vysokú schopnosť spúšťať a podporovať tumorový rast, ale sú zodpovedné za odolnosť voči chemoterapii a recidívu rakoviny. Sú to bunky CD133⁺, ktoré zastupujú všetky vlastnosti CSCs. Štandardným chemoterapeutickým liečivom na CRC je 5-Fluorouracil (ďalej len 5-FU) používaným kvôli zlepšeniu jeho terapeutickkej účinnosti v kombinácii s inými liekmi. **Metformín sa preukázal ako látka s priaznivým synergickým účinkom** (aktívny voči CSCs bunkám exprimujúcim marker CD133⁺) k výsledku chemoterapeutického pôsobenia 5-FU. Dôvodom užívania podporného liečiva bola práve získaná rezistencia pacientov v pokročilom štádiu CRC na liečbu 5-FU, čo viedlo až k úplnému zlyhaniu účinku chemoterapie.²³

Jedna zo štúdií bola zameraná na pozorovanie demografických a klinických zmien v samostatných skupinách v závislosti od užívania metformínu. V Chyba! Nenašiel sa iaden zdroj odkazov. sú uvedené výsledky testov v ktorých boli pozorované len výrazné zmeny v sledovaných skupinách: metformínovej (MET) a nemetformínovej (NM). Hladina LDL (low-density lipoprotein cholesterolu – lipoproteíny s nízkou hustotou zodpovedné za upchávanie ciev a vznik trombov) bola u skupiny MET nižšia ako u NM. Taktiež, podiel pacientov so slabo diferencovanými zhubnými nádormi (SDN), ako aj stupeň metastáz (SM) bol oveľa nižší v MET, oproti kontrolnej NM skupine. Index *p* s hodnotou nižšou ako 0,05 charakterizuje závislosť ako významnú.²⁴

²² Chiu, C. C.; Huang C. C.; Chen, Y. C.; Chen, T. J.; Liang, Y.; Lin, S. J.; Chen, J. W.; Leu, H. B.; Chan, W. L. *Intern. Med. J.* **2013**, 52, 939-946.

²³ Kim, S. L.; Kim, S. H.; Trang, K. T.; Kim, I. H.; Lee, S. O. *Cancer Lett.* **2013**, 2, 479-486.

²⁴ Zhang, Y.; Guan, M.; Zheng, Z.; Zhang, Q.; Gao, F. *Plos One* **2013**, 8, 1-8.

	MET (36 pacientov)	NM (50 pacientov)	p
LDL (mM)	2.27±0.52	2.41±1.07	0.024
SDN (počet pacientov) %	1 (2.78)	8 (16.00)	0.048
SM	2 (5.60)	11 (21.60)	0.035

Tabuľka 1 Demografické a klinické výsledky štúdie.

Vedci sa zaujímali aj o **synergické účinky metformínu pri liečbe CRC použitím 5-FU zameranej na bunky CD133⁺ a β -katenín** (difunkčný proteín, ktorý reguluje koordináciu príľnavosti buniek a génovú transkripciu) v ľudských bunkových líniiach **rakoviny čreva SW620** (type of colon carcinoma). Štúdia odhalila, že **metformín** v kombinácii s 5-FU **významne znižuje percento pozitívnych CD133 buniek a tiež vplyv β -katenínu**, čím sa potvrdil predpoklad, že môže mať protirakovinový účinok na CRC (prejavom účinku boli: inhibícia proliferácie rakovinových kmeňových buniek prostredníctvom dráhy β -katenínu). Podobné rakovinové účinky boli preukázané **aj u rakoviny prsníka**.²⁵

6.5 Príprava a štruktúrna charakterizácia arylbisguanidínov

Bisguanidíny (BG) sú bezfarebné **polárne organické zlúčeniny**, ktoré sú veľmi **dobre rozpustné vo vode**. Sú **silné bázy** a **vo vodnom roztoku pomaly hydrolyzujú na amoniak a močovinu**. V 20-tych rokoch minulého storočia boli po prvýkrát získané extrakciou z rastliny *Galega officinalis* (francúzsky orgován).

Jedna z prvých metód na ich prípravu je známa od roku 1892, kedy bol zahrievaný dikyandiamid s chloridom amónnym a následnou izoláciou produktu vytvorením bisguanidín-meďnatého komplexu.²⁶

²⁵ Cufi, S.; Corominas-Faja, B.; Vazquez-Martin, A.; Oliveras-Feranos, C.; Dorca, J.; Bosch-Barrera, J.; Martin-Castillo, B.; Menendez, J. A. *Oncotarget* **2012**, 3, 395-398.

²⁶ Bamberger, E.; Dieckmann, W. *Ber.* **1892**, 25, 543.

6.5.1 Príprava 1-arylbisguanidínov (1-AB)

Monosubstituované 1-arylbisguanidíny sa pripravujú zahrievaním anilínových solí s dikyándiamidom vo vode, pričom hydrochloridové soli vzniknutých bisguanidínov kryštalizujú z reakčnej zmesi vo vysokých výtázkoch a čistote. Použitím metanolátu sodného v metanole môžu byť deprotonizované. V Schéme 1 je znázornená príprava 1-AB.

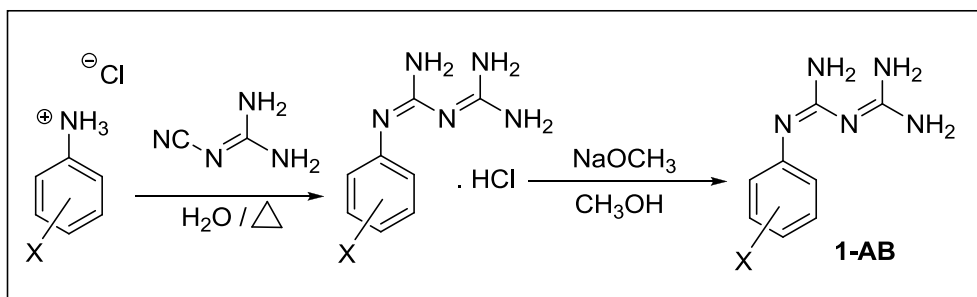
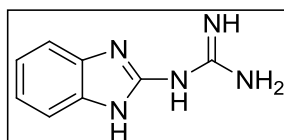


Schéma 1 Príprava 1-arylbisguanidínov 1-AB.

Obdobným spôsobom reagujú aj dihydrochloridy 1,3- a 1,4-fenyléndiamínov s dvomi mol ekv dikyándiamidu, avšak dihydrochloridy 1,2-fenyléndiamínov dávajú 2-guanidínbenzimidazol (vznikajú cyklizačnou reakciou).²⁷ (Obrázok 8) Štruktúra 2-guanidínbenzimidazolu.)



Obrázok 8 Štruktúra 2-guanidínbenzimidazolu.

6.5.2 Príprava 1,5-diarylbisguanidínov (1,5-DAB)

Diarylbisguanidíny (DAB) sa pripravujú jedнокrokovou syntézou, založenou na metóde známej z roku 1957, v ktorej sú 2 mol ekv hydrochloridu anilínu pridané do dikyándiamidu sodného vo vriacej vode. Anilíny s nízkou rozpustnosťou vo vode môžu byť rozpustené v etanole. Medziproduktom reakcie je monosubstituovaný aryldikyándiamid, ktorý reaguje do druhého stupňa na želaný DAB. Surový produkt

²⁷ King, F. E.; Acheson, R. M.; Spensley, P. C. *J. Chem. Soc.* **1948**, 1366.

pozostáva z hydrochloridu DAB a malého množstva monoaryldikyándiamidu. Nečistôt tohto druhu sa môžeme zbaviť rozpustením produktu v malom objeme DMF a vyzrážaním hydrochloridu bisguanidínu pridaním toluénu. Spracovaním produktu získame voľné bázy.²⁸ (Schéma 2)

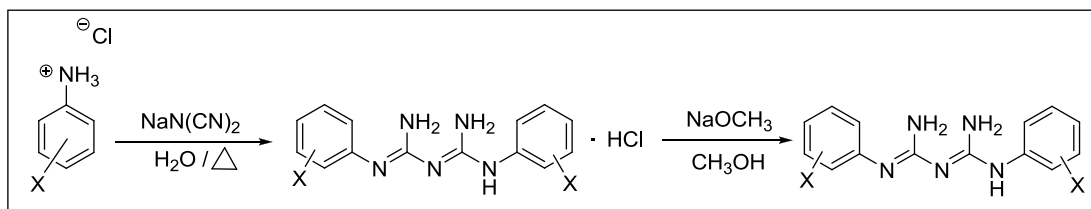


Schéma 2. Príprava 1,5-diarylbisguanidínov.

6.5.3 Kryštalová štruktúra arylbisguanidínov

Hydrochloridová soľ 1,5-difenylobisguanidínu kryštalizuje z horúcej vody v monoklinickej sústave. Na **Obrázku 9** je znázornený bisguanidínový kation, ktorého geometria bola získaná pomocou Röntgenovej štruktúrnej analýzy. Rozsah väzbových dĺžok C-N je veľmi úzky (1.343 – 1.394 Å), čo poskytuje dôkaz o značnej delokalizácii, aj keď štruktúra nie je plne symetrická. Kation môže byť vyjadrený lokalizovanou štruktúrou (A), ako aj jeho rezonančnými štruktúrami, kde je protonizovaný centrálny atóm dusíka (B) alebo sa vytvára vnútromolekulová vodíková väzba cez protonizovaný dusík (C). (Schéma 3)

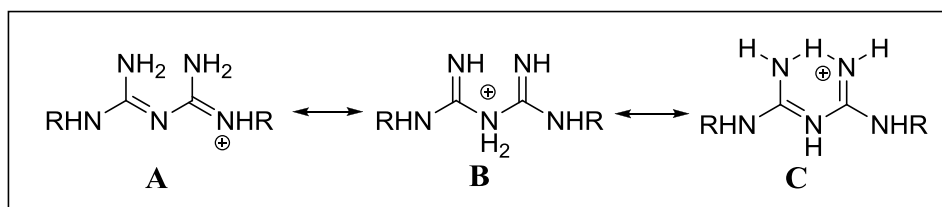
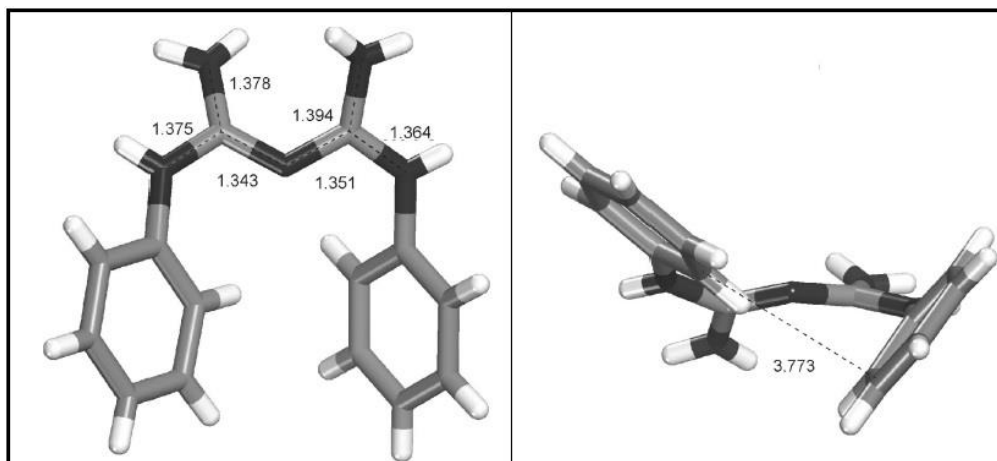


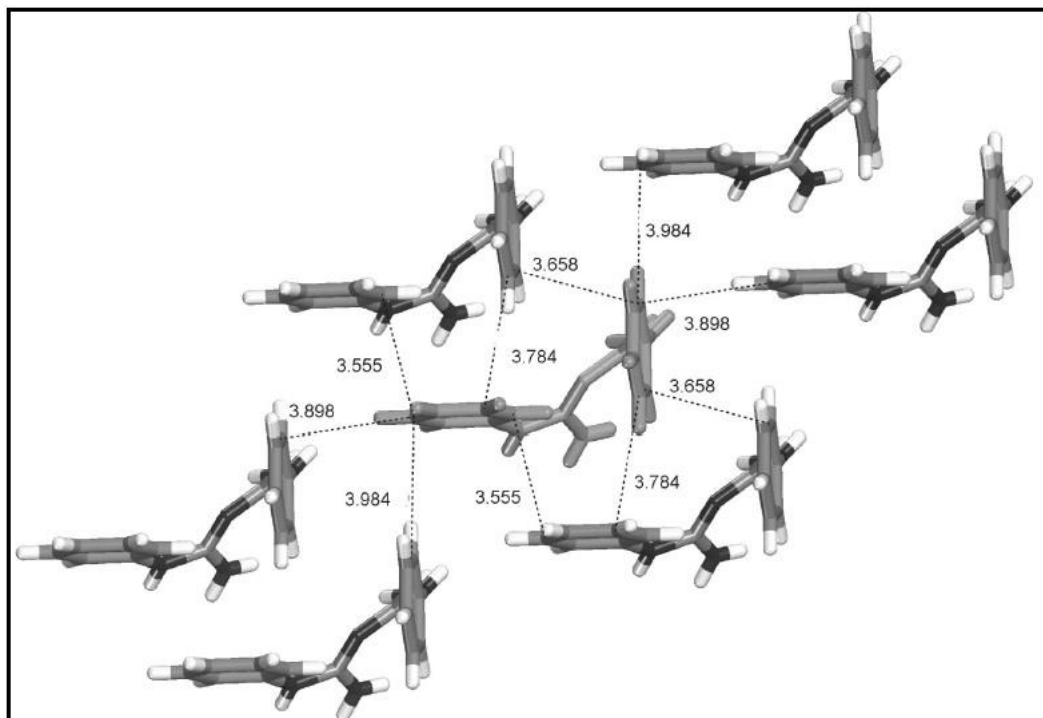
Schéma 3. Štruktúry kationov arylbisguanidínov.

²⁸ Neelakantan, L. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1587.



Obrázok 9. Dva pohľady na štruktúru bisguanidínového katiónu (H: biela, N: čierna, C: sivá). Pohľad naľavo s dĺžkami väzieb C-N. Pohľad vpravo: vnútromolekulové interakcie C-H... π (najkratšia C-C väzba: 3.773 Å).

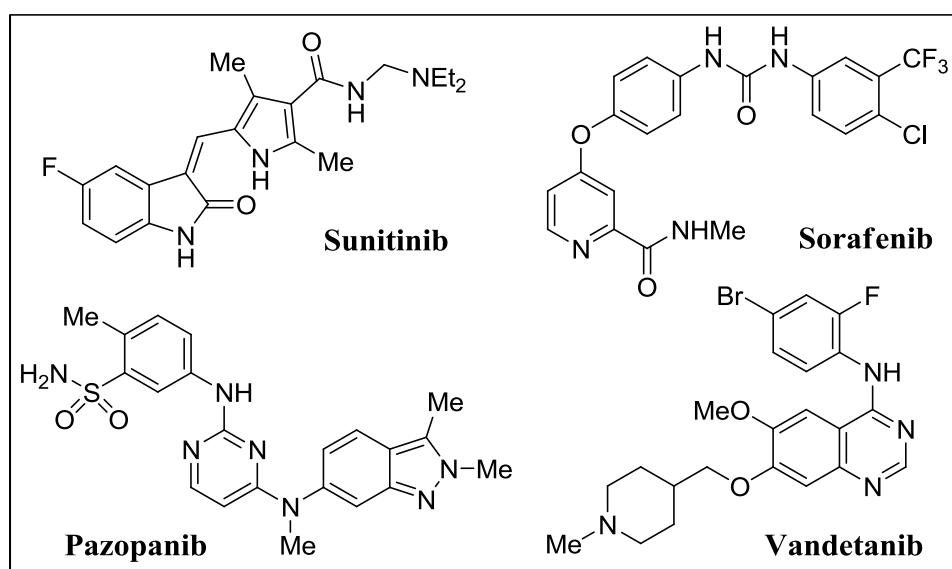
Aromatické kruhy každého bisguanidínového katiónu interagujú v kryštálovej mriežke navzájom so susednými soľami. Každá bisguanidínová soľ má 10 aromatických interakcií: 4 face-to-face a 6 edge-to-face so susednými šiestimi molekulami. Na **Obrázku 10** sú zobrazené spomínané interakcie, ako aj najkratšie C-C väzbové dĺžky.



Obrázok 10 Vzájomné interakcie viacerých fenylových kruhov (H- biela, N- čierna, C- sivá). Väzbové dĺžky vyjadrené v jednotkách Å.

6.6 Vývoj vybraných VEGFR2 TK inhibítorov

Táto časť práce sa venuje nedávnomu vývoju vybraných VEGFR2 TK inhibítorov zameraných na inhibíciu nádorovej angiogenézy. Pod pojmom VEGFR2 sa rozumie receptor vaskulárneho endotelného rastového faktora tyrozín kinázy, ktorý hrá dôležitú úlohu v regulácii vaskulárnej (cievnej) priepustnosti, endotelovej bunkovej proliferácie a angiogenézy vo fyziologických podmienkach a je aktivovaný prostredníctvom ligandu VEGF (vaskulárny rastový faktor).²⁹ VEGFR2 sa po aktivácii ligandom dimerizuje, autofosforyluje a aktivuje VEGFR2 signálnu dráhu vedúcu k angiogenéze, formovaniu nových kapilár z už existujúcich krvných ciev, a tým prispieva k podpore prežívania tumoru, jeho rastu a migrácii. Predpokladá sa, že zablokovanie VEGFR2 dráhy má za následok redukovanú tvorbu nádorov, potlačenie ich rastu a diseminácie. Cieľom mnohých farmaceutických spoločností bol vývoj malých molekúl inhibítorov VEGFR2, pričom niektoré z nich sú už dnes používané v klinických podmienkach ako lieky proti viacerým typom rakoviny. Na **Obrázku 11** môžeme vidieť štruktúrne vzorce schválných VEGFR2 liekov proti rakovine. Komerčné názvy: Sorafenib (zameraný na rakovinu pľúc a pečene), Sunitinib (na obličky), Pazopanib a Vandetanib (na obličky a štítnu žľazu).



Obrázok 11. FDA schválené VEGFR2 inhibítory používané v súčasnosti ako protirakovinové lieky v klinickej praxi.

²⁹ Olsson, A. K.; Kimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-Welsh, L. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 359.

Na inhibíciu VEGFR2 tyrozín kinázy bol opísaný celý rad zlúčenín založených na tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridín chinolínovom skelete, ktoré boli substituované na fenylovej a tetrahydropyridínovej skupine. Test na inhibíciu kinázovej aktivity bol vykonaný cez vysoko priepustný skrining HTS (metóda používaná vo výskume liečiv, ktorá umožňuje vykonávať súčasne veľké množstvo testov), ktorý poskytol informácie o hodnotách IC₅₀ týchto zlúčenín.

Rôzne substituované deriváty 3-(4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridín-2-yl)-1H-chinolín-2-ónu boli pripravené reakciou etyl esteru kyseliny (4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridín-2-yl)octovej so substituovanými 2-aminobenzaldehydmi. (Schéma 4)

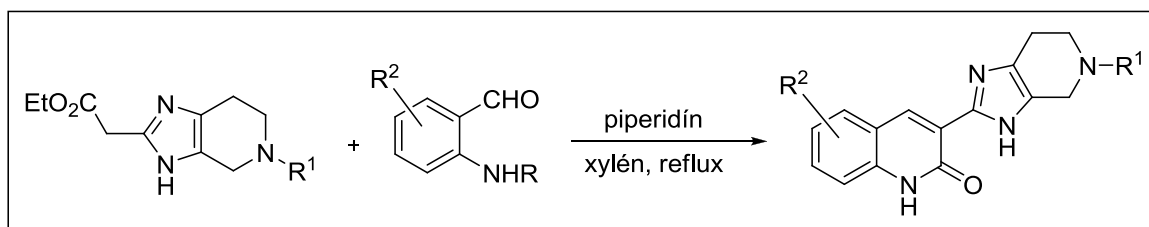
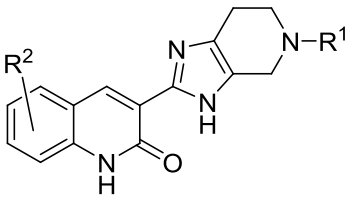
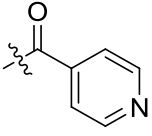
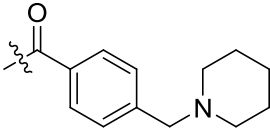
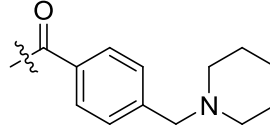
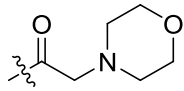
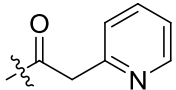
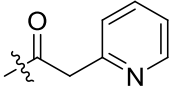
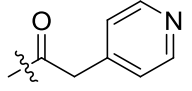


Schéma 4. Príprava tetrahydro-3H-imidazo[4,5-c]pyridín chinolínónov.

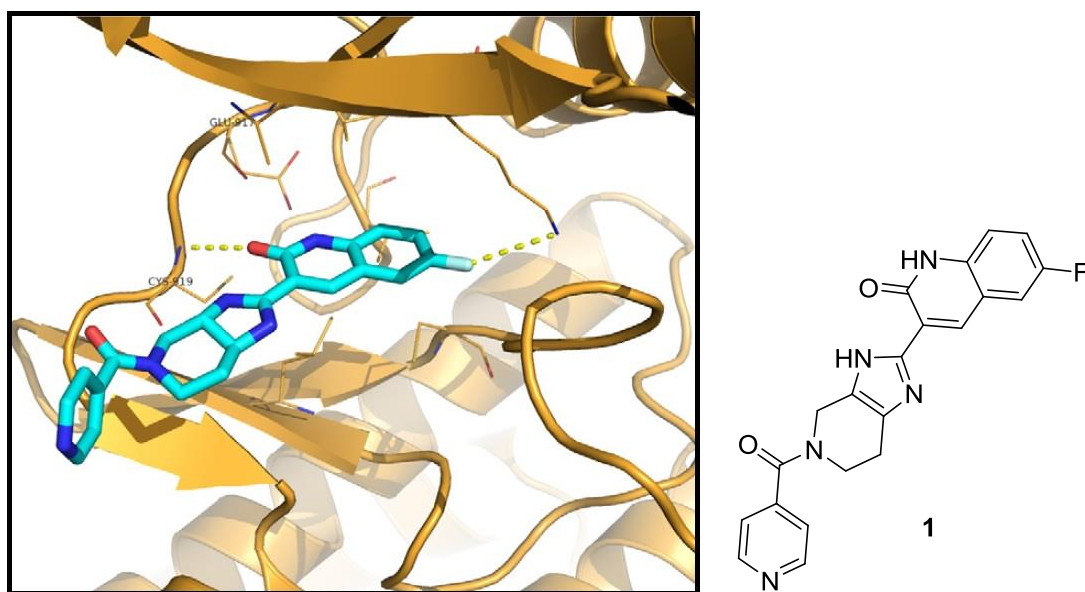
V biologických testoch (SAR) boli skúmané vlastnosti mnohých derivátov, z ktorých dva mali veľmi dobré inhibičné účinky na VEGFR2. Ich štruktúra a hodnoty IC₅₀ sú zobrazené v Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov..³⁰ Zavedením fluóru alebo chlóru do polohy 6 fenylového kruhu sa významne zvýšil inhibičný účinok týchto zlúčenín.

³⁰ Sun-Young, H.; Jie, W. Ch.; Jeon, Y.; Chong, H. Ch.; Jongkook, L.; Heejung, J.; Kwangho, L.; Jae, D. H.; Hyoung, R. K.; Sung, Y. Ch. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 2837-2842.

	Základný skelet: 		
	R¹	R²	VEGFR2 IC₅₀ (nM)
1		6 - F	0.3
2		H	1.3
3		6 - F	4.9
4		6 - F	4.3
5		6 - F	0.7
6		H	1.3
7		6 - Cl	0.5

Tabuľka 2. Štruktúry a aktivita pripravených VEGFR2 chinolinónových inhibítorov 1-7.

Dokovanie ligandov do kryštálovej štruktúry VEGFR2 bolo uskutočnené na objasnenie väzbového módu najlepších štruktúr chinolinónových derivátov (software Glide).³¹ Reprezentatívna predpovedaná poloha najaktívnejšej zlúčeniny (**1**) so štruktúrou VEGFR2 je zobrazená na **Obrázku 12**, kde sú zobrazené názvy a ukázané aj bočné reťazce aminokyselín závesného regiónu TK. Vodíkové väzby sú vyznačené žltou prerušovanou čiarou.



Obrázok 12. Komplex VEGFR2 TK so zlúčeninou **1** získaný dokovaním.

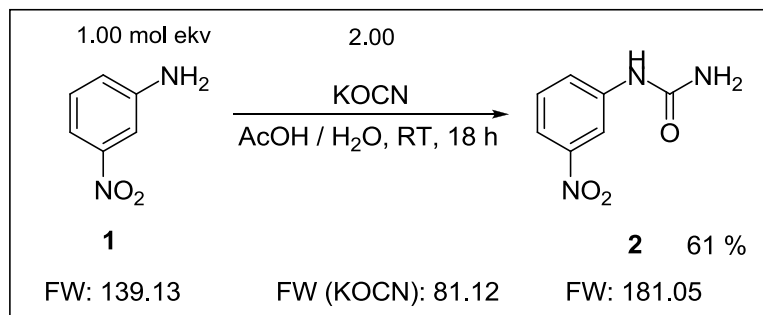
³¹ Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739.

7. Experimentálna časť

7.1 Materiál a použité metódy

^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané v DMSO-*d*₆ na prístrojoch Varian Gemini (300 MHz pre ^1H a 75 MHz pre ^{13}C). Chemické posuny sú udávané v jednotkách ppm, pričom ako vnútorný štandard (0 ppm) bol použitý tetrametylsilán. Infračervené spektrá boli merané na prístroji FT-IR Thermo Scientific Nicolet iS10. Teploty topenia boli stanovené pomocou prístroja Büchi The Melting Point M-565. Namerané hodnoty neboli korigované. Na stĺpcovú kvapalinovú chromatografiu (FLC) sme použili silikagél Merck 60 (40 – 63 μm). Priebeh reakcií sme sledovali pomocou TLC analýzy (Merck Silica gel 60 F₂₅₄) a na vizualizáciu škvrn sme používali UV lampu (254 nm). Hmotnostné spektrá (MS) boli merané na prístroji Shimadzu LC MS-IT-TOF (Combined LC/MS system). Použité rozpúšťadlá boli sušené pomocou štandardných postupov uvedených v literatúre. Komerčne dostupné zlúčeniny boli zakúpené od spoločnosti Sigma-Aldrich.

7.2 Syntéza 1-(3-nitrofenyl)močoviny (2)



Literatúra:³² (zopakované na rovnakom substráte, neuvedený výt'azok v lit.).

Experimentálny postup: 1.00 g (7.19 mmol, 1.00 mol ekv) m-nitroanilínu (**1**) sme rozpustili v 20 ml ľadovej kyseliny octovej. Do reakčnej zmesi sme počas miešania prikvapávali roztok 1.20 g KOCN (14.79 mmol, 2.06 mol ekv) v 20 ml H₂O počas 1 h a reakčnú zmes sme miešali pri RT 18 h, pričom z nej začal postupne vypadávať produkt. Potom sme k zmesi pridali 50 ml H₂O a vzniknutú zrazeninu sme odfiltrovali na Büchnerovom lieviku. Po vysušení sme získali 0.80 g (4.42 mmol, 61 %) **2** v podobe žltej kryštalickej látky.

Novosť zlúčeniny: Zlúčenina **2** je opísaná v literatúre a je charakterizovaná nasledovnými údajmi: (¹H-NMR, ¹³C-NMR)³³, M. p.³⁴

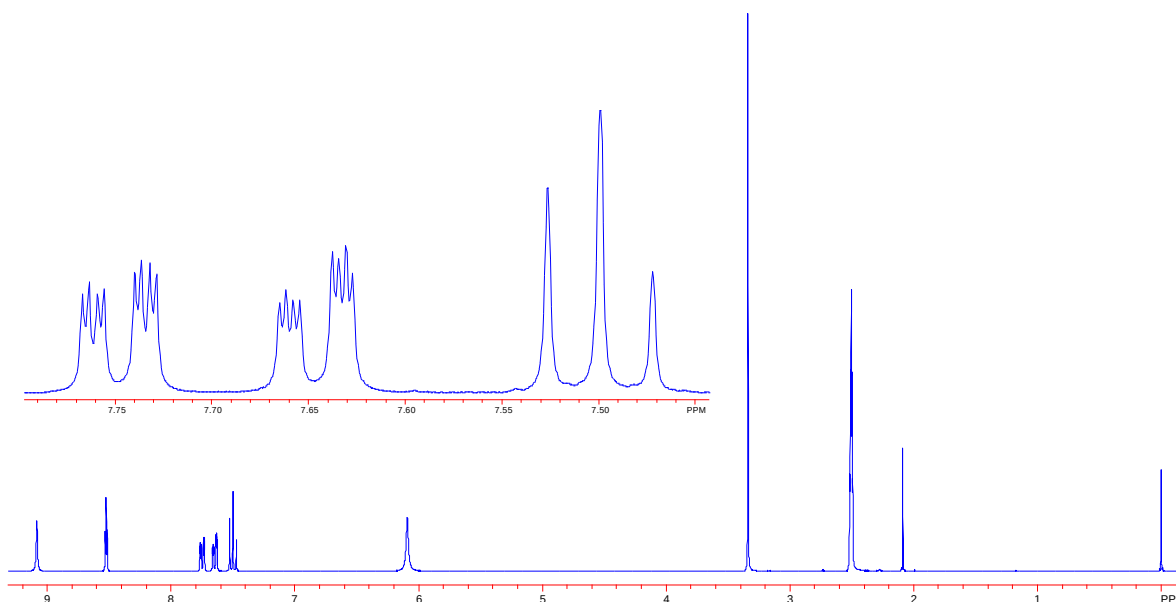
TLC analýza: (SiO₂, Hex / EA (1 / 2), 1 x vyvolané), R_F = 0.70 (UV₂₅₆)

M. p.: 186.3 – 189.3 °C [EA] (lit. 195.0 °C [EtOH])³⁴, žltá kryštaliclá látka

³² Walther, R.; Wlodkowski, S. *J Praktische Chemie* **1899**, 2, 269.

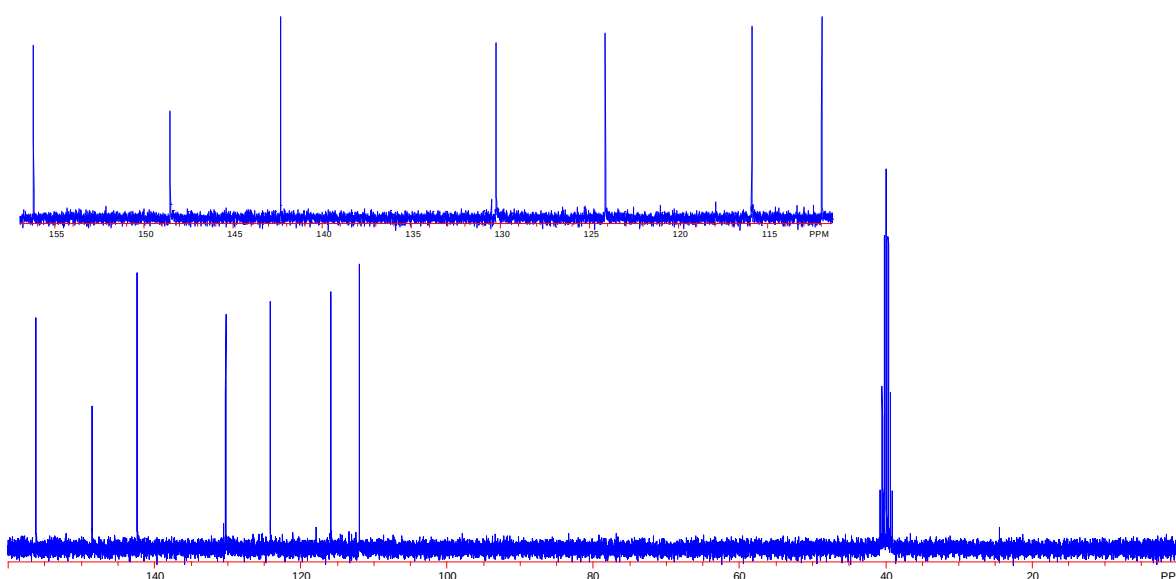
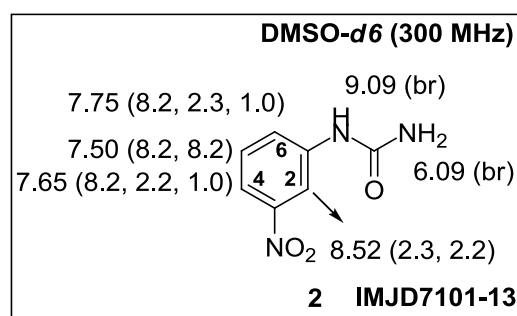
³³ Giffney, C. J.; O'Connor, Ch. J. *J Magn Reson* **1975**, 18, 230.

³⁴ Grammaticakis, P. *B Soc. Chim. Fr.* **1967**, 84 – 94.

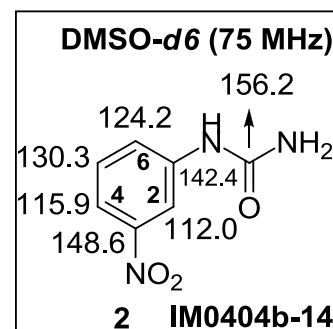


¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, IMJD7101-

13.fid): δ 9.09 (br s, 1H, -NH-), 8.52 (dd, 1H, $J(2,6) = 2.3$ Hz, $J(2,4) = 2.2$ Hz, H-C(2)), 7.75 (ddd, 1H, $J(5,6) = 8.2$ Hz, $J(2,6) = 2.3$ Hz, $J(4,6) = 1.0$ Hz, H-C(6)), 7.65 (ddd, 1H, $J(4,5) = 8.2$ Hz, $J(2,4) = 2.2$ Hz, $J(4,6) = 1.0$ Hz, H-C(4)), 7.50 (dd, 1H, $J(4,5) = J(5,6) = 8.2$ Hz, H-C(5)), 6.09 (br s, 2H, -NH₂).



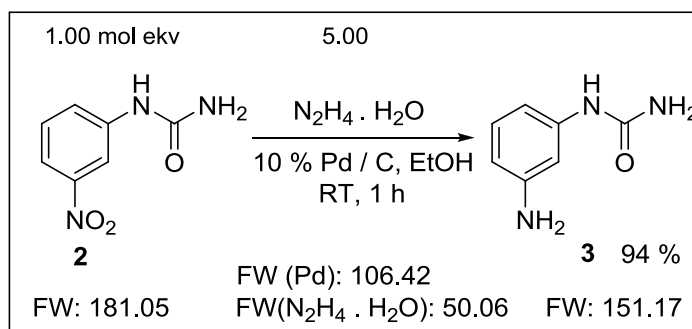
^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , IM0404b-14.fid): δ 156.2 (s, -NHCONH $_2$), 148.6 (s, C(3)), 142.4 (s, C(1)), 130.3 (d, C(5)), 124.2 (d, C(6)), 115.9 (d, C(4)), 112.0 (d, C(2)).



FT IR (solid, cm^{-1}): 3469 (s), 3345 (s), 3126 (m), 3095 (m), 1959 (w), 1889 (w), 1668 (s), 1593 (m), 1538 (s), 1485 (m), 1431 (m), 1338 (s), 1261 (s), 1123 (m), 1090 (m), 1016 (m), 883 (m), 831 (m), 803 (m), 768 (m), 739 (m), 707 (m), 666 (m). (Príloha 1)

MS (ESI $^+$): 182.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). (Príloha 2)

7.3 Syntéza 1-(3-aminofenyl)močoviny (**3**)



Literatúra:³⁵ (použitý iný substrát – dibenzofurán-3-amín, iná teplota).

Experimentálny postup: 500.0 mg (2.76 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **2** sme rozpustili v 15 ml EtOH. K roztoku sme pridali 670.0 μl (690.0 mg, 13.78 mmol, 5.00 mol ekv) hydrazín hydrátu (d: 1.032 g/mL) a 147.0 mg (0.14 mmol, 0.05 mol ekv) 10 % Pd / C. Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy. Po spotrebovaní východiskovej látky sme na krátkom stĺpci silikagélu odfiltrovali katalyzátor. Reakčnú zmes sme zahustili

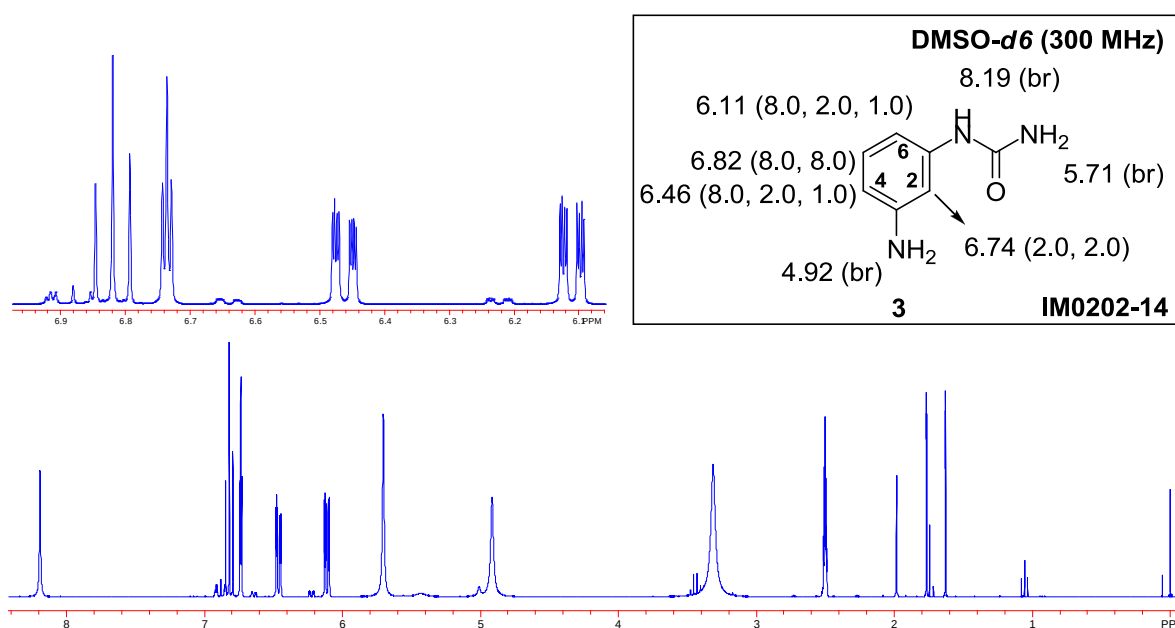
³⁵ Deady, L. W.; Sette, R. M. D. *Aust. J. Chem.* **2001**, 54, 177–180.

za zníženého tlaku a vysušili pomocou HV. Po vysušení sme získali 393 mg (2.60 mmol, 94 %) slabohnedej kryštalickej látky **3**.

Novosť zlúčeniny: Zlúčenina **3** je opísaná v literatúre a je charakterizovaná nasledovnými údajmi: M. p.³⁶, ¹H-NMR [DMSO]³⁷

M. p.: 123.2 – 125.2 °C [EA] (lit. 128.0 – 130.0 °C [H₂O]³⁶), slabohnedá kryštaliclá látka

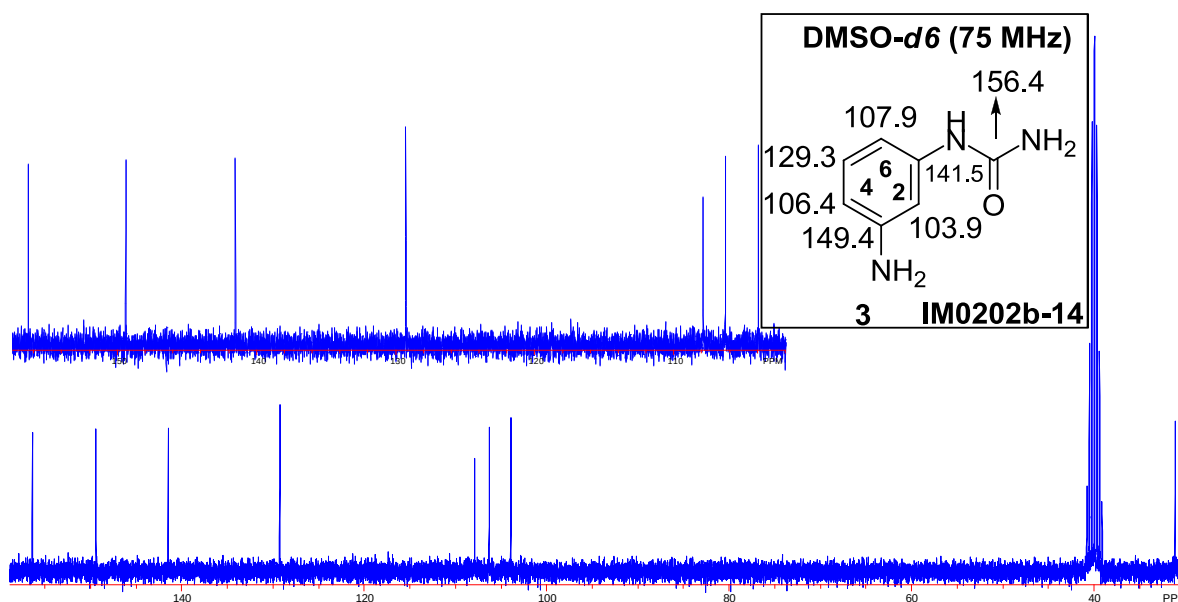
TLC analýza: (SiO₂, Hex / EA (1 / 3), 1x vyvolané), R_F = 0.12 (UV₂₅₆)



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6, IM0202-14.fid): δ 8.19 (br s, 1H, -NHCONH₂), 6.82 (dd, 1H, $J(4,5) = J(5,6) = 8.0$ Hz, H-C(5)), 6.74 (dd, 1H, $J(2,4) = J(2,6) = 2.0$ Hz, H-C(2)), 6.46 (ddd, 1H, $J(4,5) = 8.0$ Hz, $J(2,4) = 2.0$ Hz, $J(4,6) = 1.0$ Hz, H-C(4)), 6.11 (ddd, 1H, $J(5,6) = 8.0$ Hz, $J(2,6) = 2.0$ Hz, $J(4,6) = 1.0$ Hz, H-C(6)), 5.71 (br s, 2H, -CONH₂), 4.92 (br s, 2H, Ar-NH₂). Spektrum **3** bolo zhodné s literatúrou.³⁷

³⁶ Heidelberg J. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1437.

³⁷ SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT WO2004/48343 A1 **2004**.

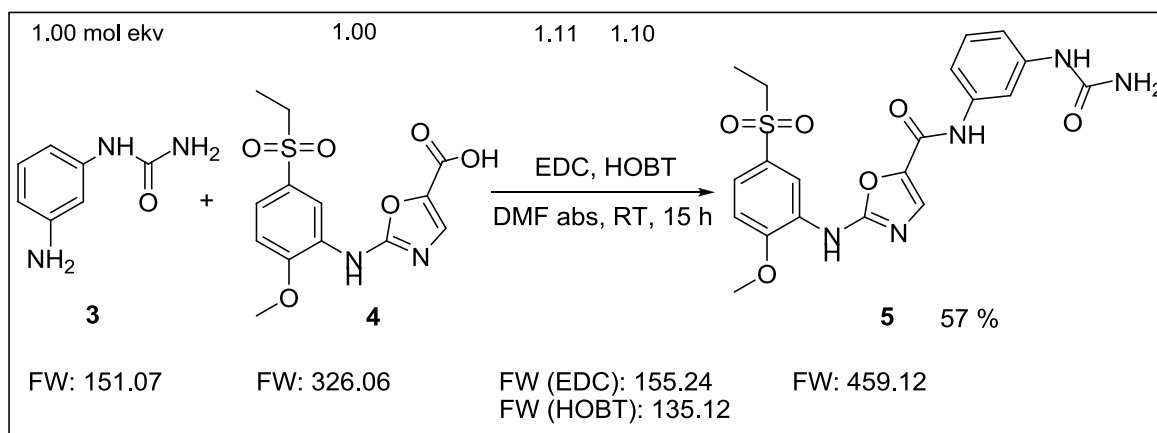


^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*6, IM0202b-14.fid): δ 156.4 (s, -NHCONH₂), 149.4 (s, C(3)), 141.5 (s, C(1)), 129.3 (d, C(5)), 107.9 (d, C(6)), 106.4 (d, C(4)), 103.9 (d, C(2)).

FT IR (solid, cm⁻¹): 3459 (m), 3380 (m), 3249 (s), 3051 (m), 1690 (s), 1667 (s), 1590 (s), 1537 (s), 1494 (s), 1442 (s), 1346 (s), 1315 (m), 1197 (s), 1164 (m), 1101 (m), 1031 (m), 868 (m), 832 (m), 784 (m), 768 (m), 701 (m). (Príloha 3)

MS (ESI+): 152.0 ([M+H]⁺). (Príloha 4)

7.4 Syntéza počítačom predpovedaného VEGFR2 inhibítora (5)



Literatúra:³⁸ (použitý iný substrát – anilín a kyselina 4-(4-amino-6-metyltieno[2,3-d]pyrimidín-5-yl)benzoová, rovnaká teplota).

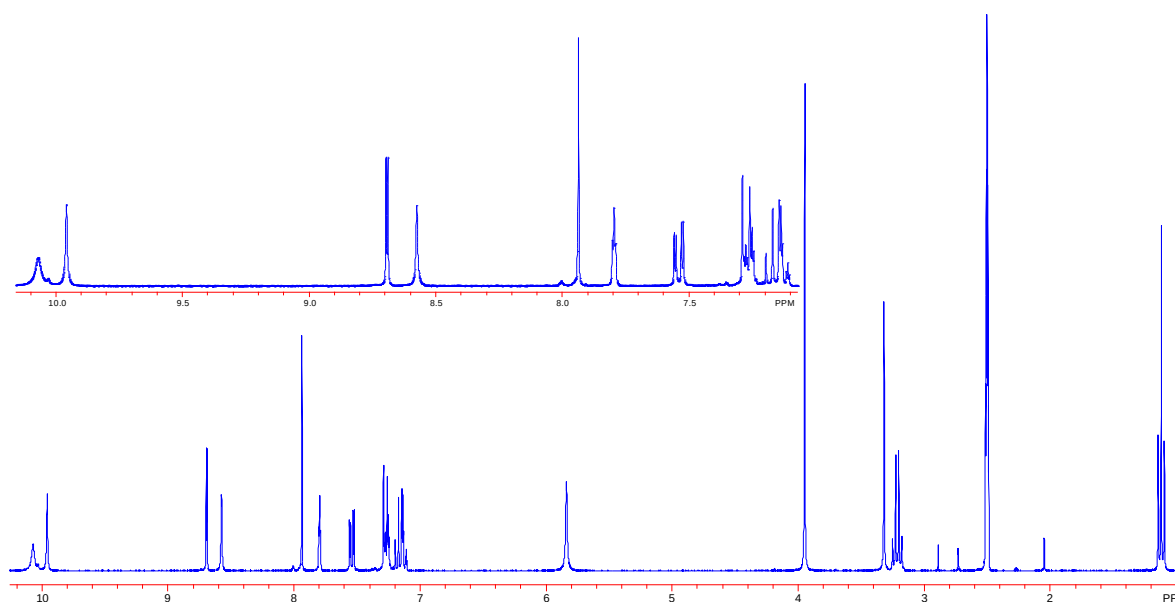
Experimentálny postup: 200.0 mg (0.61 mmol, 1.00 mol ekv) kyseliny **4** (syntéza bola vyvinutá a látka je dostupná v našej skupine) sme rozpustili v 3 ml DMF abs. K roztoku sme pridali 92.6 mg (0.61 mmol, 1.00 mol ekv) močoviny **3**, 105.0 mg (0.68 mmol, 1.11 mol ekv) EDC a 91.0 mg (0.67 mmol, 1.10 mol ekv) HOBT. Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy. Reakčnú zmes sme miešali po dobu 15 h pri RT. Potom sme do zmesi pridali 80 ml H₂O a vyzrážanú látku sme odfiltrovali, nechali vyschnúť na vzduchu a dosušili na HV. Po vysušení sme získali 160 mg (0.35 mmol, 57 %) produktu 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)-N-(3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (**5**) vo forme hnedej kryštalickej látky.

TLC analýza: (SiO₂, EA, 1 x vyvolané), R_F = 0.51 (UV₂₅₆).

Novosť zlúčeniny: Zlúčenina **5** nie je opísaná v literatúre.

M.p.: 239.0 – 241.0 °C [EA], hnedá kryštalická látka.

³⁸ Albert, D.H.; Arries, S.S.; Bauch, J.L.; Bouska, J.J.; Curtin, M.L.; Dai, Yujia; Davidsen, S.K.; Frey, R.R.; Glaser K.B.; Guo, Jun; Guo, Yan; Ji, Z.; Li, J.; Marcotte, P.A.; Marsh, K.C.; Michaelides, M.R.; Pease, L.J.; Stewart, K.D.; Stoll, V.S.; Tapang, P.; Ahmed, A.A.; Arnold, L.; Barlozzari, T.; Bousquet, P.F.; Cunha, G.A.; Moskey, M.D.; Wishart, N.; Dai, Y. *J Med Chem* **2005**, 48, 6066–83.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆,

IM0301-14.fid): δ 10.07 a 9.96 (2

x br s, 2 x 1H, -CONH- a -NH-

C_B(2)), 8.69 (d, 1H, J (C₄,C₆) = 2.3

Hz, H-C_C(6)), 8.58 (br s, 1H, -

NHCONH₂), 7.94 (s, 1H, H-C_B(4)),

7.80 (dd, 1H, J (A₂,A₆) = 1.9 Hz,

J (A₂,A₄) = 1.8 Hz, H-C_A(2)), 7.54

(dd, 1H, J (C₃,C₄) = 8.6 Hz, J (C₄,

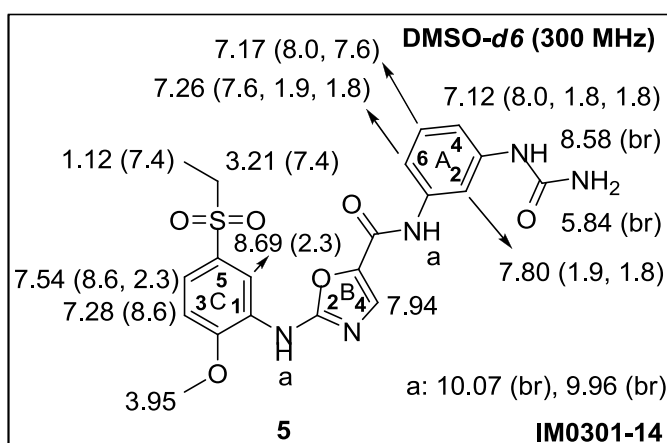
C₆) = 2.3 Hz, H-C_C(4)), 7.28 (d, 1H, J (C₃, C₄) = 8.6 Hz, H-C_C(3)), 7.26 (ddd, 1H, J (A₅,A₆)

= 7.6 Hz, J (A₂,A₆) = 1.9 Hz, J (A₄,A₆) = 1.8 Hz, H-C_A(6)), 7.17 (dd, 1H, J (A₄,A₅) = 8.0 Hz,

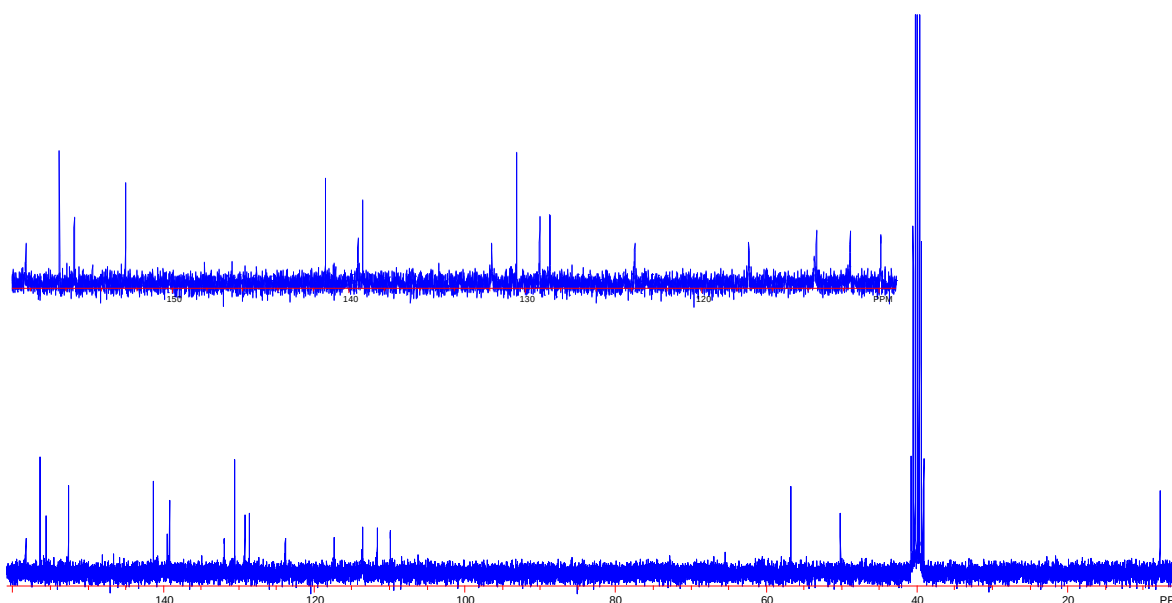
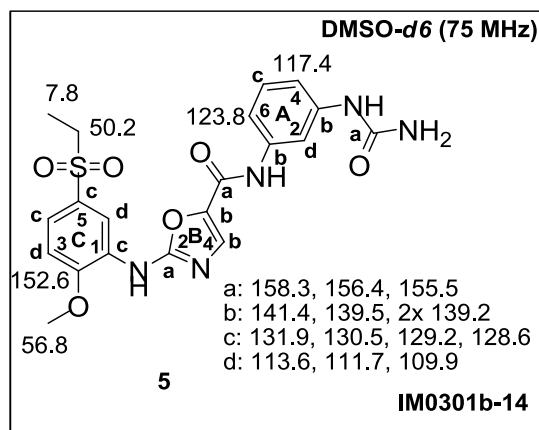
J (A₅, A₆) = 7.6 Hz, H-C_A(5)), 7.12 (ddd, 1H, J (A₄,A₅) = 8.0 Hz, J (A₂,A₄) = J (A₄,A₆) = 1.8

Hz, H-C_A(4)), 5.84 (br s, 2H, -CONH₂), 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 3.21 (q, 2H, J (CH₂,CH₃) =

7.4 Hz, -SO₂CH₂CH₃), 1.12 (t, 3H, J (CH₂,CH₃) = 7.4 Hz, -SO₂CH₂CH₃).



^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , IM0301b-14.fid): δ 158.3, 156.4 a 155.5 (3 x s, -NHCONH₂, -CONH-, C_B(2)), 152.6 (s, C_C(2)) 141.4, 139.5 a 2 x 139.2 (4 x s, C_A(1), C_A(3), C_B(4) a C_B(5)), 131.9, 130.5, 129.2 a 128.6 (2 x s, 2 x d, C_A(5), C_C(1), C_C(4) a C_C(5)), 123.8 (d, C_A(6)), 117.4 (d, C_A(4)), 113.6, 111.7 a 109.9 (3 x d, C_A(2), C_C(3) a C_C(6)), 56.8 (q, -OCH₃), 50.2 (t, -CH₂CH₃), 7.8 (q, -CH₂CH₃).



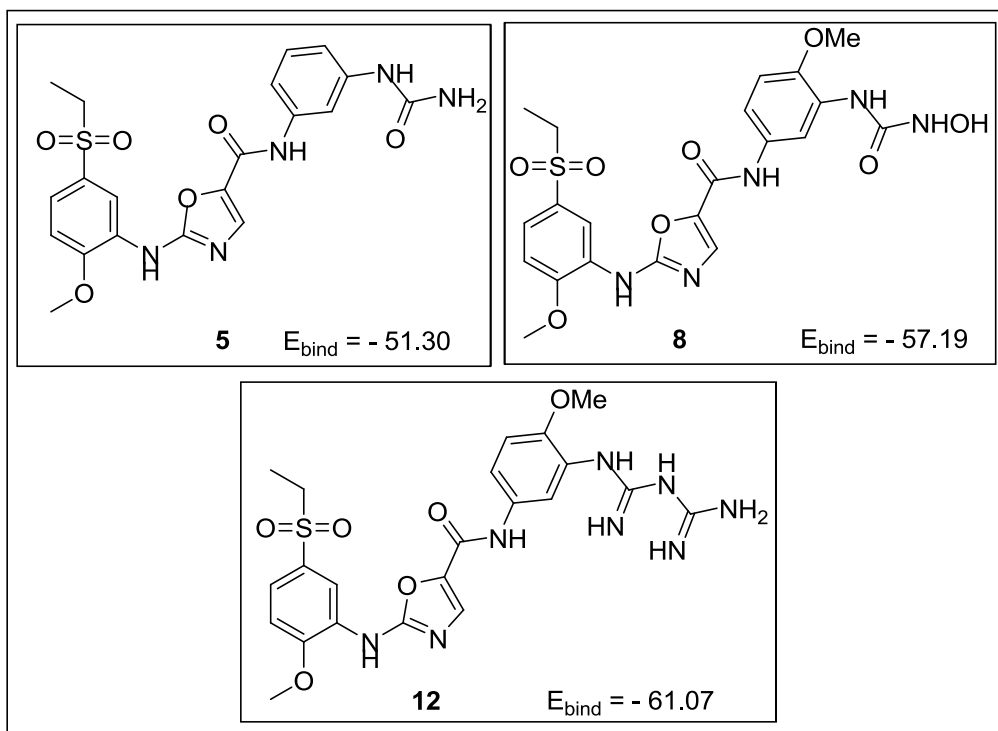
FT IR (solid, cm⁻¹): 3344 (m), 1666 (m), 1599 (m), 1567 (s), 1487 (m), 1423 (m), 1300 (m), 1264 (m), 1202 (m), 1141 (m), 1120 (s), 1085 (m), 1045 (m), 1017 (m), 922 (m), 871 (m), 778 (m), 734 (m), 717 (m). (Príloha 5)

MS (ESI-): 458.0 ([M-H]⁻). (Príloha 6)

8. Výsledky a diskusia

Cieľom teoretickej časti práce bolo spracovanie literatúry týkajúcej sa vlastností a biologickej aktivity antidiabetického liečiva metformínu, ktorý popri znižovaní hladiny krvného inzulínu potláča aj aktivitu rakovinových kmeňových buniek. Viaceré štúdie, potvrdzujúce jeho synergické účinky sa zamerali na účinnosť v kombinácií s inými druhmi chemoterapie, čo môže byť pozitívnym krokom pre vývoj liečiv do budúcnosti. Príprava metformínu je známa už takmer storočie a uskutočňuje sa v prítomnosti HCl za vzniku hydrochloridu. Zriedkavejšie sa vyskytuje vo forme voľnej bázy. V teoretickej časti sme sa zaoberali taktiež spracovaním vlastností a návrhom VEGFR2 TK inhibítorov zameraných na potlačanie nádorovej angiogenézy. Prostredníctvom biologických testov bolo preskúmaných mnoho nízkomolekulových zlúčenín, z ktorých jedna mala veľmi priaznivú hodnotu IC_{50} .

Cieľom experimentálnej práce bolo pripraviť niektorý z navrhnutých intermediátov a prípadne aj N-arylaminoxazolkarboxamidový VEGFR2 inhibítor obsahujúcich močovinovú, alebo jemu podobný fragment. Na **Obrázku 13** sú zobrazené vybrané štruktúry potenciálnych VEGFR2 inhibítorov s predpovedanými relatívnymi väzobnými energiami (E_{bind}).



Obrázok 13 Predpovedané VEGFR2 TK inhibítory 5, 8, 12 s močovinovým, alebo jemu podobným fragmentom.

Z navrhnutých intermediátov a predikovaných štruktúr VEGFR2 TK inhibítorov sa nám podarilo pripraviť medziprodukty **2**, **3** a finálnu látku - potenciálny oxazolkarboxamidový inhibítor **5**.

8.1 Syntéza 1-(3-nitrofenyl)močoviny (**2**)

Pri syntéze močoviny **2** sme vychádzali z komerčne dostupného m-nitroanilínu **1**. Reakciu sme uskutočnili podľa viacerých postupov z literatúry použitých na podobné substráty. Reakcia vyžaduje prídanie kyseliny na aktiváciu izokyanátu uvoľnením z jeho soli, pričom jej nadbytok môže znížiť nukleofilitu anilínu. Pri použití HCl nevznikal produkt a v reakčnej zmesi sme identifikovali len východiskovú látku **1**. Ani zmenou reakčných podmienok (teplota, čas, ekvivalenty kyseliny a KOCN, rozpúšťadlo) sa nám nepodarilo z anilínu **1** žiadanú močovinu pripraviť. Problémom HCl môže byť jej sila, ktorá je dostatočná na deaktiváciu anilínu jeho protonizáciou. **Schéma 5** znázorňuje druhý navrhnutý variant syntézy požadovanej močoviny **2** použitím kyseliny octovej.

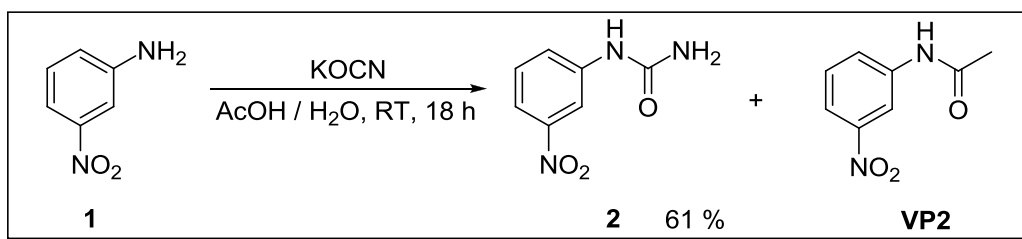


Schéma 5 Syntéza močoviny **2** za prítomnosti HOAc.

Po reakcii práškoveho KOCN s anilínom **1** rozpusteným v ľad. AcOH sme pomocou TLC identifikovali na platničke dve škvrny. Jedna z nich zodpovedala želanému produktu ($R_F = 0.70$), avšak druhá predstavovala vznik neočakávaného vedľajšieho produktu *N*-(3-nitrofenyl)acetamidu (**VP2**). Produkt sme sa pokúsili od **VP2** oddeliť pomocou FLC, avšak počas čistenia dochádzalo k rozpadu produktu **2** na silikagéli. Vzhľadom na predpokladaný mechanizmus vzniku **VP2** sme sa rozhodli znížiť obsah voľnej HOCN kyseliny v r. zmesi pomalým pridávaním KNCO do reakcie. Väčšiu selektivitu prinieslo postupné prikvapkávanie vodného roztoku KOCN (1 ml / 3 min) k anilínu **1** rozpusteného v AcOH. Minoritného zastúpenia acetamidu sme sa zbavili kryštalizáciou zo zmesi toluén / metanol. V **Schéme 6** je načrtnutý predpokladaný

mechanizmus vzniku *N*-(3-nitrofenyl)acetamidu (**VP2**), v ktorom izokyanatan pomáha odstúpeniu kyslíka z kyseliny analogicky ako pri amidačných karbodiimidových činidlách.

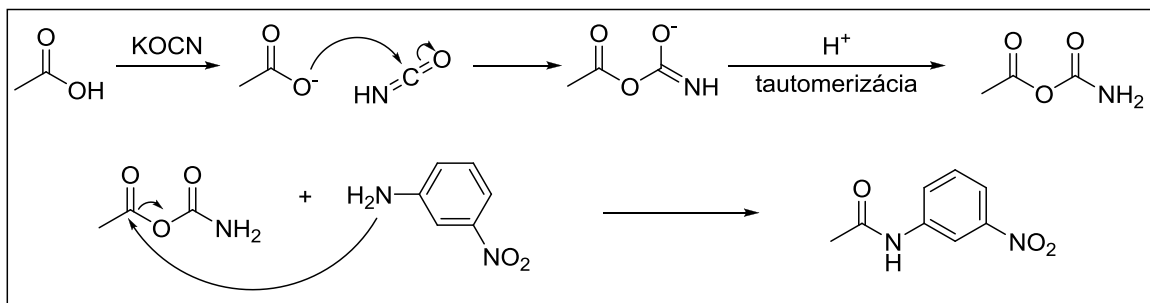


Schéma 6. Navrhnutý mechanizmus vzniku acetamidu **VP2**.

8.2 Syntéza 1-(3-aminofenyl)močoviny (**3**)

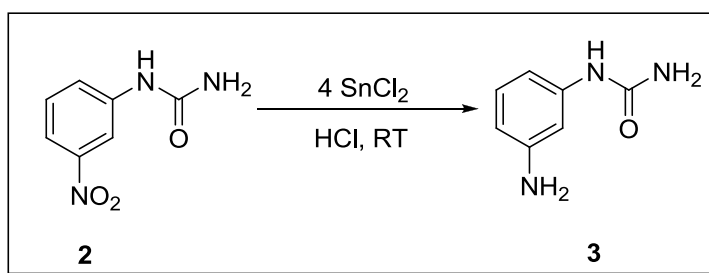


Schéma 7 Syntéza požadovaného intermediátu - močoviny **3**.

Pri príprave požadovanej aminomočoviny **3** sme vychádzali z nami pripravenej nitromočoviny **2**. Redukčnú reakciu sme uskutočnili pôsobením 4 mol ekv SnCl_2 pri RT v prostredí HCl . Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy. Po prebehnutí reakcie sme do zmesi pridali nasýtený roztok NaHCO_3 na vyzrážanie zlúčenín cínu, ktoré sme odfiltrovali a produkt sme extrahovali do EA. Vzhľadom na dlhý reakčný čas a zdĺhavé spracovanie produktu reakcie (najmä filtrácia) sme použili aj inú metódu prípravy močoviny **3**. Ďalší spôsob redukcie močoviny **2** je zobrazený na **Schéme 8**.

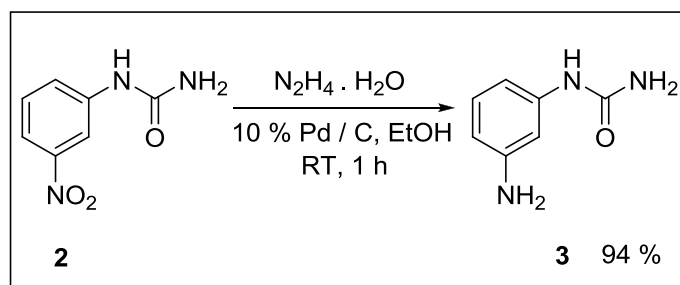


Schéma 8 Syntéza močoviny **3**.

Alternatívnym a elegantnejším spôsobom redukcie NO₂ skupiny na aromatickom systéme bola redukcia hydrazínom (N₂H₄ · H₂O) v prítomnosti hydrogenačného katalyzátora (Pd / C) v EtOH. Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy a po spotrebovaní východiskovej látky sme jednoducho odfiltrovali katalyzátor na krátkom stĺpci SiO₂. Po odparení prchavých podielov pomocou RVO a dosušení reakčnej zmesi na HV sme získali požadovanú močovinu **3** v 94 % výťažku.

8.3 Syntéza potenciálneho VEGFR2 inhibítora (**5**)

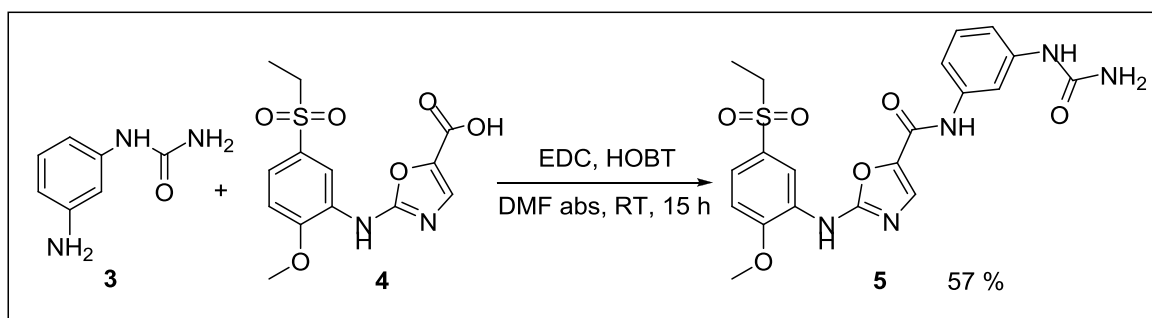


Schéma 9. Syntéza predpovedaného VEGFR2 inhibítora arylaminooxazolcarboxamidu **5**.

Pri príprave 2-(5-(etylсульfonyл)-2-метoxyфениламино)-N-(3-уреидофенил)oxazol-5-карboxамиду (**5**) sme vychádzali z nami pripravenej močoviny **3** a kyseliny **4**, ktorej syntéza bola vyvinutá v našej výskumnej skupine.³⁹ Podmienky reakcie sme prebrali zo syntézy uskutočnenej na pyrimidínovom deriváte.³² Prípravu arylaminooxazolcarboxamidu **5** sme uskutočnili v inertnej atmosfére (Ar). Do suchej banky, prefúknutej argónom, sme

³⁹ Ribar, P. *Diplomová práca* **2013**, PRIF UK Bratislava, 64-54.

navázili kyselinu **4**, ktorú sme rozpustili v DMF abs. Po jej rozpustení sme do roztoku pridali EDC, HOBT a močovinu **3**. EDC sme použili ako aktivačné činidlo kyseliny **4**. HOBT následne reaguje s aduktom EDC a kyseliny **4**, pričom vytvára aktivovaný ester, ktorý reaguje s prítomným anilínom **3**. Reakcia vytvorenia amidovej väzby prebiehala pri RT za vzniku arylaminoxazolkarboxamidu **5**. Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy. Po spotrebovaní východiskovej látky **3** (15 h) sme do reakčnej zmesi pridali H₂O, čo vyústilo ku vzniku bielej zrazeniny. Zrazeninu sme odfiltrovali vysušili na HV. Získali sme hnedú kryštalickú látku v 57 % výťažku. Na **Schéme 10** je zobrazený predpokladaný mechanizmus vzniku 2-(5-(etylсульfonyl)-2-metoxyfenylamino)-N-(3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (**5**).

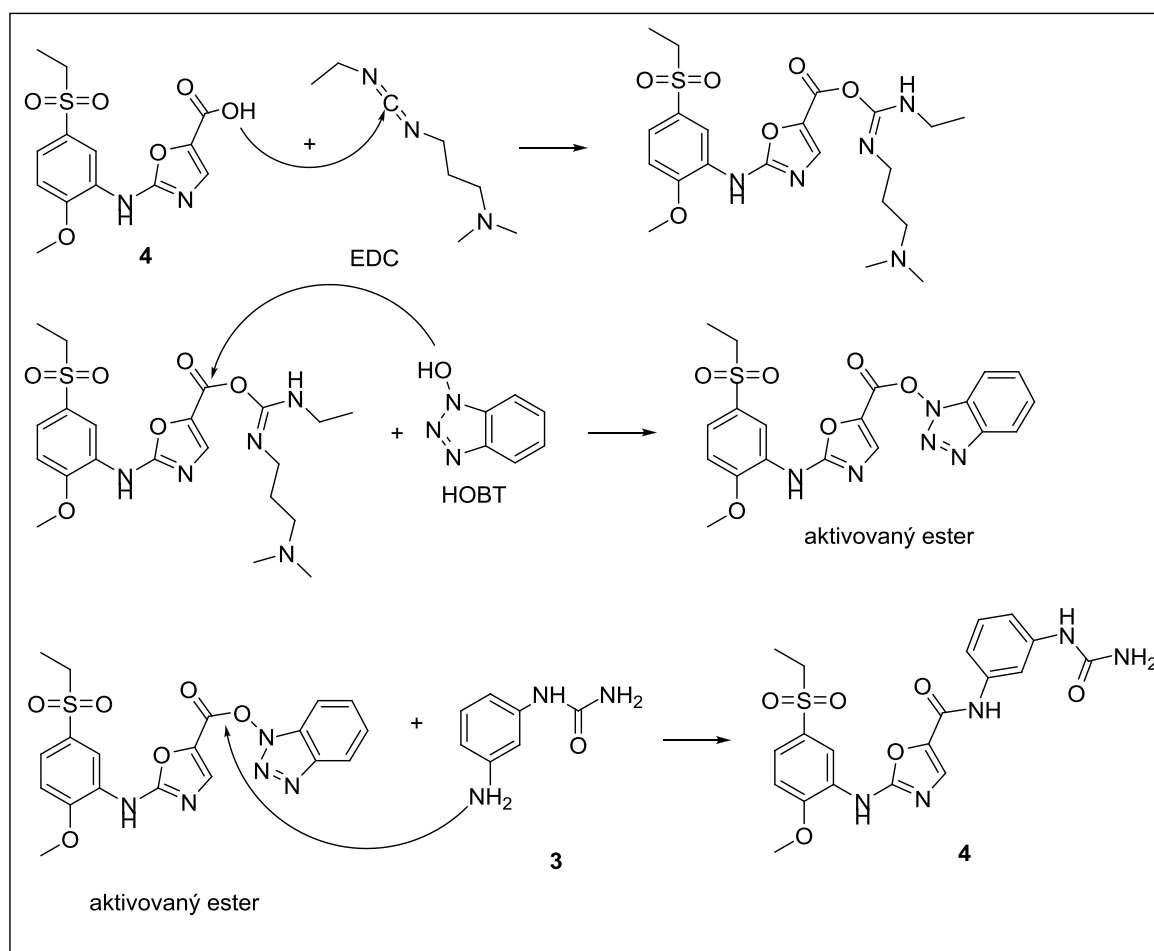


Schéma 10. Navrhnutý mechanizmus vzniku arylaminoxazolkarboxamidu **5**.

8.4 Syntéza 1-(5-amino-2-metoxyfenyl)-3-hydroxymočoviny (7)

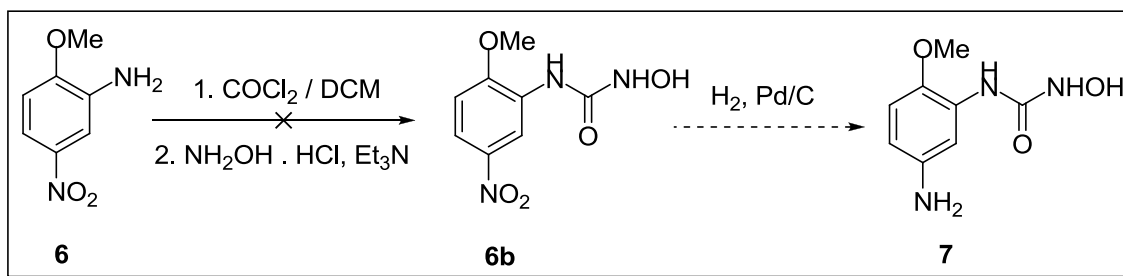


Schéma 11 Zamýšľaný postup prípravy hydroxymočoviny 7.

Pri príprave hydroxymočoviny **7** sme vychádzali z anilínu **6** podľa článku, v ktorom pripravovali močoviny z rovnakého anilínu pomocou fosgény.⁴⁰ Anilín **6** sme rozpustili v malom množstve DCM a pripravený roztok sme za chladenia ľadom prikvapávali k roztoku COCl_2 (25 % COCl_2 v PhMe) v priebehu 1 h. Potom sme do reakčnej zmesi pridali $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ / Et_3N (na uvoľnenie hydroxylamínu a zachytenie vzniknutej HCl). Priebeh reakcie sme sledovali pomocou TLC analýzy (Hex / EA : 1 / 3). Na platničke sme pozorovali prítomnosť mnohých škvrín, ktoré reprezentovali vznik viacerých vedľajších produktov. V zložitej zmesi sme pomocou rôznych separačných metód, ^1H NMR a MS dokázali identifikovať najmä východiskovú látku **6** a močovinovú dimér anilínu **6a** (1,3-bis(2-metoxy-5-nitrofenyl)močovina) „premostené anilíny karbonylom fosgény“. Na HPLC – MS sme identifikovali aj želaný produkt, ktorý bol prítomný v zmesi v zanedbateľnom zastúpení. Reakciu sme optimalizovali zmenou teploty, ekvivalentov činidiel, rozpúšťadla (THF, DMF), poradia pridávania, bázickou aktiváciou anilínu, avšak želanú hydroxymočovinu **6b** sa nám dosiaľ nepodarilo pripraviť. Predpokladáme, že problémom môže byť nízka aktivita anilínu a slabá rozpustnosť hydrochloridu hydroxylamínu. Na Schéme 12 je zobrazený predpokladaný priebeh opísanej reakcie vzniku močovinového diméru anilínu **6a**.

⁴⁰ Bermudez, J.; Dabbs, S.; King, F. D. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1932-1935.

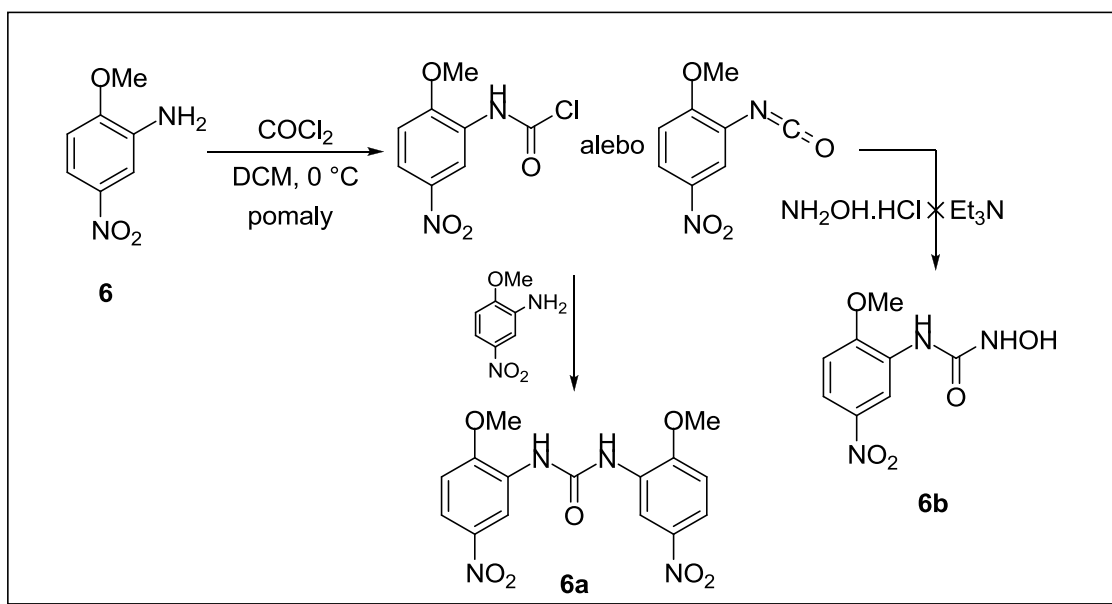


Schéma 12 Príprava hydroxymočoviny **6b** z anilínu **6**. Vysvetlenie vzniku vedľajšieho dimérneho produktu **6a**.

8.5 Syntéza 2-metoxy-5-nitrofenylbisguanidínu (**10**)

Do ďalšej cieľovej molekuly **12** potrebujeme zaviesť bisguanidínovú jednotku. Prvým krokom zamýšľanej syntézy bola príprava 2-metoxy-5-nitrofenylbisguanidínu (**10**). Syntézu sme uskutočnili podľa postupu z literatúry,⁴¹ pričom sme vychádzali z komerčne dostupného anilínu **6**. Postup prípravy z literatúry bol opísaný pre podobný analóg, 2,4-dimetoxyanilín. Reakciu sme uskutočnili rozpustením anilínu **6** v *i*-BuOH a následne sme do zmesi pridali HCl, až kým sme nedosiahli hodnotu pH = 1. Po dosiahnutí optimálneho pH sme do roztoku pridali dikyándiamid (**9**) a zmes sme refluxovali 4 h. Po prebehnutí reakcie sme roztok ochladili na RT. Vykryštalizovanú hmotu sme odfiltrovali na Büchnerovom lieviku a premyli vychladeným *i*-PrOH. NMR analýza a MS potvrdili vznik dvoch produktov v podobnom zastúpení, pričom jeden z nich zodpovedá želanej látke **10**. Vedľajší produkt sa nám nepodarilo charakterizovať a ani oddeliť od produktu. Táto metóda predstavovala najúspešnejší pokus, pričom sme vyskúšali aj najbežnejšiu metódu prípravy arylbisguanidínov – reflux s dikyándiamidom (**9**) v prostredí HCl. Metódu v 1M HCl sme overili prípravou fenylbisguanidínu z nesubstituovaného anilínu, ktorý sme pripravili v kvantitatívnom výťažku. Skúšali sme aj reakciu v DMSO s TsOH a aj

⁴¹ Tanygina, E.S.; Popova, T.N.; Semenikhina, A.V.; Krylskii, E.D.; Matasova, L.V. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **2013**, 47, 187-190.

v tavenine. Predpokladom neprebiehajúcej reakcie môže byť práve prítomnosť elektrónakceptornej $-\text{NO}_2$ skupiny na benzénovom jadre, ktorá spôsobuje nízku reaktivitu a tiež sterické bránenie prítomnej orto-metoxyskupiny. Z dôvodu nedostatku času sa nám nepodarilo optimalizovať reakčné podmienky za vzniku arylbisguanidínu **10**. Na Schéme **13** je znázornená reakčná schéma spomínanej reakcie.

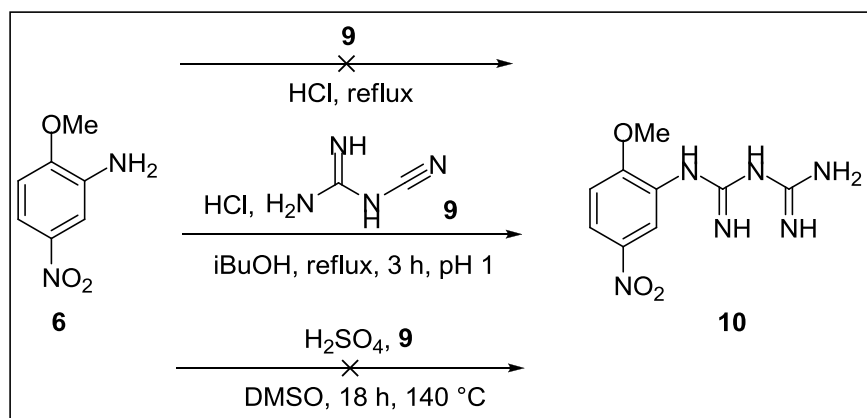


Schéma 13. Vyskúšané podmienky prípravy arylbisguanidínu **10** z anilínu **6**.

8.6 Syntéza 2-metoxyfenylbisguanidínu (10a)

Na overenie reakčných podmienok uvedených v literatúre sme sa pokúsili pripraviť arylbisguanidín **10a** z komerčného elektrónbohatého anilínu **6c**. Zopakovaním postupu syntézy arylbisguanidínu **10** sme pripravili slaboružovú kryštalickú látku v 58 % výťažku. Analýza NMR potvrdila štruktúru 2-metoxyfenylbisguanidínu **10a**.

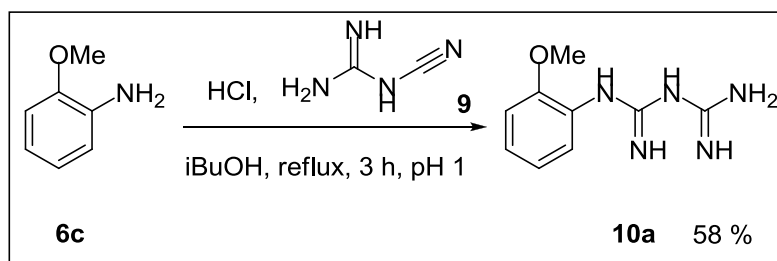


Schéma 14. Príprava modelového arylbisguanidínu **10a**.

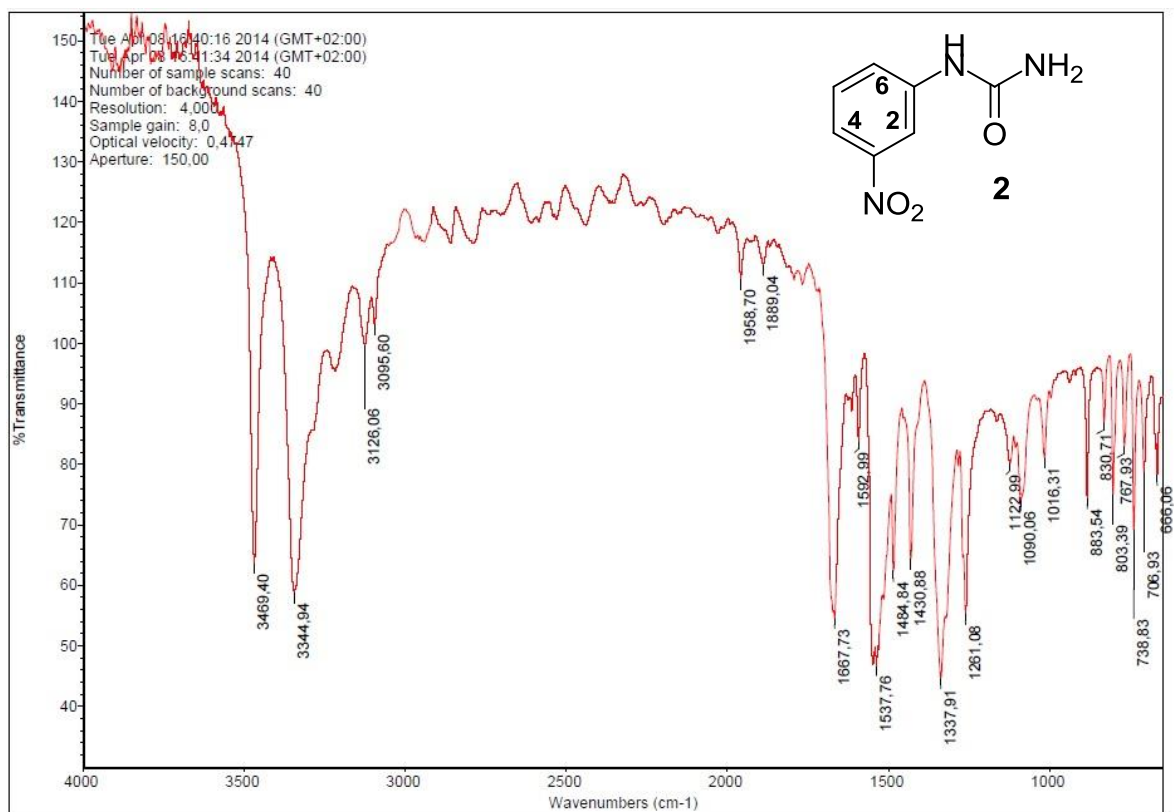
9. Záver

V rámci bakalárskej práce sme sa v teoretickej časti oboznámili s novou koncepciou liečby nádorových ochorení. Dôležitú úlohu v procese vzniku nádorových ochorení zohrávajú rakovinové kmeňové bunky, ktorých odstránením, alebo potlačením ich aktivity môžeme doceliť zníženie tvorby nových tumorov a metastáz, či dokonca významný progres pri liečbe tumorov. Staré antidiabetické liečivo metformín sa prejavuje ako sľubný inhibítor CSCs, čoho dôkazom sú mnohé práce uvedené v teoretickej časti.

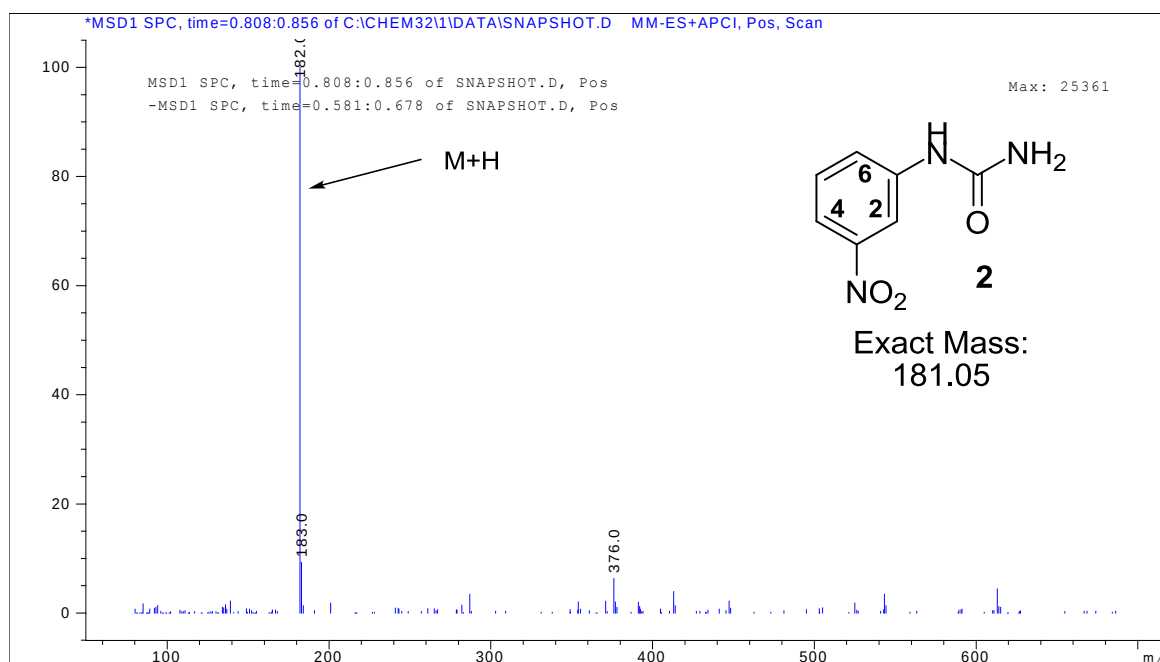
V experimentálnej časti diplomovej práce sme navrhli prípravu niektorých intermediátov predstavujúcich významné prekurzory pre syntézu počítačom predpovedaných N-arylaminooxazolkarboxamidových VEGFR2 TK inhibítorov obsahujúcich močovinovú, alebo jemu podobný fragment. Cieľom bolo pripraviť niektoré z týchto prekurzorov. Úspešne sa nám podarilo pripraviť 1-(3-nitrofenyl)močovinu (**2**), ktorej redukciou sme získali 1-(3-aminofenyl)močovinu (**3**) a jej reakciou s kyselinou **4** sme pripravili a charakterizovali dosiaľ neopísanú látku potenciálny VEGFR2 inhibítor arylaminooxazolkarboxamid **5**. Prípravy ďalších prekurzorov hydroxymočoviny napr. **7** a bisguanidínu **10** neboli zatiaľ zoptimalizované aj napriek mnohým zmenám reakčných podmienok a úspešným reakciám na príbuzných substrátoch ktoré sme urobili. Pripravený arylaminooxazolkarboxamid **5** predstavuje jeden z počítačových návrhov potenciálnych VEGFR2 inhibítorov. V dohľadnej dobe bude zistená aj jeho IC_{50} hodnota voči cieľovej VEGFR2 kináze.

10. Prílohy

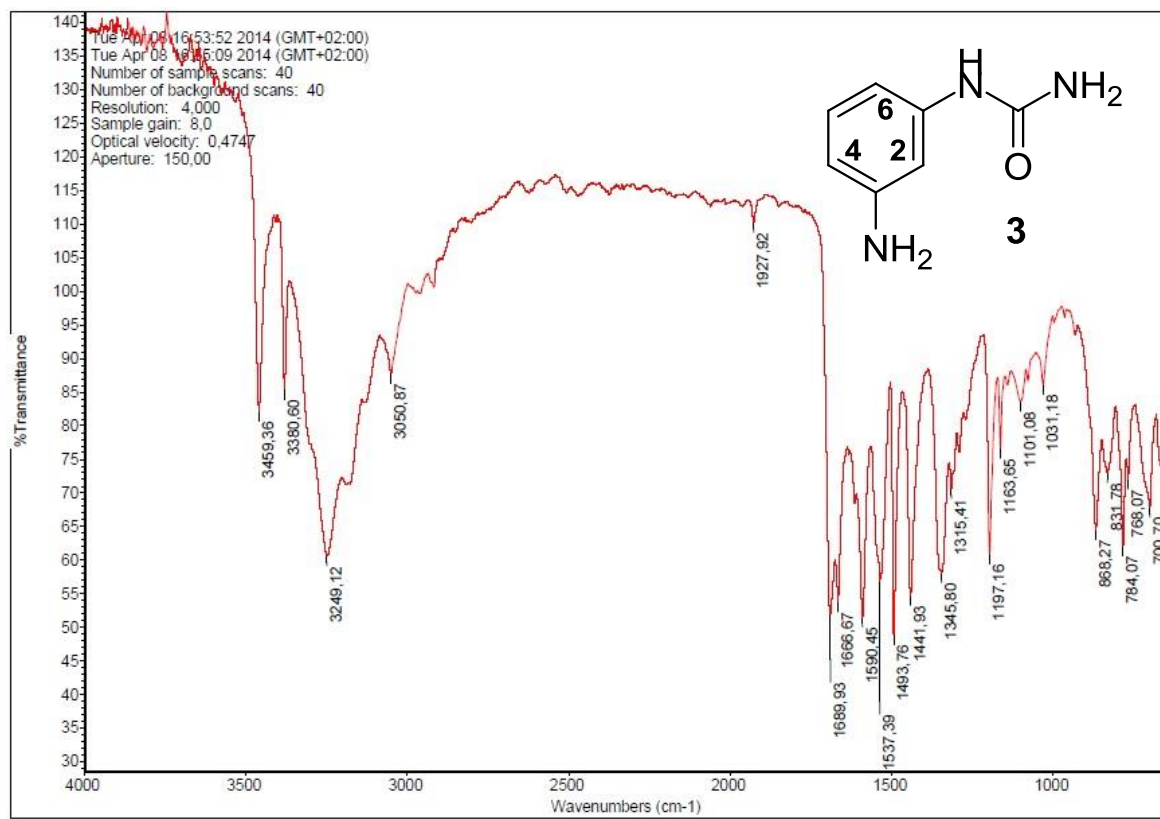
Príloha 1: IČ spektrum 1-(3-nitrofenyl)močoviny (2)



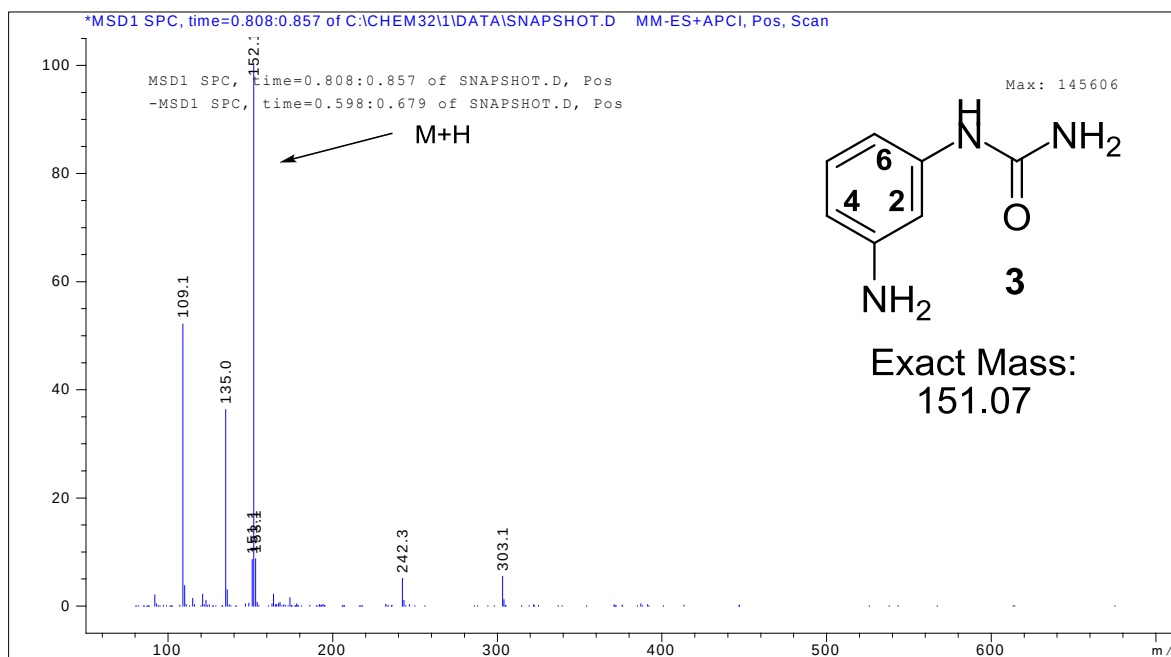
Príloha 2: MS (ESI+) spektrum 1-(3-nitrofenyl)močoviny (2)



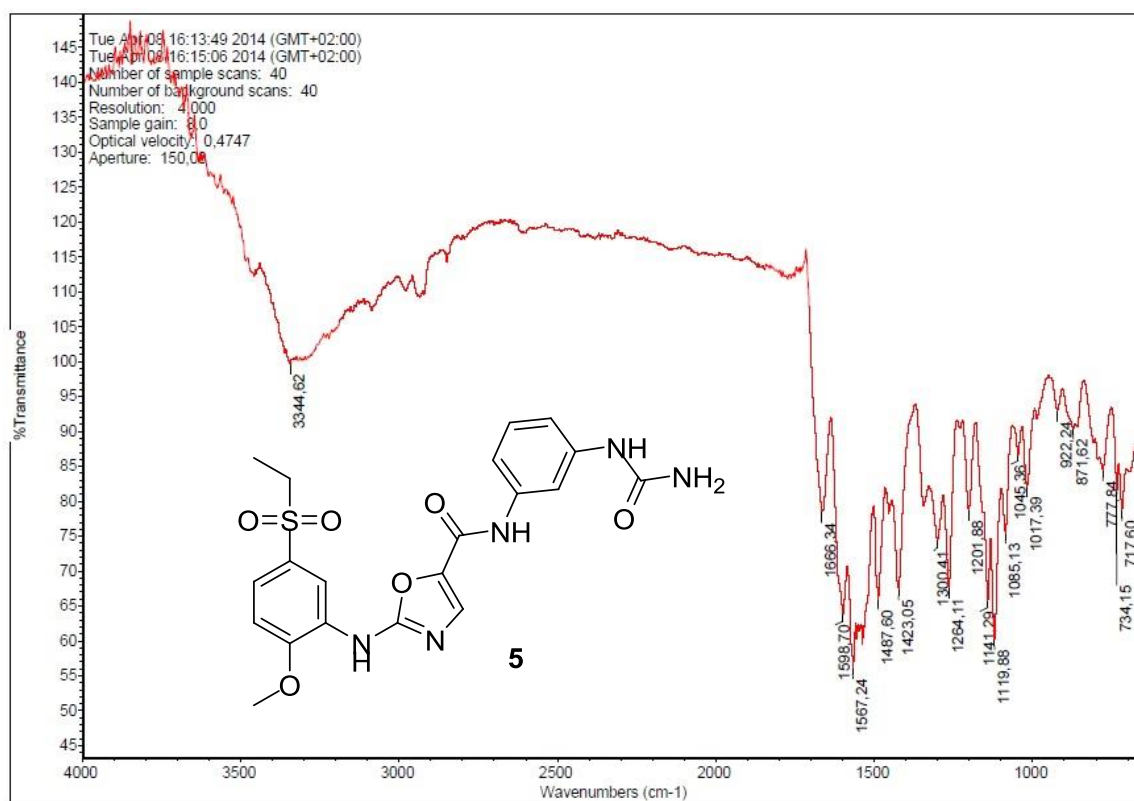
Príloha 3: IČ spektrum 1-(3-aminofenyl)močoviny (3)



Príloha 4: MS (ESI+) spektrum 1-(3-aminofenyl)močoviny (3)



Príloha 5: IČ spektrum 2-(5-(ethylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)-*N*-(3-ureidofenyl)-oxazol- 5-karboxamidu (5)



Príloha 6: MS (ESI-) spektrum 2-(5-(etylsulfonyl)-2-metoxyfenylamino)-*N*-(3-ureidofenyl)oxazol-5-karboxamidu (**5**)

