

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEJC BERČIČ

**SINTEZA KUMARINSKIH DERIVATOV KOT POTENCIALNIH
INHIBITORJEV ENCIMA 17 β -HIDROKSISTEROID-
DEHIDROGENAZE TIPA 1**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEJC BERČIČ

**SINTEZA KUMARINSKIH DERIVATOV KOT POTENCIALNIH
INHIBITORJEV ENCIMA 17 β -HIDROKSISTEROID-
DEHIDROGENAZE TIPA 1**

**SYNTHESIS OF COUMARIN DERIVATIVES AS POTENCIAL
INHIBITORS OF 17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE
TYPE 1**

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm., somentorstvom izr. prof. Tee Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem. in delovnim mentorstvom Štefana Starčevića, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Štefan. Študije encimske inhibicije so potekale na Inštitutu za Biokemijo Medicinske fakultete.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in izr. prof. Tei Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem. za posredovanost strokovno pomoč in nasvete pri diplomskem delu. Še posebej bi se rad zahvalil Štefanu Starčeviću, mag. farm. za strokovno pomoč, pridobljeno znanje, izkušnje v laboratoriju ter opravljena biološka testiranja.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim iz Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi med izdelavo diplomskega dela kakorkoli pomagali.

Na koncu pa bi se rad zahvalil še staršem in vsem, ki so mi v času študija stali ob strani in me vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm., somentorstvom izr. prof. Tee Lanišnik Rižner, univ. dipl. kem. in delovnim mentorstvom Štefana Starčevića, mag. farm.

Nejc Berčič

Ljubljana, 2011

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

VSEBINA

1 UVOD	- 1 -
1.1 Spolni hormoni	- 2 -
1.2 Kratkoverižne dehidrogenaze/reduktaze (SDR)	- 5 -
1.2.1 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD)	- 6 -
1.3 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 1 (17 β -HSD1)	- 7 -
1.3.1 Inhibitorji 17 β -HSD1	- 11 -
2 NAČRT DELA.....	- 16 -
2.1 Načrtovanje potencialnih inhibitorjev 17 β -HSD1	- 16 -
2.2 Sintezni načrt.....	- 18 -
3 MATERIALI IN METODE	- 19 -
4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ	- 21 -
4.1 Shematski prikaz sintez derivatov 6-fenil-2H-kromen-2-ona	- 21 -
4.1.1 Sinteza 6-bromo-2H-kromen-2-ona (1).....	- 21 -
4.1.2 Sinteza 6-p-tolil-2H-kromen-2-ona (2)	- 22 -
4.1.3 Sinteza 6-fenila-2H-kromen-2-ona (3).....	- 23 -
4.1.4 Sinteza 6-(4-klorofenil)-2H-kromen-2-ona (4)	- 24 -
4.1.5 Sinteza 6-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (5)	- 25 -
4.1.6 Sinteza 6-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (6).....	- 26 -
4.2 Shematski prikaz sintez derivatov 7-fenil-2H-kromen-2-ona	- 27 -
4.2.1 Poskus sinteze 7-metoksi-2H-kromen-2-ona (7).....	- 27 -
4.2.2 Sinteza 7-metoksi-2H-kromen-2-ona (7)	- 28 -
4.2.3 Sinteza 7-hidroksi-2H-kromen-2-ona (8).....	- 29 -
4.2.4 Sinteza 2-okso-2H-kromen-7-il-trifluorometansulfonata (9)	- 30 -
4.2.5 Sinteza 7-p-tolil-2H-kromen-2-ona (10)	- 31 -
4.2.6 Sinteza 7-fenil-2H-kromen-2-ona (11).....	- 31 -
4.2.7 Sinteza 7-(4-klorofenil)-2H-kromen-2-ona (12)	- 32 -
4.2.8 Sinteza 7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (13)	- 33 -
4.2.9 Sinteza 7-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (14).....	- 34 -
4.3 Shematski prikaz sintez derivatov etil 7-fenil-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata	- 35 -
4.3.1 Sinteza etil 7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata (15)	- 35 -
4.3.2 Sinteza etil 2-okso-7-(trifluorometilsulfonilksi)-2H-kromen-3-karboksilata (16)-	- 36 -
4.3.3 Sinteza etil 2-okso-7-p-tolil-2H-kromen-3-karboksilata (17)	- 37 -
4.3.4 Sinteza etil 2-okso-7-fenil-2H-kromen-3-karboksilata (18).....	- 38 -
4.3.5 Sinteza etil 2-okso-7-(4-klorofenil)-2H-kromen-3-karboksilata (19)	- 39 -

4.3.6	Sinteza etil 2-okso-7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-3-karboksilata (20)	40 -
4.3.7	Sinteza etil 2-okso-7-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-3-karboksilata (21) in 7-(4-hidroksifenil)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilne kisline (22)	41 -
5	RAZPRAVA.....	43 -
5.1	Razprava o sintezah.....	43 -
5.1.1	Perkinova reakcija	43 -
5.1.2	Poskus dekarboksilacije etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata	45 -
5.1.3	Suzukijeva reakcija	45 -
5.1.4	Trifliranje	46 -
5.1.5	Wittigova reakcija	47 -
5.1.6	Knoevenagelova kondenzacija	48 -
5.1.7	Demetiliranje z AlCl ₃	49 -
5.2	Rezultati biološkega testiranja z razpravo	50 -
6	SKLEP.....	56 -
7	LITERATURA	57 -

POVZETEK

Velik delež rakavih obolenj v razvitih državah predstavlja raki, povezani z delovanjem steroidnih hormonov. Obstaja več možnosti njihovega zdravljenja med katerimi so encimi, udeleženi v biosintezi steroidnih hormonov še posebej zanimive terapevtske tarče. 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 1 (17β -HSD1) je encim, ki je pogosto prekomerno izražen pri hormonsko odvisnem raku dojk ter pri hormonskem obolenju endometriozni. Katalizira od NADPH odvisno redukcijo šibkega estrogena estrona v močan estrogen estradiol, ki z vezavo na estrogenske receptorje vzpodbuja proliferacijo celic in zato predstavlja atraktivno tarčo za razvoj novih inhibitorjev. Znanih je že veliko steroidnih in nesteroidnih inhibitorjev 17β -HSD1, vendar še noben ni dosegel klinične faze razvoja. Raziskovalni skupini Fakultete za farmacijo in Inštituta za Biokemijo na Medicinski fakulteti sta odkrili, da enostavni kumarinski derivati šibko inhibirajo 17β -HSD1. Predvidevali smo, da bi z uvedbo različnih *para* substituiranih fenilnih substituentov na mesto 6 ali 7 kumarinskega obroča posnemali steroidno strukturo estrona ter tako dosegli še boljšo inhibicijo 17β -HSD1. Z dodatnim menjavanjem substituentov na mestu 3 kumarinskega obroča pa bi dosegli še boljši vpogled v razmerje med strukturo in aktivnostjo (SAR) novih kumarinskih derivatov. Pri sintezi smo uporabili različne klasične pristope za tvorbo kumarinov, medtem ko smo za uvajanje fenilnih substituentov na kumarinski obročni sistem uporabili znano Suzukijevo reakcijo. Izkazalo se je, da so 7-fenilni derivati kumarina s 3-acetilno skupino močni in selektivni inhibitorji 17β -HSD1, medtem ko 6-fenilni derivati ne inhibirajo encima. Naše delo je v veliki meri prispevalo k razjasnitvi SAR 7-fenilnih derivatov kumarinov, ki so obetavni kandidati za nadaljnji razvoj klinično uporabnih inhibitorjev 17β -HSD1.

ABSTRACT

Significant share of cancer diseases in developed world represent cancers related to the action of steroid hormones. Many different approaches for their treatment are currently in use and enzymes involved in biosynthesis of steroid hormones are especially interesting targets. 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17β -HSD1) is an enzyme that is frequently overexpressed in hormone dependent breast cancer and in endometriosis. It catalyzes NADPH dependent reduction of weak estrogen, estrone, to potent estrogen, estradiol, which binds to estrogen receptors and stimulates proliferation of cells and thus represents attractive target for development of new inhibitors. Many steroidal and nonsteroidal inhibitors have been designed, however none of them have entered clinical phases of drug development. The research groups at the Faculty of pharmacy and at the Institute of Biochemistry on Medical faculty, University of Ljubljana, discovered that simple coumarin derivatives show modest inhibition of 17β -HSD1. We hypothesized that introduction of various *para* substituted phenyl groups in the position 6 or 7 would mimic the steroid structure of estrone and thus more potent inhibition of 17β -HSD1 would be achieved. Additional variation of substituents at the position 3 of coumarin scaffold would gain additional insight in structure-activity relationship of new coumarin derivatives. Classical synthetic methodologies were used for construction of coumarin scaffold and Suzuki cross coupling reaction was employed for introduction of phenyl groups. We discovered that 7-phenyl coumarin derivatives with 3-acetyl group display potent and selective 17β -HSD1 inhibition, while 6-phenyl derivatives show no inhibition. Our work contributed to elucidation of SAR for 7-phenyl coumarin derivatives, which are promising candidates for further development of clinically relevant 17β -HSD1 inhibitors.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac ₂ O	acetanhidrid
ADIOL	5-androsten-3 β ,17 β -diol
ADION	4-androsten-3,17-dion
Arg	arginin
Asp	asparaginska kislina
Cys	cistein
d	dublet
dd	dublet dubleta
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEAS	dehidroepiandrosteron sulfat
DHT	dihidrotestosteron
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Et	etilna skupina
EtOAc	etilacetat
Glu	glutaminska kislina
His	histidin
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
Hz	hertz
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
<i>k</i> _{cat}	katalitična konstanta
K _m	Michaelis-Mentenova konstanta
K _i	konstanta inhibicije
Leu	levcin
Lys	lizin
m	multiplet

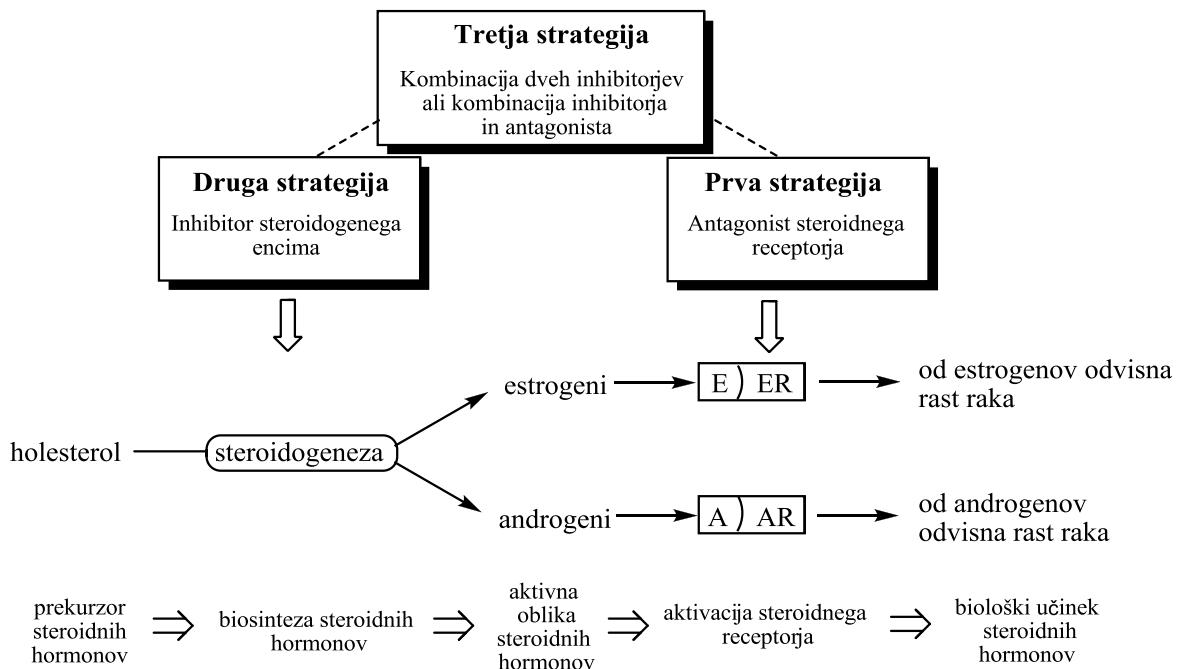
M	molarnost (mol/L)
Met	metionin
Me	metilna skupina
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotida
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
NADPH	reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata
NMR	nuklearna magnetna resonanca
Ph	fenilna skupina
Phe	fenilalanin
pKa	negativni logaritem kislinske konstante disociacije
PDB	Protein data bank
RSD	relativna standardna deviacija
Rf	retencijski faktor
S	singlet
SAR	razmerje med strukturo in aktivnostjo
SDR	kratkoverižne alkoholne dehidrogenaze/reduktaze
Ser	serin
t	triplet
T	temperatura
TFA	trifluorocetna kislina
TLC	tankoplastna kromatografija
t _R	retencijski čas
T _{tal}	temperature tališča
Tyr	tirozin
Val	valin
Å	Angstrem
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina
17β-HSD	17β-hidroksisteroid dehidrogenaze
17β-HSD1	17β-hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 1

1 UVOD

Ženski in moški spolni hormoni, estrogeni in androgeni, so bistveni za razmnoževanje, imajo pa tudi pomembno presnovno vlogo v različnih perifernih tkivih. Poleg pozitivnih učinkov so spolni hormoni vključeni tudi v razvoj nekaterih hormonsko odvisnih rakov (1). Rak je eden izmed najpogostejših vzrokov smrti v razvitih državah, med katerimi predstavljajo velik delež hormonsko odvisni raki dojke, prostate in endometrija, katerih razvoj vzpodbujujo steroidni hormoni preko delovanja na specifične jedrne receptorje. Pri zdravljenju teh rakov poleg kemoterapije obstaja tudi milejša oblika, manj agresivna in z manj neželenimi učinki, to je hormonsko zdravljenje. Možne so različne strategije hormonskega zdravljenja (slika 1):

- uporaba antihormona (antagonista) za zaviranje hormonskega delovanja na ravni receptorja,
- uporaba inhibitorja biosinteze hormonov za zmanjšanje koncentracije hormonov na predreceptorski ravni,
- uporaba kombinacije antihormona in inhibitorja ali kombinacija dveh inhibitorjev različnih biosinteznih poti.

Encimi, ki so udeleženi v biosintezi steroidnih hormonov, so še posebej zanimive terapevtske tarče. V terapiji se danes uporabljajo inhibitorji aromataze ter 5α -reduktaz. Z znižanjem ravni androgenov in estrogenov, ki vzpodbujujo proliferacijo rakavih celic, bi lahko nov, učinkovit in selektiven inhibitor ključnega steroidogenega encima postal alternativna oziroma komplementarna strategija dosedanji klinični uporabi antiestrogenov, antiandrogenov ter že znanih inhibitorjev pri zdravljenju hormonsko odvisnih rakov (slika 1) (2).



Slika 1: Različne strategije hormonskega zdravljenja od estrogenov ali androgenov odvisnega raka. E: estrogeni, A: androgeni, ER: estrogenski receptor, AR: androgenski receptor.

1.1 Spolni hormoni

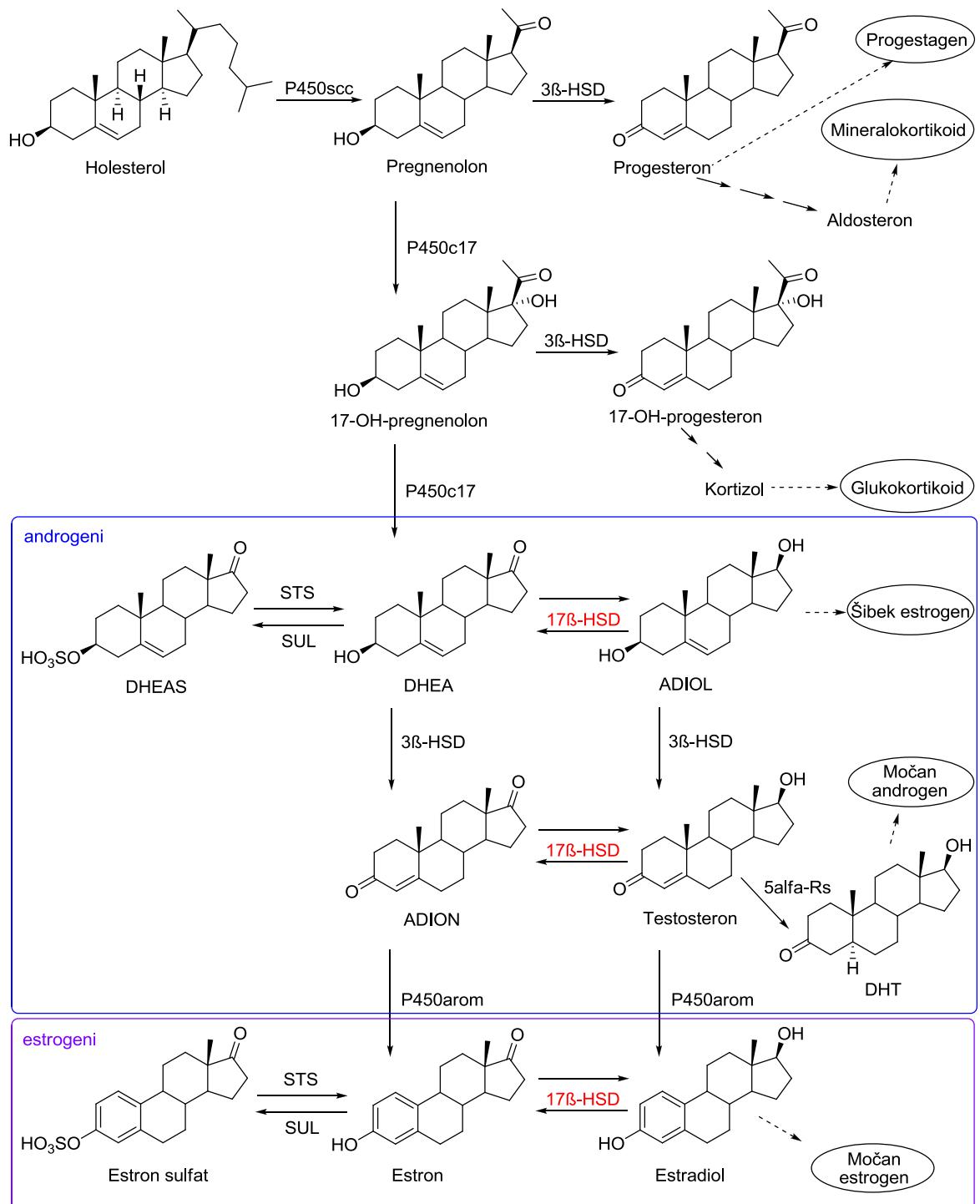
Človeško telo se od ostalih sesalcev razlikuje po tem, da lahko tvori spolne hormone neodvisno od spolnih žlez iz steroidnih prekurzorjev nadledvične žleze, ki se potem v perifernih tkivih pretvorijo v aktivne hormone. Gre za tako imenovano intrakrino sintezo in delovanje (3).

Večina aktivnih spolnih hormonov se sintetizira lokalno v perifernih tkivih. Približno 30 – 50 % androgenov pri moških nastane v intrakrinih perifernih tkivih, pri ženskah pa se po menopavzi sinteza estrogenov premakne iz jajčnikov v periferna tkiva, ki postanejo edini vir estrogenov (4). Koncentracije steroidov v celicah tarčnih tkiv spolnih hormonov uravnavajo serumske koncentracije steroidov ter lokalna biosinteza in metabolizem steroidov. Periferna tkiva niso sposobna »de novo« sintetizirati steroidov, ampak vsebujejo encime, ki so potrebni za tvorbo aktivnih estrogenov in androgenov iz prekurzorjev, ki jih v veliki količini izloča nadledvična žleza. To so neaktivni steroidi dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS), dehidroepiandrosteron (DHEA) in 4-androsten-3,17-dion (ADION), ki steroidogenim encimom v perifernih tkivih služijo kot substrati. Lokalno sintetizirani steroidni hormoni pa delujejo intrakrino na isto celico, brez sprostitev v obtok, ali parakrino na sosednje celice (6). Celice na ta način uravnavaajo in prilagajajo raven

steroidnih hormonov določenim fiziološkim pogojem (3). Motnje v lokalnem nastajanju steroidnih hormonov lahko vodijo v razvoj različnih hormonsko odvisnih bolezni. Povečana raven steroidnih hormonov je zelo pomemben dejavnik tveganja za razvoj hormonsko odvisnih rakov. Z vezavo na ustrezne receptorje in z vzpodbujanjem celične proliferacije ti hormoni povečajo število celičnih delitev in tako možnost za nastanek naključnih genetskih mutacij, ki lahko privedejo do malignih fenotipov (5).

Testosteron in dihidrotestosteron (DHT), najmočnejša androgena, sta odgovorna za moške spolne značilnosti, z aktivacijo receptorja za androgene pa sta vključena tudi v rast od androgenov odvisnega raka prostate. Podobno je estradiol, najmočnejši estrogen, odgovoren za diferenciacijo, rast in funkcijo ženskih spolnih tkiv, z aktivacijo receptorjev za estrogene pa je vključen tudi v rast od estrogenov odvisnega raka dojk in endometrija (2). Približno 40 % vseh rakov je odvisnih od spolnih steroidov, med njimi so najpogostejši rak dojk, prostate, jajčnikov in endometrija (5).

Vsi steroidni hormoni nastanejo iz prekurzorja holesterola v večstopenjskem procesu imenovanem steroidogeneza, ki vključuje zaporedne reakcije katalizirane z različnimi encimi (slika 2) (2).



Slika 2: Biosinteza (steroidogeneza) steroidnih hormonov. Encimi so: holesterol-dezmolaza (**P450ccc**), 3β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -izomeraza (**3\beta\text{-HSD}**), 17α -hidroksilaza/ $17,20$ -liaza (**P450c17**), steroid-sulfataza (**STS**), steroid-sulfotransferaza (**SUL**), 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (**17\beta\text{-HSD}**), aromataza (**P450arom**), 5α -reduktaze (**5\alpha\text{-Rs}**). Steroidi so: dehidroepiandrosteron sulfat (**DHEAS**), dehidroepiandrosteron (**DHEA**), 5 -androstene- $3\beta,17\beta$ -diol (**ADIOL**), 4 -androstene- $3,17$ -dion (**ADION**), dihidrotestosteron (**DHT**). Stereokemija ogljikovih atomov 8,9 in 14 je prikazana samo pri holesterolu.

Ti steroidogeni encimi so vključeni v sintezo različnih družin steroidnih hormonov (progestageni, mineralokortikoidi, glukokortikoidi, androgeni in estrogeni) v specifičnih sekretornih organih (endokrina sinteza) in tudi v perifernih tkivih, ki vsebujejo vse potrebne encime za lokalno sintezo (intrakrina sinteza) (2).

Sinteza estradiola v perifernih tkivih lahko poteka preko dveh poti, in sicer aromatazne poti iz neaktivnega androgenskega prekurzorja adrenalnega ali ovarijskega izvora (DHEAS, DHEA, ADION) ali pa sulfatazne poti iz plazemskega estron (šibek estrogen) sulfata.

Steroid sulfataza pretvarja DHEAS v DHEA, 3β -hidroksisteroid dehidrogenaza in $\Delta 5\text{-}\Delta 4$ -izomeraza tvori ADION iz DHEA; aromataza, citokrom P450, pa s katalizo reakcij, ki tvorijo fenolni obroč, pretvarja androgene v estrogene (ADION v estron in testosteron v estradiol). Aromatazna pot vključuje tudi 17β -hidroksisteroid dehidrogenaze (17β -HSD), ki pretvarjajo estron v estradiol in obratno (5).

Sulfatazna pot vključuje steroid sulfatazo in steroid sulfotransferazo, kot tudi 17β -HSD. Steroid sulfataza pretvori estron sulfat v estron, medtem ko steroid sulfotransferaza inaktivira estron in estradiol s tvorbo njihovih sulfatov (5).

1.2 Kratkoverižne dehidrogenaze/reduktaze (SDR)

Encimi SDR vplivajo na plodnost, krvni tlak, neoplazijo in presnovo pri sesalcih (7). Predstavljajo veliko proteinsko družino oksidoreduktaz, ki so prisotne v vseh oblikah življenja. Poleg oksido-reduktivnih reakcij imajo nekateri SDR encimi tudi izomerazne ali liazne aktivnosti. Poznanih je preko 3000 primarnih struktur SDR encimov, od tega jih je preko 70 določenih v humanem genomu (3).

Člani te družine so v večini oligomerni (dimeri in tetramerji) encimi, ki jih sestavljajo podenote iz 250 – 350 aminokislin in imajo ohranjenega samo 15 - 30 % aminokislinskega zaporedja. Imajo le nekaj skupnih motivov, med njimi dve visoko ohranjeni regiji, Tyr-X-X-X-Lys (X je aminokislina) katalitični motiv aktivnega mesta encima in regija z izmenjajočimi α -vijačnicami in β -verigami (4-5 β -verig tvori paralelno β -ravnino okoli katere so razporejene po 2-3 α -vijačnice na vsaki strani (7)), znanim kot Rossmannovo zvitje, ki ustreza vezavnemu mestu nukleotidnega kofaktorja (3, 8).

Kljub temu, da so edini ohranjeni preostanki v katalitični votlini aktivnega mesta člani katalitične triade in da je ohranjenih samo še nekaj motivov, je 3D struktura encimov ohranjena. Velika substratna variabilnost med različnimi proteini te naddružine je dosežena

z visoko variabilnim C-terminalnim segmentom, kar tvori edinstvena aktivna mesta in edinstvene vezavne lastnosti (3), tako da posamezni člani te družine encimov vežejo različne substrate (steroidi, prostaglandini, sladkorji in alkoholi) (7).

1.2.1 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD)

V aromatazni in sulfatazni poti biosinteze estrogenov imajo zelo pomembno vlogo encimi 17 β -HSD. Znanih je 15 predstnikov 17 β -HSD družine in vse spadajo v naddružino kratkoverižnih alkoholnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR), razen 17 β -HSD tipa 5, ki spada v naddružino aldo-keto reduktaz (AKR) (2).

17 β -HSD uravnavajo razpoložljivost estrogenov in androgenov kot ligandov do jedrnih receptorjev v celici, kar predstavlja predreceptorski kontrolni mehanizem. Androgeni in estrogeni se namreč vežejo na jedrne receptorje v 17 β -hidroksilirani obliki z veliko večjo afiniteto kot 17-okso steroidi ter tako aktivirajo njihove tarčne gene (3).

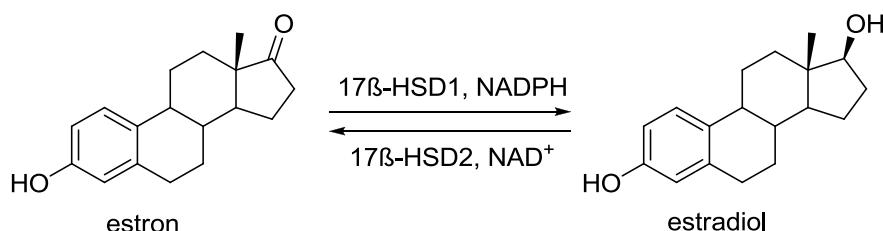
17 β -HSD katalizirajo redukcijo 17-ketosteroidov ali oksidacijo 17 β -hidroksisteroidov, odvisno od razpoložljivega kofaktorja. NADPH je potreben za redukcijo, NAD⁺ pa za oksidacijo (2). V organizmu znotraj celic prevladujeta NADPH in NAD⁺, NADP⁺ in NADH pa je občutno manj (9). 17 β -HSD se delijo v skupino oksidativnih encimov (17 β -HSD tipi 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 in 14), ki katalizirajo od NAD⁺ odvisno inaktivacijo (oksidacijo) receptorskih ligandov, in reduktivnih encimov (17 β -HSD tipi 1, 3, 5, 7 in 12), katerih od NADPH odvisne redukcije vodijo do aktivnih ligandov steroidnih receptorjev (3).

Geni, ki kodirajo za 17 β -HSD so izraženi ne samo po klasičnih steroidogenih tkivih kot so testisi, ovariji in placenta, temveč tudi po mnogih perifernih intrakrinih tkivih. Vsak predstavnik 17 β -HSD se izraža v specifičnih tkivih in ima selektivno afiniteto do substrata, v intaktnih celicah vsak predstavnik katalizira samo redukcijo ali pa samo oksidacijo. To nakazuje, da bi lahko s selektivnim inhibitorjem ciljali na točno določeno obliko 17 β -HSD. Ker so vključene v zadnjo stopnjo biosinteze estrogenov in androgenov iz holesterola, predstavljajo primerno tarčo za kontrolo koncentracije aktivnih hormonov. Za terapijo raka pride v poštev selektivna inhibicija reduktivnih 17 β -HSD, ki pretvarjajo ketosteroide v aktivne hidroksisteroide medtem ko inhibicija oksidativnih oblik 17 β -HSD, ki so vpletene v inaktivacijo proliferativnih hidroksiliranih hormonov, ne bi bila primerna (2).

V povezavi z razvojem novih inhibitorjev aktivno proučujejo 17β -HSD tipa 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 in 15. Znane so kristalne strukture 17β -HSD tipa 1, 4, 5, 8, 10, 11 in 14 (10). Najpomembnejša 17β -HSD je tipa 1, ki je naš tarčni encim in ga bomo podrobneje opisali v nadaljevanju. 17β -HSD tipa 2 katalizira pretvorbo tako estrogenih kot androgenih substratov, saj je odgovoren za oksidacijo estradiola v estron ter testosterona v ADION. 17β -HSD tipa 3 katalizira redukcijo ADIONa v testosteron (drugi najmočnejši androgen za DHT). 17β -HSD tipa 5 pretvarja ADION v testosteron, z veliko 20α -HSD aktivnostjo pa sodeluje tudi pri inaktivaciji progesterona. 17β -HSD tipa 7 reducira estron v estradiol, v enakem obsegu pa tudi DHT v androstan- $3\beta,17\beta$ -diol, šibek estrogen. 17β -HSD tipa 10 inaktivira estradiol v estron ter aktivira DHT iz androstan- $3\alpha,17\beta$ -diola (11). 17β -HSD tipa 12 pretvarja estron v estradiol (12). 17β -HSD tipa 15 reducira androstan- $3,17$ -dion v DHT (2).

Glede na katalitske značilnosti so 17β -HSD tipa 3, 5 in 15 potencialne tarče za zmanjšanje koncentracije androgenega testosterona (tip 3 in 5) in DHT (tip 15) v terapiji raka prostate (2). V terapiji od estrogenov odvisnega raka dojk in endometrioze pa so primerne tarče 17β -HSD tipa 1, 7 in 12, vendar ima pri redukciji estrona v estradiol najpomembnejšo vlogo tip 1 (12).

1.3 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 1 (17β -HSD1)

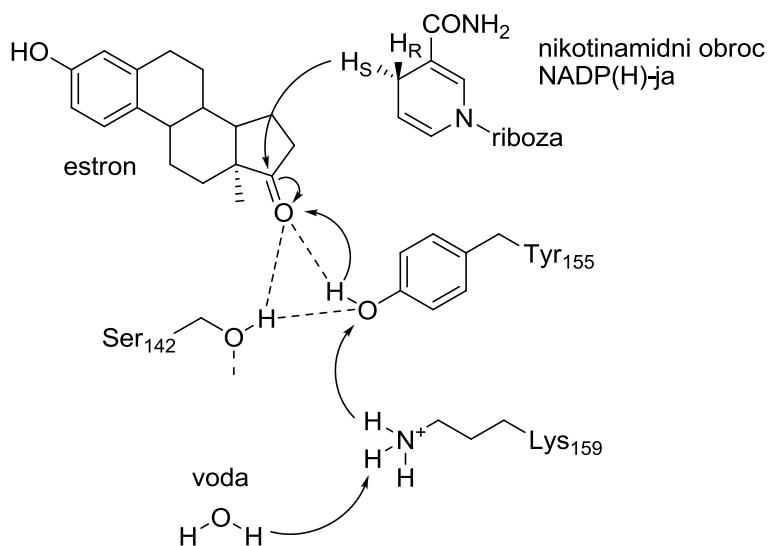


Slika 3: Pretvorba estrona v estradiol in obratno.

17β -HSD1, najpomembnejša in najbolje okarakterizirana izmed 17β -HSD, pretvarja šibek estrogen estron v močan estrogen estradiol (slika 3). V obratni smeri deluje 17β -HSD2 (13). 17β -HSD1 v manjši meri katalizira tudi pretvorbo med DHEA in 5-androsten- $3\beta,17\beta$ -diolom (ADIOL), šibkim estrogenom, ADIONom in testosteronom ter DHT in androstan- $3,17$ -dionom (14).

Nahaja se v placenti, ovarijskih granuloznih celicah, nekoliko manj v endometriju, prostati ter adipoznem tkivu, v nadledvični žlezi in testisih pa ga ni. Aktiven je kot homodimer, sestavljen iz dveh podenot, vsaka ima 327 aminokislin in molekulsko maso 34,9 kDa (15). Kot član SDR encimov ima Rossmanova zvitje in aktivno mesto, ki vsebuje Tyr^{XXX}Lys zaporedje. Študije kristaliziranega encima v ternarnem kompleksu z estradiolom in NADP⁺ (16) kažejo, da His221 in Glu282 tvorita vodikove vezi s hidroksilno skupino estradiola na mestu 3, medtem ko druga dva preostanka v ozkem substrat vezavnem delu aktivnega mesta, Ser142 in Tyr155, tvorita vodikovo vez s kisikovim atomom na mestu 17. Mnogo hidrofobnih preostankov substrat vezavnega mesta je vpleteno v hidrofobne interakcije s steroidnim skeletom (17).

Lys159, Ser142 in Tyr155 tvorijo katalitično triado in so ključnega pomena za aktivnost encima. Domnevni mehanizem redukcije, ki je ohranjen med SDR in AKR naddružinama, vključuje elektrofilni napad protona iz Tyr155 na O17 estrona ter zatem nukleofilni napad pro-S hidridnega iona iz nikotinamidnega kofaktorja na α stran C17 estrona (slika 4). Vloga Lys159 naj bi bila znižanje pKa Tyr 155 OH skupine. Ser142 OH skupina bi prav tako kot Tyr155 lahko donirala proton, vendar je zaradi višjega pKa kot pri tirozinu in večje oddaljenosti od Lys159 ta možnost manj verjetna. Bolj verjetna vloga Ser142 je prav tako kot pri Lys159 znižanje pKa ter stabilizacija neprotoniranega Tyr preostanka. Primanjkljaj protona se nadomesti z molekulami vode v aktivnem mestu, saj si eden izmed treh katalitičnih preostankov izmenja proton z molekulo vode (16, 17).



Slika 4: Shema domnevnega mehanizma redukcije estrona v estradiol. Vodikove vezi so predstavljene s prekinjenimi črtami.

17 β -HSD1 lahko *in vitro* katalizira redukcijo ali oksidacijo, odvisno od pH ter vrste dodanega kofaktorja (16).

Iz kinetičnih študij so s primerjanjem razmerja k_{cat}/K_m substratov ugotovili, da je estron ($96 \pm 10 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) v primerjavi z estradiolom ($0,4 \pm 0,1 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) preferenčen substrat 17 β -HSD1, če so uporabili kofaktor NADPH oziroma NADP $^+$. Torej je pri fizioloških pogojih, kjer prevladuje NADPH, specifičnost 17 β -HSD1 do redukcije estrona 240 krat večja kot do oksidacije estradiola. Če so kot kofaktor uporabili NADH, je specifičnost do redukcije estrona ($24,5 \pm 8 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) samo še 6,2 krat večja kot do oksidacije estradiola ($3,9 \pm 1,4 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) v prisotnosti NAD $^+$. K_m za redukcijo estrona pri zamenjavi NADPH z NADH naraste z $0,03 \pm 0,01 \mu\text{M}$ na $0,36 \pm 0,16 \mu\text{M}$ medtem ko se K_m za oksidacijo estradiola pri zamenjavi NADP ($4,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$) z NAD $^+$ ($1,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$) znatno ne spremeni. Ti podatki kažejo, kako pomembno vlogo ima 2'-fosfatna skupina kofaktorja pri redukciji estrona, saj je K_m estrona 12 krat večja ob prisotnosti NADH (18). Razvidno je, da je afiniteta encima do estrona pri redukciji velika (nM območje), zato za preverjanje aktivnosti in pri inhibicijskih študijah v veliki večini uporablajo teste z radioaktivno označenimi substrati, saj je občutljivost spektrofotometričnih metod prenizka.

Pri 17 β -HSD encimih naj bi se pri reakcijah najprej vezal kofaktor ter nato substrat, prav tako naj bi kofaktor izstopil zadnji. Izjema je le 17 β -HSD1, kjer naj bi bilo zaporedje vezave kofaktorja in substrata nepomembno (19). Vendar je konstanta disociacije estrona v prisotnosti NADPH 7 krat manjša kot brez njega, kar nakazuje, da NADPH poveča vezavno afiniteto estrona do 17 β -HSD1 (18). Kristalna struktura ternarnega kompleksa 17 β -HSD1 z NADPH in estronom zaradi izjemno hitre pretvorbe v estradiol ne obstaja (19).

Molekula NADPH se v encim veže v raztegnjeni konformaciji, tako da je nikotinamidna skupina obrnjena proti aktivnemu mestu encima. Nikotinamidni obroč je v *sin* konformaciji, adeninski obroč pa v *anti* konformaciji glede na ribozna obroča. Glavne interakcije med encimom in NADPH so vodikove vezi z 11 aminokislinskimi preostanki ter dve dodatni hidrofobni interakciji (16). Ključen preostanek, ki odraža večjo afiniteto encima do NADPH kot do NAD $^+$, je Arg37, ki ionsko interagira z 2'-fosfatno skupino NADPH; zamenjava Arg37 s kislom preostankom Asp oziroma Glu ali pa zamenjava sosednjega Leu36 s kislom Asp ovira vezavo NADPH in tako spremenjen encim ima večjo afiniteto do NAD $^+$ ter dejansko iz reduktaze nastane dehidrogenaza (20,21). Pirofosfatna skupina tvori tri vodikove vezi do peptidnih vezi pri Cys10, Ser11 ter Arg37. Vezavo

kofaktorja dodatno stabilizira še vodikova vez med karboksamidno skupino kofaktorja in peptidno vezjo Val188 (16).

17 β -HSD1 lahko veže tudi androgene oziroma C19 steroide in sicer v normalni in obratni orientaciji. To se lahko razloži s psevdosimetrijo C19 steroidov. Niso popolnoma simetrične molekule, vendar izkazujejo zadostno simetrijo, da se A obroč s C3 veže v področje encima, kjer bi se normalno vezal D obroč s C17. Dokaz je podobna izmerjena K_m za redukcijo DHT v 3 β -hidroksi obliko in oksidacijo DHT v 17-keto obliko. Estrogeni niso simetrični, saj nimajo C19 metilne skupine, imajo pa planarni aromatski A obroč, zaradi česar se lahko estron veže v aktivno mesto samo na en način (22).

Če se C19 steroidi vežejo na enak način kot estron, jih zaradi C19 metilne skupine sterično ovira Leu149. Zato domnevamo, da se C19 steroidi vežejo v obratni orientaciji (18). Kinetične študije kažejo, da je K_m za DHEA 1000x večji kot za estron, K_m za DHT pa za 10x večji kot za estradiol. Ostali C19 steroidi imajo podobne K_m . Če je Leu149 zamenjan z valinom, je afiniteta do estrogenov in C19 steroidov podobna (14).

17 β -HSD1 lahko DHT z redukcijo v 3 β -hidroksi obliko ali oksidacijo v 17-keto obliko inaktivira in s tem sodeluje pri znižanju ravni najmočnejšega androgena v perifernih intrakrinih tkivih ter tako nadzira zasedenost receptorjev za androgene (22). Zaradi močnejših interakcij pri vezavi DHT v obratni legi je bolj verjetna redukcija DHT v androstan-3 β ,17 β -diol. V rakavem tkivu dojk DHT dokazano znižuje razrast rakavih celic, 17 β -HSD1 pa z inaktivacijo DHT ter hkratno sintezo estradiola razrast pospešuje (23).

V patološko spremenjenih tkivih, kot je npr. rak dojk, je 17 β -HSD1 pogosto prekomerno izražena, kar vodi do povišanih koncentracij estradiola (13). To je povezano s slabo prognozo in pogosto ponovitvijo bolezni pri pacientkah z rakom dojk, nižja ekspresija 17 β -HSD2 pa je povezana s krajšim preživetjem (1). Namesto vrednotenja vsakega tipa posebej, bi bilo bolje vrednotiti razmerje med tipom 1 in 2; pri hormonsko odvisnem raku dojk je to razmerje povečano (24).

V nekaterih rakavih celičnih linijah so s študijami izražanja genov poleg povečanega izražanja 17 β -HSD tipa 1 določili tudi povečano izražanje reduktivnih izooblik 7 in 12. Čeprav je raven mRNA tipa 1 najnižja, raven mRNA tipa 12 pa najvišja, je tip 1 zaradi občutno višje katalitične učinkovitosti (k_{cat}/K_m) najbolj odgovoren za redukcijo estrona v estradiol. Tip 7 in 12 reducirata estron v estradiol v veliko manjši meri (12).

Zato je 17 β -HSD1 atraktivna tarča za zdravljenje in preventivo estrogensko odvisnih bolezni kot je rak dojk in endometrioza. Prednost te terapije v primerjavi z dosedanjimi

selektivnimi modulatorji receptorjev za estrogene (SERM) in aromataznimi inhibitorji naj bi bilo zmanjšanje stranskih učinkov (15).

1.3.1 Inhibitorji 17 β -HSD1

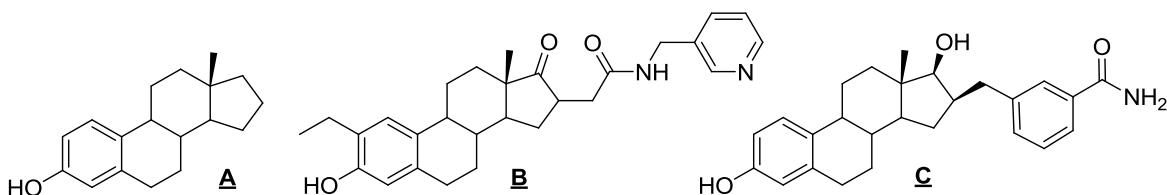
Iz intenzivnih študij potencialnih steroidnih in nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD1 so določili nekaj ključnih parametrov za načrtovanje učinkovitih inhibitorjev 17 β -HSD1. Pri steroidnih inhibitorjih so to planarna hidrofobna struktura za prileganje v ozko hidrofobno vezavno regijo (derivati estradiola, brez C19), β -usmerjene elektron privlačne skupine za tvorbo vodikovih vezi s ključnimi katalitičnimi aminokislinami Tyr155 in Ser142 ter α -usmerjene hidrofobne skupine na C17 ali C16 za preprečitev vezave kofaktorja (25). Pri nesteroidnih inhibitorjih so izpeljali več farmakofornih modelov za njihovo načrtovanje; skupen vsem je planaren hidrofobni skelet, ki posnema steroidni sistem, s po eno polarno skupino na vsaki strani. Razdalja med njima znaša približno 11 Å, kolikor sta med sabo oddaljena kisika na mestih 3 in 17 pri estronu. Polarni skupini sta lahko proton akceptorja ali donorja, pripeta pa sta lahko še dodatna polarna skupina za tvorbo vodikovih vezi ali nepolarna skupina za dodatne hidrofobne interakcije (26).

V literaturi lahko zasledimo veliko inhibitorjev 17 β -HSD1, vendar še noben ni dosegel klinične faze razvoja (27). Potencialen terapevtsko ustrezni inhibitor mora imeti v prvih fazah razvoja dokazano visoko inhibicijo 17 β -HSD1 ter nizko inhibicijo 17 β -HSD2. Zelo pomembna je tudi nizka afiniteta do ER α in ER β , da ne pride do agonističnih ali antagonističnih učinkov, ki bi izničili prvotni namen terapije (28).

Najstarejši opisani inhibitorji so derivati estrona in estradiola. Primer inhibitorja iz tega obdobja je spojina **A** ($K_i = 0,19 \mu\text{M}$) (slika 5). Kasneje so sintetizirali veliko število novih spojin z namenom, da bi določili zgradbo in lastnosti aktivnega mesta 17 β -HSD1. To so v glavnem analogi naravnega substrata estrona z zelo reaktivno skupino, ki se kovalentno veže z določenimi aminokislinami encima ter tako onemogoči vezavo substrata. Kot inhibitorji so se izkazali tudi nekateri progestini ter različni derivati estrona s pirazolom in izoksazolom pripetim na D obroč steroidnega skeleta. Pomanjkljivost vseh teh spojin je nizka selektivnost ter vezava na receptorje za estrogene (13).

Do danes je bilo objavljenih veliko steroidnih derivatov kot učinkovitih inhibitorjev 17 β -HSD1 z različno velikimi substituenti na mestih 2, 3, 6, 15, 16 ali 17 (lahko je pripet dodaten heterociklični obroč E). Njihove IC₅₀ vrednosti segajo od mikromolarnih pa vse do

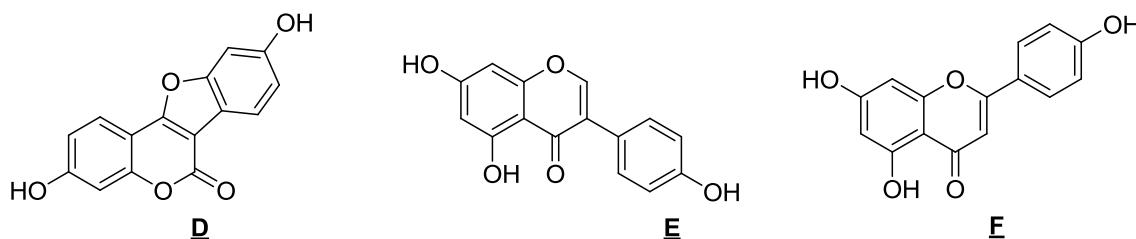
nanomolarnih. Najučinkovitejši so t.i. hibridni inhibitorji, ki imajo na mesto 16 steroidnega skeleta pripet adenozinski fragment ali pa obroč, ki oponaša nikotinamidni fragment. Primer zelo učinkovitega in selektivnega inhibitorja je spojina **B** ($IC_{50} = 27$ nM, koncentracija estrona = 2 nM) (slika 5), pri katerem so računalniške študije sidranja v aktivno mesto encima pokazale, da estrogenski obroč tvori hidrofobne interakcije z encimom, medtem ko stranska veriga na mestu 16β interagira z nikotinamidnim obročem in fosfatnim kisikom kofaktorja ter tako prepreči prenos protona iz kofaktorja na 17-karbonilno skupino. Dodatna majhna hidrofobna skupina na mestu 2 poveča inhibicijo, saj tvori dodatne interakcije z encimom, zmanjša pa neželene estrogenске učinke (29).



Slika 5: Steroidni inhibitorji 17β -HSD1.

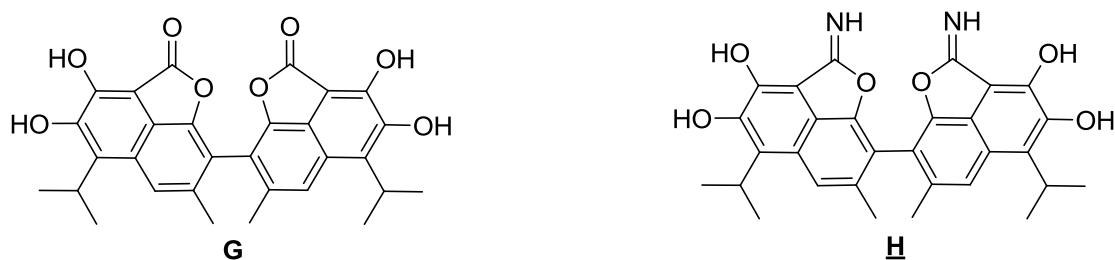
Najmočnejši znani inhibitor 17β -HSD1 je spojina **C** ($K_i = 0.9$ nM), uspeli so določiti njeno kristalno strukturo v kompleksu z 17β -HSD1 ter $NADP^+$ in na ta način razjasniti interakcije, ki privedejo do tako dobre inhibicije (27).

Vedno več raziskovalnih skupin se ukvarja tudi z iskanjem nesteroidnih inhibitorjev. Fitoestrogeni spadajo v družino naravnih spojin s širokim spektrom bioloških lastnosti. Med drugim jim pripisujejo tudi zaviralen učinek na razvoj raka dojk, zato so začeli podrobnejše proučevati njihov mehanizem delovanja in dognali, da nekateri zelo dobro inhibirajo 17β -HSD1. Kumestrol (**D**) ($IC_{50} = 0,2$ μM , koncentracija estrona = 4 nM), s kumarinskim fragmentom, je najmočnejši fitoestrogenski inhibitor 17β -HSD1. Izmed izoflavonov se je kot najmočnejši inhibitor izkazal genistein (**E**) ($IC_{50} = 1$ μM , koncentracija estrona = 4 nM), izmed flavonov pa apigenin (**F**) ($IC_{50} = 0,3$ μM , koncentracija estrona = 4 nM) (slika 6). Slabost teh inhibitorjev je sorazmerno slaba selektivnost in velika afiniteta do receptorjev za estrogene (13).



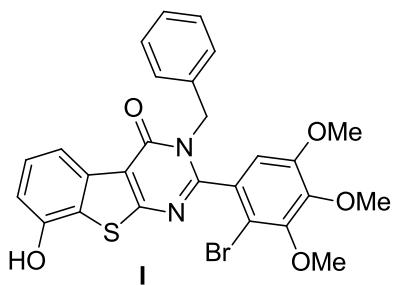
Slika 6: Nesteroidni inhibitorji 17β -HSD1 iz družine fitoestrogenov.

Za dobra inhibitorja 17β -HSD1 sta se izkazala tudi derivata polifenolnega binaftila gosipola, ki je prisoten v bombažu. Gosilolakton (**G**) ($K_i = 2,2 \mu\text{M}$) in gosiloimino-lakton (**H**) ($K_i = 4,3 \mu\text{M}$) (slika 7), ki se vežeta v vezavno mesto za koencim (11).



Slika 7: Derivata gosipola kot nesteroidna inhibitorja 17β -HSD1.

Na osnovi struktur znanih naravnih inhibitorjev kot je kumestrol so z iskanjem spojine vodnice prišli do novih nesteroidnih inhibitorjev 17β -HSD1, ki temeljijo na tiofenpirimidinonskem obroču. Pri podrobnejšem proučevanju struktur vezavnega mesta encima so ugotovili, da so aminokislinski preostanki, ki se nahajajo blizu A obroča estrona (Arg258 in Phe259) gibljivi ter da je prostor v vezavnem mestu določen z rotacijo Met279. Zaradi tega prostora v vezavnem mestu so lahko na tiofenpirimidinonski obroč dodali večji substituent (trimetoksibromofenilno skupino) in prišli do zelo učinkovitega inhibitorja **I** ($\text{IC}_{50} = 5 \text{ nM}$, koncentracija estrona = 2 nM) (slika 8) (29,30).



Slika 8: Tiofenpirimidinonski derivat kot nesteroidni inhibitor 17 β -HSD1.

Pirimidinonski obroč je odgovoren za inhibicijo encima, benzilni in trimetoksibromofenilni substituent pa za selektivnost do tipa 1, vendar selektivnost proti 17 β -HSD2 ni optimalna. Spojina pri testiranju ni kazala nobene estrogene aktivnosti, poleg tega je tudi zmanjšala rast tumorja *in vivo* (30).

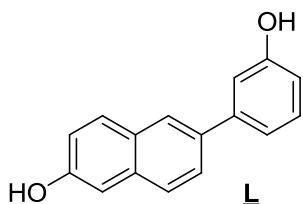
Derivati bis(hidroksifenil) tiofena in tiazola so se izkazali za močne in selektivne inhibitorje 17 β -HSD1. Tiazolski derivat **J** ($IC_{50} = 50$ nM, koncentracija estrona = 500 nM) ima proti 17 β -HSD2 selektivnostni faktor 80. Tiofensi derivat **K** ($IC_{50} = 8$ nM, koncentracija estrona = 500 nM) z dodatnim fluorom na fenilnem obroču ima proti 17 β -HSD 2 selektivnostni faktor 118 (slika 9). Te spojine torej izkazujejo odlično selektivnost, se ne vežejo na receptorje za estrogene, poleg tega pa imajo še dobre farmakokinetične lastnosti (31).



Slika 9: Tiazolski in tiofensi derivat kot nesteroidna inhibitorja 17 β -HSD1.

Ti inhibitorji imajo med OH skupinama približno enako razdaljo kot estradiol med OH skupinama na mestu 3 in 17 (11 Å). OH skupini tako lahko vzpostavita vodikove vezi s paroma His221/Glu282 in Ser142/Tyr155, ki se nahajata na nasprotnih koncih večinoma hidrofobnega aktivnega mesta encima. Vendar razdalja med OH skupinama ni edini kriterij za inhibicijo encima, pomembna je tudi vrsta heterocikla (32).

(Hidroksifenil)naftaleni imajo lipofilno planarno strukturo, ki je podobna steroidnemu obroču in njihovi derivati s polarnima skupinama so steroidomimetiki. Spojina **L** ($IC_{50} = 116 \text{ nM}$, koncentracija estrona = 500 nM) ima dve hidroksilni skupini, ki sta na enaki razdalji kot hidroksilni skupini na mestu C3 in C17 estradiola (slika 10). Tudi ta spojina je dobro selektivna glede na tip 2 in estrogenske receptorje (15).



Slika 10: Derivat (hidroksifenil)naftalena kot nesteroidni inhibitor 17β -HSD1.

V našem diplomskem delu se bomo osredotočili na kumarinske derivate kot potencialne nesteroidne inhibitorje 17β -HSD1.

2 NAČRT DELA

2.1 Načrtovanje potencialnih inhibitorjev 17 β -HSD1

V literaturi je objavljenih veliko nesteroidnih spojin, ki inhibirajo 17 β -HSD1, a le redke vsebujejo kumarinski obroč. Ker ima kumarin planarno strukturo, smo predvidevali, da bi lahko s pripenjanjem fenilnih substituentov posnemali steroidni obroč ter tako prišli do potencialnega inhibitorja 17 β -HSD1. Kar nekaj kumarinom sorodnih spojin že uspešno inhibira 17 β -HSD1. Cimetna kislina je prekurzor v biosintezi kumaria in veliko njenih estrov ima inhibitorne učinke na 17 β -HSD1. Izmed fitoestrogenov so to nekateri flavonoidi, kot najmočnejši inhibitor pa se je izkazal kumestrol, ki dejansko vsebuje kumarinski obroč (33). Poleg planarne strukture ima kumarin laktonski obroč z dvema protonakceptorstvima kisikoma, s katerima lahko tvori dodatne interakcije v aktivnem mestu 17 β -HSD1.

Na Fakulteti za farmacijo so v raziskavi preverili inhibitorno aktivnost nekaterih enostavnih derivatov 3-acetilkumarina na 17 β -HSD1. Zadovoljive rezultate sta imeli spojini **M** in **N** (slika 11), saj sta inhibirali 17 β -HSD1 v nizkem mikromolarnem območju, nista pa inhibirali 17 β -HSD2.



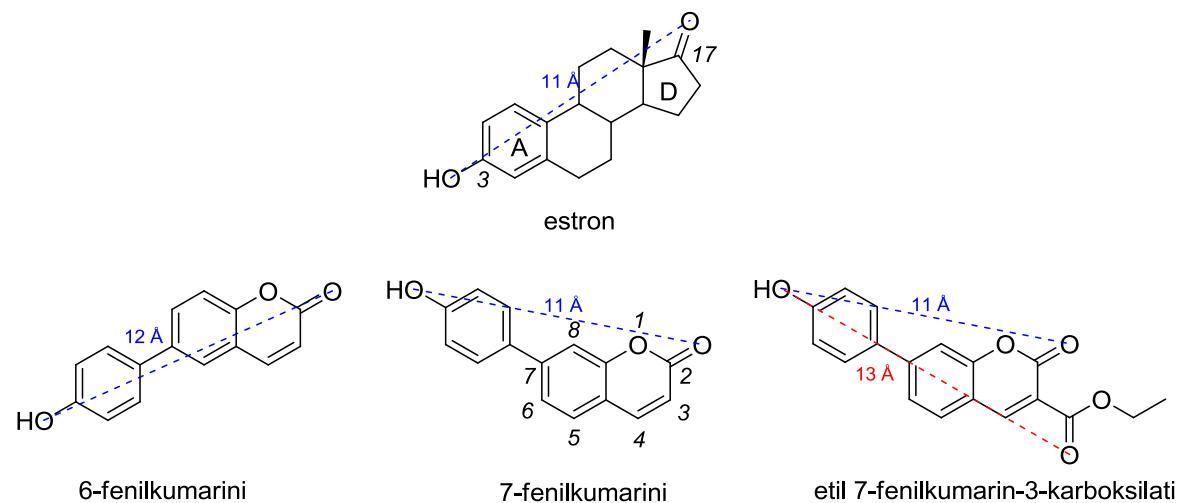
Slika 11: Enostavna 3-acetilkumarina kot inhibitorja 17 β -HSD1.

Predvidevali so, da karbonilni kisik laktone skupine ali pa kisik 3-acetilne substituente tvori podobne interakcije v vezavnem mestu 17 β -HSD1 kot C17 keto skupina estrona. Ker je struktura estrona večja in z encimom tvorita interakcije oba kisika na C3 in C17 mestu, so uvedli različne *para*-substituirane fenilne substituente na mesto 6 in 7 3-acetilkumarinskega obroča, da bi čim bolje posnemali steroidno strukturo estrona, in tako prišli do boljših inhibitorjev (34).

Naše diplomsko delo je obsegalo pripravo 6- in 7- arilnih kumarinskih derivatov, ki imajo namesto acetilne skupine na mestu 3 etoksikarbonilno skupino ali pa so na tem mestu

nesubstituirani. S tem bi preverili, ali je acetilna skupina na tem mestu ključna za inhibicijo ali pa pomembno vlogo pri tem igra le karbonilni kisik laktomskega obroča.

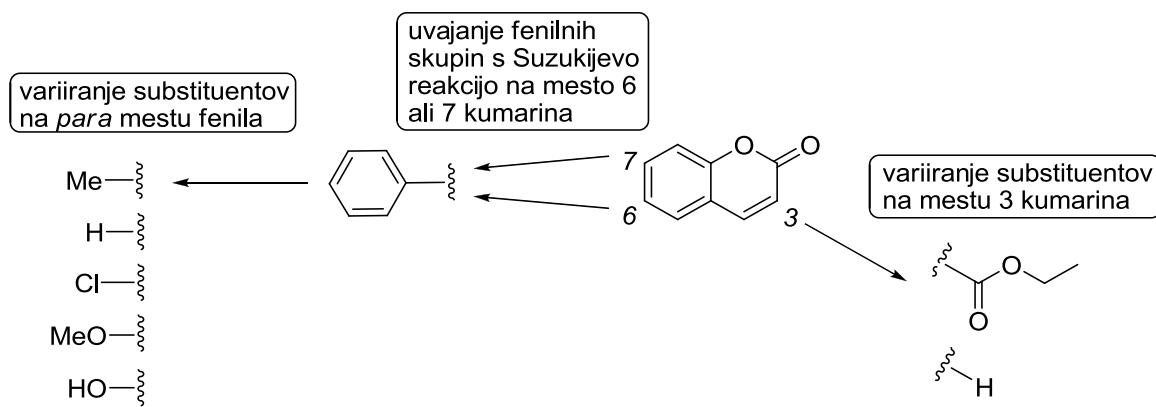
Izračunana razdalja med C3 in C17 kisikoma na estronu se približno ujema z razdaljami na 6-fenil in 7-fenil kumarinih (slika 12), zato bi se lahko kot mimetiki estrona uspešno vezali v aktivno mesto 17β -HSD1 ter ga tako inhibirali.



Slika 12: 6-fenilkumarini in 7-fenilkumarini kot domnevni mimetiki estrona. Pri 7-fenilkumarinu je prikazano številčenje kumarinskega obroča, pri estronu pa sta oštrevlčena C3 in C17 ter označena obroča A in D.

2.2 Sintezni načrt

Različno substituirane kumarinske obroče bomo pripravili s Perkinovo reakcijo ali s Knoevenagelovo kondenzacijo iz različno substituiranih benzaldehidov. Glavna reakcija v steroidomimetičnem pristopu načrtovanja učinkovin bo Suzukijeva reakcija, s katero bomo na kumarinski obroč pripenjali različno substituirane arilboronske kisline (slika 13). Pred tem bomo hidroksilno skupino na kumarinskem obroču za potrebe Suzukijeve reakcije s trifliranjem pretvorili v triflatno skupino. Za tvorbo hidroksilne skupine končnim ali vmesnim spojinam bomo uporabili reakcijo demetiliranja predhodne metoksi skupine.



Slika 13: Shema načrtovanih inhibitorjev 17 β -HSD1.

Vsem končnim spojinam bomo določili inhibicijo encima 17 β -HSD1.

3 MATERIALI IN METODE

- **reagenti in topila**

Pri delu smo uporabljali topila in reagente različnih proizvajalcev (Acros Organics, Aldrich, Fluka, Merck). Brezvodni diklorometan smo pripravili s sušenjem nad CaH in destilacijo neposredno pred uporabo.

- **kromatografske metode**

Za *tankoplastno kromatografijo* (TLC) smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za ločbo spojin smo uporabljali različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezi vsake spojine posebej.

Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm) ter reagente za oroševanje (2,4-dinitrofenilhidrazin in FeCl₃)

Za *flash kolonsko kromatografijo* in preparativno filtracijo spojin smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Za ločbo in elucijo spojin smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezah spojin.

Čistosti spojin smo preverili z *visokotlačno tekočinsko kromatografijo* (HPLC), ki smo jo izvedli na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (210, 220 in 254 nm). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse C18 150 x 4,6 mm s hitrostjo pretoka 1,0 mL/min. Mobilna faza je bila 20 – 80 % acetonitrila v vodi do 30 min (metoda A), za spojino 22 pa 5 – 70 % AcCN v 0,1 % vodne raztopine TFA (metoda B) do 30 min.

- **določanje tališča**

Tališča smo določili na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirana.

- **infrardeča spektroskopija**

Infrardeči spektri so posneti na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

- **jedrska magnetna resonanca**

NMR spektri so posneti na Brucker Avance DPX₃₀₀ spektrometru pri 300 MHz s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Kot topila smo uporabili DMSO-d₆, CDCl₃.

Za reševanje NMR spektrov smo uporabili računalniški program MestReC 4.8.6., proizvajalca MESTRELAB RESEARCH SL.

- **masna spektroskopija**

Masne spektre so posneli na masnem spektrometu AutoSpec Q (proizvajalec: Micromass, Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **poimenovanje in risanje struktur**

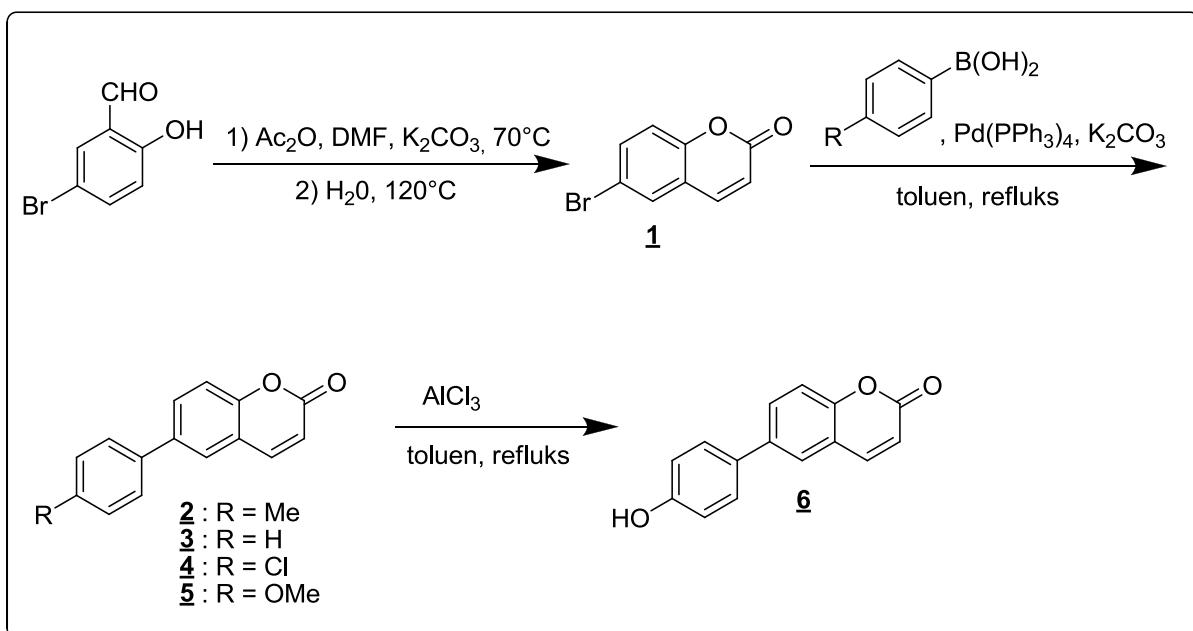
Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 proizvajalca CambridgeSoft.

- **biološko testiranje**

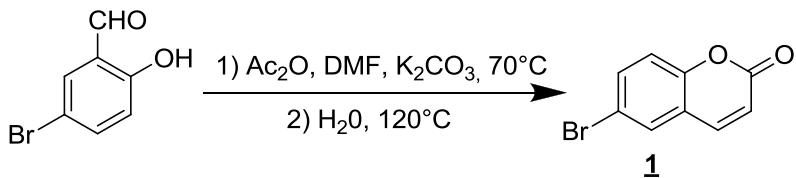
Preverjanje inhibitorne aktivnosti pripravljenih spojin na encim 17β-HSD1 je na Inštitutu za Biokemijo Medicinske fakultete opravil Štefan Starčević, mag. farm (34).

4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

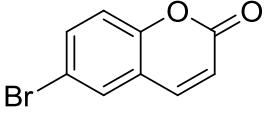
4.1 Shematski prikaz sintez derivatov 6-fenil-2H-kromen-2-ona



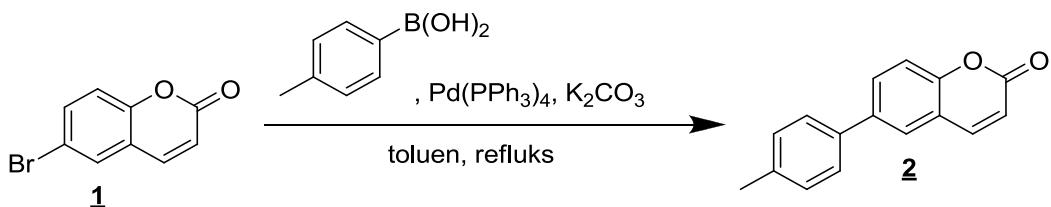
4.1.1 Sinteza 6-bromo-2H-kromen-2-ona (1)



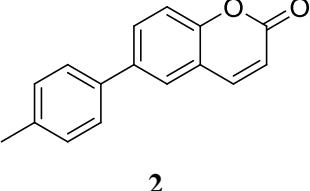
5-bromo-2-hidroksibenzaldehid (3,012 g, 15,0 mmol), K_2CO_3 (2,27 g, 16,4 mmol) in Ac_2O (9,1 g, 88,7 mmol) suspendiramo v DMF (15 ml) ter mešanico segrejemo ob mešanju na 70 °C, nato pa dodamo vodo (0,3 ml). Po dodatku vode zvišamo temperaturo na 120 °C in mešamo čez noč, nato raztopino ohladimo na 90 °C ter počasi dodamo vodo (8 ml). Potem temperaturo znižamo na 30 °C ter v raztopino vlijemo vodo (30 ml) ohlajeno na 10 °C. Dodamo 1M NaOH ter 3x ekstrahiramo z EtOAc. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Dobimo rdečerjavo viskozno tekočino, ki jo čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo ($\text{MF} = \text{heksan/EtOAc} = 100\text{-}82\%$). Masa očiščene spojine **1** je 493 mg.

 1	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 14,6 % T_{tal}: 152-156 °C, T_{tal} (35): 159-162 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,28	
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 6,49 (d, J = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,25 (d, J = 9,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 3H, Ar-H)	
MS (ESI)	m/z = 225,0 ([MH ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₉ H ₆ O ₂ Br ([MH ⁺]) Izmerjena vrednost	224,9551 224,9558
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3082, 2366, 1720, 1598, 1475, 1368, 1260, 1188, 1115, 1066, 893, 816, 631, 528	
HPLC	Čistost spojine: 96,6 % (metoda A), t _R = 16,576 min	

4.1.2 Sinteza 6-p-tolil-2H-kromen-2-ona (2)

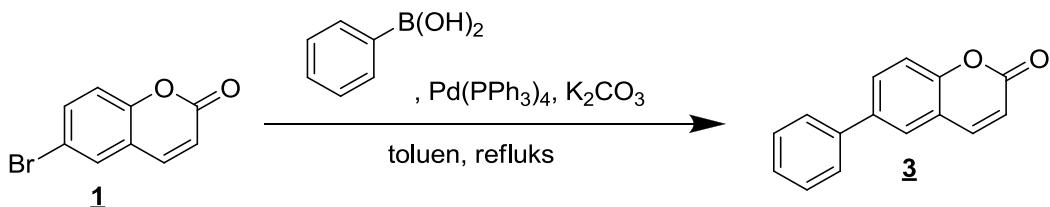


Spojino **1** (101 mg, 0,45 mmol), *p*-tolilboronsko kislino (96,7 mg, 0,71 mmol), K₂CO₃ (153 mg, 1,11 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (4,5 mg) suspendiramo v toluenu (5 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-85 %). Masa očiščene spojine **2** je 69 mg.

 2	Izgled: sivkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 65,0 % T_{tal}: 143-147 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,31
¹H NMR	δ [ppm] = 2,43 (s, 3H, -CH ₃), 6,48 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,28-

(CDCl₃)	7,31 (d, 2H, Ar'-H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 7,50 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H, Ar'-H), 7,67 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,74-7,79 (m, 2H, Ar-H)
MS (ESI)	m/z = 237,1 ([MH ⁺]), 259,1 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₃ O ₂ ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2921, 2366, 1718, 1622, 1482, 1377, 1262, 1176, 1108, 902, 808, 532
HPLC	Čistost spojine: 100 % (metoda A), t _R = 20,975 min

4.1.3 Sinteza 6-fenila-2H-kromen-2-ona (3)

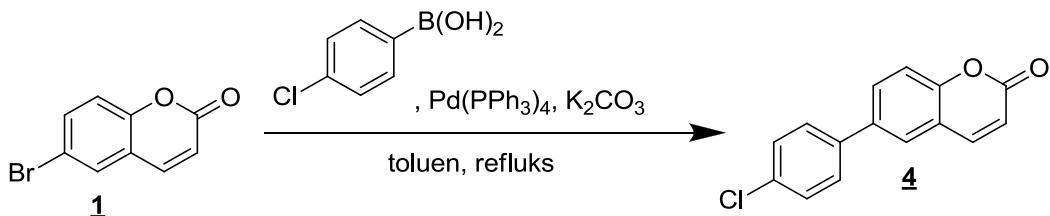


Spojino **1** (100 mg, 0,44 mmol), fenilboronsko kislino (86,8 mg, 0,71 mmol), K₂CO₃ (153 mg, 1,11 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (4,5 mg) suspendiramo v toluenu (5 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregjemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-90 %). Masa očiščene spojine **3** je 82 mg.

 3	Izgled: rjavkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 83,1 % T_{tal}: 113-118 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,26
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 6,49 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,39-7,52 (m, 4H, Ar-H), 7,59-7,62 (m, 2H, Ar-H), 7,69 (d, <i>J</i> = 2,2 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,76-7,80 (m, 2H, Ar-H)
MS (ESI)	m/z = 223,1 ([MH ⁺]), 245,1 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₅ H ₁₁ O ₂ ([MH ⁺])

	Izmerjena vrednost	223,0763
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2924, 2365, 1718, 1570, 1480, 1374, 1260, 1186, 1106, 899, 824, 759, 691, 525	
HPLC	Čistost spojine: 98,6 % (metoda A), t_R = 19,469 min	

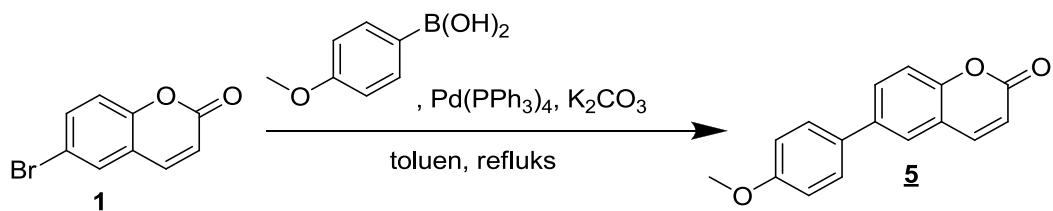
4.1.4 Sinteza 6-(4-klorofenil)-2H-kromen-2-ona (4)



Spojino **1** (100 mg, 0,44 mmol), 4-klorofenilboronsko kislino (111,3 mg, 0,71 mmol), K_2CO_3 (153 mg, 1,11 mmol) ter $Pd(PPh_3)_4$ (4,5 mg) suspendiramo v toluenu (5 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segrejemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-90 %). Masa očiščene spojine **4** je 84,5 mg.

 4	Izgled: sivkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 74,1 % T_{tal}: 169-173 °C TLC: R_f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,30	
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 6,50 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,42-7,55 (m, 5H, Ar-H), 7,65 (d, J = 2,2 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,71-7,79 (m, 2H, Ar-H)	
MS (ESI)	m/z = 257,0 ([MH ⁺]), 279,0 ([MNa ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za $C_{15}H_{10}O_2Cl$ ([MH ⁺]) Izmerjena vrednost	257,0369 257,0377
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2923, 2364, 1734, 1622, 1480, 1374, 1256, 1174, 1095, 895, 803, 541	
HPLC	Čistost spojine: 98,1 % (metoda A), t_R = 21,223 min	

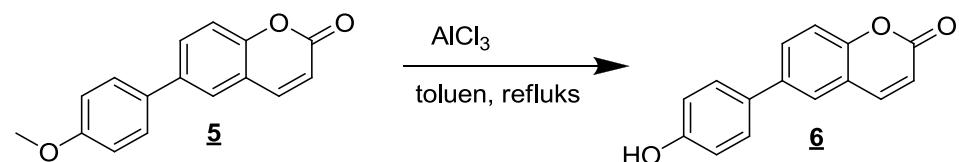
4.1.5 Sinteza 6-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (**5**)



Spojino **1** (340 mg, 1,51 mmol), 4-metoksifenilboronsko kislino (370 mg, 2,43 mmol), K_2CO_3 (525 mg, 3,80 mmol) ter $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (15,3 mg) suspendiramo v toluenu (17 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segrejemo do refluksa (110°C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-80 %). Masa očiščene spojine **5** je 298,5 mg.

 5	Izgled: rahlo rumenkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 78,3 % T_{tal}: 154-157 °C TLC: R_f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,17
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 3,88 (s, 3H, -CH ₃), 6,47 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,02 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar'-H), 7,40 (d, J = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 7,53 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar'-H), 7,63 (d, J = 2,0 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,73 (dd, J_1 = 8,7 Hz, J_2 = 2,0 Hz, 1H, Ar-H, H-7), 7,77 (d, J = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 253,1 ([MH ⁺]), 275,1 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₃ O ₃ ([MH ⁺]) 253,0865 Izmerjena vrednost 253,0865
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2935, 2363, 1737, 1605, 1514, 1436, 1245, 1181, 1101, 1023, 896, 816, 532
HPLC	Čistost spojine: 92,3 % (metoda A), t _R = 19,275 min

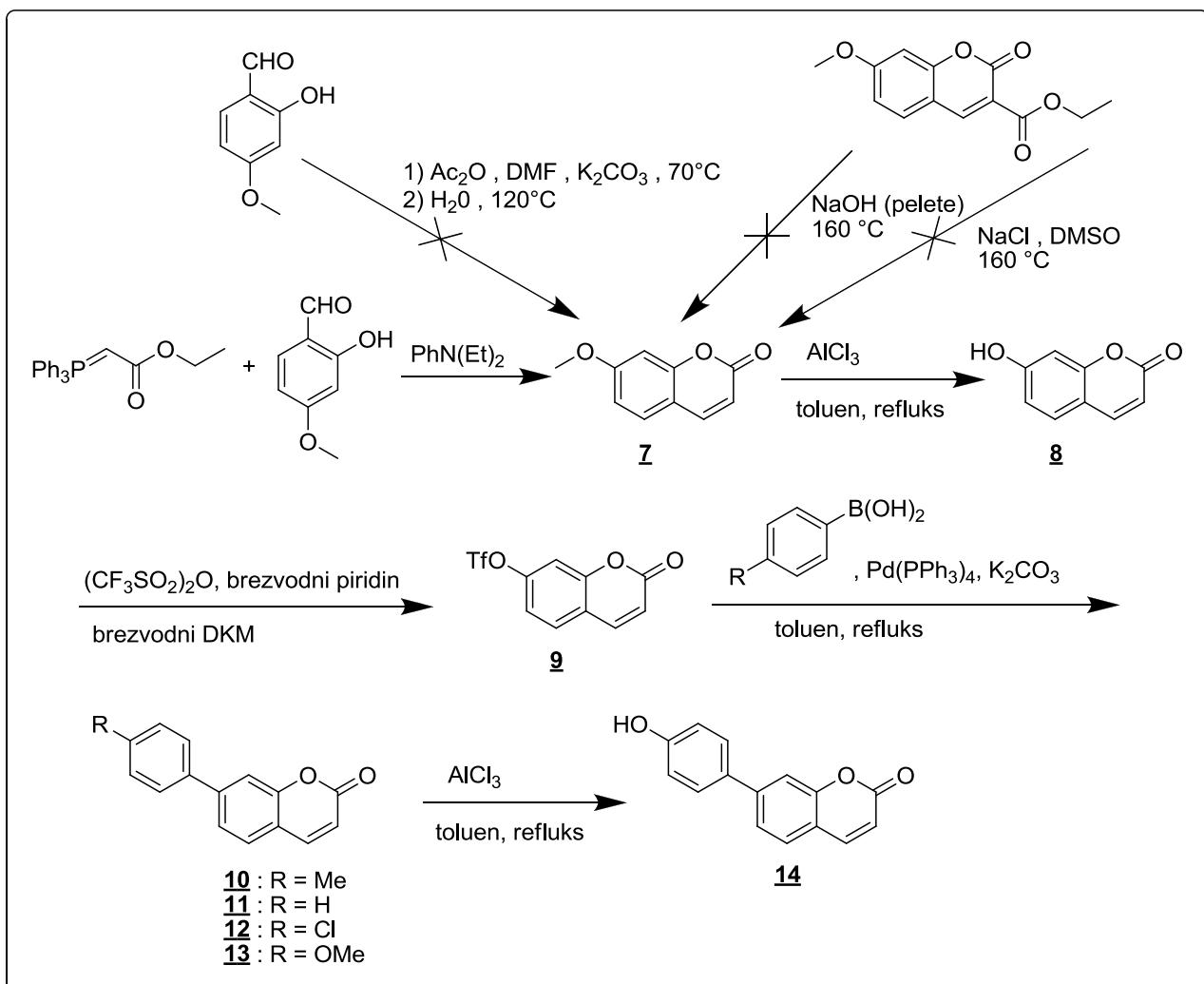
4.1.6 Sinteza 6-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (6)



Spojino **5** (247 mg, 0,98 mmol) suspendiramo v toluenu (12,5 ml) ter dodamo AlCl₃ (392 mg, 2,94 mmol). Reakcijsko mešanico segrejemo do 110 °C in mešamo 3 h. Po končani reakciji uparimo topilo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 100-99,2 %). Masa očiščene spojine **6** je 74,8 mg.

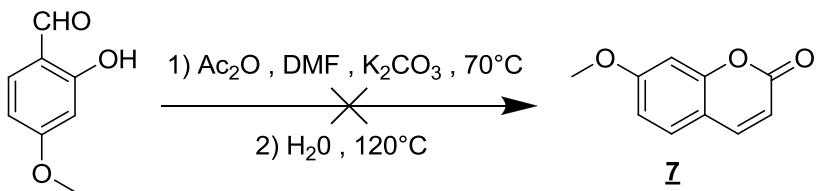
 6	Izgled: svetlo rjavi kristali Izkoristek reakcije: 32,1 % T_{tal}: 248-252 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,42
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 6,52 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 6,88 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar'-H), 7,43 (d, J = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 7,54 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar'-H), 7,82 (dd, J_1 = 8,6 Hz, J_2 = 2,1 Hz, 1H, Ar-H, H-7), 7,94 (d, J = 1,9 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,10 (d, J = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-4), 9,60 (s, 1H, -OH)
MS (ESI)	m/z = 239,1 ([MH ⁺]), 261,1 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₅ H ₁₁ O ₃ ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3233, 2364, 1715, 1588, 1519, 1424, 1376, 1275, 1187, 1134, 910, 824, 658, 534
HPLC	Čistost spojine: 98,5 % (metoda A), t _R = 15,317 min

4.2 Shematski prikaz sintez derivatov 7-fenil-2H-kromen-2-ona



4.2.1 Poskus sinteze 7-metoksi-2H-kromen-2-ona (7)

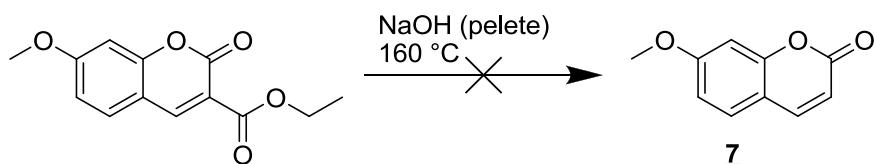
Postopek a:



2-hidroksi-4-metoksibenzaldehid (763 mg, 5,02 mmol), K₂CO₃ (810 mg, 5,86 mmol) in Ac₂O (2,8 g, 27,5 mmol) suspendiramo v DMF (5 ml) ter mešanico segregjemo ob mešanju na 70 °C, nato pa dodamo vodo (0,08 ml). Po dodatku vode zvišamo temperaturo na 120 °C in po dveh urah mešanja reakcijo prekinemo, saj s TLC spremljjanjem vidimo, da izhodne spojine ni več. Dodamo nasičeno raztopino NaHCO₃ in 3x ekstrahiramo z EtOAc.

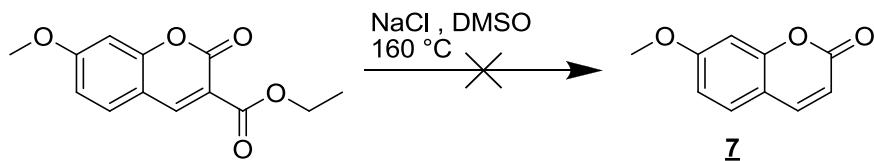
Produkt preide v organsko fazo, znebimo pa se del stranskega produkta, derivata cimetne kisline. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-80 %). NMR analiza je pokazala, da izolirana spojina ni želen produkt.

Postopek b:



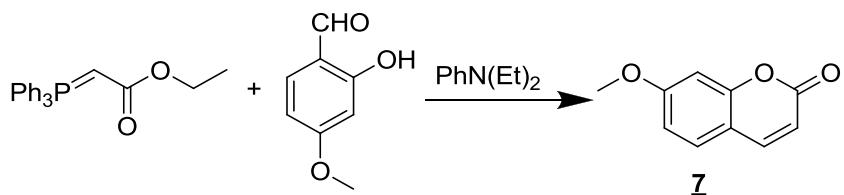
Etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat (300 mg, 1,21 mmol) in pelete NaOH (1,26 g, 31,4 mmol) natehtamo v bučko ter segrevamo 4 h ob mešanju pri 160 °C. Pri preverjanju s TLC do dekarboksilacije ni prišlo.

Postopek c:



Etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat (100 mg, 0,40 mmol) in NaCl (50 mg, 0,86 mmol) suspendiramo v DMSO (50 ml) ter dodamo vodo (5 ml). Reakcijsko zmes segrevamo 24 h pri 160 °C, odparimo DMSO, dodamo vodo ter ekstrahiramo z etilacetatom. Sodeč po TLC reakcija ni uspela.

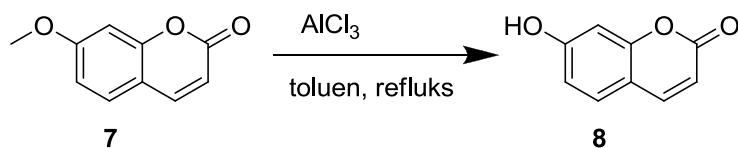
4.2.2 Sinteza 7-metoksi-2H-kromen-2-ona (7)



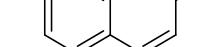
Etil 2-(trifenilfosfiniliden)acetat (2,746 g, 7,89 mmol) in 2-hidroksi-4-metoksi-benzaldehid (1,0 g, 6,58 mmol) segrevamo v N,N -dietetilanilinu (65 ml) 2h pri 210°C. Nato reakcijsko zmes razredčimo s 5 % raztopino HCl ter 3x ekstrahiramo z etrom. Združene organske faze uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-80 %). Masa očiščene spojine 7 je 697 mg.

 7	Izgled: rdečkasto rjavi kristali Izkoristek reakcije: 60,1 % T_{tal}: 97-110 °C, T_{tal} (36): 102-104 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,21	
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 3,90 (s, 3H, -CH ₃), 6,27 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 6,84-6,88 (m, 2H, Ar-H), 7,39 (d, J = 8,3 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,65 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-4)	
MS (ESI)	m/z = 177,1 ([MH ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₉ O ₃ ([MH ⁺]) Izmerjena vrednost	177,0522 177,0544
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2935, 2363, 1707, 1613, 1506, 1399, 1283, 1234, 1206, 1124, 1026, 980, 829, 616, 483	
HPLC	Čistost spojine: 98,1 % (metoda A), t _R = 13.806 min	

4.2.3 Sinteză 7-hidroksi-2H-kromen-2-onă (8)

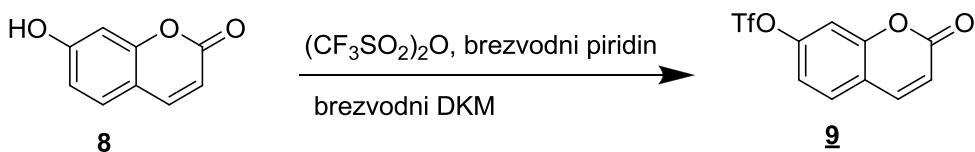


Spojino **7** (492 mg, 2,79 mmol) suspendiramo v toluenu (23 ml) ter dodamo AlCl_3 (726 mg, 5,45 mmol). Reakcijsko mešanico segrejemo do 110 °C in mešamo 3 h. Po končani reakciji uparimo topilo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 100-99,2 %). Masa očiščene spojine **8** je 390 mg.

 8	<p>Izgled: sivkasto vijolični kristali</p> <p>Izkoristek reakcije: 86,1 %</p> <p>T_{tal}: 238-240 °C, T_{tal} (37): 234-237 °C</p> <p>TLC: R_f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,36</p>
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 6,20 (d, J = 9,4 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 6,71 (d, J = 2,1 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 6,79 (dd, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 2,3 Hz, 1H, Ar-H, H-6), 7,53 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,93 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-4), 10,54 (s, 1H, -OH)

MS (ESI)	m/z = 161,0 ([MH ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₉ H ₅ O ₃ ([MH ⁺])	161,0239
	Izmerjena vrednost	161,0235
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3177, 2362, 1683, 1567, 1511, 1412, 1322, 1238, 1136, 990, 833, 710, 622, 487	
HPLC	Čistost spojine: 100% (metoda A), t _R = 6,510	

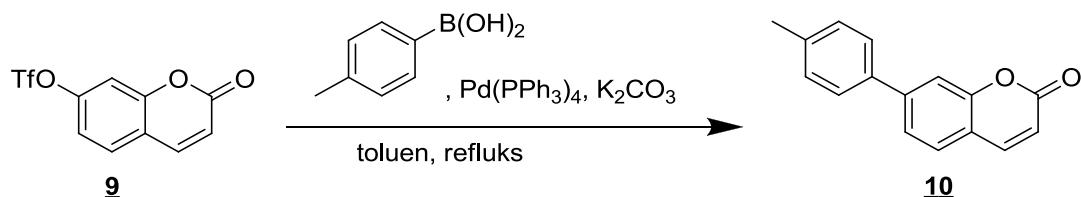
4.2.4 Sinteza 2-okso-2H-kromen-7-il-trifluorometansulfonata (**9**)



Spojino **8** (4,98 g, 30,71 mmol) suspendiramo v brezvodnem DCM (100 ml) in jo ohladimo na 0 °C, dodamo brezvodni piridin (3,5 ml, 43 mmol) ter nato še trifluorometansulfon anhidrid (7,6 ml, 46,0 mmol). Po 1 h mešanja pri 0 °C reakcijo ustavimo s počasnim dodajanjem nasičene raztopine NaHCO₃ ter 3x ekstrahiramo z DCM. Združene organske faze spustimo skozi stolpec silikagela, zberemo več frakcij in tiste, v katerih domnevamo, da je naš produkt, uparimo pod znižanim tlakom. Dobimo 8021 mg spojine **9**.

 9	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 88,8 % T_{tal}: 80-82 °C, T_{tal} (38): 74-76 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,61	
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 6,51 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,24 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, Ar-H, H-6), 7,30 (d, <i>J</i> = 2,3 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 7,60 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 7,74 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-4)	
MS (ESI)	m/z = 295,0 ([MH ⁺]), 317,1 ([MNa ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₆ O ₅ F ₃ S ([MH ⁺])	
	Izmerjena vrednost	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3091, 3059, 2370, 1732, 1609, 1492, 1433, 1225, 1132, 983, 941, 855, 748, 598, 458	
HPLC	Čistost spojine: 100 % (metoda A), t _R = 18,883 min	

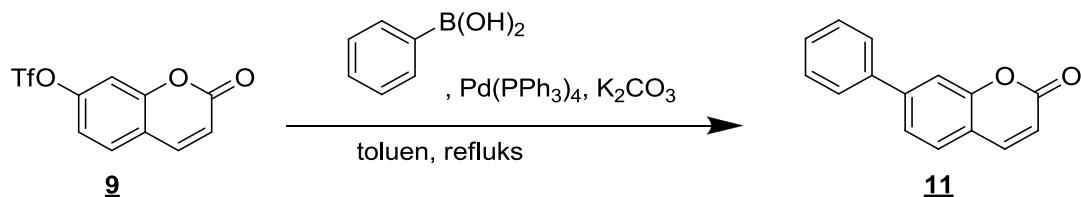
4.2.5 Sinteza 7-*p*-tolil-2*H*-kromen-2-ona (10)



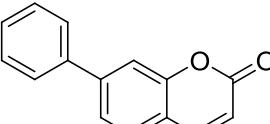
Spojino **9** (250 mg, 0,85 mmol), *p*-tolilboronsko kislino (185 mg, 1,36 mmol), K₂CO₃ (294 mg, 2,13 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (11,3 mg) suspendiramo v toluenu (12,5 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-76 %). Masa očiščene spojine **10** je 103,9 mg.

 10	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 51,7 % T_{tal}: 134-136 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,25				
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 2,44 (s, 3H, -CH ₃), 6,43 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2H, Ar'-H), 7,54-7,56 (m, 5H, Ar-H), 7,74 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-4)				
MS (ESI)	m/z = 237,1 ([MH ⁺]), 259,1 ([MNa ⁺])				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Izračunana vrednost za C₁₆H₁₃O₂ ([MH⁺])</td> <td style="width: 33%;">237,0916</td> </tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td> <td>237,0905</td> </tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₃ O ₂ ([MH ⁺])	237,0916	Izmerjena vrednost	237,0905
Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₃ O ₂ ([MH ⁺])	237,0916				
Izmerjena vrednost	237,0905				
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3055, 1718, 1616, 1396, 1240, 1144, 1115, 952, 854, 805, 756, 501				
HPLC	Čistost spojine: 99,6 % (metoda A), t _R = 20,970 min				

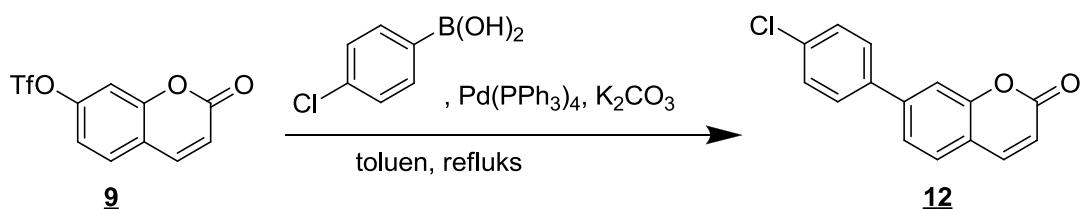
4.2.6 Sinteza 7-fenil-2*H*-kromen-2-ona (11)



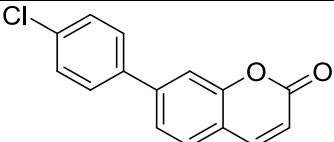
Spojino **9** (200 mg, 0,68 mmol), fenilboronsko kislino (132,7 mg, 1,09 mmol), K_2CO_3 (235 mg, 1,70 mmol) ter $Pd(PPh_3)_4$ (9 mg) suspendiramo v toluenu (10 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segrejemo do refluksa ($110^\circ C$) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-60 %). Masa očiščene spojine **11** je 142,7 mg.

 11	Izgled: rahlo rjavkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 94,5 % T_{tal}: 186-192 °C TLC: R_f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,66
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 6,45 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,42-7,58 (m, 6H, Ar-H), 7,64-7,67 (m, 2H, Ar-H), 7,75 (d, J = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 223,1 ([MH ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za $C_{15}H_{11}O_2$ ([MH ⁺]) 223,0759 Izmerjena vrednost 223,0760
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2925, 2363, 1708, 1614, 1397, 1229, 1151, 1112, 946, 876, 846, 751, 688, 564
HPLC	Čistost spojine: 99,3 % (metoda A), t_R = 19,438 min

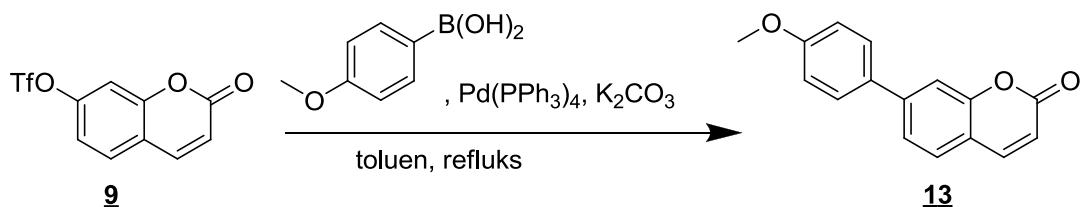
4.2.7 Sinteza 7-(4-klorofenil)-2H-kromen-2-ona (**12**)



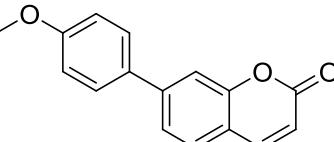
Spojino **9** (200 mg, 0,68 mmol), 4-klorofenilboronsko kislino (170,2 mg, 1,09 mmol), K_2CO_3 (235 mg, 1,70 mmol) ter $Pd(PPh_3)_4$ (9 mg) suspendiramo v toluenu (10 ml), deoksigeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segrejemo do refluksa ($110^\circ C$) ter mešamo 50 minut. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-76 %). Masa očiščene spojine **12** je 84,5 mg.

 12	Izgled: sivkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 62,3 % T_{tal}: 152-170 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,24	
¹H NMR (CDCl ₃)	δ [ppm] = 6,46 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,46-7,59 (m, 7H, Ar-H), 7,75 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-4)	
MS (ESI)	m/z = 257,0 ([MH ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₅ H ₁₀ O ₂ Cl ([MH ⁺])	257,0369
	Izmerjena vrednost	257,0362
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3056, 2368, 1743, 1618, 1485, 1391, 1220, 1093, 948, 894, 830, 757, 618, 529	
HPLC	Čistost spojine: 95,3 % (metoda A), t _R = 21,230 min	

4.2.8 Sinteza 7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (13)

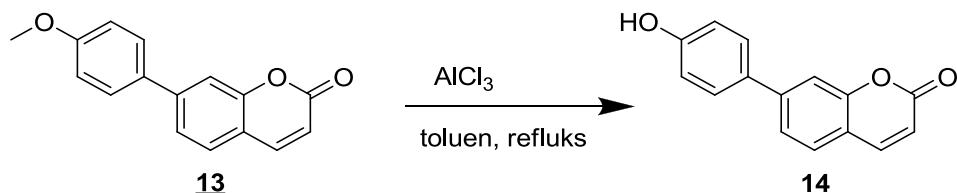


Spojino **9** (600 mg, 2,04 mmol), 4-metoksifenilboronsko kislino (496 mg, 3,26 mmol), K₂CO₃ (705 mg, 5,10 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (27 mg) suspendiramo v toluenu (30 ml), deoksiGENIRAMO z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-60 %). Masa očiščene spojine **13** je 491,5 mg.

 13	Izgled: sivkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 95,5 % T_{tal}: 139-150 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,20
¹H NMR	δ [ppm] = 3,89 (s, 3H, -CH ₃), 6,42 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 7,02 –

(CDCl₃)	7,05 (m, 2H, Ar-H), 7,51-7,53 (m, 3H, Ar-H), 7,59-7,61 (m, 2H, Ar-H), 7,74 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 253,1 ([MH ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₃ O ₃ ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2963, 2365, 1716, 1603, 1523, 1398, 1252, 1153, 1107, 1021, 950, 830, 756, 652, 519
HPLC	Čistost spojine: 94,3 % (metoda A), t _R = 19,315 min

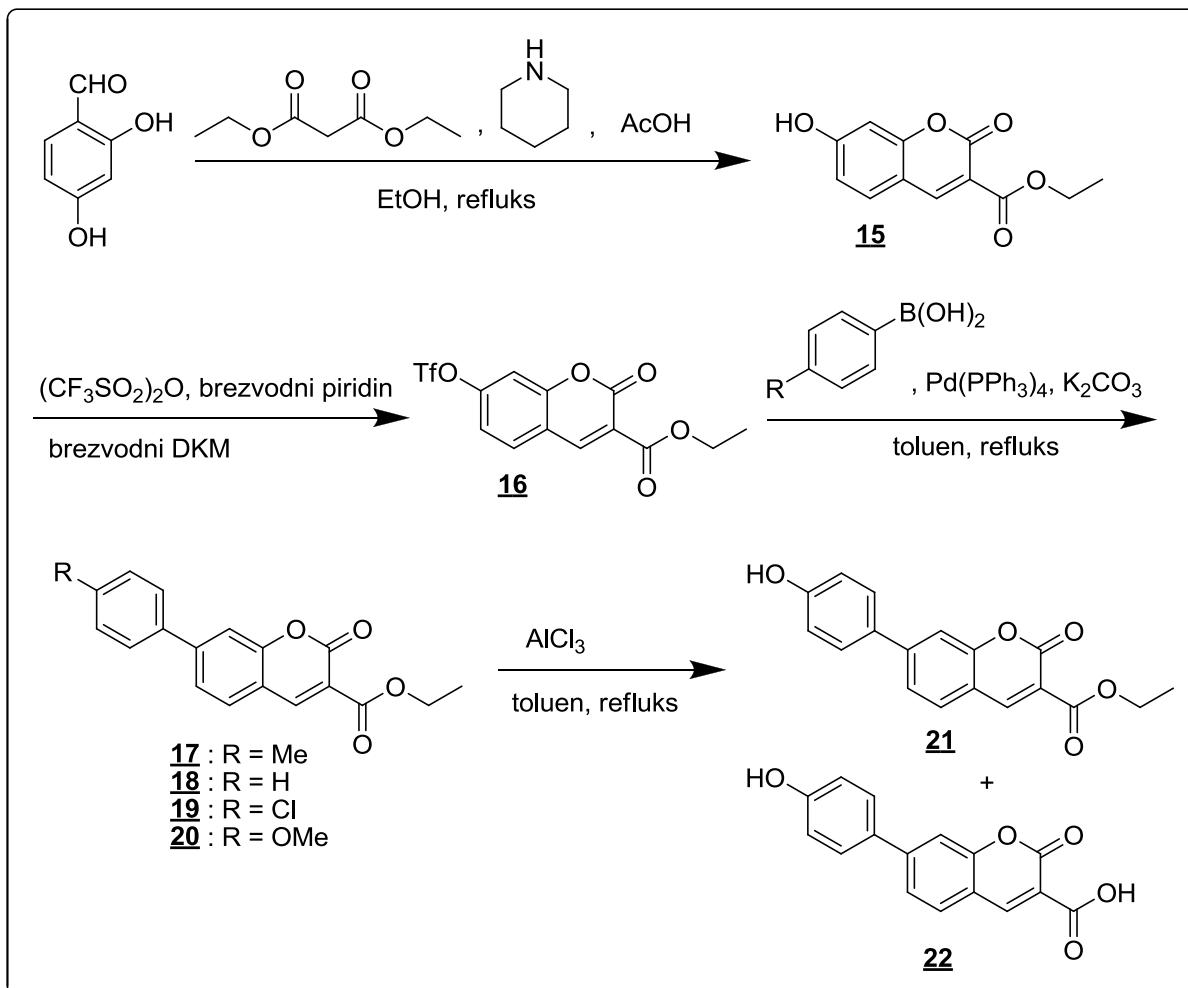
4.2.9 Sinteza 7-(4-hidroksifenil)-2*H*-kromen-2-ona (**14**)



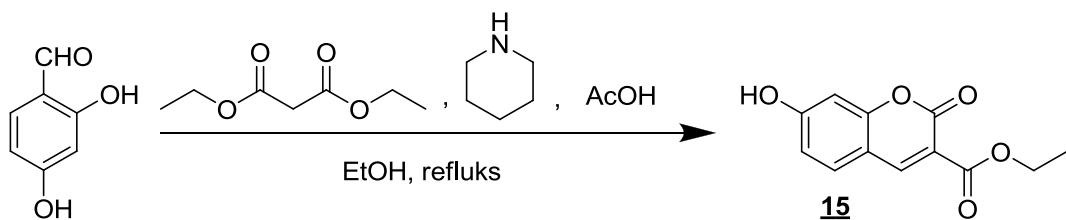
Spojino **13** (458 mg, 1,82 mmol) suspendiramo v toluenu (23 ml) ter dodamo AlCl₃ (726 mg, 5,45 mmol). Reakcijsko mešanico segrejemo do 110 °C in mešamo 3 h. Po končani reakciji uparimo topilo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 100-99,2 %). Masa očiščene spojine **14** je 283,4 mg.

 14	Izgled: svetlo rjavi kristali Izkoristek reakcije: 65,6 % T_{tal}: 230-262 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,41
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 6,44 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-3), 6,88 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H, Ar'-H), 7,61-6,66 (m, 4H, Ar-H), 7,73 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,07 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1H, Ar-H, H-4), 9,75 (s, 1H, -OH)
MS (ESI)	m/z = 239,1 ([MH ⁺]), 261,1 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₅ H ₁₁ O ₃ ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3285, 1696, 1606, 1543, 1444, 1404, 1276, 1228, 1144, 1108, 956, 838, 619, 530, 458
HPLC	Čistost spojine: 96,7 % (metoda A), t _R = 15,422 min

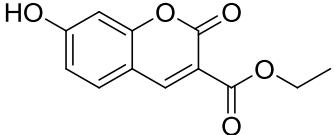
4.3 Shematski prikaz sintez derivatov etil 7-fenil-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata



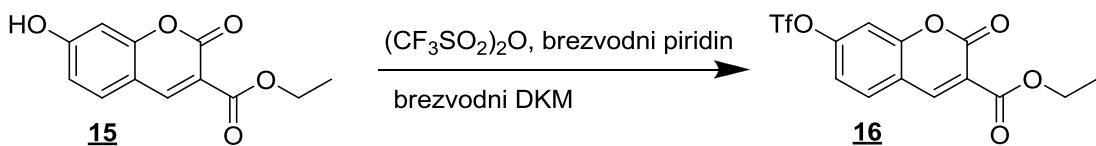
4.3.1 Sinteza etil 7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata (15)



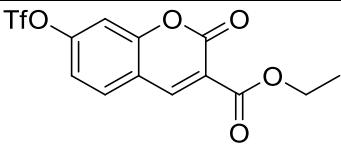
2,4-dihidroksibenzaldehid (4,0 g, 29,0 mmol) in dietilmalonat (4,84 ml, 31,8 mmol) raztopimo v etanolu (20 ml). Dodamo piperidin (0,3 ml) in ledocetno kislino (0,04 ml) ter segrevamo 4 h pod refluksom ($85^\circ C$). Po končani reakciji mešanico ohladimo in izpadle kristale odnučamo ter speremo z mrzlim razredčenim etanolom (etanol/ $H_2O = 70/30$). Masa spojine 15 je 3138 mg.

 15	Izgled: rahlo rumenkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 46,2 % T_{tal}: 168-172 °C, T_{tal} (39): 168-169 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,21	
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 1,30 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 4,26 (q, <i>J</i> = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 6,73 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H, Ar-H, H-8), 6,84 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,1 Hz, 1H, Ar-H, H-6), 7,75 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,67 (s, 1H, Ar-H, H-4), 11,05 (s, 1H, -OH)	
MS (ESI)	m/z = 235,1 ([MH ⁺]), 257,0 ([MNa ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₂ H ₁₁ O ₅ ([MH ⁺])	235,0606
	Izmerjena vrednost	235,0601
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3548, 3471, 3056, 2620, 1736, 1605, 1448, 1383, 1222, 1144, 1036, 845, 800, 634, 565, 537, 456	
HPLC	Čistost spojine: 100 % (metoda A), t _R = 12,632 min	

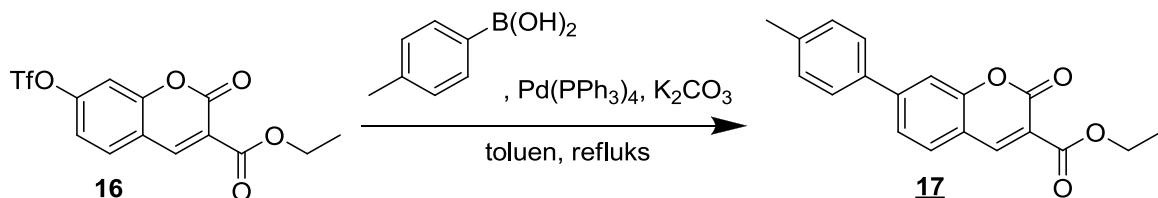
4.3.2 Sinteza etil 2-okso-7-(trifluorometilsulfoniloksi)-2*H*-kromen-3-karboksilata (**16**)



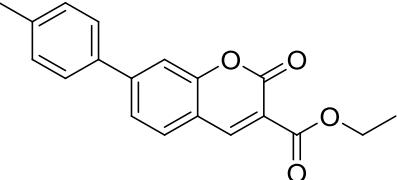
Spojino **15** (2,0 g, 8,54 mmol) suspendiramo v brezvodnem DKM (40 ml) in jo ohladimo na 0 °C, dodamo brezvodni piridin (1,0 ml, 12 mmol) ter nato še trifluorometansulfonanhidrid (2,2 ml, 13 mmol). Ker je po 1 h mešanja pri 0 °C v reakcijski zmesi še vedno izhodna spojina, dodamo še enkrat toliko brezvodnega piridina in trifluorometansulfon anhidrida. Reakcijo pustimo teči še 1 h, nato pa jo zadušimo s počasnim dodajanjem nasičene raztopine NaHCO₃ ter 3x ekstrahiramo z DKM. Združene organske faze spustimo skozi stolpec silikagela, zberemo več frakcij in tiste, v katerih domnevamo, da je naš produkt, uparimo pod znižanim tlakom. Dobimo 1611 mg spojine **16**.

 16	Izgled: rahlo vijoličasti kristali Izkoristek reakcije: 51,5 % T_{tal}: 131-148 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,65
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 1,44 (t, J = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 4,45 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,30-7,33 (m, 2H, Ar-H), 7,74 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,52 (s, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 367,0 ([MH ⁺]), 389,0 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₃ H ₁₀ O ₇ SF ₃ ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	v [cm ⁻¹] = 3064, 2967, 1760, 1703, 1624, 1576, 1434, 1371, 1307, 1220, 1142, 1024, 877, 794, 652, 604, 510
HPLC	Čistost spojine: 97,4 % (metoda A), t _R = 20,110 min

4.3.3 Sinteza etil 2-okso-7-p-tolil-2H-kromen-3-karboksilata (17)

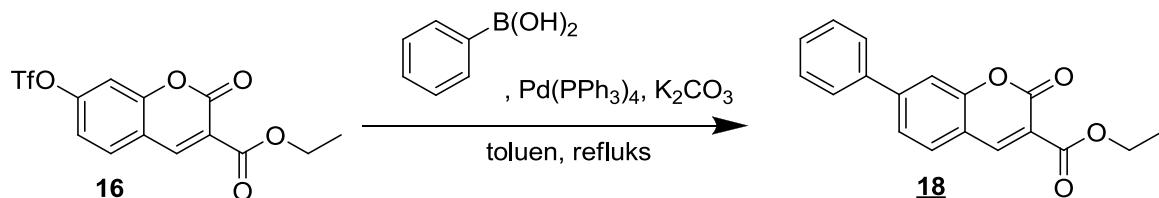


Spojino **16** (200 mg, 0,55 mmol), *p*-tolilboronsko kislino (119 mg, 0,88 mmol), K₂CO₃ (187 mg, 1,37 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (9 mg) suspendiramo v toluenu (10 ml), deoksiogeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segrejemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-80 %). Masa očiščene spojine **17** je 115,9 mg.

 17	Izgled: rahlo rumenkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 68,9 % T_{tal}: 148-152 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,80
--	---

¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 1,44 (t, J = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 2,45 (s, 3H, Ar-CH ₃), 4,45 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,33 (d, J = 7,9 Hz, 2H, Ar'-H), 7,55-7,60 (m, 4H, Ar-H), 7,66 (d, J = 8,6 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,57 (s, 1H, Ar-H, H-4)	
MS (ESI)	m/z = 309,1 ([MH ⁺]), 331,1 ([MNa ⁺])	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₉ H ₁₇ O ₄ ([MH ⁺])	309,1127
	Izmerjena vrednost	309,1128
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3053, 2910, 1756, 1606, 1547, 1378, 1282, 1218, 1154, 1037, 943, 869, 809, 682, 505, 456	
HPLC	Čistost spojine: 100 % (metoda A), t _R = 22,144 min	

4.3.4 Sinteza etil 2-okso-7-fenil-2H-kromen-3-karboksilata (**18**)

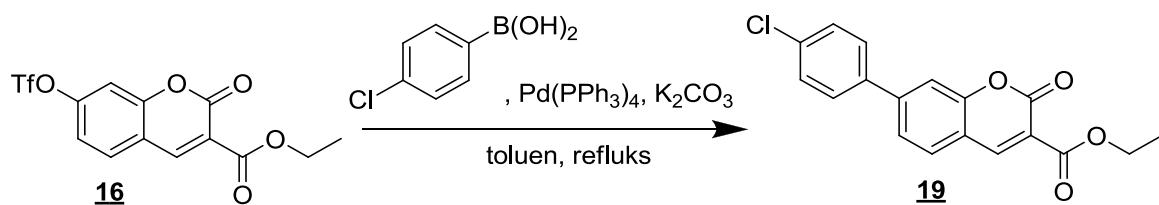


Spojino **16** (200 mg, 0,55 mmol), fenilboronsko kislino (106,6 mg, 0,87 mmol), K₂CO₃ (189 mg, 1,37 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (9 mg) suspendiramo v toluenu (10 ml), deoksiogeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-76 %). Masa očiščene spojine **18** je 147,7 mg.

 18	Izgled: rumenkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 91,9 % T_{tal}: 135-147 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,69
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 1,45 (t, J = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 4,45 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,45-7,55 (m, 3H, Ar-H), 7,58-7,61 (m, 2H, Ar-H), 7,65-7,70 (m, 3H, Ar-H), 8,58 (s, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 295,1 ([MH ⁺]), 317,1 ([MNa ⁺])

MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₁₅ O ₄ ([MH ⁺])	295,0970
	Izmerjena vrednost	295,0974
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3049, 2928, 1759, 1614, 1552, 1381, 1286, 1228, 1155, 1034, 981, 868, 798, 760, 690, 457	
HPLC	Čistost spojine: 96,5 % (metoda A), t _R = 20,730 min	

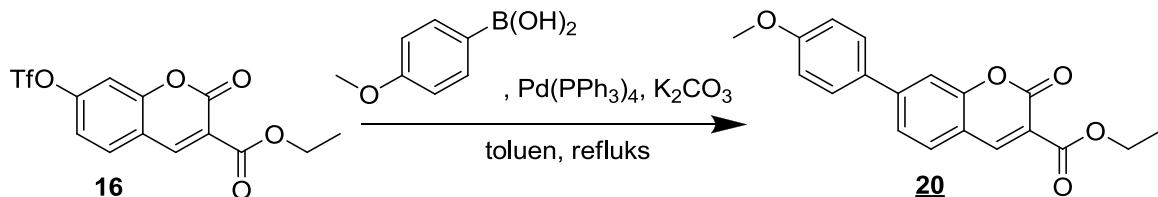
4.3.5 Sinteza etil 2-okso-7-(4-klorofenil)-2H-kromen-3-karboksilata (**19**)



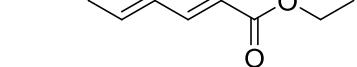
Spojino **16** (200 mg, 0,55 mmol), 4-klorofenilboronsko kislino (136,7 mg, 0,87 mmol), K₂CO₃ (189 mg, 1,37 mmol) ter Pd(PPh₃)₄ (9 mg) suspendiramo v toluenu (10 ml), deoksiogeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa (110 °C) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-70 %). Masa očiščene spojine **19** je 142,7 mg.

 19	Izgled: rumenkasto beli kristali Izkoristek reakcije: 79,5 % T_{tal}: 172-183 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,72
¹H NMR (CDCl ₃)	δ [ppm] = 1,44 (t, J = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 4,45 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,48-7,60 (m, 6H, Ar-H), 7,69 (d, J = 8,5 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,57 (s, 1H, Ar-H, H-4)
MS (ESI)	m/z = 329,1 ([MH ⁺]), 351,0 ([MNa ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₁₄ O ₄ Cl ([MH ⁺])
	Izmerjena vrednost
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3042, 2973, 2364, 1752, 1619, 1548, 1476, 1379, 1286, 1230, 1157, 1096, 1038, 815, 734, 651
HPLC	Čistost spojine: 91,7 % (metoda A), t _R = 22,347 min

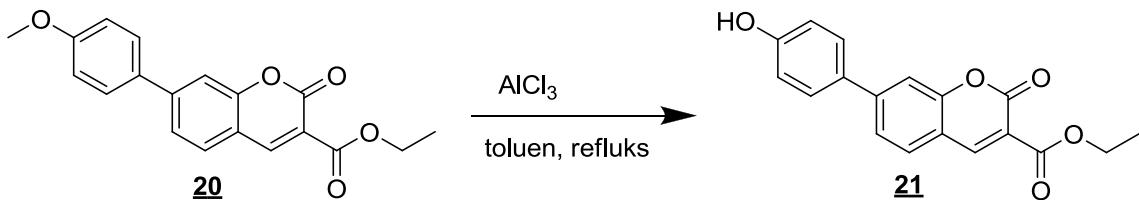
4.3.6 Sinteza etil 2-okso-7-(4-metoksifenil)-2*H*-kromen-3-karboksilata (20)



Spojino **16** (600 mg, 1,64 mmol), 4-metoksifenilboronsko kislino (398,5 mg, 2,62 mmol), K_2CO_3 (566 mg, 4,10 mmol) ter $Pd(PPh_3)_4$ (27 mg) suspendiramo v toluenu (30 ml), deoksiogeniramo z uvajanjem argona (1 min) in nato reakcijsko mešanico segregemo do refluksa ($110\ ^\circ C$) ter ob močnem mešanju pustimo čez noč. Po ohladitvi na sobno temperaturo toluen uparimo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = heksan/EtOAc = 100-76 %). Masa očiščene spojine **20** je 203,9 mg.

 20	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 46,1 % T_{tal}: 114-124 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,62				
¹H NMR (CDCl₃)	δ [ppm] = 1,44 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 3,90 (s, 3H, -O-CH ₃) 4,45 (q, <i>J</i> = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,04 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H, Ar'-H), 7,54-7,66 (m, 5H, Ar-H), 8,56 (s, 1H, Ar-H, H-4)				
MS (ESI)	m/z = 325,1 ([MH ⁺]), 347,1 ([MNa ⁺])				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Izračunana vrednost za C₁₉H₁₇O₅ ([MH⁺])</td> <td style="width: 50%;">325,1076</td> </tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td> <td>325,1077</td> </tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₁₉ H ₁₇ O ₅ ([MH ⁺])	325,1076	Izmerjena vrednost	325,1077
Izračunana vrednost za C ₁₉ H ₁₇ O ₅ ([MH ⁺])	325,1076				
Izmerjena vrednost	325,1077				
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 2926, 2364, 1750, 1601, 1547, 1378, 1307, 1224, 1186, 1040, 810, 680, 525				
HPLC	Čistost spojine: 97,7 % (metoda A), t _R = 20,632 min				

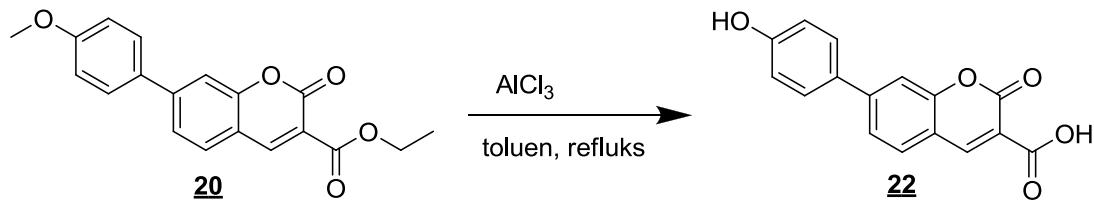
4.3.7 Sinteza etil 2-okso-7-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-3-karboksilata (21) in 7-(4-hidroksifenil)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilne kisline (22)

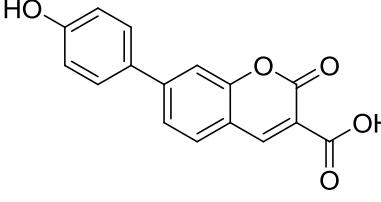


Spojino **20** (154 mg, 0,47 mmol) suspendiramo v toluenu (8 ml) ter dodamo AlCl_3 (190 mg, 1,43 mmol). Reakcijsko mešanico segrejemo do 110 °C in mešamo 3 h. Po končani reakciji uparimo topilo pod znižanim tlakom ter preostanek čistimo s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 100-99,2 %). Masa očiščene spojine **21** je 2 mg.

 21	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 1,6 % T_{tal}: 208-218 °C TLC: R_f (EtOAc/heksan = 1/1) = 0,48
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 1,32 (t, J = 7,1 Hz, 3H, -CH ₃), 4,31 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH ₂ -), 7,90 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar'-H), 7,67-7,71 (m, 4H, Ar-H), 7,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,77 (s, 1H, Ar-H, H-4), 9,84 (s, 1H, -OH)
MS (ESI)	m/z = 309,1 ([MH ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₁₃ O ₅ ([MH ⁺]) 309,0763 Izmerjena vrednost 309,0767
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3400, 2927, 2366, 1742, 1602, 1547, 1376, 1279, 1217, 1182, 1043, 827, 800
HPLC	Čistost spojine: 91,3 % (metoda A), t _R = 17,047 min

Pri tej sintezi kot nepričakovani produkt nastane spojina 7-(4-hidroksifenil)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilna kislina (**22**). Pri čiščenju s »flash« kolonsko kromatografijo uporabimo MF = DKM/MeOH = 90 %. Masa očiščene spojine **22** je 62 mg.



 22	Izgled: rjavi kristali Izkoristek reakcije: 46,2 % T_{tal}: nad 335 °C TLC: R _f (EtOAc/heksan/ocetna kislina = 1/1/0,1) = 0,21
¹H NMR (DMSO)	δ [ppm] = 6,90 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar'-H), 7,66-7,70 (m, 4H, Ar-H), 7,92 (d, J = 8,0 Hz, 1H, Ar-H, H-5), 8,76 (s, 1H, Ar-H, H-4), 9,89 (s, 1H, -OH), 13,14 (s, 1H, -COOH)
MS (ESI)	m/z = 281,0 ([MH ⁺])
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₉ O ₅ ([MH ⁺]) 281,0450 Izmerjena vrednost 281,0456
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3412, 2924, 2364, 1729, 1597, 1549, 1450, 1269, 1218, 1186, 942, 824, 650, 480
HPLC	Čistost spojine: 87,4 % (metoda B), t _R = 15,032 min

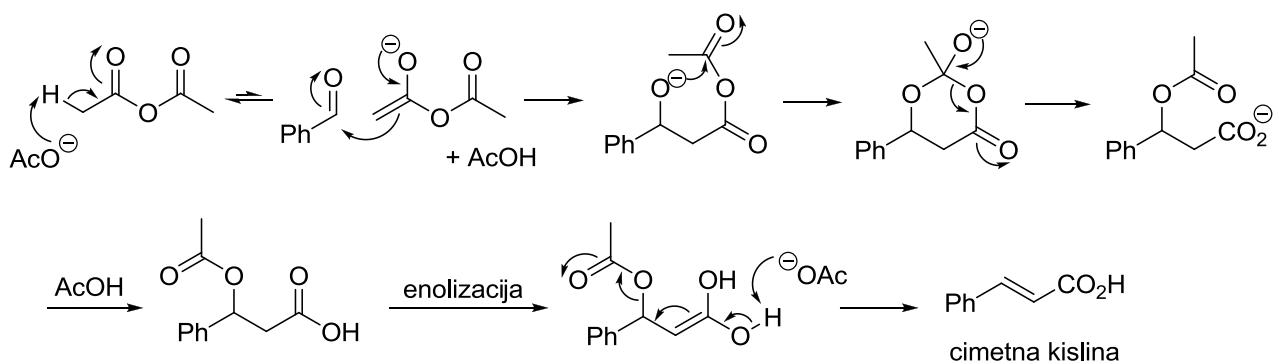
5 RAZPRAVA

5.1 Razprava o sintezah

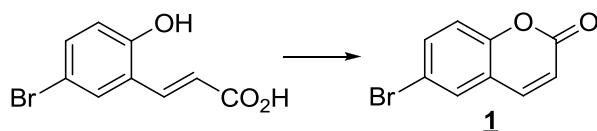
Za pripravo končnih 6- in 7-arylnih derivatov kumarinov s Suzukijevo reakcijo z različnimi *para* substituiranimi fenilboronskimi kislinami smo morali najprej pripraviti ustrezne 6-bromo in 7-trifil kumarinske derivate. Za tvorbo kumarinskega skeleta smo izhajali iz treh različnih derivatov 2-hidroksibenzaldehida. 6-bromokumarin smo pripravili v eni stopnji iz 5-bromo-2-hidroksibenzaldehida s Perkinovo reakcijo medtem ko smo za pripravo 7-trifilkumarinov morali predhodno pripraviti 7-hidroksi kumarine. 3-etoksikarbonil-7-hidroksikumarin nam je uspelo pripraviti v eni stopnji s Knoevenaglovo kondenzacijo iz 2,4-dihidroksibenzaldehida, medtem ko smo za pripravo 7-hidroksi kumarina predhodno pripravili 7-metoksikumarin z Wittigovo reakcijo iz 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehida, ki sta mu sledila demetiliranje z AlCl_3 in trifliranje obeh 7-hidroksikumarinov s trifluormetansulfonanhidridom. Večjih razlik v izkoristkih Suzukijeve reakcije med 6-bromo- in 7-trifilkumarini pri opisanih pogojih nismo opazili. Pri 6- in 7-p-metoksifenilkumarinih smo za tvorbo 6- in 7-p-hidroksifenilkumarinov zopet uporabili demetiliranje z AlCl_3 .

5.1.1 Perkinova reakcija

Spojino **1** smo pripravili s Perkinovo reakcijo. Najprej smo izhodno spojino 5-bromo-2-hidroksibenzaldehid, K_2CO_3 in Ac_2O v DMF segreli na $70\text{ }^\circ\text{C}$. Po dodatku katalitične količine vode po delni hidrolizi Ac_2O nastane kalijeva sol ocetne kisline, ki deluje kot šibka baza in v začetku Perkinove reakcije, ki je pravzaprav aldolna kondenzacija, odcepi proton Ac_2O . V tej ravnotežni reakciji nastane enolat, ki kot nukleofil napade karbonilno skupino izhodne spojine. V nastalem produktu poteče intramolekularno aciliranje, nastane ciklični intermediat, katerega najboljša izstopajoča skupina je karboksilat. Pod vplivom ocetne kisline poteče enolizacija, acetat odcepi proton, ena molekula acetata izstopi iz molekule in nastane derivat cimetne kisline (slika 14). Zaradi bližine hidroksilne skupine pride do intramolekularnega estrenja in nastane želen kumarinski produkt z laktionsko strukturo, spojina **1** (slika 15) (40, 41).



Slika 14: Mehanizem Perkinove reakcije.



Slika 15: Prikaz nastanka spojine **1** z intramolekularnim estrenjem.

Po dodatku ohlajene vode v reakcijsko zmes je izpadla oborina, vendar smo po filtraciji z uporabo TLC ugotovili, da imata filtrat in oborina enako sestavo. Zato smo obe fazи zopet združili, dodali NaOH ter ekstrahirali z EtOAc. Tako večina izhodne spojine in derivatov cimetne kisline, ki nastanejo med reakcijo preide v vodno fazу, saj pod vplivom NaOH nastaneta ionski oblici, fenolat oziroma karboksilat. V organski fazи pa ostane naš produkt, ki pa smo ga morali vseeno še očistiti s kolonsko kromatografijo. Izkoristek reakcije je majhen, saj kot stranska reakcija med hidroksilno skupino izhodne spojine in Ac_2O kljub segrevanju pri dokaj nizki temperaturi poteče nukleofilna substitucija in nastane acetatni ester, ki onemogoči tvorbo kumarina.

S Perkinovo reakcijo smo tako kot spojino **1** skušali pripraviti tudi spojino **7**, namesto 5-bromo-2-hidroksibenzaldehyda kot izhodne spojine pa smo vzeli 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehyd, iz katerega bi potem lahko pripravili derivate 7-fenila-2H-kromen-2-ona. S TLC spremeljanjem smo mislili, da je reakcija dobro potekla, vendar po izolaciji spojine s kolonsko kromatografijo in NMR analizi to ni bil želen produkt. Neuspeh reakcije si razlagamo s povečano nukleofilnostjo OH skupine zaradi elektron donorskega efekta metoksi skupine, kar vodi v acetiliranje OH skupine in preprečeno tvorbo kumarina. Spojino **1** nam je uspelo pripraviti s Perkinovo reakcijo, ker ima brom v izhodni skupini elektron akceptorsko delovanje, ki zmanjša nukleofilnost OH skupine.

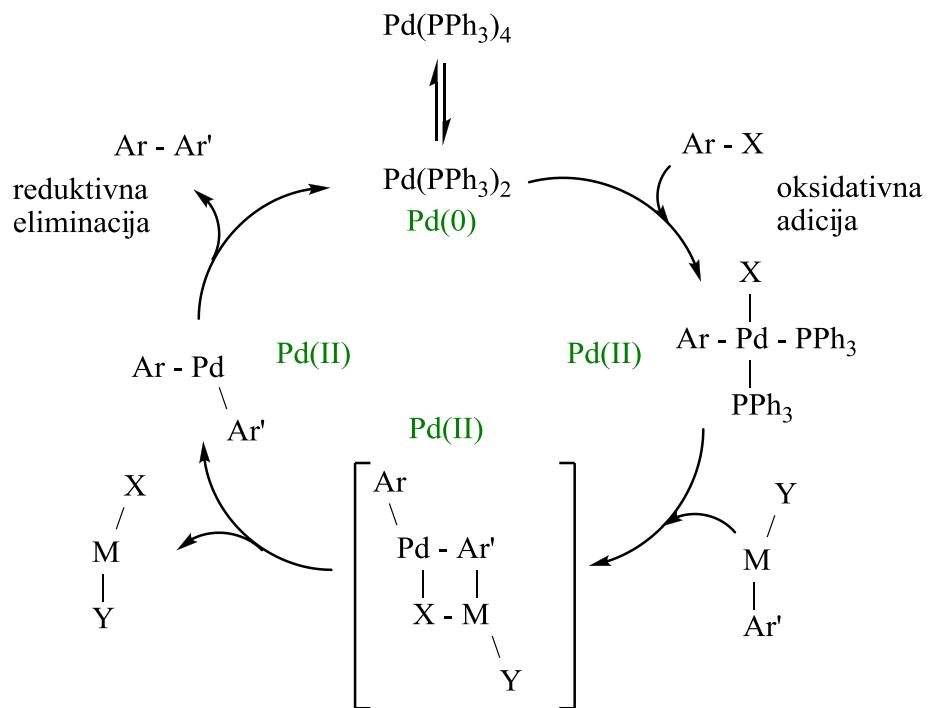
Za tvorbo 7-metoksikumarina **7** se je bolje izkazala Wittigova reakcija, ki je opisana v nadaljevanju.

5.1.2 Poskus dekarboksilacije etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata

Spojino 7 smo zaradi neuspeha Perkinove reakcije skušali pripraviti tudi z dekarboksilacijo že pripravljenega etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata. S segrevanjem spojine v DMSO pri 160 °C ob prisotnosti NaCl in malo vode poteče dekarboksilacija metilnih estrov, ki imajo na beta mestu elektron privlačno skupino (beta keto estri, malonatni estri...); postopek je imenovan Krapchova dekarboksilacija (41, stran 679). Klorid kot šibak nukleofil v DMSO postane bolj reaktiv, saj ne pride do solvatacije. Napade metilno skupino in izstopi plin klorometan, ob povišanju temperature pa pride še do dekarboksilacije oziroma izstopa CO₂. 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat je ester z laktonsko karbonilno skupino na beta mestu, zato smo ta postopek uporabili tudi mi. Po 24 h segrevanja smo DMSO odpareli, dodali vodo in ekstrahirali z EtOAc, da smo se znebili soli, ki je ostala v vodi. Ob preverjanju sestave organske faze s TLC smo žal ugotovili, da do dekarboksilacije ni prišlo, ostala je le izhodna spojina. Razlog je najverjetneje v tem, da je navedeni postopek uspešen predvsem za metilne estre.

5.1.3 Suzukijeva reakcija

Spojine 2 – 5, 10 – 13 in 17 – 20 smo pripravili s Suzukijevim reakcijom (Suzuki cross-coupling reaction, Suzuki – Miyaura cross-coupling reaction). To je najprimernejša reakcija za neposredno pripravo biarilov. Reagenti so aril halogenidi (najpogosteje bromidi) ter aril triflati, ki igrajo vlogo elektrofila ter aril boronske kisline, ki so nukleofili. Kot katalizator uporabljajo različne paladijeve komplekse (najpogosteje Pd(PPh₃)₄), za uspešen potek reakcije pa je obvezna še prisotnost baze (najpogosteje različni karbonati). Po predlaganem mehanizmu reakcije najprej nizko valentni paladijev(0) kompleks z oksidativno adicijo aktivira elektrofil (Ar), torej našo spojino 1 na mestu 6, oziroma spojini 9 in 16 na mestu 7. Nastali kompleks je sedaj bolj dovzet za napad nukleofila (Ar') iz aril boronske kisline (Ar'-M-Y), ki se prenese na paladijev atom. Ta korak smo pospešili še z dodatkom baze K₂CO₃ (42). V novo nastalem paladijevem(II) kompleksu naprej poteče reduktivna eliminacija, dobili smo želeni produkt, paladijev(0) katalizator pa je pripravljen za nov cikel (slika 16) (43).



Slika 16: Katalitični cikel Suzukijeve reakcije.

V našem primeru se je toluen izkazal za najboljše topilo, brezvodni K_2CO_3 pa za najboljšo bazo. Prisotnost vode je zmanjšala izkoristek zaradi najverjetnejše hidrolize kumarinskega obroča.

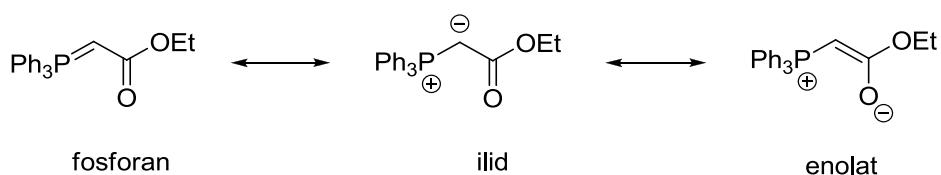
5.1.4 Trifliranje

Za pripravo bifenilov s Suzukijevo reakcijo potrebujemo triflate ali bromide kot izhodne spojine. Zato smo morali hidroksi skupino spojine **8** in **15** pretvoriti v triflatni ester, ki je dobro izstopajoča skupina in lahko sodeluje v Suzukijevi reakciji z aril boronskimi kislinami.

Reakcijo trifliranja smo izvajali v brezvodnem DKM ob prisotnosti piridina, ki igra vlogi baze za nevtralizacijo sproščene kisline in nukleofilnega katalizatorja. Hidroksilna skupina spojine **8** in **15** kot nukleofil napade žveplov atom trifluorometansulfonanhidrida, nastaneta spojini **9** oziroma **16** ter močna trifluorometansulfonska kislina, zaradi katere smo reakcijo izvajali pri temperaturi ledišča v odsotnosti vode. Pri sintezi spojine **16** ob spremljanju s TLC reakcija ni potekla, če trifluorometansulfonanhidrid in piridin nista bila v dvakratnem prebitku.

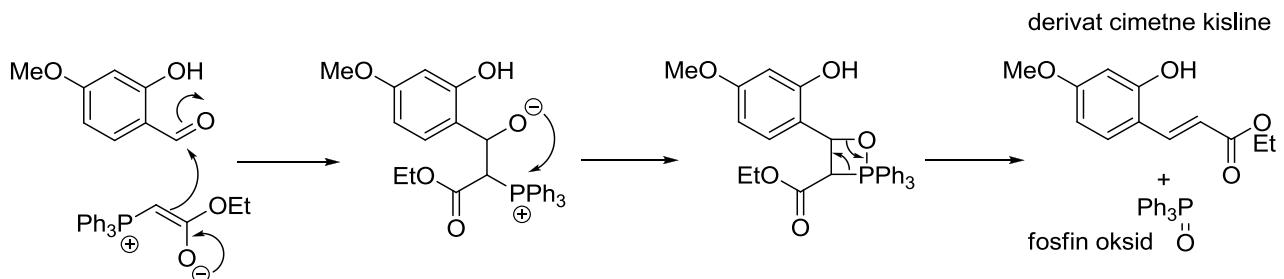
5.1.5 Wittigova reakcija

Spojino **7** smo po neuspehih poskusih Perkinove reakcije in dekarboksiliranja etil 7-metoksi-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata pripravili z Wittigovo reakcijo. Wittigov reagent etil 2-(trifenilfosfiniliden)acetat fosforanske strukture lahko zapišemo kot navadni ilid ali ilid zapisan kot enolat (slika 17).



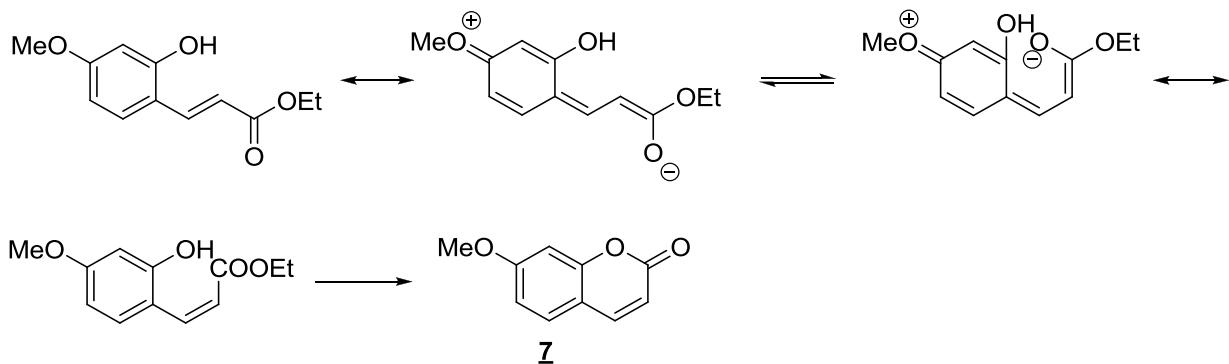
Slika 17: Prikaz različnih tautomernih oblik Wittigovega reagenta.

Prvi korak Wittigove reakcije je enak kot pri aldolni reakciji, enolat napade karbonilno skupino aldehida. Vendar namesto tvorbe »aldolnega« produkta pride do eliminacije fosfin oksida in nastane metoksi derivat etilnega estra cimetne kisline (slika 18) (41, stran 700).



Slika 18: Mehanizem Wittigove reakcije.

Elektron donorski metoksi substituent na para mestu pospeši tvorbo kumarinskega obroča, saj favorizira izomerizacijo *trans*-cinamata v *cis*-cinamat, ta pa ireverzibilno ciklizira v kumarin, našo spojino **7** (slika 19) (44).

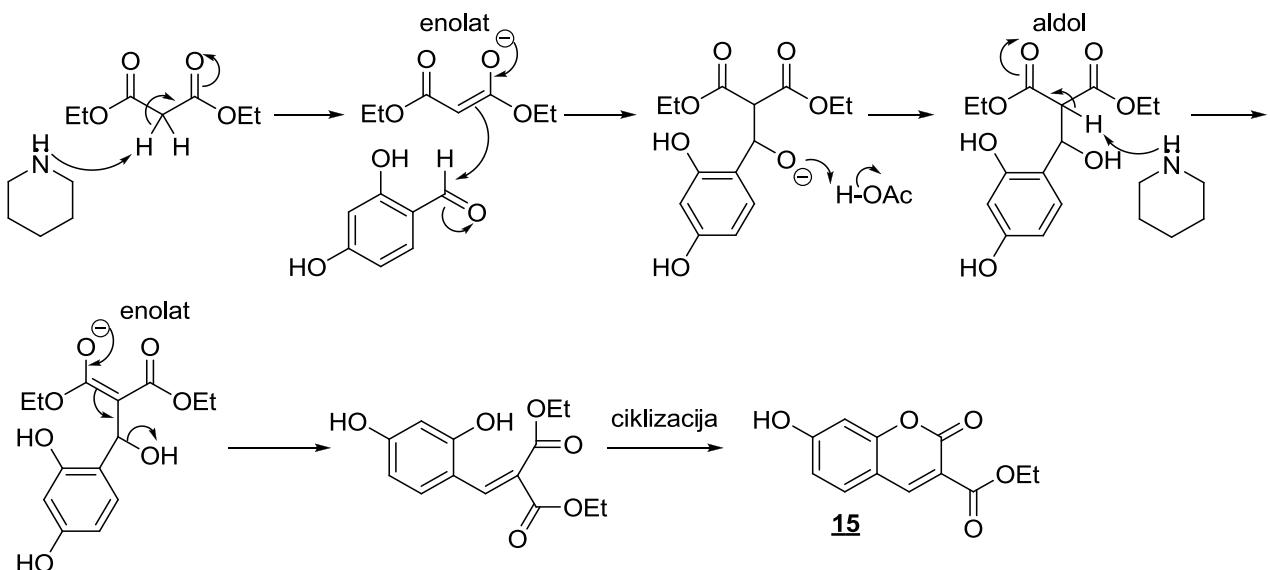


Slika 19: Izomerizacija in nastanek spojine **7** z zaprtjem obroča.

Reakcijo smo izvajali v N,N-dietilanilinu 2 h pri 210 °C. Po predpisu bi morala reakcija poteči z visokim izkoristkom že v 15 min pri 215 °C, vendar tako visoke temperature v naši oljni kopeli nismo mogli doseči, zato smo segrevali dalj časa, da bi se vsaj približali izkoristku, ki se povečuje z naraščanjem temperature (44). Po končani reakciji smo reakcijsko zmes razredčili s 5 % raztopino HCl, ki povzroči, da se N,N-dietilanilin protonira na dušiku ter tako med ekstrakcijo z etrom ostane v vodni fazi, spojina **7** pa preide v organsko fazo. Izkazalo se je, da je Wittigova reakcija najprimernejša za tvorbo kumarinskega skeleta brez substituenta na mestu 3.

5.1.6 Knoevenagelova kondenzacija

Reakcijo med aldehydom in dietil malonatom smo izvajali v etanolu pod refluksom ob prisotnosti katalitičnih količin sekundarnega amina piperidina in ocetne kisline. Piperidin kot šibka baza je dovolj močna, da najprej odvzame proton aktivirani metilenski skupini dietil malonata z dvema elektron privlačnima skupinama (karbonilni skupini). Nastane enolat, ki potem napade karbonilno skupino aldehyda, ocetna kislina pa omogoči nastanek aldola. Med karbonilnima skupinama je še en proton, ki ga baza odvzame in ponovno nastane enolat, čemur sledi eliminacija vode in nastanek dvojne vezi med dvema ogljikovima atomoma. Reakcijo pod temi pogoji imenujemo Knoevenagelova kondenzacija, ki je najprimernejša reakcija za tvorbo na mestu 3 substituiranih kumarinov. V dobljenem produktu je potekla še ciklizacija in dobili smo spojino **15** (slika 20) (41, stran 703).



Slika 20: Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije s ciklizacijo do spojine **15**.

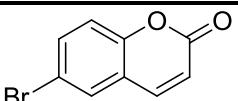
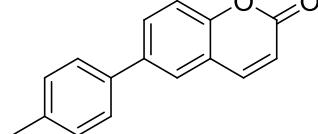
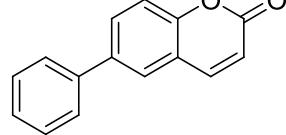
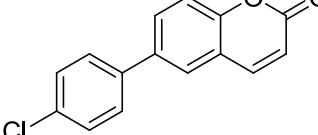
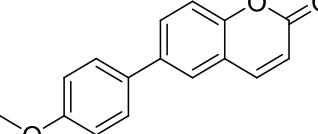
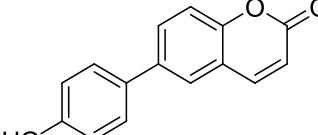
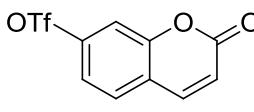
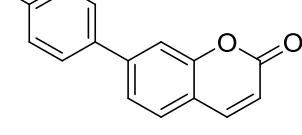
5.1.7 Demetiliranje z AlCl_3

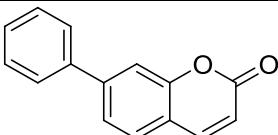
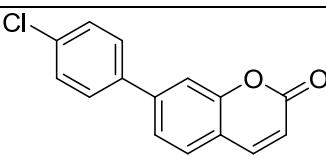
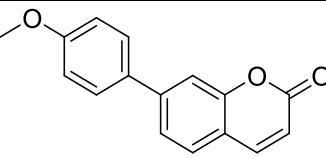
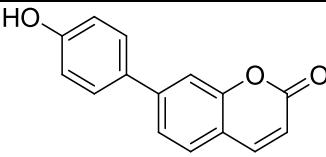
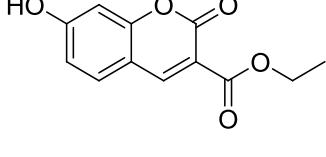
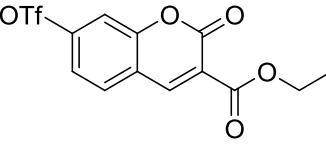
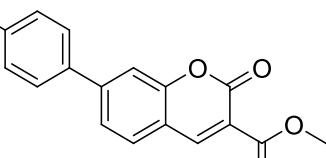
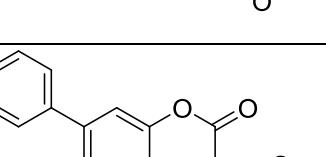
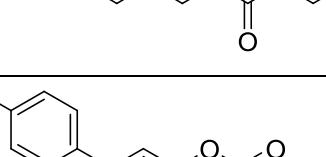
Naš cilj diplomske naloge je bil med drugimi spojinami pripraviti tudi metoksi in hidroksi derivate 6- oziroma 7-fenil-2H-kromen-2-ona. Suzukijeva reakcija s fenilboronskimi kislinami s prosto OH skupino pri opisanih pogojih ni potekla, zato smo sprva pripravili metoksi fenil derivate, spojine **5**, **13** in **20**, ki smo jih kasneje z reakcijo demetiliranja z AlCl_3 pretvorili v hidroksi derivate, spojine **6**, **14** in **21**. Isto reakcijo za cepitev eterske vezi smo uporabili tudi za pretvorbo spojine **7** v spojino **8**. AlCl_3 je močna Lewisova kislina, ki sprejme elektronski par na kisiku metoksi skupine. Nastane MeCl in adukt Ar-O-AlCl_2 . Po predpisu (45) bi morali za hidrolizo tega adukta in nastanek Ar-OH po koncu reakcije dodati vodo, vendar smo po izkušnjah delovnega mentorja zaradi nastanka emulzije in posledično težje izolacije ta del izpustili in takoj odpareli topilo ter preostanek nanesli neposredno na kolono. AlCl_3 in adukt Ar-O-AlCl_2 sta zelo higroskopna in vežeta vodo iz zraka, tako da že zaradi tega poteče del hidrolize do Ar-OH , večina Ar-OH pa nastane med ločbo pri kolonski kromatografiji, kjer so silanolne skupine silikagela vir protonov.

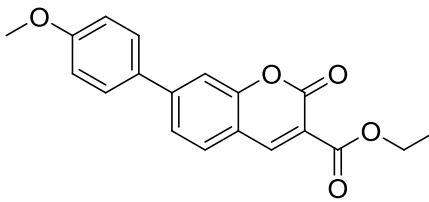
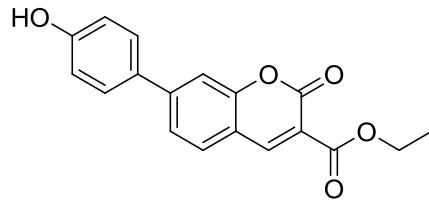
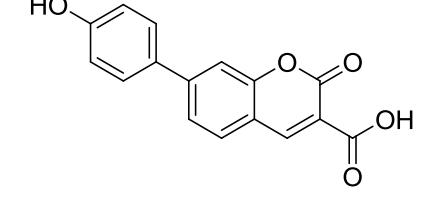
Pri demetiliranju spojine **20** dobimo zelo malo spojine **21** (2 mg), saj nam je v pogojih reakcije oziroma izolacije potekla tudi hidroliza estra, ki je botrovala nastanku **22**.

5.2 Rezultati biološkega testiranja z razpravo

Preglednica I: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih spojin kot inhibitorjev encima 17β -HSD1.

Oznaka spojine	Struktura spojine	inhibicija 17β -HSD1 (%)	
		koncentracija spojine (μM)	
		0,6	6
1		n.i.	n.i.
2		n.i.	n.i.
3		n.i.	18
4		n.i.	10
5		7	26
6		4	30
9		n.i.	9
10		10	29

<u>11</u>		n.i.	10
<u>12</u>		n.i.	9
<u>13</u>		n.i.	10
<u>14</u>		n.i.	43
<u>15</u>		n.i.	17
<u>16</u>		n.i.	n.i.
<u>17</u>		11	9
<u>18</u>		n.i.	7
<u>19</u>		n.i.	2

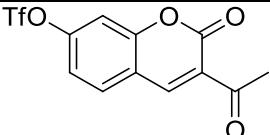
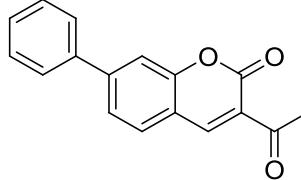
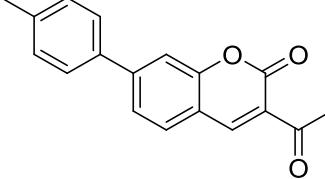
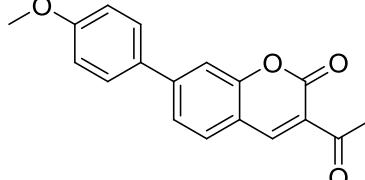
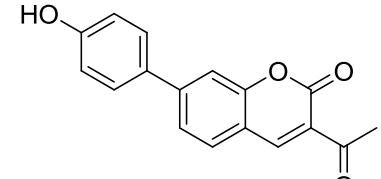
20		n.i.	1
21		2	14
22		n.i.	34

V preglednici I so prikazani rezultati biološkega testiranja sintetiziranih spojin na encim 17β -HSD1. Pri koncentraciji $0,6 \mu\text{M}$ večina spojin ni pokazala inhibicije, le nekaj jih je inhibiralo encim v zelo majhnih odstotkih ($<10\%$), kar je v območju eksperimentalne napake, zato sklepamo, da encima pri tej koncentraciji ne inhibirajo. Pri koncentraciji $6 \mu\text{M}$ so določene spojine inhibirale encim, vendar nobena od njih ni pokazala več kot 50% inhibicije. Najučinkovitejša je bila spojina **14**, ki encimsko aktivnost 17β -HSD1 zniža za 43% . V idealnih primerih bi se moral odstotek inhibicije večati z višanjem koncentracije inhibitorja, v primeru **17** pa zaradi eksperimentalne napake velja obraten trend, zato lahko zaključimo, da spojina **17** encima dejansko ne inhibira.

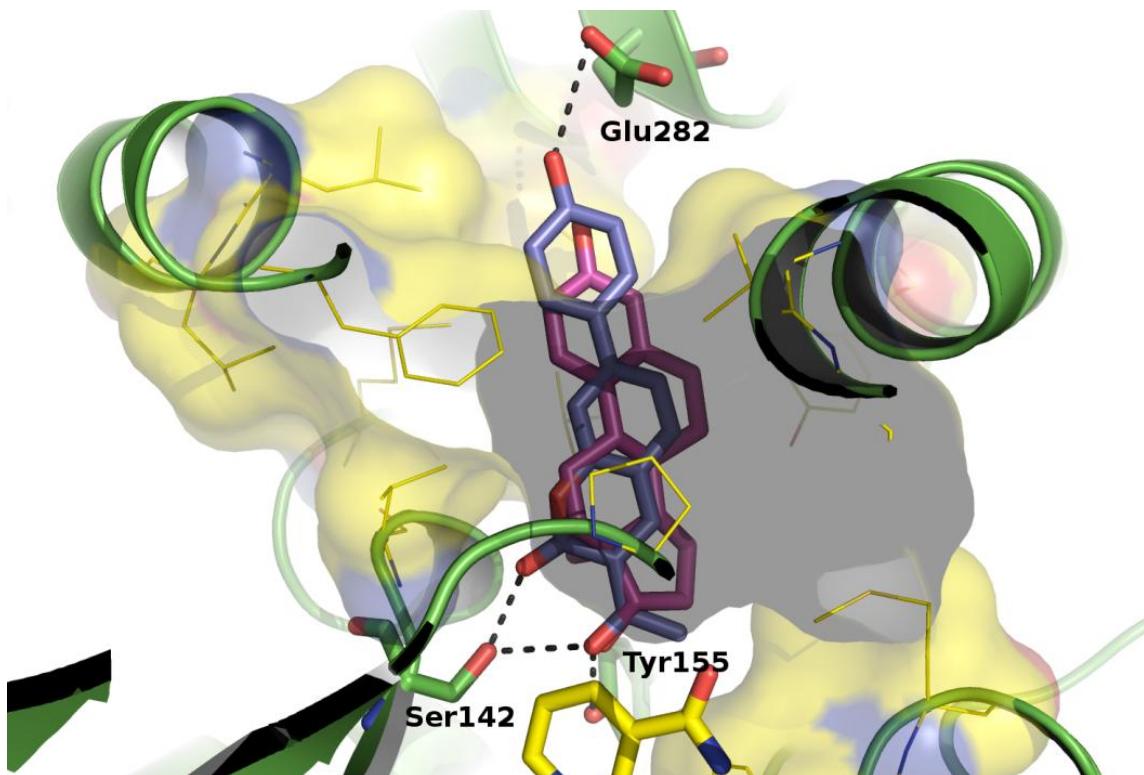
Ker pri $0,6 \mu\text{M}$ nobena od sintetiziranih spojin ne inhibira 17β -HSD1, se za primerjavo njihove inhibitorne jakosti lahko osredotočimo le na odstotek inhibicije pri $6\mu\text{M}$. Od arilnih derivatov encim najbolje inhibirajo spojine **5**, **6**, **10**, **14** in **22**, ki imajo na fenilnem obroču elektronondonorsko skupino (-OH, -OMe, -Me). Iz preglednice I je razvidno, da kumarini **1**, **9**, **15** in **16**, ki nimajo fenilnih substituentov praktično ne inhibirajo encima. Prav tako encima ne inhibirajo 7-fenilni derivati kumarina z etoksikarbonilno skupino na mestu 3. Spojina **22** s karboksilno kislino na mestu 3 je v tem primeru nekakšna izjema in kaže na to, da je esterska skupina na mestu 3 prevelika in s steričnim oviranjem preprečuje višjo inhibicijo.

Ker je bilo naše delo del širšega projekta, s katerim bi pojasnili strukturne elemente, ki pri 6- in 7-arylnih derivatih kumarinov vodijo do višje 17β -HSD1 inhibicije, se bomo v nadaljevanju sklicevali na objavljene rezultate, do katerih so prišli raziskovalci na Fakulteti za farmacijo in so strnjeni v preglednici II (34).

Preglednica II: Rezultati biološkega testiranja najmočnejših kumarinskih inhibitorjev encima 17β -HSD1 (34).

Oznak a spojine	Struktura spojine	inhibicija 17β - HSD1 (%)		inhibicija 17β - HSD2 (%)		IC_{50} (nM)	
		koncentracija (μM)		koncentracija (μM)			
		0,6	6	6	60		
<u>O</u>		60	100	n.i.	n.i.	360	
<u>P</u>		57	63	n.i.	n.i.	1928	
<u>R</u>		40	72	n.i.	n.i.	1237	
<u>S</u>		48	86	n.i.	n.i.	1135	
<u>T</u>		76	100	n.i.	n.i.	270	

Spojine **Q**, **P**, **R**, **S** in **T** (preglednica II) so najmočnejši kumarinski inhibitorji 17 β -HSD1 iz omenjenega projekta. Poleg visoke inhibicije 17 β -HSD1 izkazujejo tudi dobro selektivnost proti 17 β -HSD2 in ER. Skupna vsem je acetilna skupina na mestu 3 in večji substituent na mestu 7, ki pa ni nujno aromat. Z računalniškim sidranjem teh spojin v aktivno mesto encima so ugotovili, da protonakceptorski kisik 3-acetilne skupine tvori H-vezi s preostankoma Ser142 in Tyr155, ki sta del katalitične triade in na ta način iga podobno vlogo kot kisik keto skupine na mestu 17 pri estronu (34). Če naše spojine primerjamo s temi vidimo, da odsotnost acetilne skupine na mestu 3 občutno zniža jakost inhibicije. Tudi zamenjava acetilne skupine z navidez podobno karboksilno skupino pri spojini **22**, ne ohrani visoke inhibitorne aktivnosti, ki je značilna za spojino **T**. Verjeten vzrok je negativen naboj deprotonirane oblike karboksilne kisline pri pH 6.5, ki ne vodi do ugodnih interakcij v aktivnem mestu. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da sama laktonska karbonilna skupina ne prispeva znatno k inhibiciji. Izkazalo se je, da je inhibitorna jakost 3-acetilkumarinskih derivatov zelo odvisna od položaja na katerega je pripel fenilni susbtituent; 6-arylumarini s 3-acetilno skupino zelo slabo inhibirajo encim (34). Pri naših spojinah te odvisnosti nismo opazili, saj spojini **5** in **6**, ki imata 6-fenilni substituent, v podobni meri inhibirata encim kot spojini **10** in **14**, ki imata fenilni substituent uveden na mesto 7. Bolj očitno pa pri naših spojinah na inhibicijo vpliva vrsta aromata, ki je pripel na kumarin. Najboljšo inhibicijo dosežejo spojine **6**, **14** in **22**, ki imajo pripeto p-hidroksifenilno skupino. Pri spojini **T**, ki je najmočnejši inibitor ($IC_{50} = 270\text{ nM}$) in ima prav tako pripeto p-hidroksifenilno skupino so z računalniškim sidranjem v aktivno mesto pokazali, da fenolna OH skupina lahko stopa v interakcije s His221/Glu282 in na ta način iga podobno vlogo kot 3-OH skupina pri estronu (slika 21). Na enak način lahko tudi pri spojinah **6**, **14** in **22** razložimo relativno najmočnejše delovanje na encim med našimi spojinami.



Slika 21: Računalniško sidranje spojine **T** v aktivno mesto 17β -HSD1; spojina T je prikazana z modro, estradiol z vijolično. Označeni so ključni preostanki v aktivnem mestu in nikotinamidni del kofaktorja (34).

Ker naše spojine niso izkazale višje inhibicije 17β -HSD1, jim selektivnosti proti 17β -HSD2 in ER nismo določali.

6 SKLEP

V diplomskem delu smo v okviru večjega raziskovalnega projekta na Fakulteti za farmacijo načrtovali in sintetizirali različne kumarinske derivate kot potencialne inhibitorje encima 17β -HSD1. Izhajali smo iz različno substituiranih kumarinov, na katere smo z namenom, da bi posnemali steroidni obroč estrona, s Suzukijevo reakcijo uvedli različne fenilne substituente na mesto 6 oziroma 7. Vsem sintetiziranim spojinam smo določili inhibicijo encima 17β -HSD1.

Naše delo je pomembno pripomoglo k razjasnitvi SAR derivatov kumarina za inhibicijo encima 17β -HSD1. Potrdili smo, da je ohranitev 3-acetilne skupine pri kumarinskih derivatih ključna za ohranitev visoke inhibitorne aktivnosti. Dodatno smo se prepričali, da morajo biti spojine čim bolj podobne steroidnemu substratu. Tisti kumarini, ki imajo pripeto fenolno skupino z oponašanjem steroidnega A obroča dosežejo relativno najvišjo inhibitorno aktivnost. Skupen zaključek je, da 7-fenilkumarini z acetilno skupino na mestu 3 predstavljajo dobro osnovo za nadaljnjo optimizacijo in razvoj novih, učinkovitih in selektivnih nesteroidnih inhibitorjev 17β -HSD1.

7 LITERATURA

1. Vihko P, Härkönen P, Oduwole O, Törn S, Kurkela R, Porvari K, Pulkka A, Isomaa V: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases and cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003; 83: 119-122.
2. Poirier D: New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Discovery Research* 2008; 69: 304-18.
3. Lukacik P, Kavanagh KL, Opperman U: Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 248: 61-71.
4. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Ally M, Pelletier G, Belanger A: Introcrinology; role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 25: 169-196.
5. Šmuc T, Rižner TL: Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 178: 228-233.
6. Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A: Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSD. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 248: 141-148.
7. Duax WL, Ghosh D: Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility, and cancer. *Steroids* 1997; 62: 95-100.
8. Moghrabi N, Andersson S: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases: Physiological roles in health and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1998; 9(7): 265-270.
9. Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F: Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities: Oxidation/reduction and inhibition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1995; 55: 581-587.
10. Moeller G, Adamski J: Integrated view on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 301: 7-19.
11. Poirier D: Advances in development of inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2009; 9: 642-660.

12. Laplante Y, Rancourt C, Poirier D: Relative involvement of three 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 301: 146–153.
13. Poirier D: Inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10: 453-477.
14. Han Q, Campbell RL, Gangloff A, Huang YW, Lin SX: Dehydroepiandrosterone and dihydrotestosterone recognition by human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(2): 1105-1111.
15. Frotscher M, Ziegler E, Marchais-Oberwinkler S, Kruchten P, Neugebauer A, Fetzer L, Scherer C, Müller-Vieira U, Messinger J, Thole H, Hartmann WR: Design, synthesis, and biological evaluation of (hydroxyphenyl)naphthalene and -quinoline derivatives: potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51: 2158–2169.
16. Breton R, Housset D, Mazza C, Fontecilla-Camps JC: The structure of a complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP $^+$ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* 1996; 4: 905-915.
17. Ghosh D, Vihko P: Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Chemico-Biological Interactions* 2001; 130–132: 637–650.
18. Jin ZJ, Lin SX: Human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Predominance of estrone reduction and its induction by NADPH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 259: 489–493.
19. Negri M, Recanatini M, Hartmann RW: Insights in 17 β -HSD1 enzyme kinetics and ligand binding by dynamic motion investigation. *Plos One* 2010; 5(8).
20. Huang YW, Pineau I, Chang HJ, Azzi A, Bellemare V, Laberge S, Lin SX: Critical residues for the specificity of cofactors and substrates in human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: Variants designed from the three-dimensional structure of the enzyme. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 2010-2020.
21. Sherbet DP, Gurvey OL, Papari-Zareei M, Mizrahi D, Rambally S, Akbar S, Auchus RJ: Biochemical factors governing the steady-state estrone/estradiol ratios

- catalyzed by human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases types 1 and 2 in HEK-293 Cells. *Endocrinology* 2009; 150: 4154-4162.
22. Gangloff A, Shi R, Nahoum V, Lin SX: Pseudo-symmetry of C19 steroids, alternative binding orientations, and multispecificity in human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *The Faseb Journal* 2003; 17: 274-276.
23. Aka JA, Mazumdar M, Chen C, Poirier D, Lin SX: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 stimulates breast cancer by dihydrotestosterone inactivation in addition to estradiol production. *Molecular Endocrinology* 2010; 24: 832-845.
24. Day JM, Foster PA, Tutil HJ, Parsons MFC idr. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1, and not Type 12, is a target for endocrine therapy of hormone-dependent breast cancer. *International Journal of Cancer* 2008; 122: 1931-1940.
25. Day JM, Tutil HJ, Purohit A, Reed MJ: Design and validation of specific inhibitors of 17 β -hydroxysteroiddehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis. *Endocrine Related Cancer* 2008; 15: 665-692.
26. Marchias-Oberwinkler S, Frotscher M, Ziegler E, Werth R, Kruchten P, Messinger J, Thole H, Hartmann RW: Structure-activity study in the class of 6-(3'-hydroxyphenyl)naphthalenes leading to an optimization of a pharmacophore model for 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 301: 205-211.
27. Mazumdar M, Fournier D, Zhu D, Cadot C, Poirier D, Lin SX: Binary and ternary crystal structure analyses of a novel inhibitor with 17 β -HSD type 1: a lead compound for breast cancer therapy. *Biochemical Journal* 2009; 424: 357-366.
28. Kruchten P, Werth R, Masrchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Hartmann RW: Development of a biological screening system for the evaluation of highly active and selective 17 β -HSD1-inhibitors as potential therapeutic agents. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 301: 154-157.
29. Brožič P, Rižner TL, Gobec S: Inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Current Medicinal Chemistry* 2008; 15:137-150.
30. Mesinger J, Hirvelä L, Husen B, Kangas L, Koskimies P, Pentikäinen O, Saaraenketo P, Thole H: New inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 248:192-198.

31. Bey E, Marchais-Oberwinkler S, Negri M, Kruchten P, Oster A, Klein T, Spadaro A, Werth R, Frotscher M, Birk B, Hartmann RW: New insights into the SARs and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: Influence of additional substituents on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitory activity and selectivity. Journal od Medicinal Chemistry 2009; 52: 6724-6743.
32. Bey E, Marchais-Oberwinkler S, Werth R, Negri M, Al-Soud YA, Kruchten P, Oster A, Frotscher M, Birk B, Hartmann RW: Design, synthesis, biological evaluation and pharmacokinetics of bis(hydroxyphenyl) substituted azoles, thiophenes, benzenes, and aza-benzenes as potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1). Journal od Medicinal Chemistry 2008; 51: 6725-6739.
33. Sova M, Perdih A, Kotnik M, Kristan K, Rižner TL, Solmajer T, Gobec S: Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: A synthesis, QSAR and modelling study. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2006; 14: 7404-7418.
34. Starčević Š, Brožič P, Turk S, Cesar J, Rižner TL, Gobec S: Synthesis and biological evaluation of (6- and 7-Phenyl) coumarin derivatives as selective nonsteroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Journal of Medicinal Chemistry 2011; 54(1): 248-261.
35. Valizadeh H, Vaghefi S: One-pot Wittig and Knoevenagel reactions in ionic liquid as convenient methods for the synthesis of coumarin derivatives. Synthetic Communications 2009; 39(9): 1666-1678.
36. Wegner HA, Ahles S, Neuburger M: A new gold-catalyzed domino cyclization and oxidative coupling reaction. Chemistry - A European Journal 2008; 14(36): 11310-11313.
37. Iqbal PF, Bhat AR, Azam A: Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry 2009; 44(5): 2252-2259.
38. Chtchigrovsky M, Primo A, Gonzalez P, Molvinger K, Robitzer M, Quignard F, Taran F: Functionalized chitosan as a green, recyclable, biopolymer-supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition. Angewandte Chemie 2009; 121(32): 6030-6034.

39. Alvim J, Dias RLA, Castilho MS, Oliva G, Corrêa AG: Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2005; 16(4): 763-773.
40. Haight AR, Bailey AE, Baker WS, Cain MH et al.: A scalable synthesis of fiduxosin. *Process Research and Development* 2004; 8: 897-902.
41. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: *Organic chemistry*. Oxford University Press 2001.
42. Kotha S, Lahiri K, Kashinath D: Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. *Tetrahedron* 2002; 58: 9633-9695.
43. Kotha S, Lahiri K: Expanding the diversity of polycyclic aromatics through a Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Strategy. *European Journal of Organic Chemistry* 2007; 2007(8): 1221-1236.
44. Harayama T, Katsuno K, Nishioka H, Fujii M, Nishita Y, Ishii H, Kaneko Y: A convenient synthesis of a simple coumarin from salicylaldehyde and Wittig reagent (I): A synthesis of methoxy- and hydroxycoumarins. *ChemInform* 1995; 26(26).
45. Hutschenreuter TU, Ehmer PB, Hartmann RW: Synthesis of hydroxy derivatives of highly potent non-steroidal CYP 17 inhibitors as potential metabolites and evaluation of their activity by a non cellular assay using recombinant human enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2004; 19(1): 17-32.