

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

POLONA BOŽNAR

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2011

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

POLONA BOŽNAR

**UPORABA SUZUKIJEVE REAKCIJE ZA PRIPRAVO DERIVATOV
INDOLA IN KUMARINA KOT POTENCIALNIH INHIBITORJEV
17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE TIPA 1**

**IMPLEMENTATION OF SUZUKI CROSS COUPLING REACTION
FOR THE PREPARATION OF INDOLE AND COUMARIN
DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF
17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE TYPE 1**

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, somentorstvom izr. prof. Tee Lanišnik Rižner in delovnim mentorstvom Štefana Starčeviča, mag. farm.

Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Štefan. Študije inhibicije 17β -HSD tipa 1 so potekale na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Stanislavu Gobcu, izr. prof. Tei Lanišnik Rižner in Štefanu Starčeviču, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri diplomskem delu. Štefanu Starčeviču, mag. farm. se zahvaljujem tudi za izvedbo bioloških testiranj, asist. Samotu Turku, mag. farm. pa za izvedbo računalniške študije. Najlepša hvala tudi ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, somentorstvom izr. prof. Tee Lanišnik Rižner in delovnim mentorstvom Štefana Starčeviča, mag. farm.

Polona Božnar

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1. STEROIDNI HORMONI	1
1.2. STEROIDOGENEZA.....	3
1.3. HORMONSKO ODDISNE OBLIKE RAKA IN INTRAKRINOLOGIJA	4
1.4. 17β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE	7
1.5. 17β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZA TIPA 1	8
1.5.1. INHIBITORJI 17β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE TIPA 1	11
1.6. SUZUKIJEVA REAKCIJA.....	15
1.6.1. MEHANIZEM SUZUKIJEVE REAKCIJE	16
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1. MATERIALI	20
3.2. METODE.....	20
3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE	20
3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE	21
3.2.3. ELEMENTNA ANALIZA	21
3.2.4. DOLOČANJE TALIŠČ.....	21
3.2.5. NOMENKLATURA, RISANJE SPOJIN IN DOLOČANJE RAZDALJ MED ATOMI V MOLEKULAH	22
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. SINTEZA 4-METOKSIFENILBORONSKE KISLINE	23
4.2. SINTEZA ARILNIH DERIVATOV INDOLA	24
4.2.1. SINTEZA 5-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 5-BROMO-1H-INDOLA	28
4.2.1.1. Sinteza 5-(4-metoksifenil)-1H-indola (1)	28
4.2.1.2. Sinteza 5-p-tolil-1H-indola (2)	29
4.2.1.3. Sinteza 5-fenil-1H-indola (3)	30

4.2.1.4. Sinteza 5-(4-klorofenil)-1H-indola (4)	30
4.2.1.5. Sinteza 3-(1H-indol-5-il)anilina (5).....	31
4.2.1.6. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)fenola (6)	32
4.2.1.7. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)benzaldehida (7)	33
4.2.1.8. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)benzonitrila (8)	34
4.2.1.9. Sinteza metil 3-(1H-indol-5-il)benzoata (9).....	34
4.2.1.10. Sinteza 5-(3-nitrofenil)-1H-indola (10)	35
4.2.1.11. Poskus sinteze 4-(1H-indol-5-il)benzamida (11)	36
4.2.1.12. Poskus sinteze 4-(1H-indol-5-il)benzojske kisline (12)	37
4.2.2. SINTEZA 6-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 6-BROMO-1H-INDOL-3-KARBALDEHIDA	37
4.2.2.1. Sinteza 6-(4-metoksifenil)-1H-indol-3-karbaldehida (13)	37
4.2.2.2. Sinteza 6-(4-hidroksifenil)-1H-indol-3-karbaldehida (14).....	38
4.2.2.3. Poskus sinteze 6-p-tolil-1H-indol-3-karbaldehida (15).....	39
4.2.2.4. Poskus sinteze 6-fenil-1H-indol-3-karbaldehida (16)	40
4.2.2.5. Poskus sinteze 6-(3-aminofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (17)	40
4.2.2.6. Poskus sinteze 6-(4-klorofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (18)	41
4.2.2.7. Poskus sinteze 4-(3-formil-1H-indol-6-il)benzonitrila (19)	41
4.2.2.8. Poskus sinteze 6-(4-formilfenil)-1H-indol-3-karbaldehida (20)	41
4.2.2.9. Poskus sinteze 6-(3-nitrofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (21).....	42
4.2.2.10. Poskus sinteze metil 3-(3-formil-1H-indol-6-il)benzoata (22).....	42
4.2.3. SINTEZA 5-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 5-BROMO-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE	43
4.2.3.1. Poskus sinteze 5-(4-metoksifenil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (23)	43
4.2.3.2. Poskus sinteze 5-(4-hidroksifenil)-1H-indol-2-karboksilne kisline (24).....	43
4.3. SINTEZA ARILNIH DERIVATOV KUMARINA	44
4.3.1. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 3-ACETIL-2-OKSO-2H-KROMEN-7-IL TRIFLUOROMETANSULFONATA	46

4.3.1.1. Sinteza 3-acetyl-7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (25)	46
4.3.1.2. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-oxo-2H-kromen-7-il) benzonitrila (26)	47
4.3.1.3. Poskus sinteze 3-acetyl-7-(3-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (27), 3-acetyl-7-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (28), 3-acetyl-7-(3,4-dimetoksifenil)-2H-kromen-2-ona (29), 3-acetyl-7-(3-fluorofenil)-2H-kromen-2-ona (30) in 3-acetyl-7-(3-aminofenil)-2H-kromen-2-ona (31)	48
4.3.2. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 3-ACETIL-6-BROMO-2H-KROMEN-2-ONA	49
4.3.2.1. Sinteza 3-acetyl-6-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (32)	49
4.3.2.2. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-oxo-2H-kromen-6-il) benzonitrila (33)	50
4.3.2.3. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-oxo-2H-kromen-6-il) benzaldehida (34)	50
4.3.3. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ ETIL 6-BROMO-2-OKSO-2H-KROMEN-3-KARBOKSILATA	51
4.3.3.1. Poskus sinteze etil 6-(4-cianofenil)-2-oxo-2H-kromen-3-karboksilata (35) ..	51
4.3.3.2. Poskus sinteze etil 6-(4-formilfenil)-2-oxo-2H-kromen-3-karboksilata (36) ..	51
4.3.4. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 2-OKSO-2H-KROMEN-7-ILTRIFLUOROMETANSULFONATA	52
4.3.4.1. Poskus sinteze 4-(2-oxo-2H-kromen-7-il) benzonitrila (37)	52
4.3.4.2. Poskus sinteze 4-(2-oxo-2H-kromen-7-il) benzaldehida (38)	52
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	53
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	53
5.1.1. KOMENTAR SINTEZE 4-METOKSIFENILBORONSKE KISLINE	53
5.1.2. KOMENTAR SINTEZE ARILNIH DERIVATOV INDOLA	53
5.1.3. KOMENTAR SINTEZE ARILNIH DERIVATOV KUMARINA	55
5.2. REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ	57
5.3. REZULTATI SIDRANJA	62
6. ZAKLJUČEK	65
7. LITERATURA	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukture najpomembnejših steroidnih hormonov	2
Slika 2: Shema steroidogeneze	3
Slika 3: Intrakrinologija: biosinteza in metabolizem estrogenih hormonov v rakavih celicah dojk pri ženskah v menopavzi.....	5
Slika 4: Pretvorba estrona v estradiol in obratno; reakciji, ki ju katalizirata 17β -HSD tipa 1 in 17β -HSD tipa 2 ob prisotnosti kofaktorjev NADPH in NAD^+	8
Slika 5: Aktivno mesto 17β -HSD tipa 1 z vezanim estronom	9
Slika 6: Kompleks 17β -HSD tipa 1 z estradiolom in NADP^+	10
Slika 7: Naravni inhibitorji 17β -HSD tipa 1	12
Slika 8: Nesteroidni inhibitorji 17β -HSD tipa 1	12
Slika 9: Estron; razdalja med kisikovima atomoma	13
Slika 10: 6- in 7-fenilni derivati kumarina.....	14
Slika 11: Struktura ekvilina	15
Slika 12: Shema Suzukijeve reakcije.....	15
Slika 13: Shema dveh paladijevih katalizatorjev: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in $\text{Pd}(\text{dpf})\text{Cl}_2$	16
Slika 14: Mehanizem Suzukijeve reakcije.....	17
Slika 15: Strukture 5- in 6-arylnih derivatov indola ter 6- in 7-arylnih derivatov kumarina z označenimi razdaljami med polarnimi skupinami	18
Slika 16: Strukture izhodnih spojin za sintezo biarilnih derivatov indola	54
Slika 17: Strukture izhodnih spojin za sintezo biarilnih derivatov kumarina.....	56
Slika 18: Derivati indola in kumarina, sintetizirani v diplomskem delu in njihova struturna podobnost z estronom	57
Slika 19: Spojini <u>6</u> in <u>14</u> in razdalje med polarnimi skupinami v molekulah.....	60
Slika 20: Sidranje spojine <u>6</u> v aktivno mesto 17β -HSD tipa 1 in primerjava z vezavo estradiola	63
Slika 21: Sidranje spojine <u>14</u> v aktivno mesto 17β -HSD tipa 1 in primerjava z vezavo estradiola	64

KAZALO TABEL

Tabela I: Rezultati bioloških testiranj na 17β -HSD tipa 1	58
Tabela II: Sintetizirani arilindoli s polarno skupino na fenilnem obroču, ki ne inhibirajo 17β -HSD tipa 1 in razdalje med heteroatomom v aromatu in heteroatomom na fenilnem obroču	61
Tabela III: Sintetizirana arilkumarina in razdalje med metoksi skupino na fenilnem obroču in karbonilnim kisikom laktonske in acetilne skupine	62

POVZETEK

Danes je rak za kardiovaskularnimi obolenji najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu. 40 % vseh rakov je hormonsko odvisnih. Pri ženskah je najpogostejši rak na dojkah, zaradi katerega še vedno umre največ rakavih bolnic. 60 % primerov raka na dojkah je hormonsko odvisnih in se pojavljajo predvsem pri pacientkah v menopavzi. Njegov razvoj je povezan s previsoko koncentracijo hormona estradiola oziroma njegovih prekomernih proliferativnih učinkov v tkivu dojk. Do zdaj znane učinkovine za zdravljenje hormonsko odvisnih rakov dojk niso dovolj selektivne, zato izkazujejo številne sistemske neželene učinke. Poleg tega se nekatere bolnice nanje ne odzivajo, pri nekaterih pa se tekom terapije razvije rezistenca. Z zvišano ravnjo estradiola je povezan tudi razvoj nekaterih benignih hormonskih obolenj, kot je endometriosa, za katero prav tako še ni znane selektivne učinkovine. Povišano koncentracijo estradiola povezujejo z delovanjem več encimov, med katerimi igra pomembno vlogo 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 1.

Z uporabo selektivnih inhibitorjev 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1 bi inhibirali pretvorbo estrona v fiziološko aktivni estradiol v tkivu dojk in endometrija, kjer je povečana izraženost encima, ter se izognili mnogim neželenim učinkom.

V diplomskem delu smo uporabili steroidomimetični pristop načrtovanja nesteroidnih inhibitorjev 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1. Z uporabo Suzukijeve reakcije smo sintetizirali arilne derivate indola in kumarina, ki oponašajo strukturo estrona, fiziološkega substrata 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1. Za optimizacijo izkoristkov smo uporabili različna topila, katalizatorje in baze. Reakcije smo izvajali v argonovi atmosferi pri temperaturi vrelišča topila. Ugotovili smo, da obstajajo občutne razlike v reaktivnosti med indoli in kumarini, kar zahteva uporabo različnih reakcijskih pogojev za uspešno izvedbo reakcije.

Nekaterim sintetiziranim arilindolom smo določili inhibitorno aktivnost na rekombinantni 17β -hidroksisteroid-dehidrogenazi tipa 1 pri dveh različnih koncentracijah spojine, 0,6 μM in 6 μM . Podali smo jo kot odstotek inhibicije encima. Dve spojini izmed 7 analiziranih, (z oznakama **6** in **14**), sta inhibirali encim. Boljše inhibitorne lastnosti je pokazala spojina **6**. Inhibitorno aktivnost derivatov indola smo primerjali tudi z derivati kumarina, ki so jih na Fakulteti za farmacijo pripravili že prej. Ugotovili smo, da so 7-arilkumarini boljši inhibitorji od arilnih derivatov indola.

Derivati indola in 7-arilkumarini predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj novih potencialnih nesteroidnih inhibitorjev 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa I.

ABSTRACT

Today, cancer represents the second most common cause of death in western countries after cardiovascular diseases. 40% of all cancers are hormone-dependent cancers. The most common cancer in women is breast cancer, which is still primary cause of cancer mortality. 60% of all breast cancer tumours are hormone dependent and are especially common in postmenopausal patients. The development of hormone dependent breast cancer is related to the elevated tissue levels of hormone estradiol, which stimulates proliferation of cells. Currently used drugs for the treatment of hormone dependent cancer are not selective enough and display numerous side effects. Further, a great proportion of patients show tolerance to current treatments and some types of hormone dependent breast cancers also develop resistance to drugs. Higher levels of estradiol are also related to the development of benign hormone dependent disease endometriosis for which no effective and no selective treatment is available yet. Higher levels of estradiol in hormone responsive tissues are related to the action of several enzymes of which 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 plays crucial role.

Implementation of selective 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors would reduce the formation of estradiol in breast and endometrium tissue where this enzyme is overexpressed and would exert fewer side effects than currently used drugs.

In our graduate work we employed steroidomimetic approach for design of nonsteroidal inhibitors of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Suzuki cross-coupling reaction was used for the preparation of aryl derivatives of indole and coumarin, which mimic the structure of estrone, the physiological substrate of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. For optimization of yields we screened various solvents, bases and catalytic reagents. Reactions were performed at the boiling temperature of the solvent and under argon atmosphere. Significant differences in reactivity among indoles and coumarins in Suzuki cross coupling reaction demand usage of different reaction conditions for successful completion of this reaction.

Some of the prepared arylindoles were evaluated in the recombinant 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition assay. Their inhibition activities were expressed as percent of inhibition at the two tested concentrations of compound, 0.6 μ M and 6 μ M. Compounds **6** and **14** were modest inhibitors where compound **6** was more potent. We also compared the inhibitory activities of indole derivatives with inhibition activities of coumarin derivatives that have already been prepared at the Faculty of Pharmacy. We discovered that 7-arylcoumarin derivatives display better inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 than arylindoles.

Arylindoles and 7-arylcoumarins represent good starting point for further optimization and development of new nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors.

SEZNAM OKRAJŠAV

3 β -HSD	3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza
17 β -HSD	17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza
AcCN	acetonitril
ACTH	adrenokortikotropni hormon
Asn	aminokislina asparagin
Bu ₄ N ⁺ Br ⁻	tetrabutilamonijev bromid
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
d	doublet
dd	doublet doubleta
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEA-sulfat	dehidroepiandrosteron sulfat
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
E1	estron
E2	estradiol
ekv.	ekvivalent
EST	estrogen sulfotransferaza
EtOAc	etilacetat
EtOH	etanol (96%)
FSH	folikel stimulirajoči hormon
Glu	aminokislina glutaminska kislina
GnRH	gonadoliberin / gonadotropin-sproščajoči hormon (gonadotropin-releasing hormone)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (high-performance liquid chromatography)
Hz	hertz
ICSH	hormon vzpodbujanja intersticijskih celic
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
kDa	kilodalton
LH	luteinizirajoči hormon

Lys	aminokislina lizin
M	molarnost (mol/L)
m	multiplet
MF	mobilna faza
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MS	masna spektroskopija
NAD(P) ⁺	β-nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
NAD(P)H	β-nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)- reducirana oblika
nm	nanometer
NMR	jedrska magnetna resonanca
Pd	paladij
Pd(dppf)Cl ₂	paladijev (II) [1,1'-bis(difenilfosfino)ferocen] klorid
Pd(OAc) ₂	paladijev acetat
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfin) paladij
Ph	fenilna skupina
Rf	retencijski faktor
s	singlet
Ser	aminokislina serin
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev (selective estrogen receptor modulator)
STS	steroid sulfataza
T	temperatura
t	triplet
Tf	triflatna (trifluorometansulfonatna) skupina
THF	tetrahidrofuran
TPK	tankoplastna kromatografija
Tyr	aminokislina tirozin
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

1.1. STEROIDNI HORMONI

Hormoni so spojine, ki nastajajo v specializiranih celicah žlez in se z eksocitozo ali drugim načinom membranskega transporta sproščajo v krvni obtok. Po krvi potujejo do tarčnih tkiv, kjer se vežejo na membranske ali jedrne receptorje, in tam delujejo (1-4). Glede na kemijsko strukturo jih razdelimo na peptidne hormone, derivate lipidov in fosfolipidov ter monoamine. Steroidni hormoni spadajo v drugo skupino (1).

Vsi steroidni hormoni so derivati holesterola in so si strukturno zelo podobni. Osrednji del je ciklopantanofenantrenski obročni sistem, substituente, ki so vezane nanj, pa se razlikujejo. Nimajo ne kislih in ne bazičnih lastnosti, z izjemo estradiola, ki je zaradi fenolne skupine na obroču A rahlo kisel. So zelo lipofilne molekule, zato zlahka prehajajo membrane (1).

Nastajajo v različnih tkivih, predvsem v nadledvičnih in spolnih žlezah, pri čemer sodelujejo številni encimi. Po sintezi se s pasivno difuzijo sprostijo v krvni obtok. Ker je njihova topnost v plazmi zelo nizka, se do tarčnih celic prenesejo vezani na transportne proteine. Ti so lahko specifični za določene steroidne hormone ali pa so nespecifični. V tarčnih tkivih lahko povzročijo hiter ali počasen odgovor. Z vezavo na membranske receptorje aktivirajo znotrajcelično signalno pot, preko katere učinek nastopi zelo hitro. Lahko pa hormoni difundirajo skozi celično membrano v citosol, kjer se vežejo na citosolne receptorje. Kompleks receptor-steroidni hormon se nato prenese v jedro, kjer se veže na kromosom in poveča ali zmanjša ekspresijo genov. Tak učinek nastopi mnogo počasneje (2).

Kljub zelo podobni strukturi pa imajo povsem različno fiziološko vlogo. Glede na to, na katere receptorje se vežejo in kakšni so njihovi učinki, jih razdelimo v pet skupin (3):

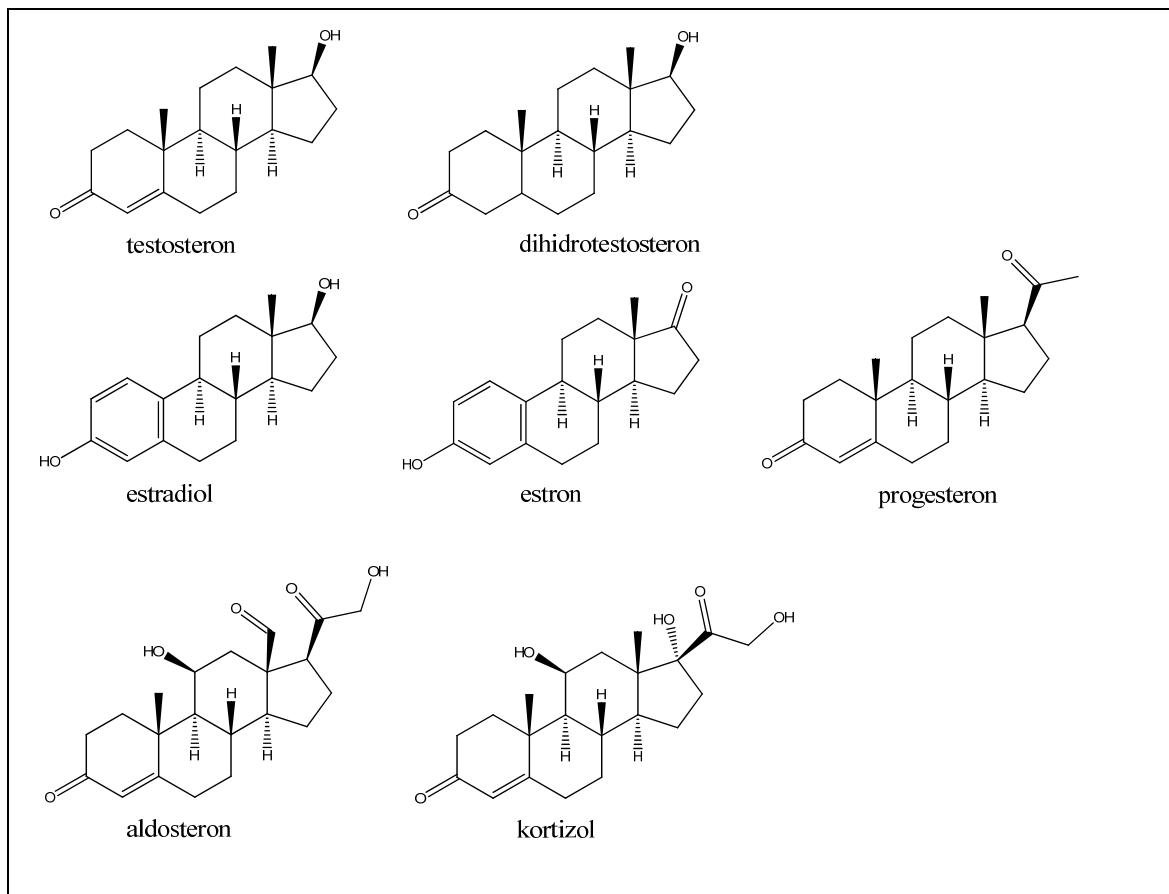
- Androgeni
- Estrogeni
- Progestageni
- Glukokortikoidi
- Mineralokortikoidi

Androgeni (testosteron in dihidrotestosteron) in estrogeni (estradiol in estron) (Slika 1) nastajajo predvsem v spolnih žlezah ter vplivajo na spolni razvoj in funkcijo, uravnavajo

diferenciacijo spolnih celic in vplivajo na razvoj sekundarnih spolnih znakov (4). Estrogeni sodelujejo tudi pri nastajanju in diferenciaciji nekaterih drugih tkiv: kostnine, možganov in debelega črevesa in imajo zaščitno vlogo, saj ščitijo pred nastankom kardiovaskularnih bolezni, osteoporozo in izgubo kognitivnih funkcij (5).

Progestereni, na primer progesteron (Slika 1), nastajajo v jajčnikih in placenti ter pomagajo uravnavati menstrualni cikel in so pomembni za vzdrževanje nosečnosti (4).

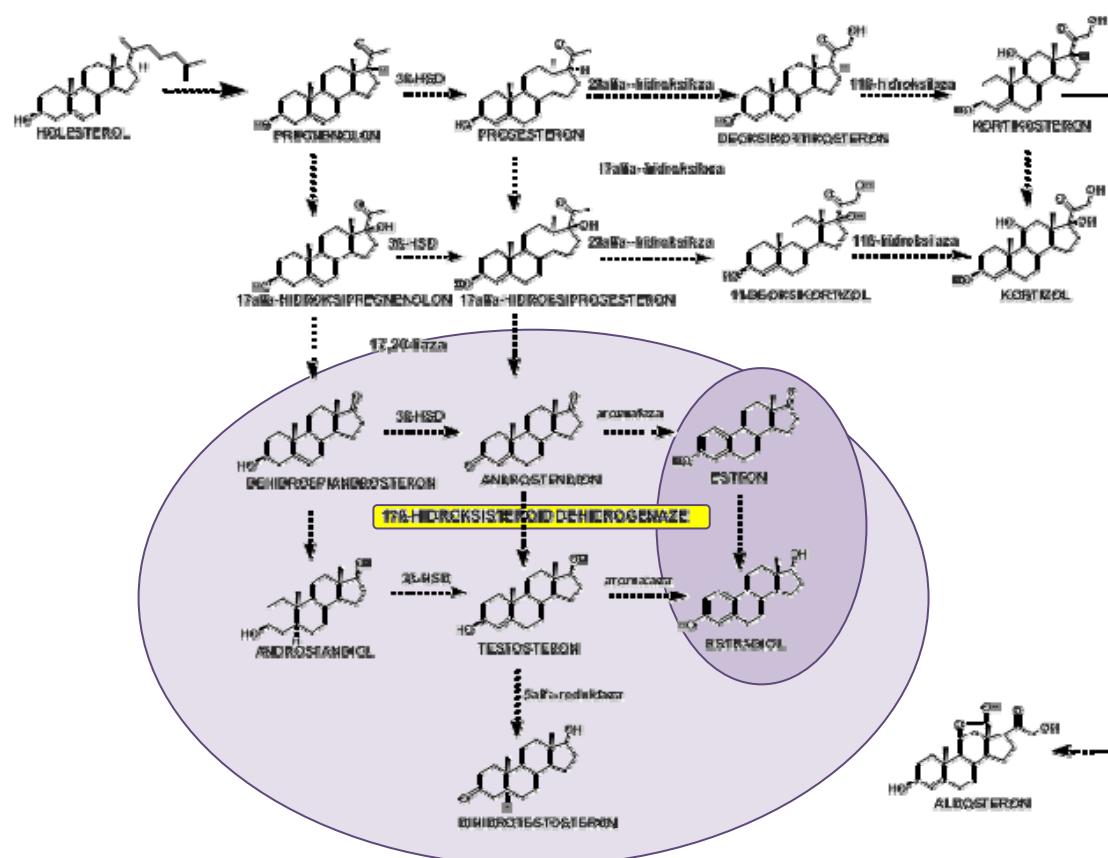
Mineralokortikidi in glukokortikidi nastajajo v nadledvični žlezi. Glavni predstavnik mineralokortikoidov je aldosteron (Slika 1). Uravnavajo izločanje soli in vode iz telesa skozi ledvica. Glukokortikidi, med njimi je najpomembnejši kortizol (Slika 1), uravnavajo metabolizem ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov, sodelujejo pa tudi pri odzivu na stres in imajo protivnetno delovanje. Kratkoročno delujejo tako, da sprožijo nastanek sekundarnih prenašalcev (cAMP), dolgoročno pa vplivajo na nekatere fiziološke procese preko sinteze proteinov (4).



Slika 1: Strukture najpomembnejših steroidnih hormonov

1.2. STEROIDOGENEZA

Steroidni hormoni se ne skladiščijo v organizmu, ampak se sintetizirajo takrat, ko jih telo potrebuje za določen učinek. Biosintezena pot, po kateri nastajajo, imenujemo steroidogeneza (Slika 2) in je uravnavana po principu negativne povratne zanke. Signal za začetek pride iz možganov. Hipotalamus sprosti v hipotalamo-hipofizni krvni obtok sproščajoče (GnRH) ali inhibitorne faktorje, ki se po krvi prenesejo v adenohipofizo, kjer vplivajo na sproščanje FSH (folikel vzpodbjajočega hormona), LH (luteinizirajočega hormona), ki ga pri moških pogosteje imenujemo ICSH (hormon vzpodbjanja intersticijskih celic), in ACTH (adrenokortikotropnega hormona) v kri, ti pa delujejo na endokrine žleze. V njih povečajo ali zmanjšajo biosintezo in izločanje steroidnih hormonov (6).



Slika 2: Shema steroidogeneze

Steroidogeneza androgenih in estrogenih hormonov poteka predvsem v primarnih spolnih žlezah, pri moških v Leydigovih celicah testisov, pri ženskah v jajčnih foliklih, in v nadledvičnih žlezah, v manjši meri pa tudi v perifernih tkivih. Mineralokortikoidi in glukokortikoidi nastajajo v skorji nadledvične žleze (2). Prekursor vseh steroidnih hormonov je holesterol, ki ga celice dobijo s privzemom lipoproteinov, LDL in HDL, iz plazme ali ga sintetizirajo (3). Holesterol nato potuje preko membrane iz citoplazme v mitohondrij. Ta stopnja je najpočasnejša in določa hitrost nastajanja hormonov. Encim CYP11A1, ki se nahaja na notranji membrani mitohondrija, pretvori holesterol do pregnenolona, ki je še skupna predstopnja vseh steroidnih hormonov. Reakcijska pot se nato razveji in pod vplivom različnih encimov in kofaktorjev nastajajo različne skupine hormonov (Slika 2) (1, 3, 4).

1.3. HORMONSKO ODVISNE OBLIKE RAKA IN INTRAKRINOLOGIJA

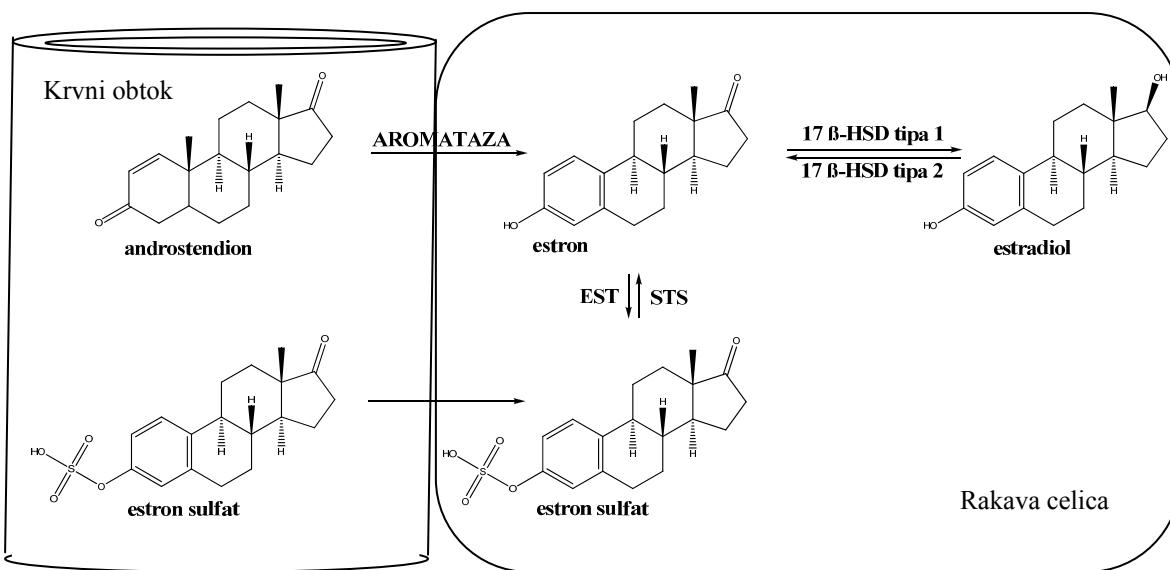
Približno 40 % vseh vrst raka je hormonsko odvisnih (7). Razvijejo se zaradi povečanih proliferativnih učinkov hormonov na celice kot posledica povišane koncentracije le-teh v plazmi ali pa povečanih lokalnih učinkov hormonov ob normalni plazemski koncentraciji. Mednje spadajo rak dojk, prostate, rak na modih, jajčnikih, na ščitnici in osteosarkom. Pri ženskah se najpogosteje pojavlja rak dojk, pri moških pa rak prostate (8).

Rak dojk je najpogostejši vzrok smrti pri ženskah v Zahodnem svetu. Pojavlja se lahko pred menopavzo ali po njej, vendar je pri ženskah v menopavzi pogostejši (9-11). Večina primerov raka na dojkah je hormonsko odvisnih: pri pacientkah pred menopavzo 60 %, pri pacientkah po menopavzi pa 75 % (9).

Pri pre-menopavzalnih ženskah je hormonsko odvisen rak dojk večinoma posledica povišane plazemske koncentracije estrogenov. Ti se namreč sintetizirajo v glavnem v jajčnikih in v jajčnem foliku, pa tudi v perifernih tkivih, na primer maščevju, ter se po plazmi prenesejo do tkiva dojk, kjer pospešijo rast in diferenciacijo celic, kar lahko vodi v razvoj raka (12, 13).

Pri ženskah v menopavzi, ki zbolevajo za hormonsko odvisnim rakom dojk, pa je plazemska koncentracija estrogenov običajno normalna (14). Pri njih namreč biosinteza estrogenov skoraj v celoti poteka v perifernih tkivih v celicah dojk ali v okolnih adipocitih (12, 15). Hormoni se ne sproščajo v krvni obtok, temveč delujejo v celicah dojk, v katerih

so nastali, čemur pravimo intrakrino delovanje. Estrogeni, ki se sintetizirajo v adipocitih, pa imajo učinke na sosednje celice dojk, kar imenujemo parakrino delovanje (7, 16). Glavna prekurzorja estrogenov v celicah dojk sta androgena dehidroepiandrosteron (DHEA) in DHEA-sulfat, ki nastajata predvsem v retikularnem območju skorje nadledvične žleze (7, 16, 17), od koder po krvi potujeta do tkiva dojk. Steroid sulfataza hidrolizira DHEA-sulfat v DHEA, 3 β -HSD pa pretvori DHEA v androstendion. Nadaljnjo pretvorbo v estron katalizira encim aromataza. Estron pa, predvsem pri postmenopavzalnih ženskah, nastaja tudi iz estron-sulfata, ki je neaktivna oblika in potuje po krvnem obtoku. V celicah dojk se hidrolizira ob prisotnosti encima STS do estrona, ta pa se nato s 17 β -HSD tipa 1 pretvori v estradiol (Slika 3). Za ženske z rakom dojk v menopavzi je zato značilna povišana koncentracija androgenov in sulfatirane oblike estrona v plazmi in povišana koncentracija estrogenov v tkivu dojk (7) ali pa le povečano razmerje med koncentracijama estradiola in estrona v rakavih celicah. Plazemska koncentracija aktivnih estrogenov je pogosto normalna (13).



Slika 3: Intrakrinologija: biosinteza in metabolizem estrogenih hormonov v rakavih celicah dojk pri ženskah v menopavzi

Posledica neravnovesja v delovanju encimov, ki sodelujejo pri biosintezi in metabolizmu estrogenih hormonov, poleg 17 β -HSD tipa 1, aromataze in STS tudi 17 β -HSD tipa 2 in EST, je lahko povišana koncentracija estradiola v plazmi ali v celicah, njegovi povečani proliferativni učinki na celice pa pomembno prispevajo k razvoju raka (5, 11).

Kateri encim ima največjo vlogo pri tem, še ni povsem jasno. Nekateri znanstveniki so mnenja, da je ključna povečana koncentracija encima 17 β -HSD tipa 1, kar je lahko posledica pomnožitve gena, ki kodira ta encim. To dejstvo podpira tudi raziskava, s katero so ugotovili, da se rak lahko razvije kljub blokadi estrogenskih receptorjev (ER) z njihovimi antagonisti ter inhibiciji aromataze (17). Mnogi raziskovalci zagovarjajo teorijo, da vzrok ni povečana koncentracija 17 β -HSD tipa 1, temveč povečano razmerje med koncentracijama encimov 17 β -HSD tipa 1 in 17 β -HSD tipa 2, kar pa je lahko tudi posledica zmanjšane ekspresije gena za 17 β -HSD tipa 2 (10). Spet drugi pa trdijo, da ima odločilno vlogo encim aromataza (13). Tudi povečano delovanje encima STS in povečano izražanje mRNA za ER β sta možna vzroka za razvoj raka (14).

Rak dojk je kompleksna in heterogena bolezen z različnimi mehanizmi razvoja in tudi pristopov za zdravljenje je več. Do zdaj znane učinkovine so aromatazni inhibitorji in inhibitorji STS, ki zavirajo sintezo estrogenov, ter SERM (selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev) in antiestrogeni, ki preprečijo vezavo estrogenov na estrogenske receptorje in tako zmanjšajo njihove učinke (5, 18-20). Inhibitorji aromataze so se med temi izkazali za najbolj varne učinkovine, vendar se nekatere paciente nanje ne odzivajo, nekatere pa med terapijo razvijejo rezistenco nanje. Boljše učinke izkazujejo pri ženskah pred menopavzo (9, 13). Skupna pomanjkljivost vseh zgoraj naštetih učinkovin je, da sistemsko zmanjšajo koncentracijo estrogenov, kar privede do neželenih sistemskih učinkov. Mnogi znanstveniki trdijo, da bi te občutno zmanjšali z uporabo selektivnih inhibitorjev 17 β -HSD tipa 1. Na ravnovesje estrogenov bi vplivali le lokalno v rakovih celicah dojk. Mnoge raziskave potekajo v tej smeri, vendar še noben inhibitor 17 β -HSD tipa 1 ni dosegel faze kliničnih študij (18-20). Ugodna naj bi bila tudi kombinacija inhibitorja 17 β -HSD tipa 1 in SERM (17).

Prevelika koncentracija estradiola lahko pripelje tudi do nastanka endometrioze. To je najpogosteji razlog za bolečine v medeničnem predelu in neplodnost pri ženskah. Endometriozno tkivo se razrašča tudi izven maternice na jajčnikih, jajcevodih in v trebušni votlini. Endometriozo pogosto spremljajo bolečina, hude krvavitve, pride lahko do okvare reprodukcijskih organov, motenj ovulacije in težav pri vgnezdenju embrija (14).

Zakaj se pri endometriозi poveča koncentracija estradiola, ni povsem jasno. Razlog iščejo v povečani ali zmanjšani ekspresiji encimov, ki sodelujejo pri biosintezi estrogenov, enako kot pri nastanku hormonsko-odvisnega raka dojk.

To bolezen zdravimo s progestini in analogi GnRH. S tem se ustavi menstruacija, ki je glavni vzrok za bolečino, in rast endometrioznega tkiva. Bolečino blažijo tudi z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili, plodnost pa skušajo izboljšati s klomifen citratom (5, 14). Zdravljenje pogosto spremljajo neželeni učinki, kot so vročični oblici, akne in povečanje telesne teže (5). Inhibitorji 17 β -HSD tipa 1 bi bili verjetno zelo uspešni pri zdravljenju te bolezni (14).

1.4. 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze so encimi, ki pretvarjajo aktivne oblike androgenov in estrogenov v neaktivne oblike, in obratno, preko specifične oksido-redukcijske pretvorbe hidroksilne oziroma karbonilne skupine na mestu 17 steroidnega skeleta. Za svoje delovanje potrebujejo kofaktorje NAD(P)⁺ ali NAD(P)(H) (5, 17, 21). Kljub imenu pa steroidi niso edine spojine, ki jih ti encimi lahko uporabljajo za substrate. Zmožni so katalizirati tudi pretvorbe bilirubina, maščobnih kislin, žolčnih kislin, retinoidov in ksenobiotikov (5, 22). Ker za neketere oblike teh encimov steroidi niso primarni substrati, razmišljajo o uvedbi novega poimenovanja (14).

Kateri substrat se bo pretvoril in ali bo potekla oksidacija ali redukcija, je odvisno od razpoložljivih encimov in kofaktorjev v določenih delih celice (22). Za različne oblike 17 β -HSD je namreč značilna različna zastopanost v celici: 17 β -HSD tipa 1 je citosolni encim, 17 β -HSD tipa 3 je največ v mikrosomih, 17 β -HSD tipa 4 v peroksisomih in 17 β -HSD tipa 10 v mitohondrijih. (5) Na koncentracijo fiziološko aktivnih hormonov v plazmi in v tkivih tako vpliva tudi izražanje genov za različne oblike 17 β -HSD (21).

Pri sesalcih je znanih 15 oblik 17 β -HSD, pri človeku so jih našli 13 (5). Označeni so z zaporednimi številkami po kronologiji odkritja (21-23). Večino 17 β -HSD uvrščamo v proteinsko naddružino kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR), le tip 5 spada v naddružino aldo-keto reduktaz (AKR) (5, 21, 22).

SDR je evolucijsko zelo stara naddružina encimov. Vanjo spada več kot 2000 encimov, ki jih kodira več kot 60 genov. Splošna značilnost SDR naddružine je nizka homologija v

zaporedju aminokislin (10-30 %), je pa 3D struktura med posameznimi predstavniki zelo podobna (23).

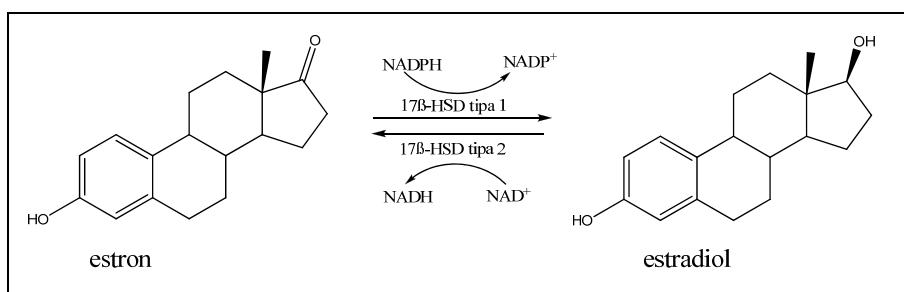
Za vse encime, ki spadajo v SDR naddružino, je značilno vezavno mesto za kofaktor, ki ga imenujemo Rossmannovo zvitje, in je po zgradbi pri vseh 17 β -HSD iz SDR naddružine zelo podobno ter katalitični motiv TyrXXXLys (5).

17 β -HSD glede na substrat razdelimo na estrogenske in androgenske, glede na tip reakcije, ki jo katalizirajo, pa na oksidacijske in redukcijske izooblike. Oksidativne 17 β -HSD, ki katalizirajo pretvorbo aktivnih oblik hormonov v neaktivne, kot kofaktor pri reakcijah potrebujejo NAD⁺. Mednje spadajo 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 in 14. Redukcijske 17 β -HSD pa sodelujejo pri aktivaciji manj aktivnih oblik hormonov. Za delovanje potrebujejo NADPH. To so 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1, 3, 5, 7 in 12 (21). Nekateri v *in vitro* pogojih lahko katalizirajo oksidacijo in redukcijo, smer reakcije pa je odvisna od prisotnosti kofaktorja (NAD(P)⁺ ali NAD(P)H); vendar v živih organizmih katalizirajo reakcijo le v eno smer zaradi razlike v afinitetah do posameznega kofaktorja (5).

Številne bolezni, kot so rak dojk, rak prostate, endometriosa, metabolni sindrom in nekatere kognitivne motnje so posledica neustreznega delovanja 17 β -HSD, zato ti encimi predstavljajo tarčo za razvoj novih učinkovin (22).

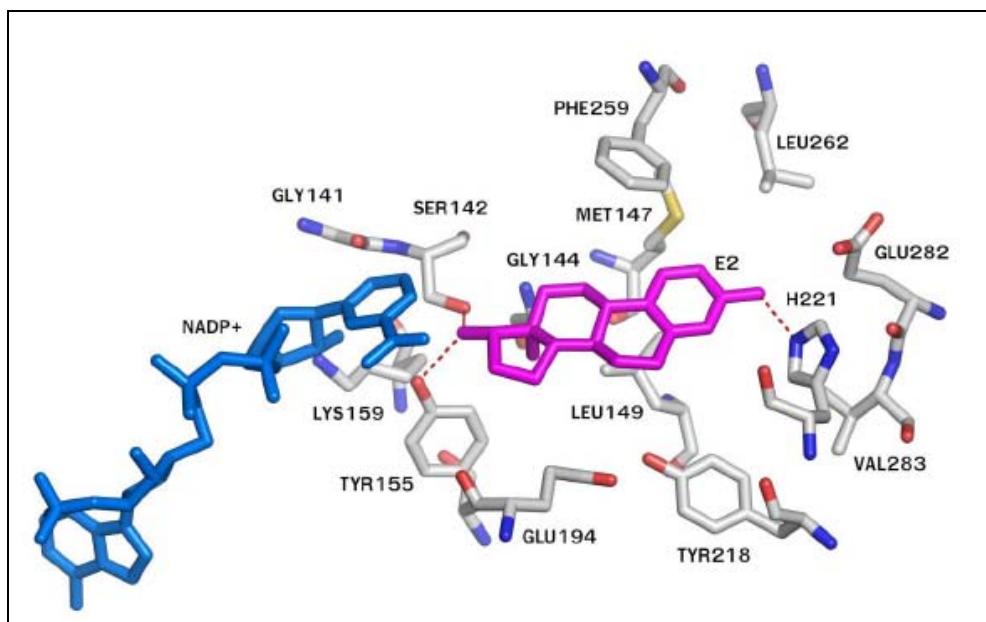
1.5. 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZA TIPA 1

Encim so prvič izolirali 1. 1958 iz človeške posteljice, kristalna struktura pa je bila znana šele l. 1995 (24, 25). Uvrščamo jo med kratkoverižne dehidrogenaze/reduktaze. Katalizira stereoselektivno redukcijsko pretvorbo estrona v estradiol (Slika 4) (12).



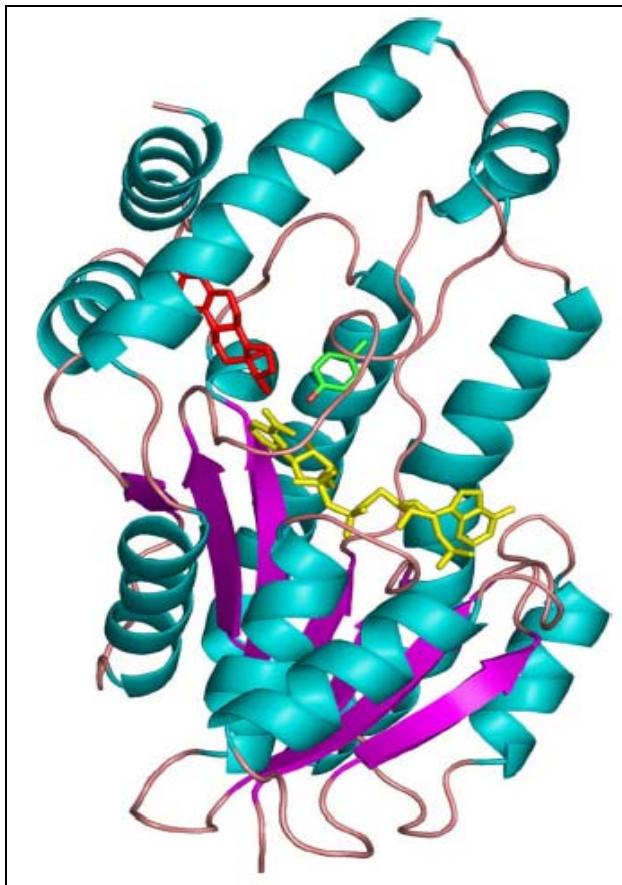
Slika 4: Pretvorba estrona v estradiol in obratno; reakciji, ki ju katalizirata 17 β -HSD tipa 1 in 17 β -HSD tipa 2 ob prisotnosti kofaktorjev NADPH in NAD⁺

Je citosolni homodimer. Eno podenoto sestavlja 327 aminokislin in ima molekulsko maso 34,5 kDa. Najpomembnejši del encima je katalitična tetrada, ki jo sestavljajo Asn114, Ser142, Tyr155 in Lys159 (19). Predlagan mehanizem redukcije je tak, da najprej hidroksilna skupina Tyr155 aktivira karbonilni kisik na mestu 17, za tem pa se prenese hidridni ion iz kofaktorja NADPH na α -stran C17 (25).



Slika 5: Aktivno mesto 17 β -HSD tipa 1 z vezanim estradiolom (26)

Vezavno mesto za substrat je ozek hidrofoben kanal, na obeh koncih tega kanala pa sta po dve polarni aminokislini: Ser142 in Tyr155 ter Glu282 in His221 (20). Za optimalno vezavo substrata so ključnega pomena H-vezi hidroksilne skupine na mestu 3 steroidnega skeleta substrata z Glu282 ali/in His221 ter keto skupine na mestu 17 s Ser142 in Tyr155 (Slika 5) (21, 27). Poleg zgoraj omenjenih polarnih aminokislinskih vezav v vezavnem mestu prisotne še tri polarne aminokislinske veze: Asn152, Tyr218 in Ser222, ki pa ne sodelujejo pri vezavi substrata (19). Močne so tudi hidrofobne interakcije med steroidnim skeletom in lipofilnim delom vezavnega mesta. Mesto na encimu, kamor se veže kofaktor, imenujemo Rosmannovo zvitje. Sestavlja ga 7 paralelnih β površin, ki so na vsaki strani obdane s po 3 α heliksi (Slika 6). 3D struktura tega dela je značilnost SDR naddružine ter je pri vseh 17 β -HSD iz SDR naddružine zelo podobna (14).



Slika 6: Kompleks monomerne enote encima 17 β -HSD tipa 1 z estradiolom in NADP⁺ (estradiol je rdeče barve, NADP⁺ pa rumene). α heliksi (modre barve) in β površine (roza barve) predstavljajo Rosmannovo zvitje (28).

Gen za 17 β -HSD tipa 1, HSD17B1, se izraža v jajčnikih in nekaterih perifernih tkivih (placenta, dojke, prostata, limfociti, kosti, maternica). V jajčnikih katalizira nastajanje estradiola, v perifernih tkivih pa skupaj z nekaterimi redukcijskimi 17 β -HSD (tip 7, tip 12) in oksidacijskimi 17 β -HSD (tip 2) skrbi za ravnotesje med koncentracijama estradiola in estrona (12, 21).

Prevelika aktivnost 17 β -HSD tipa 1 v jajčnikih lahko domnevno privede do raka jajčnikov, encim pa je povezan tudi z nastankom raka endometrija (29) in endometrioze, prevlada 17 β -HSD tipa 1 nad 17 β -HSD tipa 2 v dojkah pa prispeva k razvoju raka dojk (21). 17 β -HSD tipa 1 je tudi neodvisen prognostični znak raka dojk (14, 23). Zaradi povečane aktivnosti encima se poveča koncentracija estradiola, ki lokalno pospeši proliferacijo celic in s tem nastanek tumorskega tkiva (21). Pričakujemo lahko, da bo 17 β -HSD tipa 1 v kratkem postala pomembna terapevtska tarča.

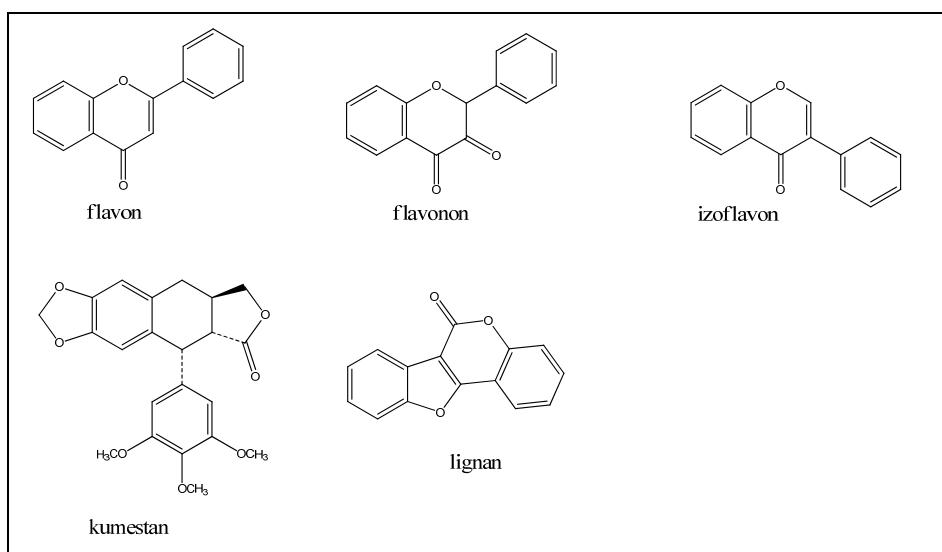
1.5.1. INHIBITORJI 17 β -HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE TIPA 1

V zadnjih letih potekajo mnoge raziskave na področju sinteze in preizkušanja selektivnih inhibitorjev 17 β -HSD tipa 1, ki bi inhibirali encim že v nanomolarnih koncentracijah. Inhibicijo encima lahko dosežemo na različne načine: spojina se reverzibilno ali ireverzibilno veže na mesto za estron, lahko tekmuje z NADPH za vezavo v Rosmannovo zvitje ali pa se veže na mesto za substrat in kofaktor hkrati (14).

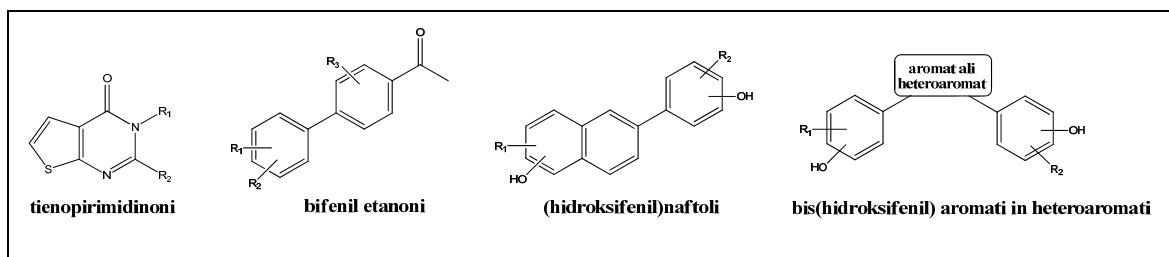
Sprva so poročali le o steroidnih inhibitorjih, zadnjih nekaj let pa vedno večji pomen dobivajo nesteroidni inhibitorji.

Steroidni inhibitorji so derivati estrona in estradiola. Glavni del njihove strukture predstavlja steroidni skelet, nanj pa so na različnih mestih (predvsem 6, 15, 16 in 17) vezane večje in manjše substituente (19, 21). Obroč A ne sme biti substituiran, ker je zelo malo prostora v vezavnem mestu encima. Možne so majhne substituente (metoksi- ali etil-) na mestu 2, vendar se tudi v tem primeru inhibitorna aktivnost zmanjša (20). Za najboljše so se izkazali takoimenovani dvojni ali hibridni inhibitorji, ki so sestavljeni iz steroidnega skeleta, distančnika in adenozinskega dela. Adenozinski del je preko distančnika vezan na steroidni skelet običajno na mestu 16. Spojina se na encim veže v mesti za substrat in kofaktor (19, 21).

Nesteroidni inhibitorji so manjše molekule, ki nimajo steroidnega skeleta. Nekatere naravne nesteroidne spojine inhibirajo 17 β -HSD tipa 1. Znano je, da Azijci manj zbolevajo za hormonsko odvisnimi oblikami raka, saj uživajo hrano, bogato s fitoestrogeni in flavonoidi. Flavoni, flavononi, izoflavoni, kumestani in lignani (Slika 7) inhibirajo 17 β -HSD tipa 1, vendar imajo številne slabe lastnosti, zaradi česar se ne uporabljam v terapevtske namene. Nekateri delujejo estrogeno, drugi inhibirajo še nekatere druge oblike 17 β -HSD ali pa imajo neugodne farmakokinetične lastnosti: v organizmu se lahko metabolizirajo v fiziološko aktivne spojine z estrogenim delovanjem, lahko pa vplivajo na metabolizem endogenih steroidnih hormonov, s tem pa tudi na plazemske koncentracije in učinek (14).

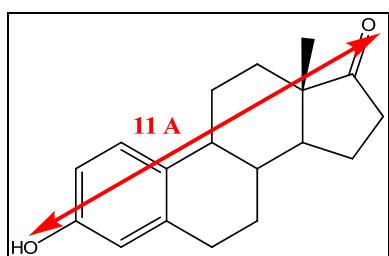
**Slika 7:** Naravni inhibitorji 17 β -HSD tipa 1

V zadnjem času se je povečal obseg načrtovanja sinteznih nesteroidnih inhibitorjev 17 β -HSD tipa 1 (Slika 8).

**Slika 8:** Nesteroidni inhibitorji 17 β -HSD tipa 1

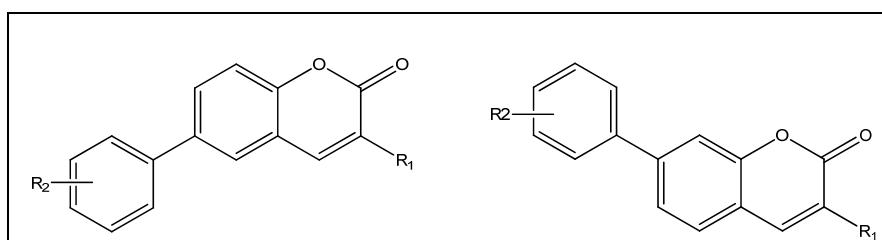
Prve močnejše sintezne nesteroidne inhibitorje so razvili na osnovi iskanja spojine vodnice z optimizacijo naravnih nesteroidnih spojin vodnic, ki inhibirajo encim 17 β -HSD tipa 1. Rezultat so bili nefenolni derivati tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (Slika 8) (23, 30).

Drug pristop je temeljil na oponašanju strukture estrona, v katerem je razdalja med kisikovima atomoma približno 11 Å (Slika 9).

**Slika 9:** Estron; razdalja med kisikovima atomoma

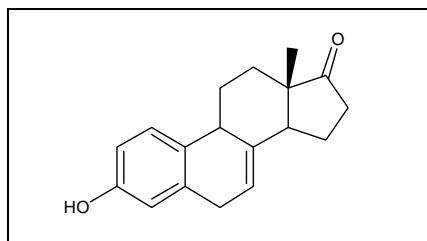
Ta pristop je pripeljal do odkritja že v nM območju učinkovitih nesteroidnih inhibitorjev iz skupine bifenil etanonov (31), hidroksifenil naftolov (19, 20) ter bishidroksifenil aromatov/heteroaromatov (18, 19) (Slika 8). Najboljše inhibitorne lastnosti imajo slednji; na vmesnem aromatskem oziroma heterocikličnem skeletu imajo vezana dva fenolna obroča, pri čemer razdalja med posameznima hidroksi skupinama znaša približno 11 Å. Spojine z dvema fenolnima skupinama se v telesu zelo hitro metabolizirajo, zato so eno fenolno skupino zamenjali z neko drugo polarno skupino (heteroaromatski obroč), razdalja okrog 11 Å med polarnima skupinama pa je ostala. Visoke inhibitorne učinke so ohranile spojine, ki so za vmesnik ohranile aromatski obroč brez donorjev vodikovih vezi. Krajše in daljše alifatske skupine, ki bi oponašale obroč D, so se izkazale za neučinkovite. Pomembna je namreč planarnost sistema in delokalizacija π elektronov (19).

Pristop podprt s strukturo naravnega liganda so uporabili tudi pri načrtovanju kumarinskih inhibitorjev 17 β -HSD tipa 1. Kumarinski skelet je pogost v naravnih in sinteznih spojinah, vendar le redke med njimi inhibirajo 17 β -HSD tipa 1. Zelo pomebno je, ali je substituiran fenilni obroč vezan na kumarin na mestu 6 ali 7. 7-fenilni derivati kumarina izkazujejo mnogo boljše inhibitorne lastnosti v primerjavi s 6-fenilnimi derivati. Razlog je v tem, da je zaradi drugačne prostorske strukture 6-fenilnih derivatov onemogočena tvorba H-vezi med spojino in katalitičnima aminokislinama na encimu, Ser142 in Tyr155. 7-fenilni derivati kumarina pa se v vezavno mesto encima vežejo podobno kot estron, kar se kaže tudi v boljših inhibitornih lastnostih spojin. Ugotavljeni so tudi vpliv substituente na mesto 3 kumarinskega skeleta. Primerjali so inhibitorne lastnosti spojin, ki imajo na mestu 3 vezan H, acetilno skupino ali karbonilosietilno skupino in ugotovili, da so najboljši inhibitorji kumarinski derivati, ki imajo na mestu 3 vezano acetilno skupino (Slika 10) (32).

**Slika 10:** 6- in 7- fenilni derivati kumarina ($R_1 = -H$, $-\text{COCH}_3$ ali $-\text{COOEt}$)

Iz objavljenih struktur nesteroidnih inhibitorjev je možna izpeljava strukturnih zahtev (SAR- structure-activity relationship) za načrtovanje novih inhibitorjev, pri kateri je računalniško podprt načrtovanje postalo nepogrešljiv člen. Pri tem so nam v veliko pomoč objavljene kristalne strukture encima z različnimi steroidnimi ligandi (strukturno podprt načrtovanje) (18). Interakcije med obstoječimi inhibitorji in aktivnim mestom encima je možno preverjati z računalniškim sidranjem (angl.: docking) inhibitorjev v aktivno mesto encima. Na ta način si pomagamo razložiti vezavo inhibitorja ter sklepamo na možnost dodatnih strukturnih izboljšav (23, 33). Pri računalniško podprtih metodah načrtovanja učinkovin je v zadnjem času postalo priljubljeno virtualno rešetanje visoke zmogljivosti, pri katerem lahko različni računalniški programi v aktivno mesto encima sidrajo več milijonov spojin iz virtualnih podatkovnih baz ter jih pri tem tudi razvrstijo po jakostih vezave (34).

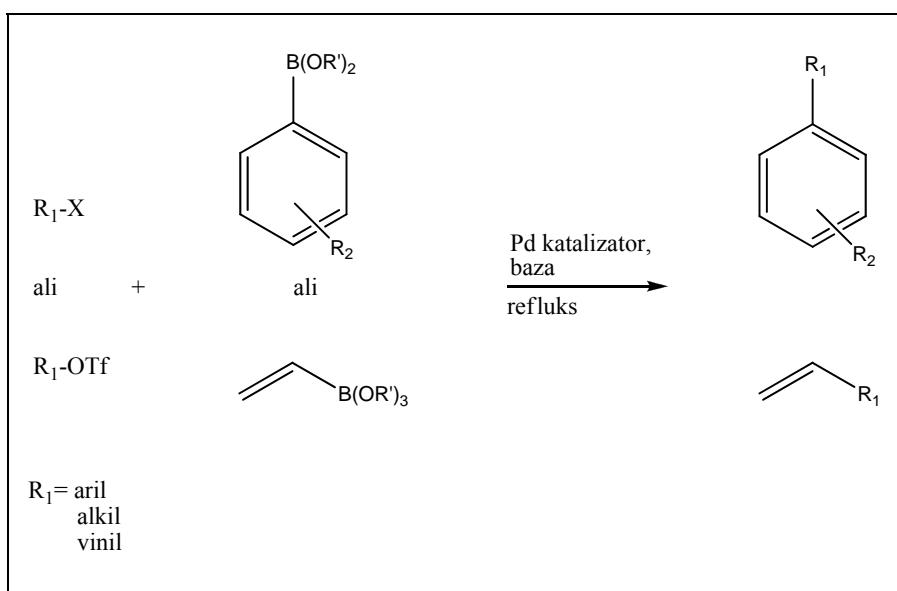
Inhibitorna aktivnost 17 β -HSD tipa 1 inhibitorjev je največkrat izražena kot IC₅₀ vrednost, vendar jo je med posameznimi študijami težko primerjati, saj se eksperimentalni pogoji pogosto razlikujejo. Študije inhibicije izvajajo v prisotnosti različnih koncentracij in virov encima: izolirani človeški encim, različni rekombinantni encimi, različni homogenati celic z izraženim encimom, živalski encim, celice z encimom iz različnih živalskih in človeških tkiv. Prav tako študije izvajajo v različnih pufrih pri različnih pH-jih in v prisotnosti različnih kofaktorjev, kar vse lahko vpliva na rezultat. Zato je priporočljiva uporaba splošne pozitivne kontrole za inhibicijo 17 β -HSD tipa 1, ki bi omogočala primerjavo rezultatov med različnimi študijami (v našem primeru je to ekvilin, steroidni inhibitor 17 β -HSD tipa 1) (Slika 11).

**Slika 11:** Struktura ekvilina

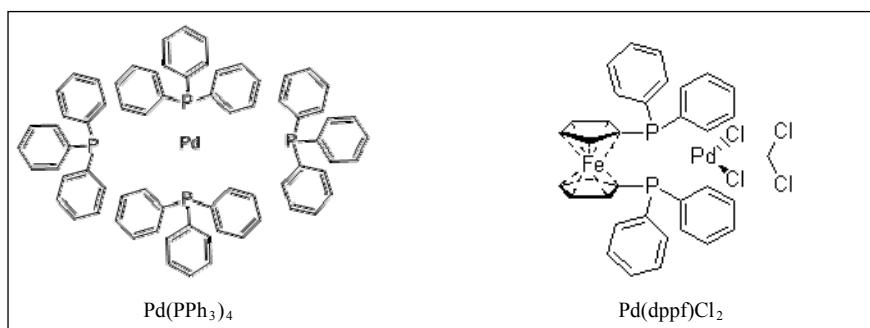
Zelo pomembno pri načrtovanju selektivnih inhibitorjev 17 β -HSD tipa 1 je, da ne inhibirajo 17 β -HSD tipa 2, saj ta encim katalizira ravno obratno reakcijo, pretvarja estradiol v estron in ima zaščitno vlogo pred razvojem raka. Pomembno je tudi, da se ne vežejo na receptorje za estrogene in ne delujejo estrogeno, saj s tem lahko sami povečajo proliferacijo in rast celic (19). Potencialnim inhibitorjem 17 β -HSD tipa 1 zato v prvotnih fazah razvoja določajo tudi inhibitorno aktivnost za 17 β -HSD tipa 2 ter afiniteto do ER α in ER β (33).

1.6. SUZUKIJEVA REAKCIJA

Suzukijeva reakcija je vsestranski postopek za tvorbo vezi ogljik-ogljik. Izhodni reagenti so najpogosteje aril-, alkil- ali vinilhalidi ali triflati in aril- ali vinilboronske kisline ali boronatni estri (Slika 12) (35-37). Derivati boronske kisline se v primerjavi z boronatnimi estri uporabljajo pogosteje, saj so komercialno dostopni, termostabilni ter niso občutljivi na prisotnost vlage in kisika (38).

**Slika 12:** Shema Suzukijeve reakcije

Za potek reakcije je potrebna prisotnost specifičnega katalizatorja. Najpogosteje so to različne paladijeve spojine, predvsem tetrakis(trifenilfosfin) paladij ($Pd(PPh_3)_4$) (Slika 13) (35), pa tudi paladijev (II) (1,1'-bis(difenilfosfino)ferocen) klorid ($Pd(dppf)Cl_2$) (Slika 13) (38), paladijev acetat (39), $Pd/P(t\text{-}Bu)_2Me$ (39) in še nekateri drugi.



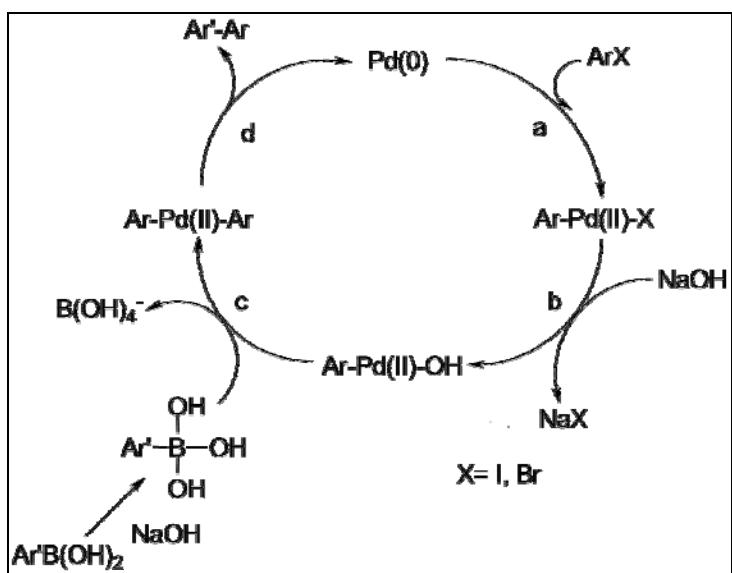
Slika 13: Shema dveh paladijevih katalizatorjev: $Pd(PPh_3)_4$ in $Pd(dppf)Cl_2$

Reakcijo je prvič opisal Akira Suzuki leta 1979. Sintetiziral je (E,E)-1-fenil-1,3-oktadien iz 1-heksendisiamil borana in (E)-1-bromo-2-feniletena ob prisotnosti katalizatorja tetrakis(trifenilfosfin)paladija in baze natrijevega metoksida, etoksida, acetata ali hidroksida v THF in pri tem dobil zadovoljiv izkoristek. Leta 2010 je Suzuki za ta izum prejel Nobelovo nagrado za kemijo (35).

V zadnjem desetletju se reakcija zelo pogosto uporablja za tvorbo C-C vezi predvsem pri spojinah, ki imajo v strukturi sp^2 hibridizirane atome (36). Uporabna je v optiki za sintezo spojin, ki imajo v strukturi elektron donorske in elektronakceptorske skupine, možna je priprava derivatov poli(2,7-karbazola), ki se uporablajo za sončne celice, 3,4-disubstituiranih kinolin-2-(1H)-onov, ki delujejo antikancerogeno, protivirusno in antihipertenzivno, nendaravnih aminokislin, diarilketonov, nekaterih učinkovin, ki delujejo proti virusu HIV, in antibiotika vankomicina, katerega sinteza je dolgo časa predstavljala velik izziv (35).

1.6.1. MEHANIZEM SUZUKIJEVE REAKCIJE

Tako kot velja za večino ostalih reakcij sklapljanja, ki jih katalizirajo prehodne kovine, je tudi Suzukijeva reakcija sestavljena iz treh osnovnih stopenj: oksidativne adicije, transmetaliranja in reduktivne eliminacije (Slika 14).



Slika 14: Mehanizem Suzukijeve reakcije

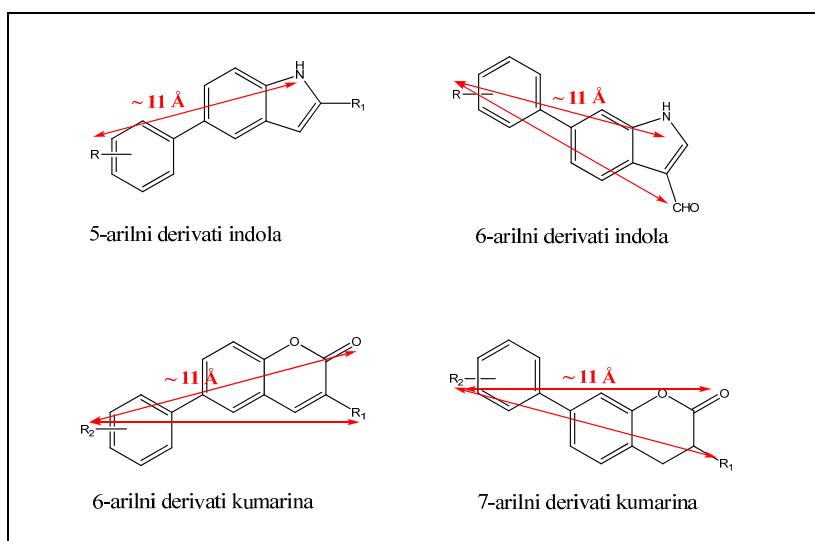
Najprej se z oksidativno adicijo na Pd(0) veže 1-alkenil-, 1-alkinil-, alil- ali arilhalid. Pri tem pride do aktivacije vezi C-X (X = I, Cl, Br, O). Nastane stabilen trans-6-paladijev (II) kompleks (Slika 14 a). Stereokemijske lastnosti alkenilhalidov se ohranijo, pri alkil- in arilhalidih pa pride do inverzije konfiguracije (38, 40). Prva stopnja je odločilna za potek Suzukijeve reakcije (39).

Za proces transmetaliranja med organopaladijevim (II) kompleksom in organoborovo spojino je pogosto potrebna baza. Ta poveča nukleofilnost borovega atoma (Slika 14 b, c). Reduktivna eliminacija biarila poteče samo pri cis-kompleksu. Pri trans oblikah mora priti najprej do izomerizacije. Pd(II) se v tej stopnji reducira nazaj do Pd(0) (Slika 14 d) (38, 40, 41).

Pri reakciji pogosto nastajajo tudi stranski produkti. Boronska kislina lahko reagira s fenilno skupino iz trifenilfosfinskega liganda, kar se dogaja predvsem v primerih, ko kot reaktante v reakciji uporabimo arilbromide. Če reakcija poteka zelo počasi ali če je prisoten kisik, pa so stranski produkti pogosto biarili, ki nastajajo s spajanjem dveh fenilboronskih kislin, kar je pogosto predvsem pri boronskih kislinah, ki imajo na fenilni obroč vezane elektronakceptorske skupine (40).

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je uporaba Suzukijeve reakcije pri sintezi 5- in 6-arylnih derivatov indola ter 6- in 7-arylnih derivatov kumarina kot steroidomimetičnih inhibitorjev 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1. Osrednji del spojin je hidrofoben in planaren kot steroidni skelet substrata s po eno polarno skupino na vsaki strani. Razdalja med njima je približno 11 Å, kolikor znaša razdalja med kisikoma na mestih 3 in 17 v estronu (Slika 15).



Slika 15: Strukture 5- in 6-arylnih derivatov indola ter 6- in 7-arylnih derivatov kumarina z označenimi razdaljami med polarnimi skupinami

Arilne derivate indola bomo sintetizirali iz različno substituiranih derivatov 5- in 6-bromoindola ter substituiranih fenilboronskih kislin ob prisotnosti različnih katalizatorjev, topil in baz. Derivati fenilboronske kisline so komercialno dostopni, vendar bomo 4-metoksifenilboronsko kislino pripravili tudi sami iz anizola.

Arilni derivati kumarinov na mestu 6 in 7 so se že izkazali kot selektivni inhibitorji 17 β -HSD tipa 1. Na Fakulteti za farmacijo so jih pripravili s Suzukijevim reakcijom, pri kateri so uporabili predvsem fenilne derivate boronskih kislin z elektronondonorskimi skupinami. V tem delu bomo skušali pripraviti 6- in 7-arylne derivate kumarinov z elektronakceptorsko skupino na uvedenem arilnem delu. Uporabili bomo derivate 6-bromo ali 7-triflikumarina ter fenilne derivate boronskih kislin z elektronakceptorskimi skupinami. Reakcije bomo izvajali v prisotnosti različnih katalizatorjev, topil in baz. Skušali bomo izolirati čist produkt in pri tem dobiti čim boljši izkoristek.

Nekaterim sintetiziranim arilindolom bomo določili inhibitorno aktivnost na rekombinantni 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenazi tipa 1, ki jo bomo izrazili kot odstotek inhibiranega encima pri dveh različnih koncentracijah spojine. Primerjali jo bomo z inhibitorno aktivnostjo arilnih derivatov kumarina z elektrondonorskimi skupinami, ki so jih na Fakulteti za farmacijo že sintetizirali in jim določili inhibitorno aktivnost na omenjenem rekombinantnem encimu. Študije inhibicije so bile izvdene pri enakih pogojih, zato lahko vrednosti med sabo primerjamo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri sinteznem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev Acros, Aldrich, Fluka, Merck. Kumarinski derivati 3-acetyl-2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat, 2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat, 3-acetyl-6-bromo-2H-kromen-2-on in etil-6-bromo-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat, iz katerih smo sintetizirali biarile, so bili pripravljeni na Fakulteti za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana. Brezvodna topila smo pripravili z destilacijo.

3.2. METODE

3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TPK) Uporabljali smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze so navedene pri vsaki spojni posebej. Za detekcijo lis smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm ter orositvene reagente:

- 0,05M FeCl₃ v 5% HClO₄ (1:50) (orositveni reagent za indole)
- ninhidrin (orositveni reagent za amine)
- 2,4- dinitrofenilhidrazin (orositveni reagent za aldehyde in ketone)
- FeCl₃ (orositveni reagent za fenole)

Kolonska kromatografija pod tlakom (FLASH) Za čiščenje nekaterih spojin smo kot separacijsko tehniko uporabili kolonsko kromatografijo pod tlakom. V vseh primerih je bila stacionarna faza silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck), uporabili pa smo različne mobilne faze. Običajno smo najprej spirali z bolj nepolarnim topilom, nato pa smo postopoma dodajali bolj polarno topilo (gradientni način).

Isolera One Biotage Za čiščenje manjših količin produktov smo uporabili Isolero One Biotage, avtomatiziran postopek, s katerim z izbiro gradiента največ 4 topil dosežemo boljše ločevanje. Uporabili smo različne mobilne faze in so navedene pri vsaki spojni

posebej. Prostotnost produkta smo spremljali pri 2 λ (254 in 366 nm). Določili smo vrednost absorbance, pri kateri smo začeli zbirati frakcije. Isolera One omogoča tudi spremeljanje pretoka (1-200 mL/min) in volumna frakcij. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck).

3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

Jedrska magnetna resonanca (NMR) NMR spektre so posneli na NMR spektrometru Bruker ADVANCE DPX₃₀₀ na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, NMR center. Kot interni standard so uporabili TMS, kot topilo pa CDCl₃, DMSO-d₆ in CD₃OD. Za reševanje NMR spektrov smo uporabljali računalniški program Mestrec 4.8.6. proizvajalca MESTRELAB RESEARCH SL.

Infrardeča spektroskopija (IR) IR spektre smo posneli na spektrometru Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Masna spektroskopija (MS) Masne spektre so posneli na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI ali FAB tehniko in na masnem spektrometru AutoSpec Q (proizvajalec: Micromass, Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko (ionizacija z elektrorazprševanjem) v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.2.3. ELEMENTNA ANALIZA

Relativno vsebnost ogljika in vodika pri novih spojinah so določili z analizatorjem Perkin-Elmer 240 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

3.2.4. DOLOČANJE TALIŠČ

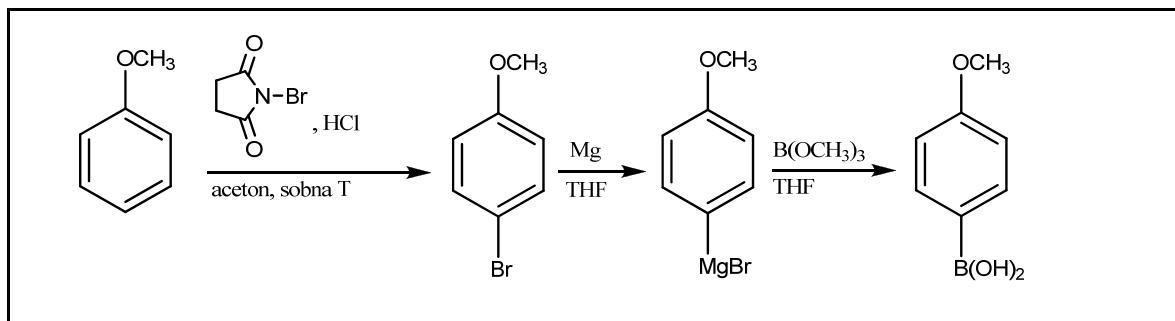
Tališča smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorigirana.

3.2.5. NOMENKLATURA, RISANJE SPOJIN IN DOLOČANJE RAZDALJ MED ATOMI V MOLEKULAH

Vse strukturne formule smo narisali v programu ChemBioDraw Ultra 11.0. S tem programom smo si pomagali tudi pri poimenovanju spojin v skladu z IUPAC nomenklaturo. Razdalje med atomi v molekulah smo ugotavljali s pomočjo programa Chem 3D Ultra 11.0. Pri iskanju spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder-Scholar.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. SINTEZA 4-METOKSIFENILBORONSKE KISLINE



V bučki smo v 150 mL acetona raztopili anizol (9 g, 83,1 mol, 9,06 mL). Po dodatu N-bromosukcinimida (14,82 g, 83,1 mol) se je raztopina obarvala rumeno. Mešali smo pri sobni temperaturi, dokler se raztopina ni razbarvala.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v heksanu. Zmes smo ohladili na ledeni kopeli. Pri tem so izpadli kristali N-bromosukcinimida, ki smo jih odstranili s filtracijo z odsesavanjem, heksan pa smo nato odparili pod znižanim pritiskom. Dobili smo produkt 4-bromoanizol. Strukturo smo preverili z NMR in takoj nadaljevali s sintezo.

V suho okroglo bučko smo natehtali magnezij (2 g, 0,08 mol), dodali kristalček joda in mešali na magnetnem mešalu. Za tem smo dodali suh THF (250 mL). Raztopina se je nato mešala pri temperaturi 70°C. Med mešanjem smo s kanulo po kapljicah dodajali v THF raztopljen 4-bromoanizol (13,76 g, 0,07 mol). Ko smo dodali vsega, smo temperaturo povišali na 90°C in pri tej temperaturi mešali dve uri.

Po dveh urah smo raztopino ohladili na temperaturo -78°C. Po kapljicah smo dodali trimetil borat (15,29 g, 0,15 mol, 16,4 mL) in nato pustili, da se je zmes mešala pri tej temperaturi še eno uro, potem pa smo bučko postavili na sobno temperaturo.

Dodali smo 200 mL 1M HCl in 2 x ekstrahirali z dietiletrom. Združili smo etrne faze in odparili topilo pod znižanim tlakom. Sledila je prekristalizacija iz toluena: dolili smo toluen in segreli do vrenja, da so se delci raztopili, za tem pa ohladili na sobno temperaturo in nato postavili v hladilnik. Izpadli so kristali 4-metoksifenilboronske kisline, ki smo jih filtrirali z odsesavanjem in sušili do konstantne mase (42). Strukturo produkta smo potrdili z NMR.

4.2. SINTEZA ARILNIH DERIVATOV INDOLA

Arilne derivate indola smo sintetizirali po **postopkih A-J**. Spojine **1-10** in spojina **13** so bile znane in večinoma tudi komercialno dostopne, že preden smo jih mi v diplomskem delu pripravili, vendar za spojine **4**, **7**, **9** in **10** nimamo dostopa do eksperimentalnih podatkov o tališču.

POSTOPEK A

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola in derivat fenilboronske kisline (2 ekv.), ju raztopili v 4 mL topila EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom.

V drugo bučko smo dali katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), v 2,5 mL prečiščene vode raztopljeno bazo Na₂CO₃ (2,5 ekv.) ter 4 mL topila EtOH/toluen (1/1). Prepihovali smo z argonom in nato s pomočjo kanule to raztopino prenesli v prvo.

Raztopina se je mešala pri temperaturi vrelišča (110°C) eno uro. Nato smo dodali katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), ki smo ga predhodno raztopili v 4 mL EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom. Nadaljevali smo z mešanjem pri temperaturi vrelišča. Čez eno uro smo spet dodali isti katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), raztopljen v 4 mL EtOH/toluen (1/1) in prepihan z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala še 12 ur pri temperaturi vrelišča (36, 43).

POSTOPEK B

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) in katalizator faznega prenosa Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.), vse raztopili v 4 mL zmesi topil EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom.

V drugi bučki smo v 2 mL etanola in 2 mL toluena raztopili Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), prepihali z argonom in prenesli v prvo bučko.

K tej raztopini smo nato dodali še Na₂CO₃ (2,5 ekv.), ki smo ga pred tem raztopili v prečiščeni vodi (2,5 mL) in prepihali z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča (110°C) eno uro. Nato smo dodali katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), raztopljen v 4 mL topila EtOH/toluen (1/1) in predhodno prepihan z argonom. Mešali smo pri temperaturi vrelišča in po eni uri ponovno dodali katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.), ki

smo ga pred tem raztopili v 4 mL EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča še 12 ur (44).

POSTOPEK C

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilnoronske kisline (2 ekv.), K₂CO₃ (10 ekv.) in katalizator faznega prenosa Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.). Dodali smo 5 mL prečiščene vode in prepihovali z argonom 10 min. Nato smo dodali še 4 mL topila EtOH/toluen (1/1), da so se spojine raztopile, in zopet prepihovali z argonom 10 min.

Potem smo dodali katalizator Pd(OAc)₂ (0,01 ekv.), ki smo ga raztopili v 1,5 mL topila EtOH/prečiščena voda (2/1) in zopet prepihovali z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča (110°C) 4 ure (45).

POSTOPEK D

V bučki smo v 8 mL THF raztopili derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola in derivat fenilboronske kisline (2 ekv.). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, nato pa dodali katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,06 ekv.), ki smo ga prej raztopili v 8 mL THF in prepihali z argonom, in za tem še bazo Na₂CO₃ (3 ekv.), raztopljeno v 3 mL prečiščene vode in prav tako prepihano z argonom. Reakcijsko zmes se je nato mešala eno uro pri sobni temperaturi, nato pa pri temperaturi vrelišča (85°C) 12 ur (37).

POSTOPEK E

V bučko smo v 8 mL DMF raztopili derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2,5 ekv.) in katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,02 ekv.) ter prepihovali z argonom. Tej raztopini smo dodali K₂CO₃ (10 ekv.), ki smo jo prej raztopili v prečiščeni vodi (6,5 mL) in prepihali z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča (120°C) 12 ur (46).

POSTOPEK F

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) ter katalizatorja Pd(PPh₃)₄ (0,06 ekv.) in Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.). Vse smo raztopili v 8 mL DMF in prepihovali z argonom 15 min. Nato smo dodali bazo Na₂CO₃ (3 ekv.),

raztopljeno v 2 mL prečiščene vode in prepihano z argonom. Reakcijska zmes se je najprej 10 min mešala pri sobni temperaturi, nato pa 12 ur pri temperaturi vrelišča (120°C) (46).

POSTOPEK G

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.), katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,06 ekv.) in katalizator faznega prenosa Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.). Vse smo raztopili v 8 mL THF in prepihovali z argonom 15 min. K tej raztopini smo nato dodali Na₂CO₃ (3 ekv.), ki smo jo pred tem raztopili v 2 mL prečiščene vode in prepihali z argonom. 5 min smo mešali pri sobni temperaturi, nato pa pri temperaturi vrelišča (70°C) 12 ur (37).

Nato smo dodali še raztopino katalizatorja Pd(dppf)Cl₂ (0,06 ekv. v 3 mL DMF in 3 mL THF), ki smo jo prej prepihali z argonom.

POSTOPEK H

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola in ga raztopili v 4 mL toluena. K tej raztopini smo dodali v etanolu (4 mL) raztopljen derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) ter vodno raztopino katalizatorja Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.) in baze Na₂CO₃ (3 ekv.). Vse skupaj smo prepihovali z argonom 15 min (47).

Nato smo dodali še katalizator Pd(OAc)₂ (0,04 ekv.), raztopljen v 4 mL EtOH in prepihan z argonom. Mešali smo pri temperaturi vrelišča (110°C) 12 ur.

POSTOPEK I

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) in katalizator faznega prenosa Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.). Vse smo raztopili v 4 mL zmaesi topil EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom.

V drugi bučki smo v 10 mL zmesi topil etanola in toluena (1/1) raztopili Pd(PPh₃)₄ (0,06 ekv.), prepihali z argonom in raztopino s kanulo prenesli v prvo bučko.

Nato smo dodali še bazo Na₂CO₃ (2,5 eq), ki smo jo pred tem raztopili v prečiščeni vodi (2,5 mL) in prepihali z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča (110°C) približno 12 ur (44).

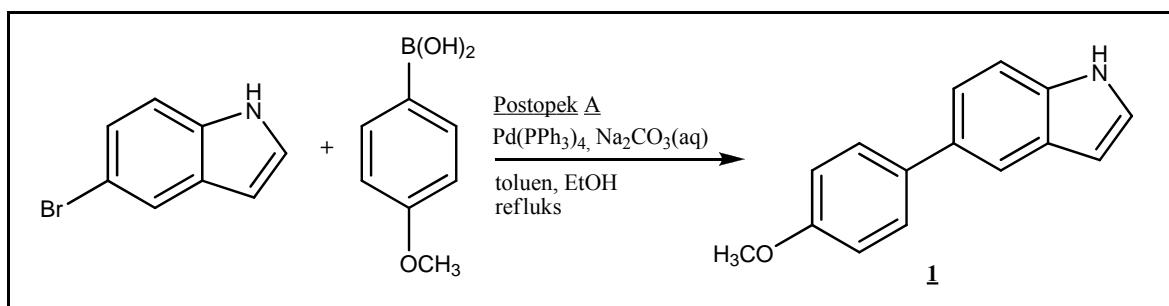
Nato smo dodali katalizator $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,02 ekv.), ki smo ga raztopili v 1 mL EtOH in 0,5 mL prečiščene vode in prepihali z argonom. Reakcijska zmes se je ob refluksu mešala še 4 ure.

POSTOPEK J

V bučko smo natehtali derivat 5- ali 6-bromo-1H-indola, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,01 eq) in katalizator faznega prenosa $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$ (1 ekv.). Vse smo raztopili v 5 mL dioksana in prepihovali z argonom 10 min. Nato smo dodali 2,5 mL 1 M raztopine Na_2CO_3 , ki smo jo prej prepihali z argonom. 5 min smo mešali pri sobni temperaturi, nato pa pri temperaturi vrelišča (90°C) 12 ur (44).

4.2.1. SINTEZA 5-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 5-BROMO-1H-INDOLA

4.2.1.1. Sinteza 5-(4-metoksifenil)-1H-indola (1)



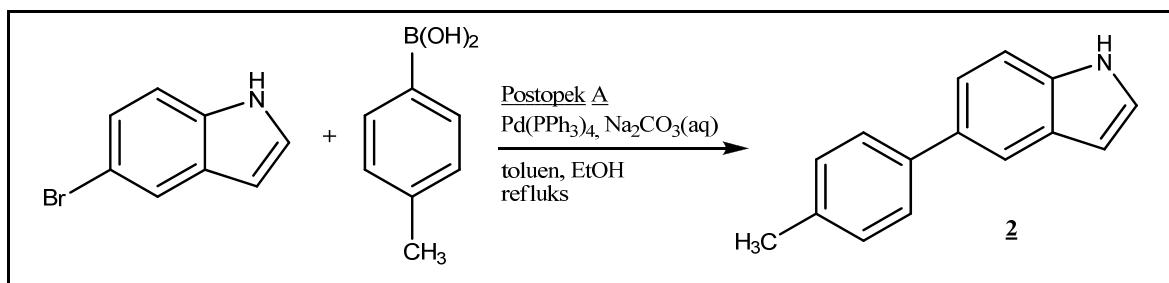
Sintezo spojine smo izvedli po **postopku A** (5-bromo-1H-indol 320 mg, 1,63 mmol; 4-metoksifenilboronska kislina 500 mg, 3,29 mmol).

Izolacijo in čiščenje smo izvedli tako, da smo v ohlajeno reakcijsko zmes vlili 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl in z lijem ločnikom ločili vodno fazo od organske. Vodno fazo smo še 2x ekstrahirali z etilacetatom (2 x 30 mL). Združili smo organske faze in dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄, ki smo ga kasneje odfiltrirali z odsesavanjem. Na rotavaporju smo pod znižanim tlakom odparili topilo.

Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo pri povišanem tlaku. Najprej smo pripravili suh nanos. Na začetku smo spirali s čistim heksanom, nato pa povečevali delež etilacetata do razmerja heksan/EtOAc = 7/3. S TPK smo preverili, v katerih frakcijah je prisoten produkt. Nato smo te frakcije združili in na rotavaporju odparili topilo.

5-(4-metoksifenil)-1H-indol	
M_r	223,27
Izgled	prašek svetlo roza barve
Rf	0,82 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	127-129°C (109°C; (48))
Izkoristek	61,6 %
MS (ESI)	224,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 3,89 (s, 3H, CH ₃ O); 6,61-6,63 (m, 1H, Ar-H); 6,99-7,04 (m, 2H, Ar-H); 7,25 (m, 1H, Ar-H); 7,41-7,45 (m, 2H, Ar-H); 7,58-7,63 (m, 2H, Ar-H); 7,84 (d, 1H, Ar-H, J = 0,66 Hz); 8,16 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3419, 2926, 2358, 1603, 1519, 1468, 1449, 1240, 1146, 1034, 890, 841, 806, 767, 738, 606 cm ⁻¹

4.2.1.2. Sinteza 5-p-tolil-1H-indola (**2**)



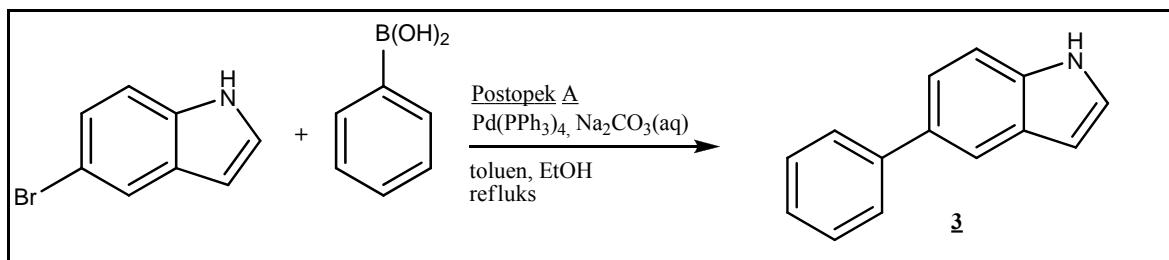
Sintezo spojine smo izvedli po **postopku A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; p-tolilboronska kislina 277 mg, 2,04 mmol).

Izolacijo smo izvedli tako kot pri spojni 5-(4-metoksifenil)-1H-indolu (**1**). Produkt smo čistili z »Isolero One Biotage«. Na začetku smo spirali z nepolarnim heksanom, nato smo polarnost mobilne faze povečevali s postopnim dodajanjem DKM do razmerja heksan/DKM = 7/3. Prisotnost produkta v frakcijah smo preverili s TPK. Te frakcije smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom.

Ker produkt na videz ni bil homogen, smo v dietiletru (25 mL) raztopili produkt, odfiltrirali neraztopljene delce ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo oljnati preostanek, ki je ustrezal čistemu produktu.

5-p-tolil-1H-indol	
M_r	207,27
Izgled	olje svetlo rumene barve
Rf	0,17 (MF = heksan/DKM = 7/3)
Izkoristek	67,8 %
MS (ESI)	208,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 2,43 (s, 3H, CH ₃); 6,62-6,64 (m, 1H, Ar-H); 7,25-7,30 (m, 3H, Ar-H); 7,47 (d, 2H, Ar-H, <i>J</i> = 1,20 Hz); 7,57-7,60 (m, 2H, Ar-H); 7,87 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 0,6 Hz); 8,16 (s, 1H, NH)
IR (NaCl)	3415, 3020, 2862, 1469, 1417, 1320, 1092, 892, 801, 764, 727 cm ⁻¹

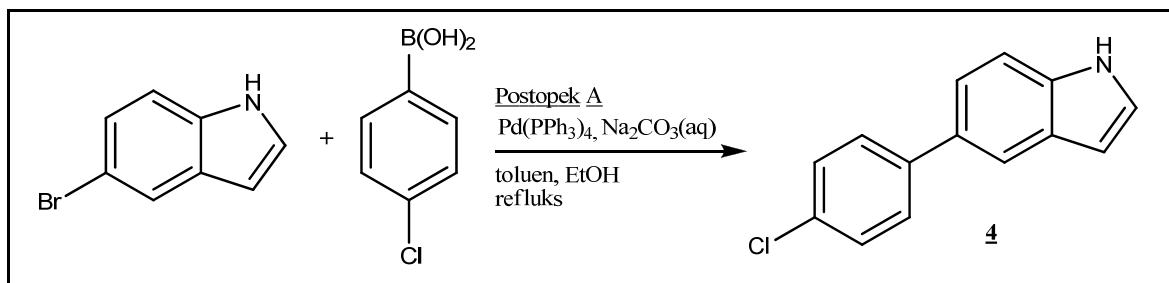
4.2.1.3. Sinteza 5-fenil-1H-indola (3)



Za sintezo spojine smo uporabili **postopek A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; fenilboronska kislina 249 mg, 2,04 mmol), izolacijo in čiščenje pa smo izvedli tako kot pri spojni 5-p-tolil-1H-indolu (**2**).

5-fenil-1H-indol	
M_r	193,24
Izgled	prašek svetlo roza barve
Rf	0,18 (MF = heksan/DKM = 7/3)
Tališče	71-73°C (74°C; (49))
Izkoristek	52,8 %
MS (ESI)	194,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 6,63-6,65 (m, 1H, Ar-H); 7,33-7,36 (m, 1H, Ar-H); 7,44-7,49 (m, 4H, Ar-H); 7,67-7,70 (m, 2H, Ar-H); 7,89 (d, 2H, Ar-H, <i>J</i> = 0,6 Hz); 8,19 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3408, 1469, 1436, 1088, 880, 756, 701 cm ⁻¹

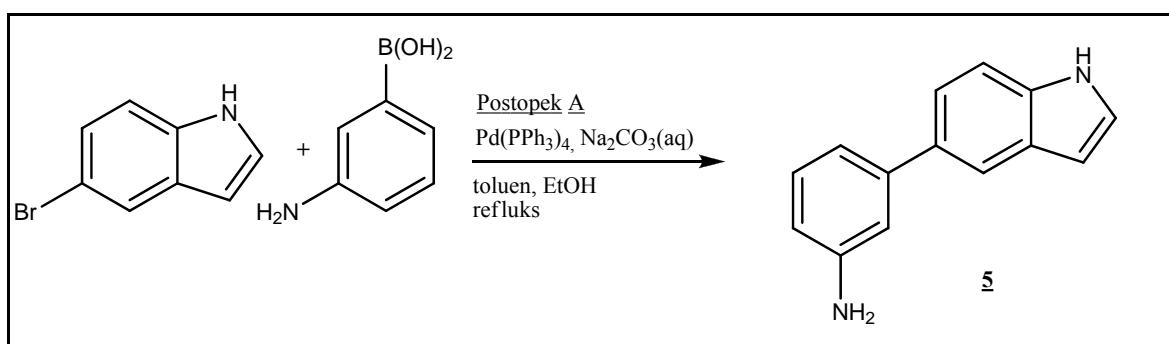
4.2.1.4. Sinteza 5-(4-klorofenil)-1H-indola (**4**)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-klorofenilboronska kislina 319 mg, 2,04 mmol). Spojino smo izolirali in čistili tako kot 5-p-tolil-1H-indol (**2**).

5-(4-klorofenil)-1H-indol	
M_r	227,69
Izgled	kristali svetlo oranžne barve
Rf	0,79 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	80-84°C
Izkoristek	44,0 %
MS (ESI)	228,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 6,63-6,64 (m, 1H, Ar-H); 7,41-7,50 (m, 5H, Ar-H); 7,58-7,61 (m, 2H, Ar-H); 7,85 (s, 1H, Ar-H); 8,21 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3462, 1464, 1415, 1091, 886, 802, 732 cm ⁻¹

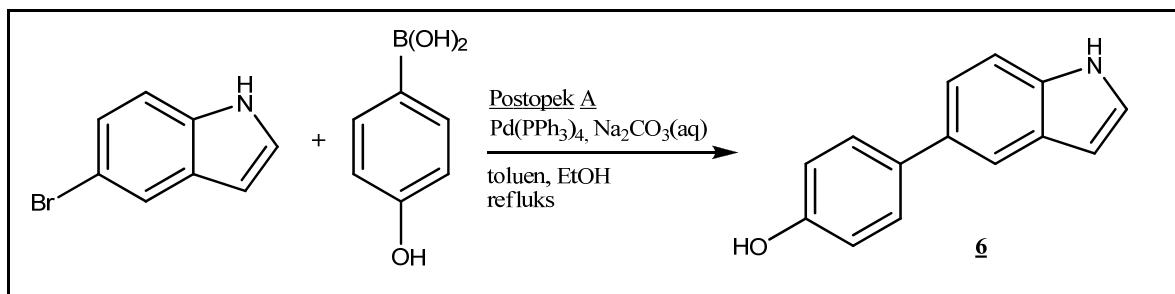
4.2.1.5. Sinteza 3-(1H-indol-5-il)anilina (**5**)



Za sintezo smo uporabili **postopek A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 3-aminofenilboronska kislina 316 mg, 2,04 mmol). Izolacijo in čiščenje smo izvedli tako kot pri spojini 5-p-tolil-1H-indolu (**2**), vendar smo na »Isoleri One Biotage« za spiranje namesto DKM uporabili etilacetat. Spirati smo začeli s heksanom. Delež etilacetata smo postopoma povečevali- od 0% do 30%.

3-(1H-indol-5-il)anilin	
M_r	208,26
Izgled	olje rjave barve
Rf	0,57 (MF = heksan/EtOAc = 1/1; bazična)
Izkoristek	32,5 %
MS (ESI)	209,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 3,76 (s, 2H, NH ₂); 6,62 (dd, 2H, Ar-H, <i>J</i> ₁ = 3,30 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,10 Hz); 6,66-6,69 (m, 1H, Ar-H); 7,00-7,01 (m, 1H, Ar-H); 7,06-7,10 (m, 1H, Ar-H); 7,25-7,27 (m, 1H, Ar-H); 7,45 (d, 2H, Ar-H, <i>J</i> = 1,2 Hz); 7,86 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 0,9 Hz); 8,18 (s, 1H, NH)
IR (NaCl)	3408, 1617, 1603, 1466, 1319, 1167, 871, 765 cm ⁻¹

4.2.1.6. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)fenola (**6**)

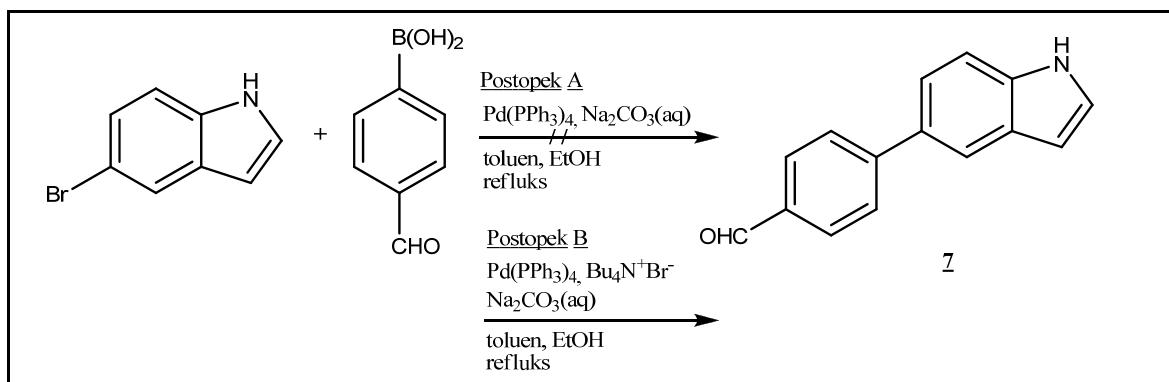


Za sintezo spojine smo uporabili **postopek A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-hidroksifenilboronska kislina 281 mg, 2,04 mmol). Izolacijo spojine smo izvedli tako kot pri spojini 5-p-tolil-1H-indolu (**2**), le da smo reakcijsko zmes pred dodatkom nasičene vodne raztopine NaCl nevtralizirali z 1 M HCl in šele nato ekstrahirali z etilacetatom (3 x 30 mL).

Produkt smo čistili na »Isoleri One Biotage«. Mobilna faza je bila zmes heksana in etilacetata. Spirati smo začeli s heksanom in nato delež etilacetata postopoma povečevali do 30 %.

4-(1H-indol-5-il)fenol	
M_r	209,24
Izgled	olje rjave barve
Rf	0,61 (MF = heksan/EtOAc = 1/1; kisla)
Izkoristek	32,4 %
MS (ESI)	210,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 6,44-6,45 (m, 1H, Ar-H); 6,81-6,84 (m, 2H, Ar-H); 7,28-7,31 (m, 1H, Ar-H); 7,33-7,34 (m, 1H, Ar-H); 7,40-7,49 (m, 3H, Ar-H); 7,69 (s, 1H, Ar-H); 9,33 (s, 1H, NH); 11,04 (s, 1H, OH)
IR (NaCl)	3412, 1654, 1592, 1504, 1469, 1435, 1384, 1344, 1315, 1253, 1174, 1105, 892, 838, 805, 766, 732 cm ⁻¹

4.2.1.7. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)benzaldehida (7)



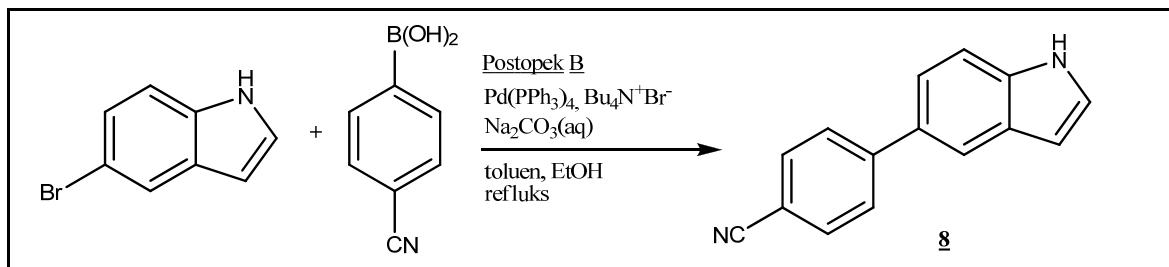
Sintezo spojine smo izvedli po **postopkih A** in **B** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-formilfenilboronska kislina 306 mg, 2,04 mmol).

Reakcija daje po **postopku A** zelo slab izkoristek. Na TPK ploščici je še vedno vidna lisa izhodne spojine. Z »Isolero One Biotage« nismo dobili ustrezno čistega produkta.

Postopek B se od prvega razlikuje le po tem, da smo v reakcijsko zmes na začetku dali en ekvivalent katalizatorja faznega prenosa Bu₄N⁺Br⁻, vendar ima ta očitno ključen pomen. Lise izhodne spojine na TPK ploščici nismo več videli, zato je sledilo še čiščenje in izolacija produkta. Izvedli smo ju tako kot pri spojini 3-(1H-indol-5-il)anilinu (**5**).

4-(1H-indol-5-il)benzaldehid	
M_r	221,25
Izgled	kristali svetlo oranžne barve
Rf	0,79 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	80-84°C
Izkoristek	44,0 %
MS (ESI)	222,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 6,52-6,54 (m, 1H, Ar-H); 7,41-7,43 (m, 1H, Ar-H); 7,91-8,05 (m, 7H, Ar-H); 10,04 (s, 1H, NH); 11,24 (s, 1H, CHO)
IR (KBr)	3462, 1464, 1415, 1091, 886, 802, 732 cm ⁻¹

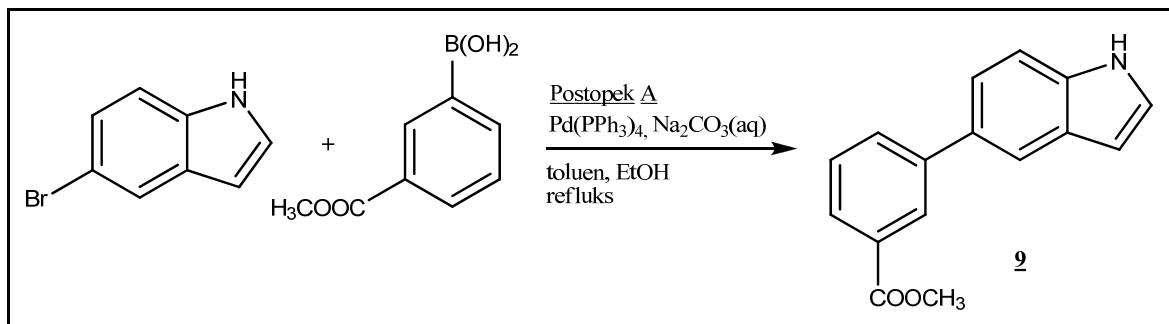
4.2.1.8. Sinteza 4-(1H-indol-5-il)benzonitrila (8)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku B** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 300 mg, 2,04 mmol). Izolacijo in čiščenje spojine smo izvedli enako kot pri spojnini 3-(1H-indol-5-il)anilinu (**5**).

4-(1H-indol-5-il)benzonitril	
M_r	218,25
Izgled	bel prašek
Rf	0,71 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	160-175°C (176-178°C; (50))
Izkoristek	27,9 %
MS (ESI)	219,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 6,52-6,53 (m, 1H, Ar-H); 7,41-7,43 (m, 1H, Ar-H); 7,48 (dd, 1H, Ar-H, <i>J</i> ₁ = 8,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz); 7,52 (d, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,7 Hz); 7,88-7,98 (m, 5H, Ar-H); 11,25 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3337, 2923, 2346, 2229, 1601, 1438, 1406, 1306, 1247, 1173, 1096, 1067, 890, 842, 806, 767, 734, 650, 626, 558 cm ⁻¹

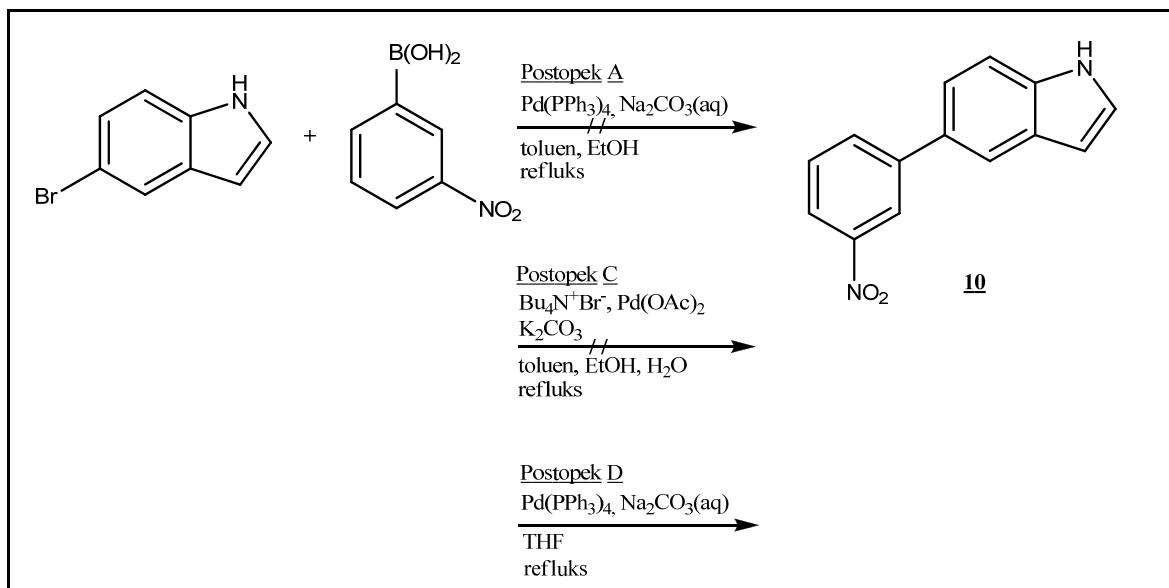
4.2.1.9. Sinteza metil 3-(1H-indol-5-il)benzoata (9)



Spojino smo sintetizirali po **postopku A** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 3-(metoksikarbonil)fenilboronska kislina 367 mg, 2,04 mmol). Produkt smo izolirali in čistili na enak način kot spojino 3-(1H-indol-5-il)anilin (**5**).

metil 3-(1H-indol-5-il)benzoat	
M_r	251,28
Izgled	kristali rjave barve
Rf	0,63 (MF = heksan:EtOAc = 1:1)
Tališče	103-106°C
Izkoristek	39,6 %
MS (ESI)	252,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 3,90 (s, 3H, CH ₃); 5,76 (s, 1H, Ar-H); 6,51-6,53 (m, 1H, Ar-H); 7,39-7,62 (m, 3H, Ar-H); 7,87-7,97 (m, 3H, Ar-H); 8,21-8,22 (m, 1H, Ar-H); 11,19 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3504, 3357, 2848, 1751, 1707, 1598, 1466, 1432, 1348, 1308, 1282, 1255, 1195, 1175, 1086, 920, 875, 783, 751, 681, 636 cm ⁻¹

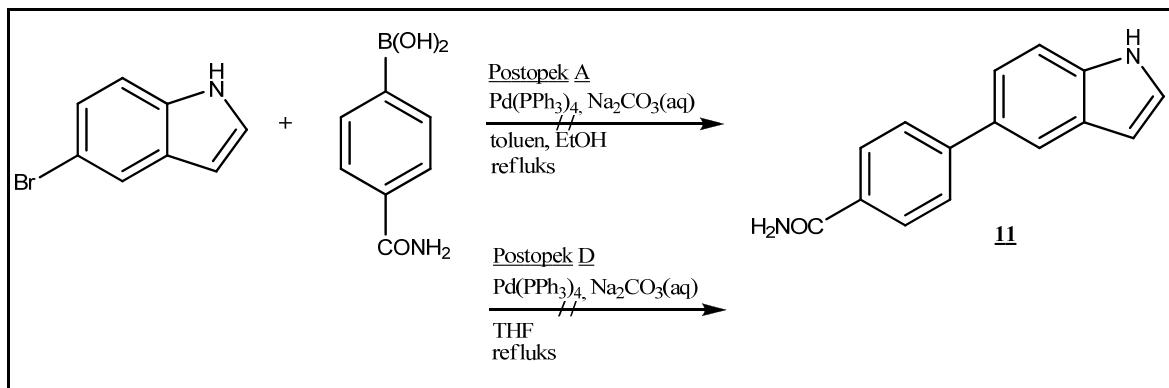
4.2.1.10. Sinteza 5-(3-nitrofenil)-1H-indola (**10**)



Sintezo spojine **10** smo izvedli po **postopkih A, C in D** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 3-nitrofenilboronska kislina 341 mg, 2,04 mmol). S **postopkoma A in C** nam ni uspelo dobiti čistega produkta, izkoristek reakcije, ki smo jo izvedli po **postopku D** pa je bil višji. Dobili smo produkt, ki smo ga čistili in izolirali tako kot spojino 3-(1H-indol-5-il)anilin (**5**), le da smo na »Isoleri One Biotage« uporabili večji gradient mobilne faze: začeli smo s heksanom, nato pa smo postopoma dodajali etilacetat do razmerja heksan/EtOAc = 4/1. Združili smo frakcije, v katerih je bil prisoten produkt in pod znižanim tlakom odparili topilo.

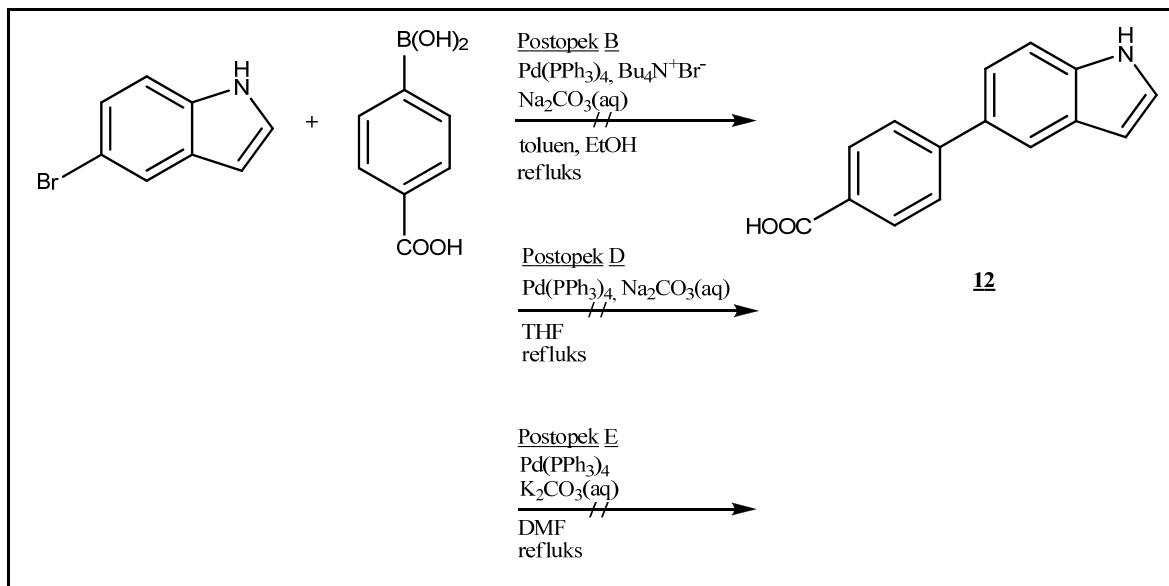
5-(3-nitrofenil)-1H-indol	
M_r	238,24
Izgled	rumeni kristali
Rf	0,50 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	120-127°C
Izkoristek	21,8 %
MS (ESI)	239,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 6,66-6,80 (m, 1H, Ar-H); 7,31-7,33 (m, 1H, Ar-H); 7,48-7,51 (m, 1H, Ar-H); 7,53-7,55 (m, 1H, Ar-H); 7,61 (dd, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 8,10 Hz); 7,94 (dd, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 0,90 Hz); 8,00 (ddd, 1H, Ar-H, <i>J</i> ₁ = 7,50 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,65 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,20 Hz); 8,17 (ddd, 1H, Ar-H, <i>J</i> ₁ = 7,80 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,25 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,20 Hz); 8,28 (s, 1H, NH); 8,54 (dd, 1H, Ar-H, <i>J</i> = 2,00 Hz)
IR (KBr)	3403, 3076, 2926, 2345, 1718, 1617, 1560, 1522, 1508, 1464, 1459, 1348, 1323, 1272, 1248, 1179, 1101, 1034, 895, 872, 764, 736, 679, 625, 554 cm ⁻¹

4.2.1.11. Poskus sinteze 4-(1H-indol-5-il)benzamida (**11**)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopkih A in D** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-karbamoilfenilboronska kislina 336 mg, 2,04 mmol), vendar nam v nobenem primeru ni uspelo izolirati čistega produkta. V NMR spektru so bili vedno prisotni še vrhovi nečistot.

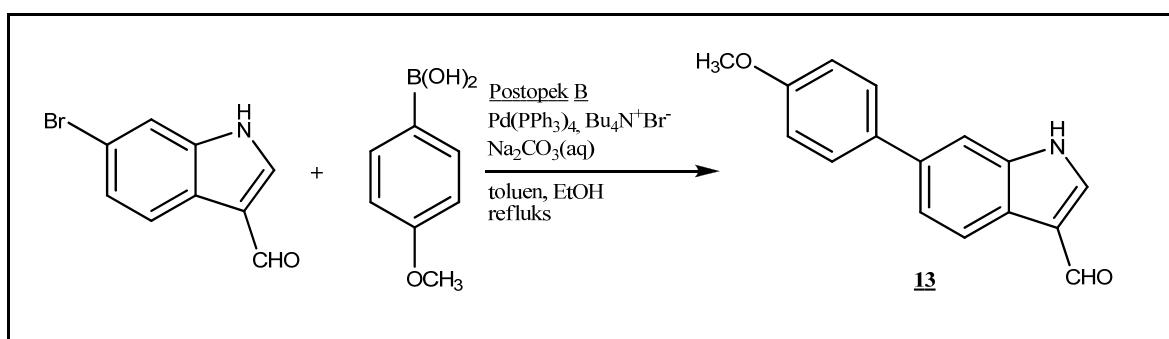
4.2.1.12. Poskus sinteze 4-(1H-indol-5-il)benzojske kislino (12)



Spojino **12** smo poskusili sintetizirati po **postopkih B, D** in **E** (5-bromo-1H-indol 200 mg, 1,02 mmol; 4-karboksifenilboronska kislina 339 mg, 2,04 mmol). Z nobenim od navedenih postopkov nam ni uspelo dobiti produkta. Reakcija sploh ni potekala ali pa smo dobili produkt, ki ni bil dovolj čist.

4.2.2. SINTEZA 6-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 6-BROMO-1H-INDOL-3-KARBALDEHIDA

4.2.2.1. Sinteza 6-(4-metoksifenil)-1H-indol-3-karbaldehida (13)

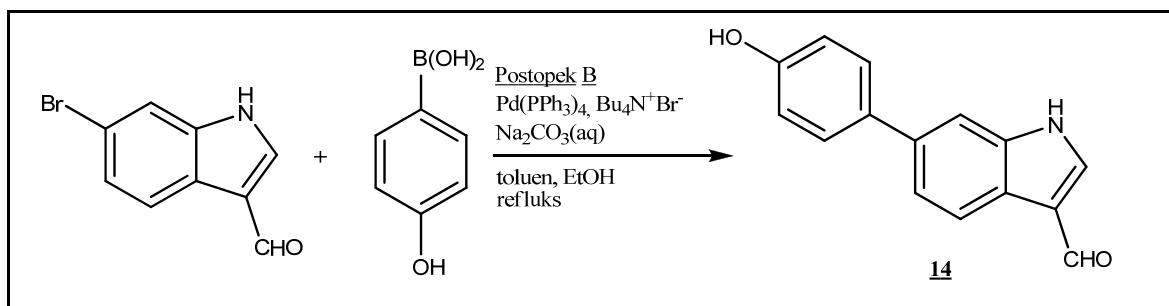


Sintezo spojine smo izvedli po **postopku B** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 4-metoksifenilboronska kislina 310 mg, 2,04 mmol). Ker je TPK pokazala

prisotnost produkta, smo produkt še izolirali in očistili. Izolacijo in čiščenje spojine smo izvedli enako kot pri spojini 3-(1H-indol-5-il)anilinu (**5**).

6-(4-metoksifenil)-1H-indol-3-karbaldehid	
M_r	251,28
Izgled	kristali svetlo oranžne barve
Rf	0,26 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	183–195°C
Izkoristek	31,3 %
MS (ESI)	252,1 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 3,81 (s, 3H, CH ₃); 7,04 (dd, 2H, Ar-H, J_1 = 6,9 Hz, J_2 = 2,1 Hz); 7,49 (dd, 1H, Ar-H, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 1,7 Hz); 7,48–7,67 (m, 3H, Ar-H); 8,19 (d, 1H, Ar-H, J = 8,1 Hz); 8,30 (d, 1H, Ar-H, J = 2,1 Hz); 9,95 (s, 1H, CHO); 12,14 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3448, 3205, 3119, 2969, 2931, 2801, 2743, 1637, 1534, 1450, 1432, 1271, 1238, 1175, 1120, 1087, 1035, 1018, 810 cm ⁻¹

4.2.2.2. Sinteza 6-(4-hidroksifenil)-1H-indol-3-karbaldehida (**14**)



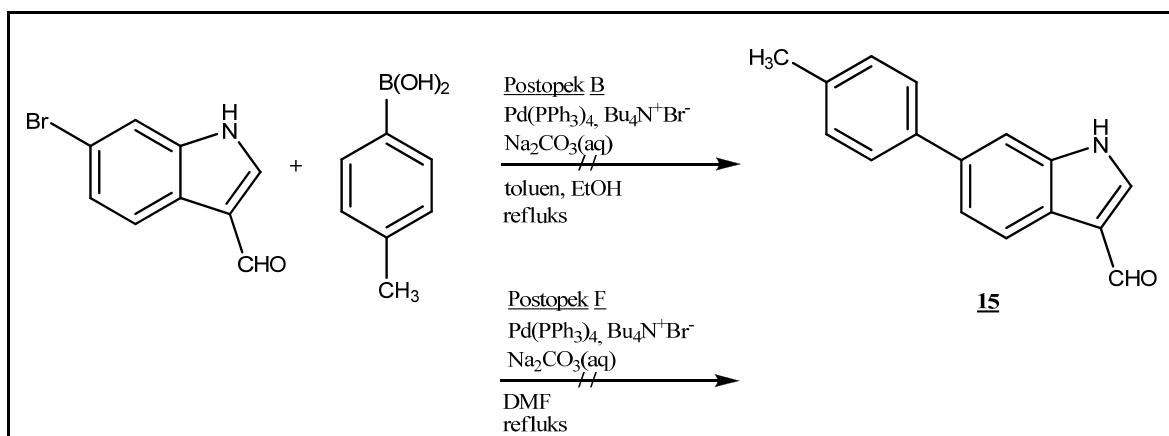
Za sintezo spojine smo uporabili **postopek B** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 67 mg, 0,30 mmol; 4-hidroksifenilboronska kislina 82 mg, 0,59 mmol), izolacijo pa smo izvedli tako kot pri spojini 5-(4-metoksifenil)-1H-indolu (**1**), le da smo pred dodatkom nasičene vodne raztopine NaCl reakcijsko zmes nakisali z 1 M HCl do pH = 2.

Čistili smo na »Isoleri One Biotage«. Spirati smo začeli s čistim heksanom, nato smo postopoma povečevali delež etilacetata do razmerja heksan/EtOAc = 1/1. S TPK smo preverili, kje se nahaja produkt. Te frakcije smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom.

6-(4-hidroksifenil)-1H-indol-3-karbaldehid	
M_r	237,25
Izgled	svetlo oranžni kristali

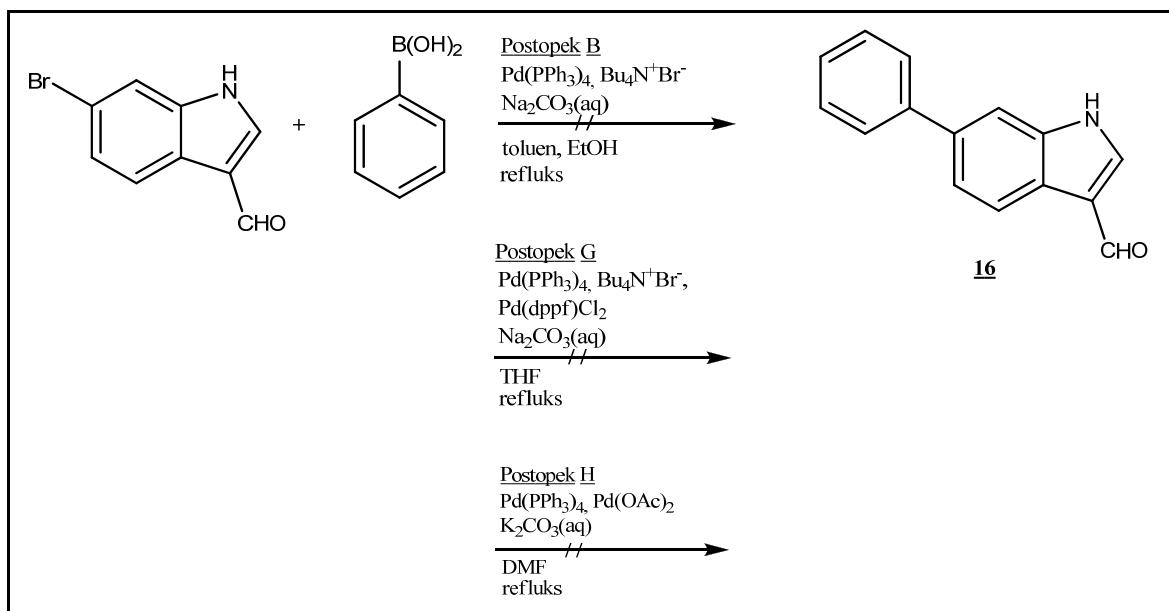
Rf	0,20 (MF = heksan/EtOAc = 1/1; kisla)
Tališče	91-102°C
Izkoristek	136,6 %
MS (ESI)	238,1 ($M + H$) ⁺
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₂ NO ₂ (m/z): 238,0868 ($M + H$) ⁺ ; dobljen rezultat (m/z): 238,0860 ($M + H$) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 6,87 (d, 2H, Ar-H, J = 8,1 Hz); 7,44 (dd, 1H, Ar-H, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 1,5 Hz); 7,47 (d, 2H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 7,50-7,63 (m, 1H, Ar-H); 8,10 (d, 1H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 8,28 (d, 1H, Ar-H, J = 3 Hz); 9,48 (s, 1H, OH); 9,94 (s, 1H, CHO); 12,11 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	3235, 1612, 1587, 1565, 1522, 1506, 1440, 1414, 1357, 1276, 1193, 1124, 1090, 816, 724, 694 cm ⁻¹

4.2.2.3. Poskus sinteze 6-p-tolil-1H-indol-3-karbaldehida (15)



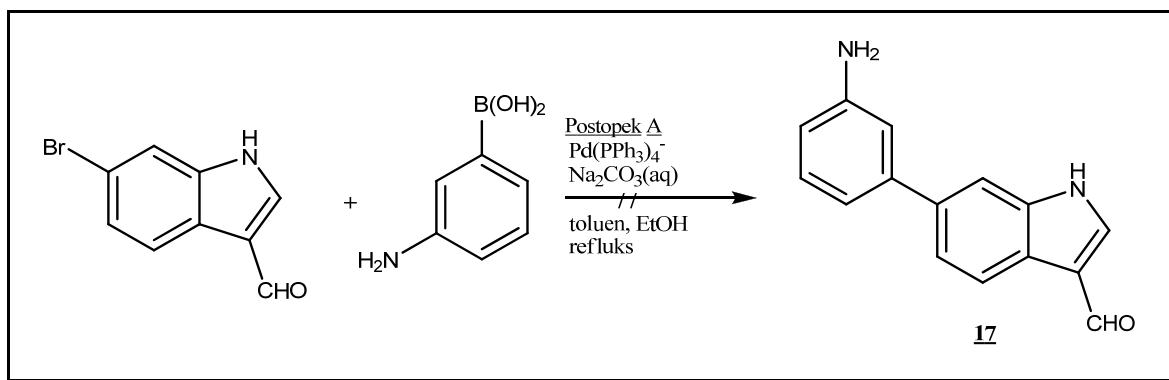
Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopkih B** in **F** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; p-tolilboronska kislina 277 mg, 2,04 mmol), vendar nam v nobenem primeru ni uspelo izolirati produkta. Po **postopku B** smo dobili veliko stranskih produktov, po **postopku F** pa reakcija sploh ni potekala, kar smo ugotovili s TPK. Na TPK ploščici se namreč lisa produkta ni pojavila.

4.2.2.4. Poskus sinteze 6-fenil-1H-indol-3-karbaldehida (16)

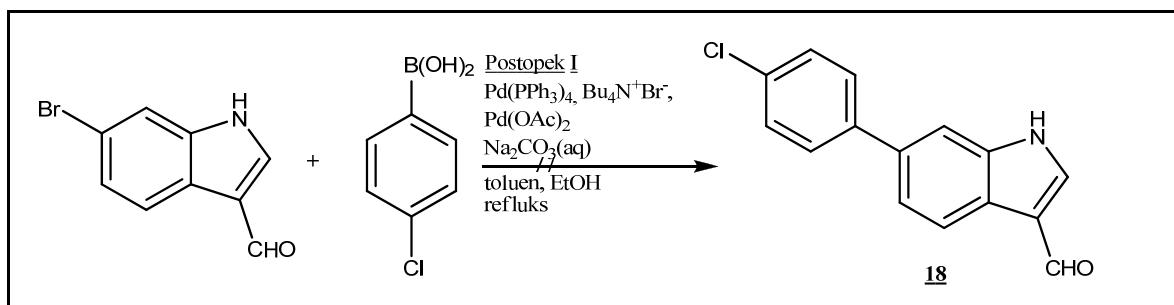


Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopkih B, G in H** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; fenilboronska kislina 249 mg, 2,04 mmol). Z NMR analizo smo ugotovili, da je produkt, pridobljen po **postopkih B in H** vseboval še mnogo nečistot, po **postopku G** pa reakcija sploh ni potekla.

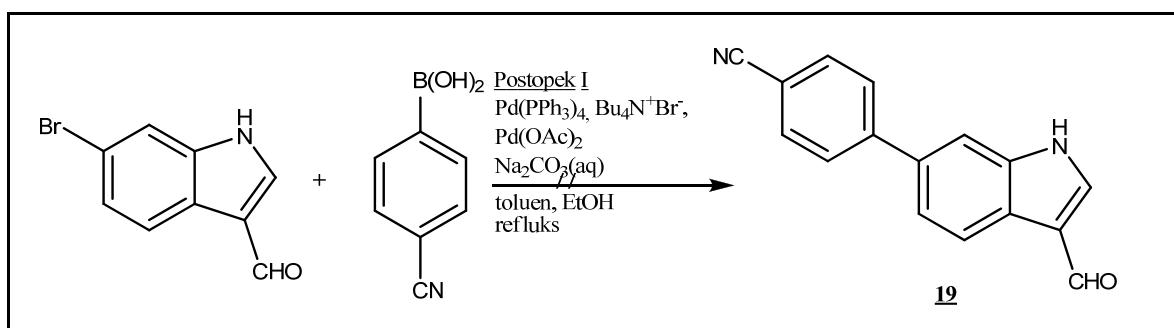
4.2.2.5. Poskus sinteze 6-(3-aminofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (17)



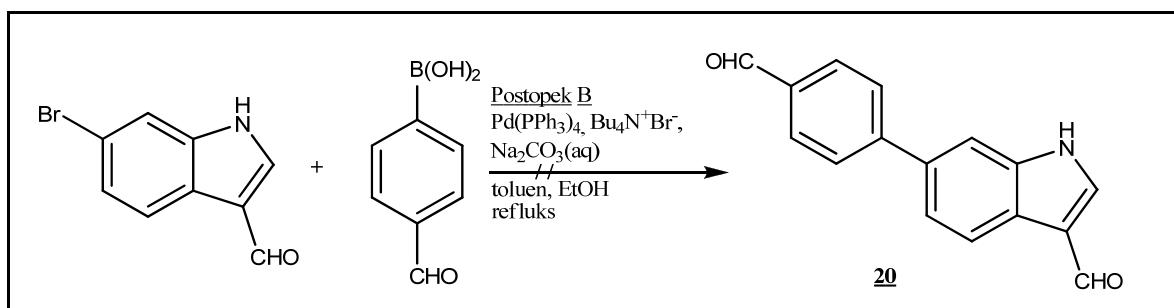
Sintezo spojine smo izvedli po **postopku A** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 3-aminofenilboronska kislina 284 mg, 2,04 mmol), vendar nam želenega produkta ni uspelo izolirati.

4.2.2.6. Poskus sinteze 6-(4-klorofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (18)

Sintezo spojine smo izvedli po **postopku I** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 4-klorofenilboronoska kislina 319 mg, 2,04 mmol). S TPK smo spremljali potek reakcije. Ugotovili smo, da reakcija ni potekala.

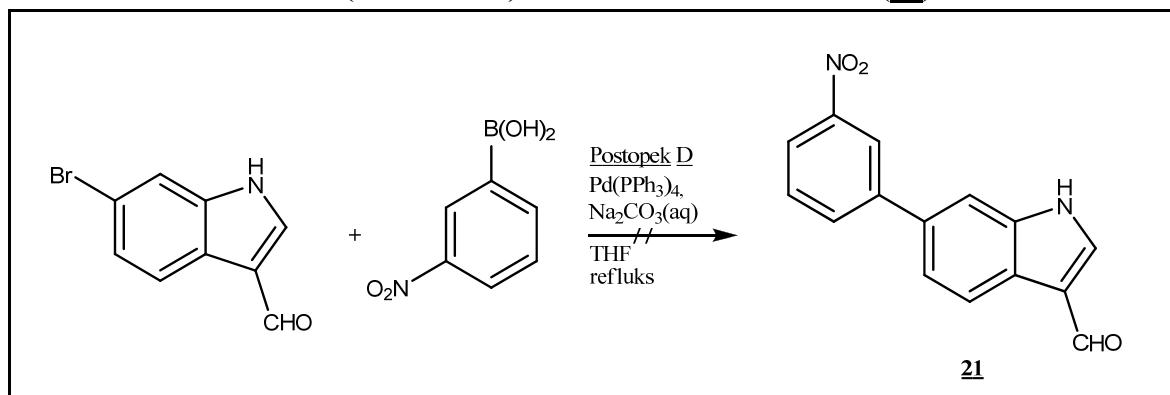
4.2.2.7. Poskus sinteze 4-(3-formil-1H-indol-6-il)benzonitrila (19)

Sintezo spojine smo izvedli po **postopku I** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 300 mg, 2,04 mmol). Potek reakcije smo spremljali s TPK. Na ploščici je bila vidna lisa izhodne spojine, lisa produkta pa se ni pojavila.

4.2.2.8. Poskus sinteze 6-(4-formilfenil)-1H-indol-3-karbaldehida (20)

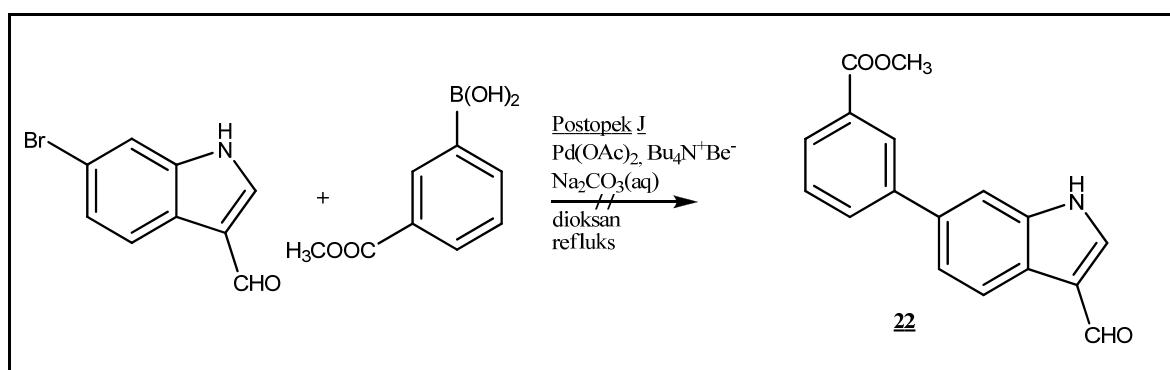
Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopku B** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 4-formilfenilboronska kislina 306 mg, 2,04 mmol). Reakcija sploh ni potekala, kar smo ugotovili s pomočjo TPK. Na ploščici se namreč nova lisa ni pojavila.

4.2.2.9. Poskus sinteze 6-(3-nitrofenil)-1H-indol-3-karbaldehida (**21**)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku D** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 3-nitrofenilboronska kislina 341 mg, 2,04 mmol). Reakcija ni potekla.

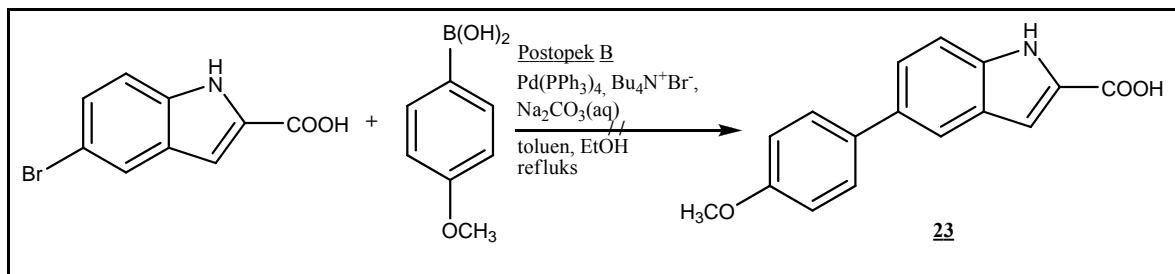
4.2.2.10. Poskus sinteze metil 3-(3-formil-1H-indol-6-il)benzoata (**22**)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku J** (6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid 229 mg, 1,02 mmol; 3-(metoksikarbonil)fenilboronska kislina 367 mg, 2,04 mmol), vendar nam produkta ni uspelo dobiti. Reakcija namreč v tem pogojih sploh ni potekla.

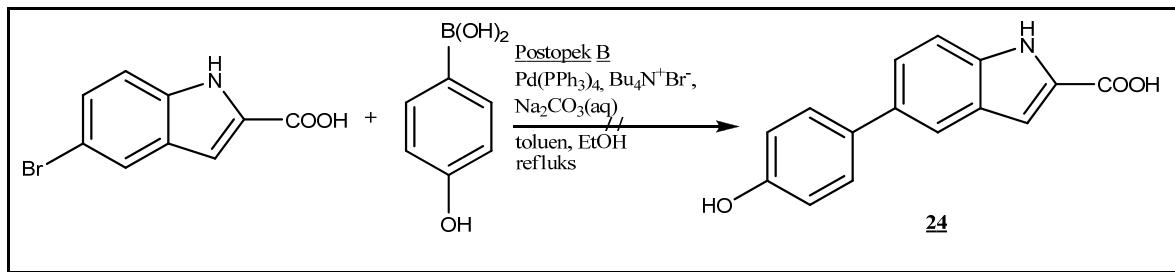
4.2.3. SINTEZA 5-ARILNIH DERIVATOV INDOLA IZ 5-BROMO-1H-INDOL-2-KARBOKSILNE KISLINE

4.2.3.1. Poskus sinteze 5-(4-metoksifenil)-1H-indol-2-karboksilne kislina (23)



Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopku B** (5-bromo-1H-indol-2-karboksilna kislina 100 mg, 0,42 mmol; 4-metoksifenilboronska kislina 127 mg, 0,833 mmol). Pri reakciji so nastali številni stranski produkti, zato nam želene spojine ni uspelo izolirati.

4.2.3.2. Poskus sinteze 5-(4-hidroksifenil)-1H-indol-2-karboksilne kislina (24)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku B** (5-bromo-1H-indol-2-karboksilna kislina 100 mg, 0,42 mmol; 4-hidroksifenilboronska kislina 115 mg, 0,833 mmol). Med reakcijo je nastalo mnogo stranskih produktov. Želene spojine nam ni uspelo izolirati.

4.3. SINTEZA ARILNIH DERIVATOV KUMARINA

Sinteze arilnih derivatov kumarina smo izvajali po **postopkih K-S.**

POSTOPEK K

V bučko smo natehtali derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) in K_2CO_3 (2,5 ekv.), vse raztopili v 20 mL toluena in prepihovali z argonom 15 min. Nato smo dodali katalizator $Pd(PPh_3)_4$ (0,02 ekv.). Reakcijska zmes se je mešala pri temperaturi vrelišča ($110^{\circ}C$) 12 ur. (32).

POSTOPEK L

V bučki smo v 10 mL EtOH in 10 mL toluena raztopili derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.), $Pd(PPh_3)_4$ (0,02 ekv.) in Na_2CO_3 (2,5 ekv.) ter prepihovali z argonom 15 min. Raztopina se je mešala pri temperaturi vrelišča ($110^{\circ}C$) 12 ur (36).

POSTOPEK M

V bučko smo natehtali derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina in derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) ter ju raztopili v 2 mL EtOH in 2 mL toluena ter prepihali z argonom. K tej raztopini smo dodali $Pd(PPh_3)_4$ (0,03 ekv.), ki smo ga pred tem reztopili v 2 mL zmesi topil EtOH/toluen (1/1) in prepihali z argonom. Za tem smo dodali še 1 mL 1 M vodne raztopine Na_2CO_3 , tudi prej prepihane z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča ($110^{\circ}C$). Med mešanjem smo po eni in po dveh urah dodali katalizator $Pd(PPh_3)_4$ (0,03 ekv.), raztopljen v 1 mL EtOH in 1 mL toluena ter prepihan z argonom. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri temperaturi vrelišča ($110^{\circ}C$) 12 ur (36).

POSTOPEK N

V bučko smo zatehtali derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.), katalizator $Pd(PPh_3)_4$ (0,02 ekv.) in bazo K_2CO_3 (2,5 ekv.). Vse smo raztopili v 10 mL EtOH in 10 mL toluena ter prepihovali z argonom 15 min. Raztopina se je mešala pri temperaturi vrelišča ($110^{\circ}C$) 12 ur (36).

POSTOPEK O

V bučki smo v 4 mL topila EtOH/toluen (1/1) raztopili derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) ter katalizatorja Pd(PPh₃)₄ (0,03 ekv.) in Bu₄N⁺Br⁻ (1 ekv.). Prepihovali smo z argonom 10 min. Nato smo dodali 2 mL 1 M Na₂CO₃, ki smo jo prej prepigli z argonom. Reakcijska zmes se je 5 min mešala pri sobni temperaturi, nato pa pri temperaturi vrelišča (110°C) 12 ur (44).

POSTOPEK P

V bučki smo v 2 mL EtOH in 2 mL toluena raztopili derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (2 ekv.) ter prepighovali z argonom. Nato smo dodali v zmesi topil EtOH/toluen (1/1) raztopljen katalizator Pd(PPh₃)₄ (0,01 ekv.) in 3 mL vodne raztopine K₂CO₃ (7 ekv.), oboje prej prepigano z argonom. Reakcijska zmes se je pri temperaturi vrelišča (110°C) mešala 12 ur (32).

POSTOPEK R

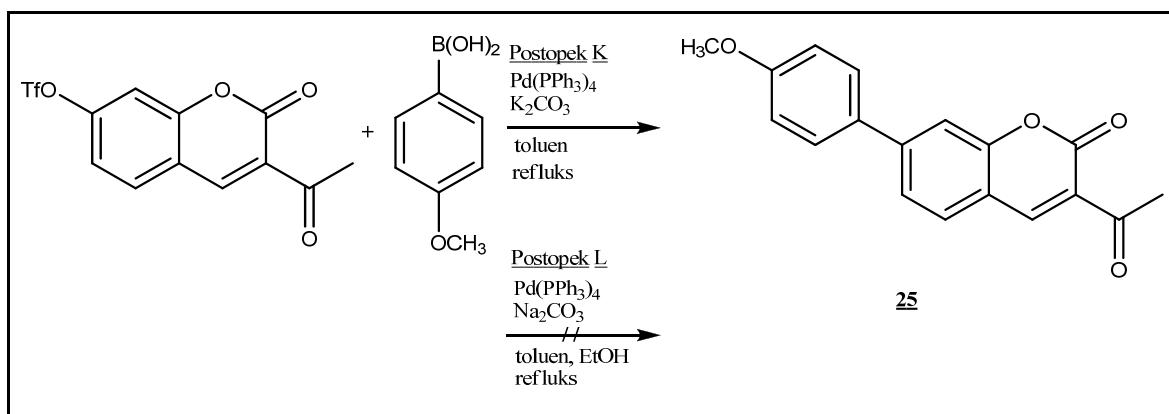
V bučki smo v 8 mL DMF raztopili derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (1,7 ekv.) in katalizator Pd(OAc)₂ (0,03 ekv.). Z argonom smo prepighovali 10 min, nato pa dodali 2 mL 1 M Na₂CO₃, ki je bila prej prepigana z argonom. Reakcijska zmes se je mešala pri temperaturi vrelišča (120°C) 12 ur (45).

POSTOPEK S

V bučko smo natehtali derivat 6-bromo- ali 7-triflilkumarina, derivat fenilboronske kisline (1,7 ekv.) ter katalizatorja Pd(dppf)Cl₂ (0,05 ekv.) in Bu₄N⁺Br⁻ (0,09 ekv.). Vse smo raztopili v 10 mL AcCN in prepighovali z argonom 15 min. Nato smo dodali v prečiščeni vodi (3 mL) raztopljen K₃PO₄ (3 ekv.), ki smo ga prej prepigli z argonom. Reakcijska zmes se je nato mešala pri temperaturi vrelišča (75°C) 12 ur (51).

4.3.1. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 3-ACETIL-2-OKSO-2H-KROMEN-7-IL TRIFLUOROMETANSULFONATA

4.3.1.1. Sinteza 3-acetil-7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-ona (25)



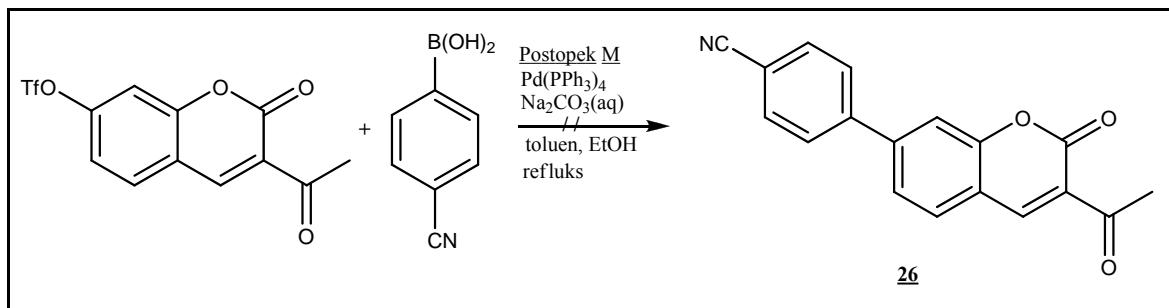
Sintezo spojine smo izvedli po **postopkih K** in **L** (3-acetil-2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat 1153 mg, 3,40 mmol; 4-metoksifenilboronska kislina 1,034 mg, 6,80 mmol). **Postopek K** je dal boljši izkoristek, poleg tega je med reakcijo nastalo manj stranskih produktov. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili in pripravili suh nanos. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo pod tlakom. Za mobilno fazo smo najprej uporabili čisti heksan, nato pa postopoma povečevali delež etilacetata do razmerja topil heksan/EtOAc = 7/3. S takšno mešanico topil smo nadaljevali s spiranjem, dokler nismo sprali produkta s kolone.

Združili smo frakcije, v katerih je bil prisoten produkt in odparili topilo po znižanim tlakom. Ker frakcije niso bile čiste, smo izvedli še prekristalizacijo. Suh preostanek smo raztopili v etilacetatu in segreli do vrenja, nato pa med ohlajanjem počasi dodajali enako količino heksana. Bučko smo postavili v hladilnik. Izpadli so kristali produkta, ki smo jih nato odfiltrirali z odsesavanjem in sušili do konstantne mase.

3-acetil-7-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-on	
M _r	294,30
Izgled	rumeni kristali
Rf	0,71 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	192-196°C
Izkoristek	71,3 %
MS (ESI)	295,1 (M + H) ⁺ 317,1 (M + Na) ⁺
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₁₅ O ₄ (m/z): 295,0970 (M + H) ⁺ ;

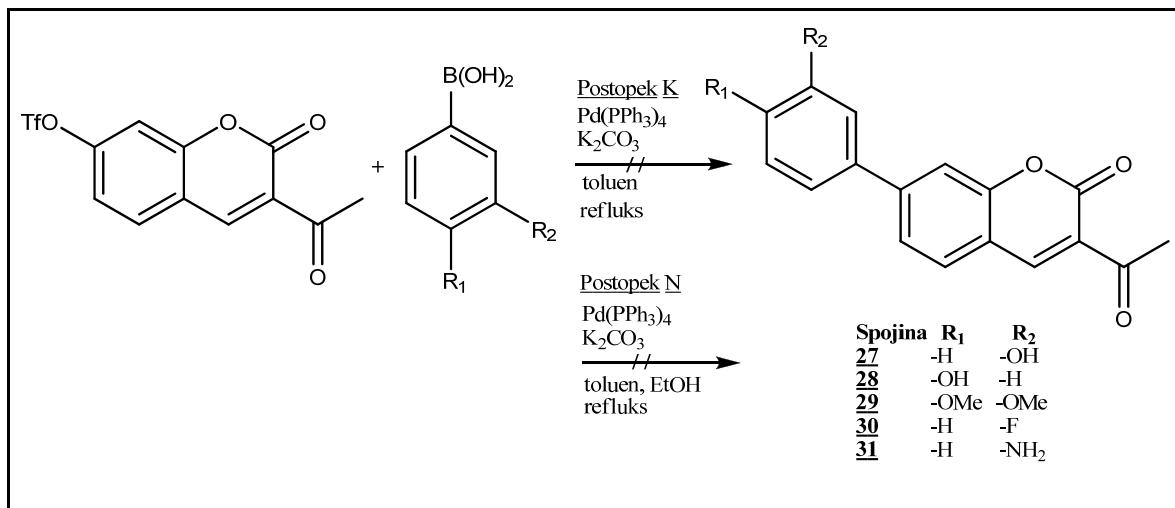
	dobljen rezultat (m/z): 295,0968 ($M + H$) ⁺
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 2,60 (s, 3H, CH ₃ CO); 3,84 (s, 3H, CH ₃ O); 7,09 (d, 2H, Ar-H, J = 8,7 Hz); 7,75 (d, 2H, Ar-H, J = 7,5 Hz); 7,83 (d, 2H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 7,99 (d, 1H, Ar-H, J = 8,1 Hz); 8,69 (s, 1H, Ar-H)
IR (KBr)	3442, 1721, 1682, 1602, 1590, 1542, 1482, 1401, 1273, 1254, 1210, 1182, 1144, 1116, 1041, 1026, 984, 878, 822, 769 cm ⁻¹

4.3.1.2. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-okso-2H-kromen-7-il) benzonitrila (26)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku M** (3-acetyl-2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat 127 mg, 0,38 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 110 mg, 0,75 mmol). Reakcija je potekala, vendar smo po čiščenju na »Isolera One Biotage« ugotovili, da je produkta zelo malo in da nobena frakcija ni čista. Produkta nam ni uspelo izolirati.

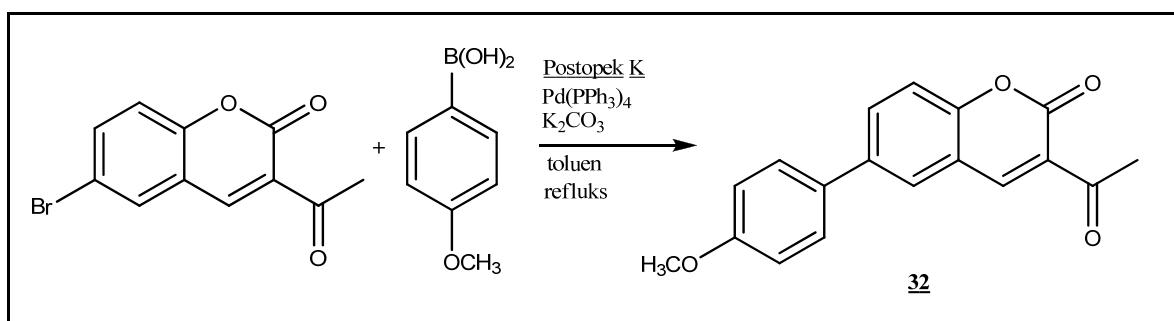
4.3.1.3. Poskus sinteze 3-acetyl-7-(3-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (27), 3-acetyl-7-(4-hidroksifenil)-2H-kromen-2-ona (28), 3-acetyl-7-(3,4-dimetoksifenil)-2H-kromen-2-ona (29), 3-acetyl-7-(3-fluorofenil)-2H-kromen-2-ona (30) in 3-acetyl-7-(3-aminofenil)-2H-kromen-2-ona (31)



Sintezo spojin 27 – 31 smo izvedli po **postopku K** (3-acetyl-2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat 200 mg, 0,59 mmol; 3-hidroksifenilboronska kislina 163 mg, 1,18 mmol (27) ali 4-hidroksifenilboronska kislina 163 mg, 1,18 mmol (28) ali 3,4-dimetoksifenilboronska kislina 214 mg, 1,18 mmol (29) ali 3-fluorofenilboronska kislina 164 mg, 1,18 mmol (30) ali 3-aminofenilboronska kislina 162 mg, 1,18 mmol (31)). V nobenem primeru nam produkta ni uspelo izolirati. Spojino 31 smo poskusili sintetizirati tudi po **postopku N** (3-acetyl-2-okso-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat 200 mg, 0,59 mmol; 3-aminofenilboronska kislina 162 mg, 1,18 mmol), vendar tudi po tem postopku nismo dobili čistega produkta.

4.3.2. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 3-ACETIL-6-BROMO-2H-KROMEN-2-ONA

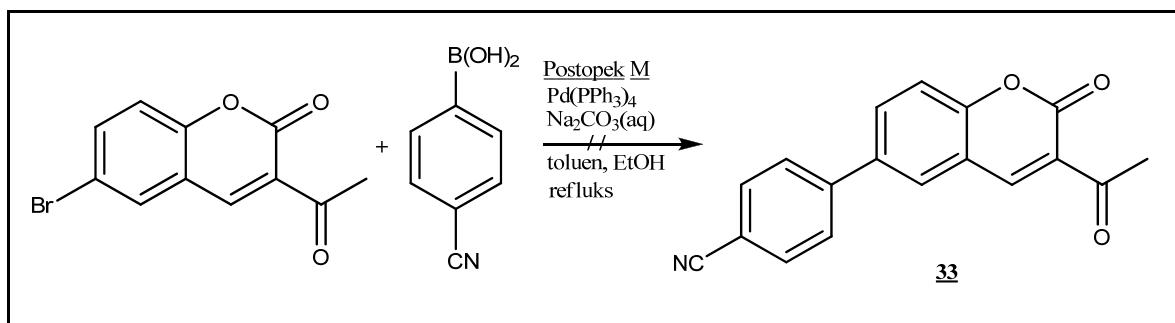
4.3.2.1. Sinteza 3-acetil-6-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-on (32)



Spojino smo sintetizirali po **postopku K** (3-acetyl-6-bromo-2H-kromen-2-on 200 mg, 0,75 mmol; 4-metoksifenilboronska kislina 228 mg, 1,50 mmol). Ko je reakcija potekla, smo reakcijsko zmes ohladili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Pripravili smo suh nanos in izvedli kolonsko kromatografijo pod tlakom. Prisotnost produkta v frakcijah smo preverjali s TPK. Združili smo frakcije, v katerih se je nahajala iskana spojina in odparili topilo.

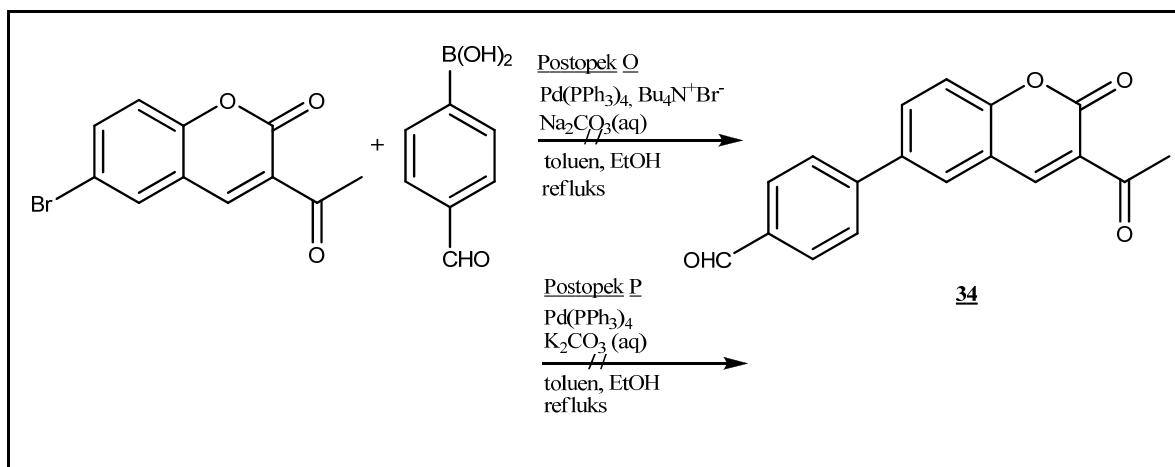
3-acetyl-6-(4-metoksifenil)-2H-kromen-2-on	
M_r	294,30
Izgled	rumeni kristali
Rf	0,74 (MF = heksan/EtOAc = 1/1)
Tališče	185-192°C
Izkoristek	69,5 %
MS (ESI)	295,1 (M + H) ⁺ 317,1 (M + Na) ⁺
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₁₅ O ₄ (m/z): 295,0970 (M + H) ⁺ ; dobljen rezultat (m/z): 295,0974 (M + H) ⁺
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm) = 2,61 (s, 3H, CH ₃ CO); 3,82 (s, 3H, CH ₃ O); 7,08 (d, 2H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 7,53 (d, 1H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 7,58 (d, 2H, Ar-H, J = 8,4 Hz); 8,01 (dd, 1H, Ar-H, J ₁ = 8,7 Hz, J ₂ = 2,1 Hz); 8,23 (d, 1H, Ar-H, J = 2,1 Hz); 8,70 (s, 1H, Ar-H)
IR (KBr)	3446, 3060, 3038, 2839, 1725, 1675, 1615, 1564, 1506, 1490, 1357, 1232, 1190, 1148, 1112, 1024, 974, 820, 802 cm ⁻¹

4.3.2.2. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-okso-2H-kromen-6-il) benzonitrila (33)



Za sintezo spojine smo uporabili **postopek M** (3-acetyl-6-bromo-2H-kromen-2-on 100 mg, 0,38 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 110 mg, 0,75 mmol). Tudi v tem primeru nam ni uspelo dobiti čistega produkta.

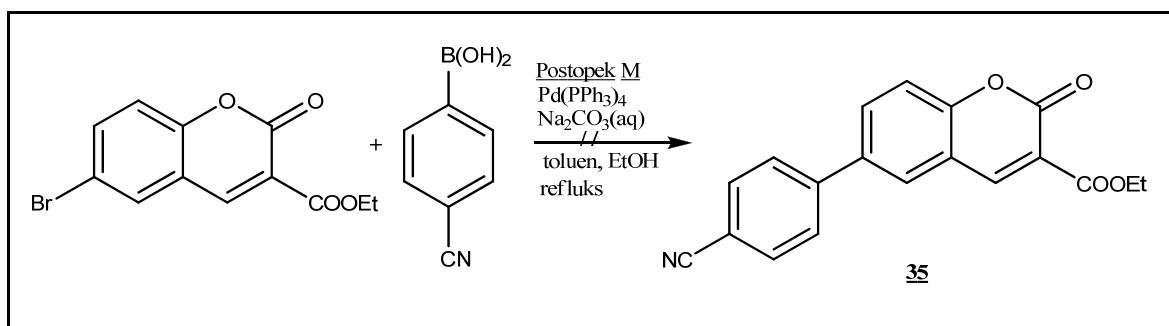
4.3.2.3. Poskus sinteze 4-(3-acetyl-2-okso-2H-kromen-6-il) benzaldehida (34)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopkih O** in **P** (3-acetyl-6-bromo-2H-kromen-2-on 200 mg, 0,75 mmol; 4-formilfenilboronska kislina 225 mg, 1,50 mmol). Z nobenim od omenjenih postopkov nam produkta ni uspelo izolirati, kar je pokazala NMR analiza.

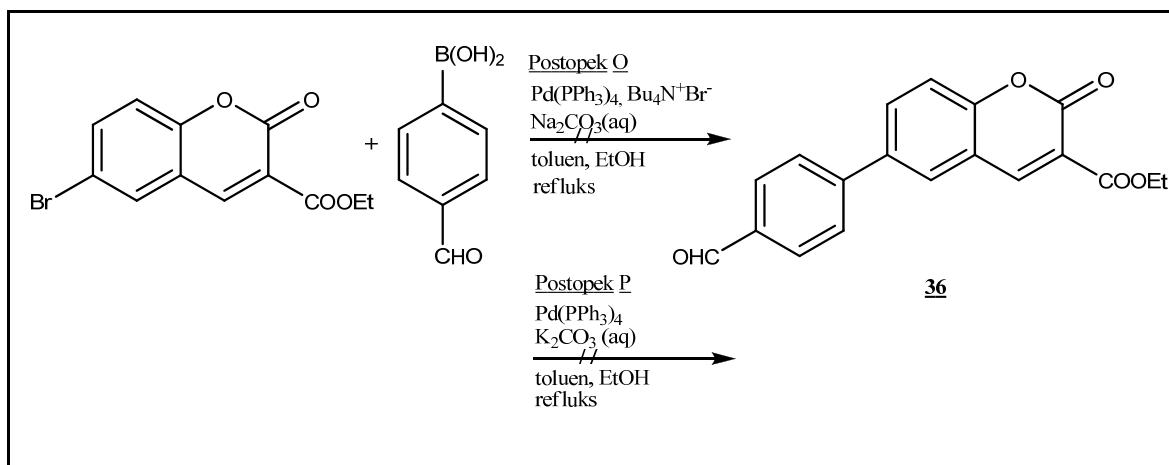
4.3.3. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ ETIL 6-BROMO-2-OKSO-2H-KROMEN-3-KARBOKSILATA

4.3.3.1. Poskus sinteze etil 6-(4-cianofenil)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata (35)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku M** (etil-6-bromo-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat 111 mg, 0,38 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 110 mg, 0,75 mmol). NMR analiza ni pokazala prisotnosti želenega produkta.

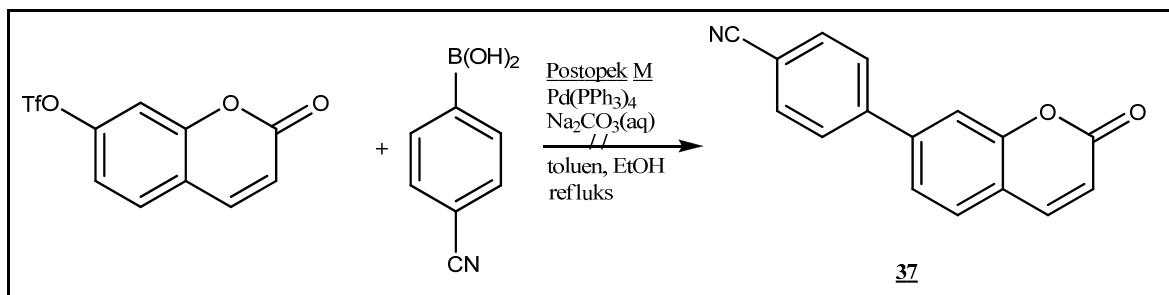
4.3.3.2. Poskus sinteze etil 6-(4-formilfenil)-2-okso-2H-kromen-3-karboksilata (36)



Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopkih O** in **P** (etil-6-bromo-2-okso-2H-kromen-3-karboksilat 222 mg, 0,75 mmol; 4-formilfenilboronska kislina 225 mg, 1,50 mmol). V nobenem primeru nam ni uspelo izolirati produkta, kar je pokazala tudi NMR analiza.

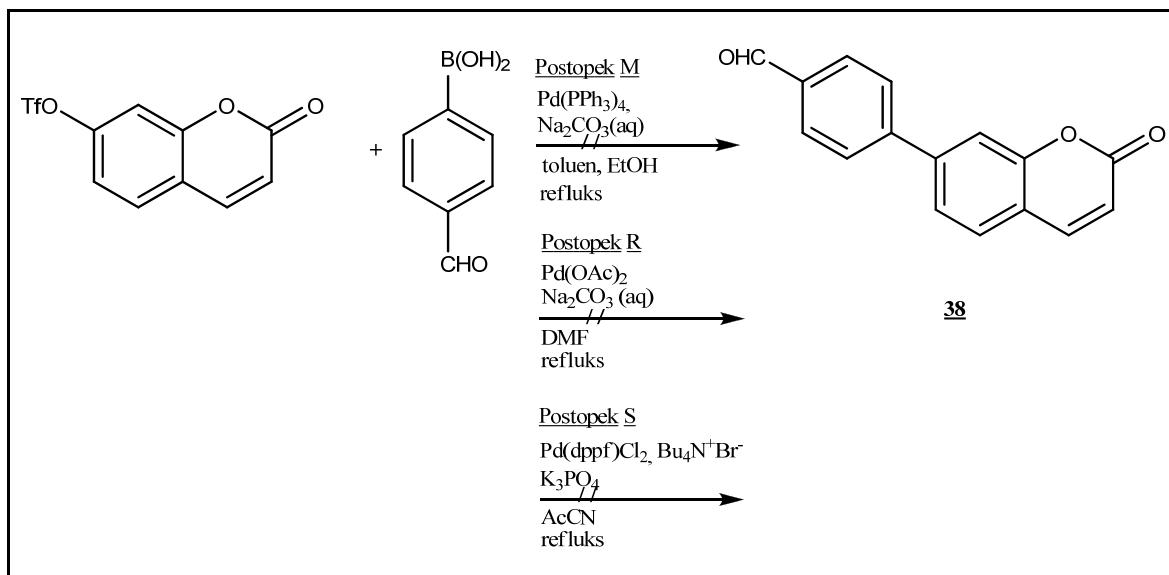
4.3.4. SINTEZA DERIVATOV 2H-KROMEN-2-ONA IZ 2-OKSO-2H-KROMEN-7-ILTRIFLUOROMETANSULFONATA

4.3.4.1. Poskus sinteze 4-(2-okso-2H-kromen-7-il) benzonitrila (37)



Sintezo spojine smo izvedli po **postopku M** (2-okso-2H-kromen-7il trifluorometansulfonat 110 mg, 0,38 mmol; 4-cianofenilboronska kislina 110 mg, 0,75 mmol). NMR analiza ni pokazala prisotnosti želenega produkta.

4.3.4.2. Poskus sinteze 4-(2-okso-2H-kromen-7-il) benzaldehida (38)



Spojino smo poskusili sintetizirati po **postopkih M, R in S** (2-okso-2H-kromen-7il trifluorometansulfonat 220 mg, 0,75 mmol; 4-formilfenilboronska kislina 191 mg, 1,27 mmol. Z nobenim od omenjenih postopkov nam ustrezno čistega produkta ni uspelo dobiti.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

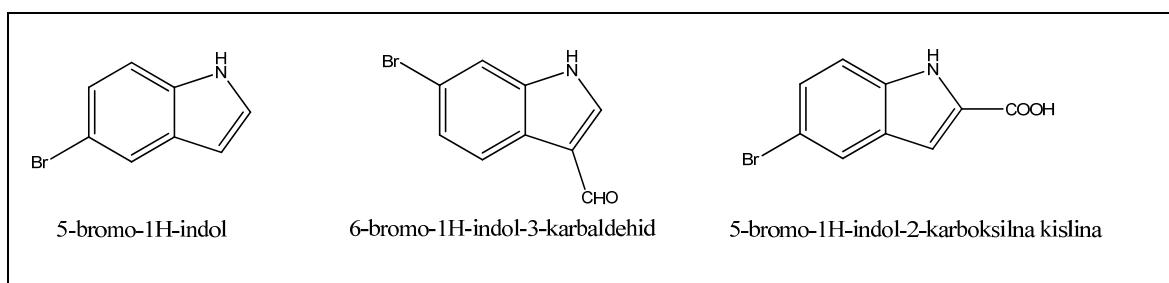
V diplomskem delu smo s Suzukijevo reakcijo sintetizirali arilne derivate indola in kumarina. Izhajali smo iz derivatov indola ali kumarina in derivatov fenilboronske kislina. Uporabili smo različne paladijeve katalizatorje: $Pd(PPh_3)_4$, $Pd(OAc)_2$ in $Pd(dppf)Cl_2$. V nekaterih primerih smo dodali še katalizator faznega prenosa $Bu_4N^+Br^-$. Reakcije so potekale v argonovi atmosferi v različnih topilih pri temperaturi vrelišča približno 12 ur. Sintetizirali smo tudi 4-metoksifenilboronsko kislino, ki je sicer komercialno dostopna, in smo jo tudi uporabili v Suzukijevi reakciji za pripravo nekaterih biarilnih derivatov.

5.1.1. KOMENTAR SINTEZE 4-METOKSIFENILBORONSKE KISLINE

4-metoksifenilboronsko kislino smo pripravili v več stopnjah iz anizola. V prvi stopnji je poteklo bromiranje na p-mestu v benzenovem obroču anizola. Kot bromirno sredstvo smo uporabili N-bromosukcinimid. Sledila je tvorba Grignardovega reagenta v brezvodnem THF z uporabo Mg, ki ga je bilo potrebno pred tem aktivirati z močnim mešanjem v prisotnosti kristalčka joda. V bučko z aktiviranim Mg smo pri temperaturi 70°C po kapljicah dodajali v THF raztopljen 4-bromoanizol. Temperaturo smo nato za dve uri povišali na 90°C. Pretvorbo (4-metoksifenil)magnezijevega bromida do 4-metoksifenilboronske kislina s trimetilboratom smo izvedli pri temperaturi -78°C.

5.1.2. KOMENTAR SINTEZE ARILNIH DERIVATOV INDOLA

Izhodne spojine za sintezo arilnih derivatov indola so bili bromirani derivati indola: 5-bromo-1H-indol, 6-bromo-1H-indol-3-karbaldehid in 5-bromo-1H-indol-2-karboksilna kislina (Slika 16) in derivati fenilboronske kislina. Najprej smo reakcijo skušali izvesti v topilu toluen/EtOH ob prisotnosti baze Na_2CO_3 in katalizatorja $Pd(PPh_3)_4$ (**postopek A**). Če reakcija v teh pogojih ni potekla, smo postopek modificirali tako, da smo $Pd(PPh_3)_4$ zamenjali z drugim paladijevim katalizatorjem ali pa dodali katalizator faznega prenosa $Bu_4N^+Br^-$, ki poleg topnosti izboljša tudi stabilnost Pd-anionskih intermedijatov, ki nastanejo v katalitičnem ciklu. Uporabljali smo tudi različna topila in baze. Baza ima namreč odločilno vlogo v korakih b in c Suzukijeve reakcije (Slika 14).

**Slika 16:** Strukture izhodnih spojin za sintezo biarilnih derivatov indola

Iz izhodne spojine 5-bromo-1H-indola smo po **postopku A** pridobili spojine **1-6** in **9**. Pri sintezi spojin **7** in **8** je bil ključen dodatek $Bu_4N^+Br^-$ (**postopek B**), ostali parametri so ostali nespremenjeni. Sinteza spojine **10** je potekla le v topilu THF (**postopek D**), druge modifikacije osnovnega postopka (dodatek $Bu_4N^+Br^-$ in menjava katalizatorja s $Pd(OAc)_2$) niso prinesele rezultatov. Sintezo spojin **11** in **12** smo izvajali pri več različnih pogojih, vendar reakcija ni potekla ali pa produkta nismo uspeli izolirati. Vzrok za to sta najverjetneje 4-karboksifenilboronska kislina in 4-karbamoilfenilboronska kislina, ki imata na benzenov obroč vezano elektronakceptorsko skupino, kar zmanjša izkoristek Suzukijeve reakcije. Pri fenilboronskih kislinah z elektronakceptorskimi skupinami je pogosta stranska reakcija protodeboriranje kar preprečuje potek Suzukijeve reakcije (40).

Iz izhodne spojine 6-bromo-1H-indol-3-karbaldehida smo dobili le dva biarilna produkta, in sicer spojini **13** in **14**. V obeh primerih je reakcija potekla z dodatkom katalizatorja faznega prenosa $Bu_4N^+Br^-$ (**postopek B**), kar kaže na slabšo topnost 6-bromo-1H-indol-3-karbaldehida. Sinteza spojin **15 – 22** tudi pri različnih pogojih ni potekla. Drugi možni vzroki so lahko še slabša stabilnost vmesnih intermediatov ali pa pojav stranskih reakcij zaradi prisotne aldehydne skupine, saj so vse reakcije s 5-bromo-1H-indolom v enakih pogojih potekle. Občutnih razlik v reaktivnosti med 5- in 6-bromo indoli sicer niso opazili (36).

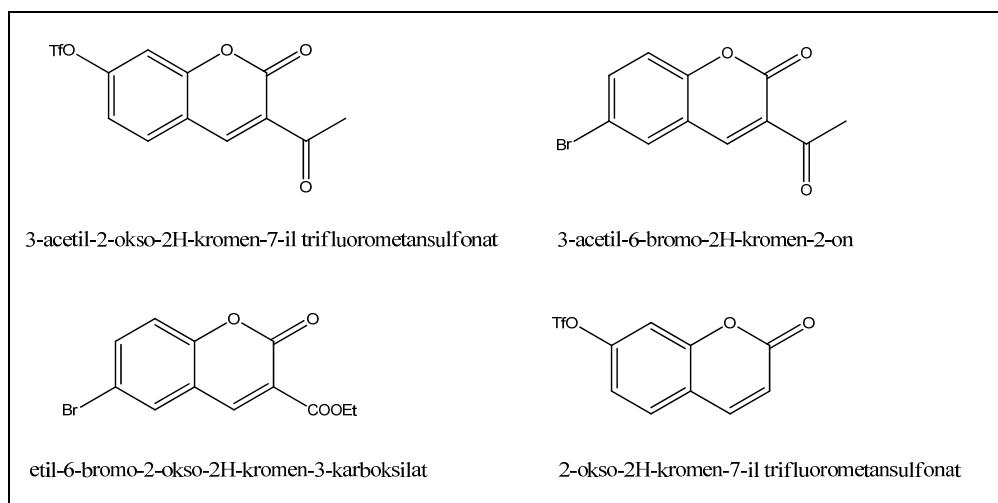
Iz izhodne spojine 5-bromo-1H-indol-2-karboksilne kisline smo skušali dobiti le 5-metoksifenilni in 5-hidroksifenil-1H-indol-2-karboksilno kislino (spojini **23** in **24**), saj smo pri teh pričakovali najboljšo inhibitorno aktivnost na rekombinantni encim 17 β -HSD tipa 1. Reakciji po **postopkih A** in **B** nista potekli. Kot možen vzrok lahko spet navedemo slabšo topnost 5-bromo-1H-indol-2-karboksilne kisline v topilu, v katerem smo izvedli reakcijo. Po teoriji prisotnost elektronakceptorskih skupin kot je na primer karboksilna skupina na aromatskem obroču arilhalidov poveča reaktivnost (52-54), zato je možno tudi,

da ta spojina pri reakcijski pogojih ni obstojna. Pri enakih pogojih smo namreč iz ostalih dveh izhodnih derivatov indola sintetizirali in izolirali želeni produkt.

5.1.3. KOMENTAR SINTEZE ARILNIH DERIVATOV KUMARINA

Izhodne spojine za sintezo arilnih derivatov kumarina so bile 3-acetyl-2-oxo-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat, 2-oxo-2H-kromen-7-il trifluorometansulfonat, 3-acetyl-6-bromo-2H-kromen-2-on in etil-6-bromo-2-oxo-2H-kromen-3-karboksilat (Slika 17). Uporabili smo jih v Suzukijevi reakciji z različnimi derivati fenilboronske kisline. Reakcije smo izvedli po več sintezičnih postopkih, vendar smo dobili samo dve spojini, **25** in **32**. Reakciji smo izvedli v toluenu ob prisotnosti baze K_2CO_3 , ki smo jo dodali v reakcijsko zmes brez predhodnega raztopljanja v prečiščeni vodi, in katalizatorja $Pd(PPh_3)_4$ (**postopek K**). Ti dve spojini sta bili, poleg nekaterih drugih 6- in 7-substituiranih fenilnih derivatov kumarina, ki imajo na fenilni obroč vezano elektronondonorsko skupino, na Fakulteti za farmacijo že sintetizirani in smo postopka samo ponovili. Zanimivo je, da spojine **25** nismo uspeli dobiti, če je bil prisoten EtOH, kar kaže na to, da prisotnost protičnih topil v Suzukijevi reakciji lahko neugodno vpliva na trifilno skupino, ki je podvržena solvolizi. Možno je celo, da poteče solvoliza kumarinskega laktona. Po istem postopku bi pričakovali uspešno pripravo spojine **29** s 3,4-dimetoksifenilboronsko kislino, vendar nam ni uspelo. Znano je, da so fenilboronske kisline z močnim prebitkom elektronov podvržene spajanju med sabo in s fenilnimi skupinami liganda $P(PPh_3)_3$ (40). Z istim postopkom ter z menjavo katalizatorjev, topila ali baze smo skušali pripraviti tudi arilne derivate kumarina z elektronakceptorskimi skupinami, vezanimi na fenilni obroč, vendar produkta nismo uspeli dobiti. Očitno je, da sta mesti 6 in 7 kumarinskega skeleta veliko slabše aktivirani za Suzukijevu reakcijo s fenilboronskimi kislinami, ki imajo elektronakceptorske skupine, kot je 5-bromoindol. Daljši reakcijski časi, s katerimi smo poskušali pridobiti vsaj manjšo količino produkta, pa so najverjetneje vodili v nastanek stranskih produktov. V nekaterih primerih je za to verjetno kriva prisotnost vode, ki smo jo uporabili za raztopljanje baze in derivatov fenilboronske kisline, ki bi lahko vodila do hidrolize kumarinskega skeleta in triflatne skupine pri daljših reakcijskih časih. Za uspešen potek reakcije bi bilo najverjetneje potrebno uporabiti druga topila, katalizatorje in predvsem bazo, ki bi bila dovolj šibka, da ne bi povzročila hidrolize, vendar bi bila hkrati dovolj močna za uspešen potek reakcije (take lastnosti bi lahko imela $CsCO_3$ in različni

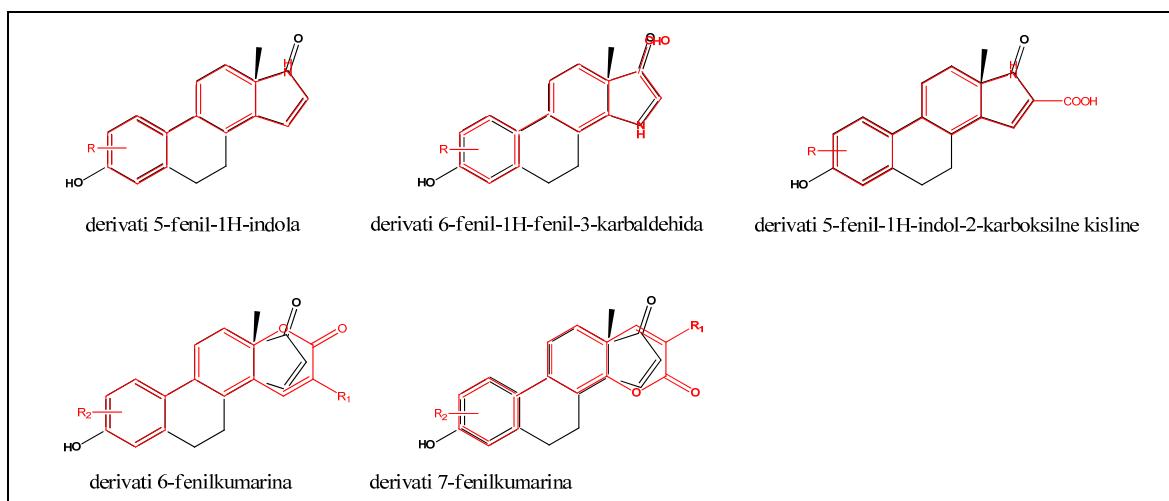
acetati, ki pa jih v svojem delu nismo uporabili). Prav tako kumarinski »elektrofili« niso zreagirali s fenilboronskimi kislinami, ki imajo protondonorske skupine (-OH, -NH₂). Te boronske kisline so slabše topne v organskih topilih in zahtevajo prisotnost vode, ki pa v opisanih pogojih najverjetneje destruktivno vpliva na kumarinski skelet.



Slika 17: Strukture izhodnih spojin za sintezo biarilnih derivatov kumarina

5.2. REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

Indolni in kumarinski derivati, na katerih je na različnih mestih vezan substituiran ali nesubstituiran fenilni obroč, posnemajo hidrofobni steroidni skelet molekule estrona (Slika 18), zato smo sklepali, da se bodo vezali v aktivno mesto in s tem inhibirali encim 17 β -HSD tipa 1.

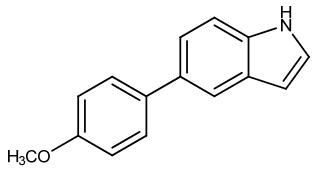
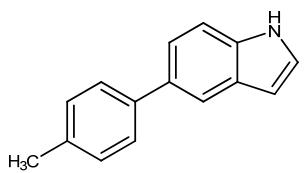
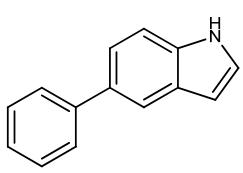
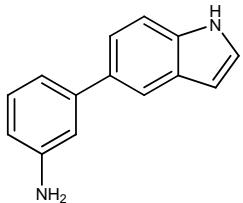
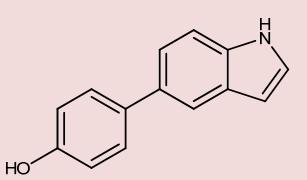
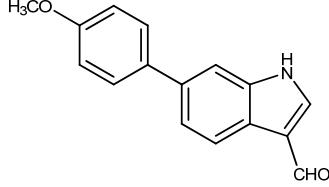


Slika 18: Derivati indola in kumarina, sintetizirani v diplomskem delu in njihova struktturna podobnost z estronom

Za preverjanje inhibitornih aktivnosti spojin smo izvedli encimski test, pri katerem smo uporabili rekombinantno 17 β -HSD tipa 1. Substrat je bil radioaktivno označen (s tricijem označen estron na mestih 1, 2, 6 in 7), saj je občutljivost spektrofotometričnih metod prenizka za preverjanje reduktivne encimske aktivnosti v nM koncentracijskem območju substrata (koncentracija neoznačenega in označenega estrona skupaj je bila 67 nM). V pufer smo dodali tudi kofaktor NADPH. Encimsko reakcijo smo izvedli v dveh neodvisnih paralelkah pri dveh koncentracijah potencialnega inhibitorja, 0,6 μ M in 6 μ M. Negativna kontrola je vsebovala le topila, pozitivna kontrola pa je namesto sintetiziranih spojin vsebovala ekvilin, ki je steroidni inhibitor 17 β -HSD tipa 1.

Rezultate smo podali kot odstotek inhibiranega encima pri določeni koncentraciji inhibitorja (Tabela 1). Višja ko je ta vrednost, večjo inhibitorno aktivnost ima neka spojina pri tej koncentraciji.

Tabela I: Rezultati bioloških testiranj na 17 β -HSD tipa 1

Oznaka spojine	Struktura spojine	Mr	Inhibicija 17 β -HSD tipa 1 [%], [E ₁]=67 nM	
			0,6 μ M	6 μ M
1		223,27	n.i.*	n.i.*
2		207,27	n.i.*	n.i.*
3		193,24	n.i.*	n.i.*
5		208,26	n.i.*	n.i.*
6		209,24	37	64
13		251,28	n.i.*	n.i.*

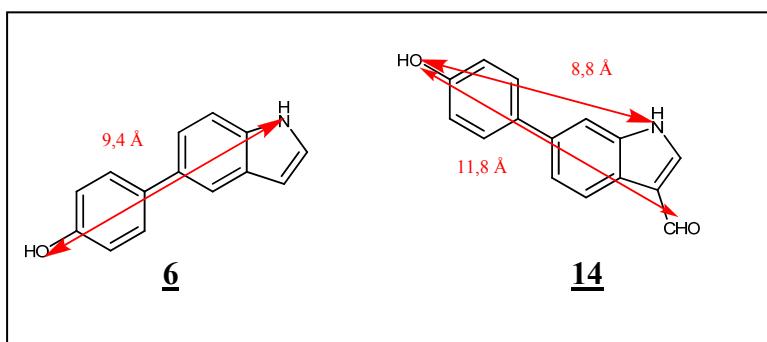
<u>14</u>		209,24	10	49
<u>25</u>		294,30	48	86
<u>32</u>		294,30	n.i.*	n.i.*
<u>ekvilin**</u>		270,37	81	100

* n.i. ne inhibira

** ekvilin pozitivna kontrola (steroidni inhibitor 17 β -HSD tipa 1)

Ugotovili smo, da od testiranih arilindolov encim 17 β -HSD tipa 1 inhibirata samo spojini 6 in 14. Spojini imata v strukturi hidroksifenilno skupino, ki je očitno ključni element strukture arilnih derivatov indola, ki inhibirajo 17 β -HSD tipa 1. Zamenjava z metoksifenilno skupino namreč izniči aktivnost. Pomembne so tudi razdalje med polarnimi skupinami v molekulah. V spojini 6 je fenolna OH skupina od N v indolu oddaljena 9,4 Å. V spojini 14 ta razdalja znaša 8,8 Å, fenolna OH skupina pa je od aldehidne oddaljena 11,8 Å (Slika 19). Te razdalje so zelo podobne razdalji med fenolno OH v obroču A in karbonilnim kisikom na mestu 17 v estronu. To je torej pomemben parameter za inhibitorno aktivnost, ni pa ključen. Oddaljenost med fenolno OH skupino in aldehidno skupino v spojini 14 je namreč najbližja razdalji med kisikoma na mestih 3 in 17 v estronu, vendar spojina 14 manj inhibira 17 β -HSD tipa 1 kot spojina 6. Možen razlog za slabšo inhibicijo je tudi aldehidna skupina na indolnem skeletu spojine 14. Ta lahko ovira vezavo

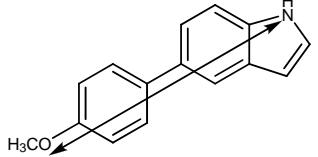
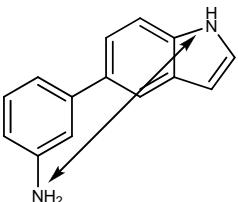
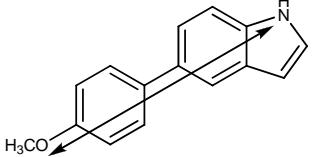
spojine v vezavno mesto encima, saj je to zelo ozko in ima hidrofobne lastnosti. Tudi mesto na indolu, kamor je vezana hidroksifenilna skupina, lahko vpliva na interakcije spojine z encimom in s tem na inhibitorno aktivnost. V spojini **6** je hidroksifenilna skupina na mestu 5, v spojini **14** pa na mestu 6. Da se spojina **6** zelo podobno veže kot steroidni substrat in tvori več interakcij z vezavnim mestom kot spojina **14**, smo ugotovili tudi s sidranjem spojine v aktivno mesto encima.



Slika 19: Spojini **6** in **14** in razdalje med polarnimi skupinami v molekulah

Pričakovali smo, da bodo tudi spojine z metoksifenilno ali katero drugo polarno skupino, vezano na fenilnem obroču, inhibirale encim, vendar testiranja tega niso pokazala. Razdalje med polarnimi deli molekule se v nekaterih spojinah manj razlikujejo od razdalje med O(3) in O(17) v estronu kot pri spojinah **6** in **14** (Tabela II), kar je še dodaten dokaz, da iz te vrednosti ne moremo sklepati na inhibitorno aktivnost spojin. Z računalniško študijo vezave ostalih sintetiziranih derivatov indola v aktivno mesto 17 β -HSD tipa 1 nismo preverjali.

Tabela II: Sintetizirani arilindoli s polarno skupino na fenilnem obroču, ki ne inhibirajo 17 β -HSD tipa 1 in razdalje med heteroatomom v aromatu in heteroatomom na fenilnem obroču

Oznaka spojine	Struktura spojine	Razdalja med polarnimi skupinami [Å]
1		9,6
5		8,6
13		8,8

Od sintetiziranih arilnih derivatov kumarina encim 17 β -HSD tipa 1 inhibira spojina **25**. V primerjavi s spojinama **6** in **14** je spojina **25** boljši inhibitor. Metoksi skupina je od karbonilnega kisika laktomske skupine oddaljena 10,8 Å, od karbonilnega kisika acetilne skupine pa 12,3 Å. Razdalja med omenjenimi skupinami je zelo podobna tudi pri spojni **32** (Tabela III), kar spet dokazuje, da to ni odločilni parameter za inhibitorno aktivnost, saj spojina **32** encima ne inhibira. Ugotovili so, da je pri kumarinskih derivatih zelo pomembno, ali je substituiran fenilni obroč vezan na kumarinski sklet na mestu 6 ali na mestu 7 (32). To ima namreč velik vpliv na prileganje spojine v vezavno mesto in interakcije med njima. 7-arylni derivati zavzamejo podoben položaj kot estradiol. H-vezi med polarnimi skupinami spojin in katalitičnim mestom encima so prisotne. Povsem drugače pa se v vezavno mesto 17 β -HSD tipa 1 vežejo 6-arylni derivati, zaradi česar je tvorba H-vezi onemogočena, s tem pa se tudi inhibitorna aktivnost izniči (31).

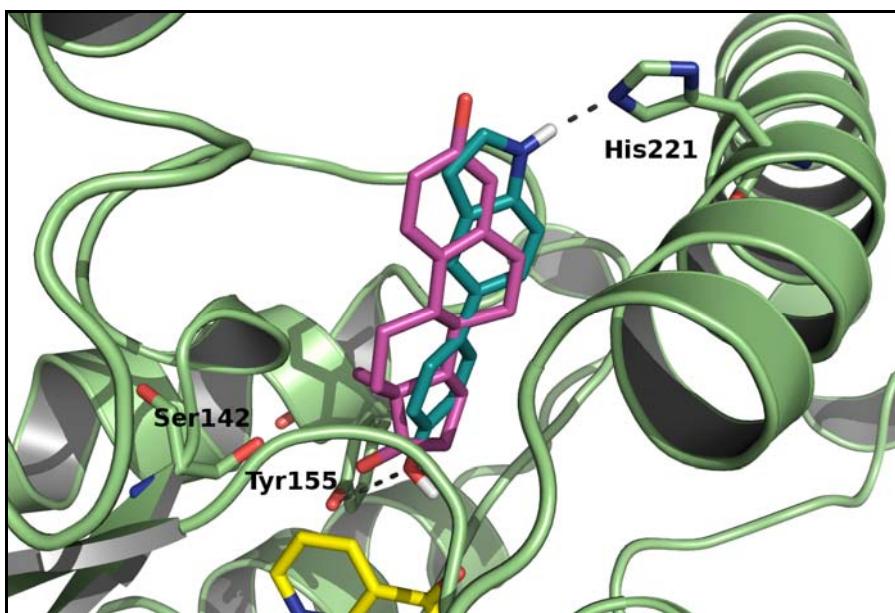
Tabela III: Sintetizirana arilkumarina in razdalje med metoksi skupino na fenilnem obroču in karbonilnim kisikom laktonske in acetilne skupine

Oznaka spojine	Struktura spojine	Razdalja med polarnimi skupinami [Å]
<u>25</u>		10,8 (CH ₃ O, karbonilni O laktonske skupine) 12,3 (CH ₃ O, karbonilni O acetilne skupine)
<u>32</u>		11,7 (CH ₃ O, karbonilni O laktonske skupine) 11,0 (CH ₃ O, karbonilni O acetilne skupine)

5.3. REZULTATI SIDRANJA

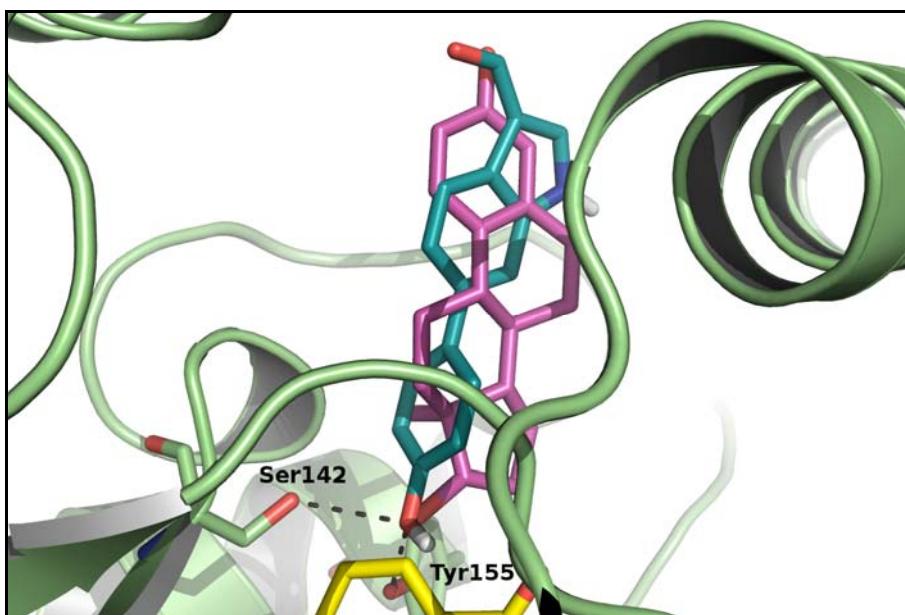
S pomočjo računalniških programov smo ugotavljali, kako se spojini **6** in **14** vežeta v aktivno mesto 17 β -HSD tipa 1. Uporabili smo kristalno strukturo encima s kokristaliziranim estradiolom.

Na **sliki 20** je prikazana računalniška simulacija vezave spojine **6** v aktivno mesto encima. Ugotovimo lahko, da se spojina **6** veže zelo podobno kot steroidni ligand. Indolni del zavzame podoben položaj kot obroča A in B steroidnega skeleta. Dušik v indolu tvori H-vezi s His221, ki je pomemben za vezavo in prepoznavo substrata preko fenolne OH skupine na obroču A steroidea. 5-fenilni del spojine **6** zavzame regijo obroča D steroidnega skeleta, čeprav smo predvidevali, da bi zavzel področje aromatskega obroča A. Fenolna OH skupina spojine **6** tako tvori H-vezi s Tyr155, podobno kot karbonilni O na mestu 17 steroidnega skeleta.



Slika 20: Sidranje spojine **6** v aktivno mesto 17 β -HSD tipa 1 in primerjava z vezavo estradiola; spojina **6** je modre barve, kokristaliziran estradiol je vijolične barve.

Slika 21 prikazuje vezavo spojine **14** v aktivno mesto encima. Spojina **14** glede na prileganje steroidnemu ligandu zavzame manj ugoden položaj kot spojina **6**, kar vodi do manj učinkovitih interakcij. H-vezi se tvorijo le na enem delu spojine in sicer med fenolno OH skupino spojine **14**, ki tvori H-vezi s Ser142 in Tyr155, tako kot karbonilni kisik na mestu 17 v estradiolu, medtem ko med indolovim dušikom ter polarnimi preostanki na drugem koncu vezavnega mesta (His221 ali Glu282) računalniški program ne predvidi tvorbe H-vezi. Aldehydna skupina, za katero smo predvidevali, da bi lahko igrala podobno vlogo kot 17-keto skupina na steroidu, prav tako ne vstopa v interakcije s polarnimi aminokislinsinami v vezavnem mestu za substrat. Takšna orientacija spojine **14** v aktivnem mestu očitno ni dovolj za visoko inhibitorno aktivnost.



Slika 21: Sidranje spojine **14** v aktivno mesto 17 β -HSD tipa 1 in primerjava z vezavo estradiola; spojina **14** je modre barve, kokristaliziran estradiol je vijolične barve.

6. ZAKLJUČEK

V diplomskem delu smo načrtovali in s Suzukijevo reakcijo sintetizirali serijo arilnih derivatov indola in kumarina. Nekatere reakcije niso potekle zaradi neustreznega katalizatorja, topila ali baze ali pa vplivov izhodnih spojin. Aldehydna in karboksilna skupina na indolovem obroču zmanjšata topnost spojin, elektronakceptorske skupine na benzenovem obroču fenilboronskih kislin pa zmanjšajo reaktivnost in tako otežijo potek reakcije. Pri sintezi kumarinskih derivatov smo ugotovili, da v reakcijski zmesi ne sme biti prisotne vode ozziroma protičnih topil, sicer reakcija ne poteče, nastanejo stranski produkti ali pa pride do hidrolize kumarinskega skeleta. Zaključili smo, da so 6-bromo in 7-triflikumarini slabše reaktivni za Suzukijevo reakcijo s fenilboronskimi kislinami z elektronakceptorskimi skupinami.

Nekaterim sintetiziranim spojinam smo določili tudi inhibitorno aktivnost na rekombinantni encim 17 β -HSD tipa 1. Od indolov samo spojini **6** in **14** inhibirata encim. Na aromatski skelet imata vezano hidroksifenilno skupino, ki je ključna, da 5- in 6-arylni derivati indola lahko inhibirajo 17 β -HSD tipa 1, saj ostali derivati indola s podobno strukturo omenjenega encima ne inhibirajo. Hidroksifenilna skupina v spojinah **6** in **14** je od drugega polarnega dela molekule oddaljena približno toliko, kolikor znaša razdalja med fenolno 3-OH skupino in 17-keto skupino v estronu. Osrednji del pa je, tako kot pri steroidnem substratu, planaren in hidrofoben. Razdalja ni edini pomembni parameter za inhibitorno aktivnost. Na vezavo v vezavno mesto encima in s tem na inhibicijo lahko vplivajo še druge skupine, ki so vezane na indolov obroč, na primer aldehydna skupina v spojini **14**, in pozicija, kamor je pripel fenilni substituent. S pomočjo računalniške simulacije smo ugotovili, da se spojina **6** bolje prilega položaju estradiola v vezavnem mestu encima kot spojina **14**, posledično pa tudi bolje inhibira 17 β -HSD tipa 1. Za razliko od pričakovanj pa se obe spojini vežeta tako, da se njuna fenolna obroča ne prekrivata s fenolnim A obročem steroidnega liganda.

Inhibitorne aktivnosti derivatov indola smo primerjali z inhibitornimi aktivnostmi sintetiziranih kumarinskih derivatov, ki so jih na Fakulteti za farmacijo že določili. Ugotovili smo, da je spojina **25** boljši inhibitor omenjenega encima kot spojini **6** in **14**, spojina **32** pa encima ne inhibira. Razlog za to je način vezave spojine v vezavno mesto encima, ki je med 6- in 7-arylumarini različen.

Polona Božnar

Uporaba Suzukijeve reakcije za pripravo derivatov indola in kumarina kot potencialnih inhibitorjev 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1

Hidroksifenilni derivati indola in 7-arylni derivati kumarina predstavljajo dobre izhodiščne spojine, ki jih lahko z nadaljnjo optimizacijo razvijemo v nove potencialne inhibitorje 17 β -HSD tipa 1.

7. LITERATURA

1. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, 2002: 685-717.
2. Katzung BG: Basic & Clinical Pharmacology, 9th Edition, Mc Graw Hill, San Francisco, 2004: 661-669.
3. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology, 5th Edition, Mosby, Elsevier, USA, 2004: 717-742; 883-919.
4. Kaplan A, Jack R, Opheim KE, Toivola B, Lyon AW: Clinical Chemistry, 4th Edition, Williams & Wilkins, Malvern, USA, 1995: 371-405.
5. Day JM, Tutil HJ, Purohit A, Reed MJ: Design and validation of specific inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis. *Endocrine-Related Cancer* 2008; 15: 665-692.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Pharmacology, 6th Edition, Churchill Livingstone, Elsevier, 2007: 445-460.
7. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Bélanger A: Introcrinology: role of the family of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Medicinal Endocrinology* 2000; 25:1-16.
8. Henderson BE, Feigelson HS: Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 427-433.
9. Chanplakorn N, Chanplakorn P, Suzuki T, Ono K, Chan MSM, Miki Y, Saji S, Ueno T, Toi M, Sasano H: Increased estrogen sulfatase (STS) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) following neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; 120: 639-648.
10. Jansson A: 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009; 114: 64-67.
11. Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters. *British Journal of Cancer* 2000; 82(3): 518-523.
12. Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T: New Development in introcrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 2006; 13: 129-136.

13. Sasano H, Miki Y, Fukuda T, Nagasaki S, Nakata T, Suzuki T: New development in intracrinology of breast carcinoma: therapeutic horizons after aromatase inhibitors. Future Drugs Ltd 2007; 367-374.
14. Schuster D, Nashev LG, Kirchmair J, Laggner C, Wolber G, Langer T, Odermatt A: Discovery of nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors by pharmacophore-based screening of virtual compound libraries. Journal of Medicinal Chemistry 2008; 51: 4188-4199.
15. Honma N, Takubo K, Sawabe M, Arai T, Akiyama F, Sakamoto G, Utsumi T, Yoshimura N, Harada N: Estrogen-metabolizing enzymes in breast cancers from women over the age of 80 years. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 91(2): 607-613.
16. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H: Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. Endocrine-Realated Cancer 2005; 12: 701-720.
17. Mazumdar M, Fournier D, Zhu DW, 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.
18. 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 SAR 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 of Medicinal Chemistry 2009; 52: 6724-6743.
19. Oster A, Klein T, Werth R, Kruchten P, Bey E, Negri M, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Hartmann RW: Novel estrone mimetics with high 17 β -HSD1 inhibitory activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2010; 18: 3494-3505.
20. Marchais-Oberwinkler S, Kruchten P, Frotscher M, Ziegler E, Neugebauer A, Bhoga U, Bey E, Müller-Vieira U, Messinger J, Thole H, Hartmann RW: Substituted 6-phenyl-2-naphthols. Potent and selective nonsteroidal inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1): Design, synthesis, biological evaluation, and pharmacokinetics. Journal of Medicinal Chemistry 2008; 51: 4685-4698.
21. Brožič P, Lanišnik Rižner T, Gobec S: Inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Current Medicinal Chemistry 2008; 15: 137-150.

22. Prehn C, Möller G, Adamski J: Recent advances in 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009; 114: 72-77.
23. Lilienkampf A, Karkola S, Alho-Richmond S, Koskimies P, Johansson N, Huhtinen K, Vihko K, Wähälä K: Synthesis and biological evaluation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitors based on a thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one core. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009; <http://pubs.acs.org/>.
24. Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jörnvall H, Oppermann U: Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 28: 25677-25684.
25. Ghosh D, Pletnev VZ, Zhu DW, Wawrzak Z, Duax WL, Pangborn W, Labrie F, Lin SX: Structure of human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* 1995; Volume 3, Issue 5: 503-513.
26. Lilienkampf A: Synthesis, reactivity and biological activity of 17 β -HSD1 inhibitors based on a thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)- β 17one core; Academic dissertation; University of Helsinki, 2007.
27. Ghosh D, Vihko P: Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Chemico-Biological Interaction* 2001; 130-132: 637-650.
28. Lukacik P, Kavanagh KL, Oppermann U: Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 248: 61–71.
29. Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Utsunomiya H, Ito K, Ariga N, Moriya T: 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial carcinoma. *Oncology* 2000; 59: 5-12.
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. Heinzerling L, Hartmann RW, Frotscher M, Neumann D: Predicting putative inhibitors of 17 β -HSD1. *Molecular informatics* 2010; 29: 695-705.

32. Starčević Š, Brožič P, Turk S, Cesar J, Lanišnik Rižner T, 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: 248-261.
33. Kruchten P, Werth R, Marchais-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.
34. Perdih A, Kotnik M, Oblak M, Šolmajer T: Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61: 195-202.
35. A review paper on Suzuki coupling reaction; Dripta de Joarder, 2008; <http://bama.ua.edu/~kshaughn/ch609/paper/paper-s08/dejoarder-suzuki.pdf>
36. Prieto M, Zurita E, Rosa E, Muñoz L, Lloyd-Williams P, Giralt E: Arylboronic acids and arylpinacolboronate esters in Suzuki coupling reactions involving indoles. Partner role swapping and heterocycle protection. *The Journal of Organic Chemistry* 2004; 69: 6812-6820.
37. Goodall W, Wild K, Arm KJ, Gareth Williams JA: The synthesis of 4'-aryl substituted terpyridines by Suzuki cross-coupling reactions: substituent effects on ligand fluorescence. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans* 2002; 2: 1669-1681.
38. Matos K, Soderquist JA: Alkylboranes in the Suzuki-Miyaura coupling: Stereochemical and mechanistic studies. *The Journal of Organic Chemistry* 1998; 63: 461-470.
39. Kirchhoff JH, Netherton MR, Hills ID, Fu GC: Boronic Acids: New coupling partners in room-temperature Suzuki reactions of alkyl bromides. Crystallographic characterization of an oxidative-addition adduct generated under remarkably mild conditions. *Journal of the American Chemical Society* 2002; 124: 13662-13663.
40. Moreno-Mañas M, Pérez M, Pleixats R: Palladium-catalyzed Suzuki-type coupling of arylboronic acids. A mechanistic study. *The Journal of Organic Chemistry* 1996; 61: 2346-2351.
41. Miyaura N, Suzuki A: Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical Reviews* 1995; 95: 2457-2483.

42. Brousmiche DW, Xu M, Lukeman M, Wan P: Photohydration and photosolvolytic of biphenyl alkenes and alcohols via biphenyl quinone methide-type intermediates and diarylmethyl carbocations. Contribution from the Department of Chemistry, Box 3065.
43. Kiliç Z, Isgör YG, Ölgen S: Synthesis and pp60^{c-Src} tyrosine kinase inhibitory activities of novel indole-3-imine and amine derivatives substituted at N1 and C5. Archiv der Pharmazie- Chemistry in Life Sciences 2009; 342: 333-343.
44. Pinto-Bazurco Mendieta MAE, Negri M, Hu Q, Hille UE, Jagusch C, Jahn-Hofmann K, Müller-Vieira U, Schmidt D, Lauterbach T, Hartmann RW: CYP17 inhibitors. annulations of additional rings in methylene imidazole substituted biphenyls: Synthesis, biological evaluation and molecular modelling. Archiv der Pharmazie- Chemistry in Life Sciences 2008; 341: 597-609.
45. Chordia MD, Zigler M, Murphree LJ, Figler H, Macdonald TL, Olsson RA, Linden J: 6-aryl-8H-indeno[1,2-d]thiazol-2-ylamines: A₁ adenosine receptor agonist allosteric enhancers having improved potency. Journal of Medicinal Chemistry 2005; 45: 5131-5139.
46. Klotz EJF, Claridge TDW, Anderson HL: Homo- and hetero-(3)rotaxanes with two π -systems clasped in a single macrocycle. Journal of the American Chemical Society 2006; 128: 15374-15375.
47. Ismail MA, Batista-Parra A, Miao Y, Wilson WD, Wenzler T, Brun R, Boykin DW: Dicationic near-linear biphenyl benzimidazole derivatives as DNA-targeted antiprotozoal agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2005; 13: 6718-6726.
48. Razler TM, Hsiao Y, Qian F, Fu R, Khan RK, Doubleday W: A preparatively convenient ligand-free catalytic PEG 2000 Suzuki-Miyaura coupling. Journal of Organic Chemistry 2009; 74(3): 1381-1384.
49. Isgor YG, Kilic Z, Olgen S: Novel aminomethylindole derivatives as inhibitors of pp60c-Src tyrosine kinase: synthesis and biological activity. Chemical Biology & Drug Design 2008; 72(6): 599-604.
50. Molander GA, Canturk B, Kennedy LE: Scope of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of potassium heteroaryltrifluoroborates. Journal of Organic Chemistry 2009; 74(3): 973-980.
51. Ganina OG, Daras E, Bourgarel-Rey V, Peyrot V, Andresyuk AN, Finet JP, Federov AY, Beletskaya IP, Combes S: Synthesis and biological evaluation of

- polymethoxylated 4-heteroarylcoumarins as tubulin assembly inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2008; 16: 8806-8812.
52. Shen W: Palladium catalyzed coupling of aryl chlorides with arylboronic acids. Elsevier Science Ltd 1997; Vol. 38, 32: 5575-5578.
53. Bumagin NA, Bykov VV: Ligandless palladium catalyzed reactions of arylboronic acids and sodium tetraphenylborate with aryl halides in aqueous media. Elsevier Science Ltd 1997; Vol. 53, 42: 14437-14450.
54. Firooznia F, Gude C, Chan K, Satoh Y: Synthesis of 4-substituted phenylalanines by cross-coupling reactions: Extension of the methodology to aryl chlorides. *Tetrahedron Letters* 1998; 39: 3985-3988.