

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA SINREIH

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA SINREIH

**NOVI DERIVATI ANTRANILNE KISLINE KOT
INHIBITORJI ALDO/KETO-REDUKTAZ AKR1C1–AKR1C3**

**NEW DERIVATIVES OF ANTRANILIC ACID AS
INHIBITORS OF ALDO/KETO-REDUCTASES AKR1C1–
AKR1C3**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm in Inštitutu za biokemijo pod somentorstvom izr. prof. dr. Tee Lanišnik Rižner, uni. dipl. kem. Elementne analize so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Meritve iz masne spektroskopije so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, izr. prof. dr. Tei Lanišnik Rižner in Izidorju Sosiču za vso pomoč, kritike in vzpodbudo. Zahvaljujem se tudi Nataši Beranič in Samotu Turku.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom izr. prof. dr. Tee Lanišnik Rižner.

KAZALO

1	POVZETEK	4
2	ABSTRACT	5
3	SEZNAM OKRAJŠAV	6
4	SEZNAM TRIVIALNIH IMEN STEROIDOV	8
5	UVOD.....	9
5.1	HORMONSKI SISTEM	9
5.1.1	POIMENOVANJE STEROIDOV IN NJIHOVA STRUKTURA	9
5.1.2	MEHANIZEM DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV	9
5.1.3	BIOSINTEZA.....	10
5.1.4	SPOLNI HORMONI	12
5.2	HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE	13
5.2.1	KRATKOVERIŽNE DEHIDROGENAZE/REDUKTAZE	14
5.2.2	ALDO/KETO-REDUKTAZE	16
5.3	AKR1C1	19
5.4	AKR1C2	22
5.5	AKR1C3	22
6	NAMEN DELA	26
7	MATERIALI IN METODE	27
8	EKSPERIMENTALNO DELO	31
8.1	Splošna reakcijska shema	31
8.2	1. Stopnja sinteze: uvedba metilne zaščite na karboksilno kislino	32
8.3	2. Stopnja sinteze: tvorba amidne vezi	34
8.3.1	Uporaba HOBt / EDC sklopitvenega reagenta	34
8.3.2	Uporaba CDI / DMAP sklopitvenega reagenta	35
8.3.3	Tvorba amidne vezi s tionil kloridom.....	35
8.4	3. Stopnja sinteze: pripajanje alkilne verige	44
8.4.1	Pripajanje alkilne verige na OH skupino	44
8.4.2	Pripajanje alkilne veriga na NH ₂ skupino	47
8.5	4. Stopnja sinteze: alkalna hidroliza	48
8.6	5. Stopnja sinteze: redukcija nitro skupine	55
8.6.1	Katalitsko hidrogeniranje	55
8.6.2	Redukcija nitro skupine s kositrovim kloridom	60
9	RAZPRAVA.....	61
9.1	1. Stopnja sinteze: uvedba metilne zaščite na karboksilno kislino	61

9.2	2. Stopnja sinteze: tvorba amidne vezi	62
9.2.1	Uporaba HOBt / EDC sklopitvenega reagenta	62
9.2.2	Uporaba CDI / DMAP sklopitvenega reagenta	63
9.2.3	Tvorba amidne vezi s tionil kloridom.....	64
9.3	3. Stopnja sinteze: pripajanje alkilne verige	66
9.3.1	Pripajanje alkilne verige na OH skupino	66
9.3.2	Pripajanje alkilne verige na NH ₂ skupino	67
9.4	4. Stopnja sinteze: alkalna hidroliza	68
9.5	5. Stopnja sinteze: redukcija nitro skupine	69
9.6	Reševanje spojin kot inhibitorjev encimov AKR1C	71
9.6.1	Razlaga odnosa med strukturo in delovanjem.....	74
9.6.2	Model vezave spojine 35 v aktivno mesto AKR1C1	77
9.6.3	Model vezave spojine 35 v aktivno mesto AKR1C2	78
9.6.4	Model vezave spojin 25 in 26 v aktivno mesto AKR1C3	79
10	SKLEP	81
11	VIRI.....	82

1 POVZETEK

Hidroksisteroid-dehidrogenaze AKR1C1, AKR1C2 in AKR1C3 sodijo v proteinsko naddružino aldo/keto-reduktaz ter sodelujejo pri biosintezi in inaktivaciji steroidnih hormonov, prostaglandinov in ksenobiotikov. Aldo/keto-reduktaze katalizirajo redukcijo karbonilnih skupin v ustrezne hidoksilne skupine. Zaradi vloge, ki jo imajo v človeškem organizmu, so povezane z nastankom različnih bolezni (hormonsko odvisne in neodvisne oblike raka, druge hormonsko odvisne bolezni, depresija, epilepsija, predmenstrualni sindrom,...) in predstavljajo zanimive tarče za razvoj novih zdravilnih učinkovin. V okviru diplomske naloge smo sintetizirali 19 novih derivatov antranilne kisline in jih testirali kot inhibitorje izoencimov AKR1C1, AKR1C2 in AKR1C3. Karboksilno skupino antranilne kisline smo najprej zaščitili s tvorbo metilnega estra, nato pa smo z derivatom benzojske kisline tvorili amidno vez. Kot najboljši postopek za tvorbo amidne vezi se je izkazal tisti, pri katerem smo karboksilno skupino aktivirali v ustrezen derivat kislinskega klorida z uporabo tionil klorida, medtem ko smo pri uporabi sklopitvenih reagentov imeli slabše izkoristke. Z Williamsonovo sintezo etrov in reduktivnim aminiranjem smo nato uvedli krajšo alkilno verigo, na koncu pa smo hidrolizirali metilni ester in reducirali nitro skupino do aminske. Inhibicijo posameznih izoencimov smo spremljali spektrofotometrično v smeri oksidacije, 1-acenaftol smo uporabili kot substrat, NAD^+ pa kot koencim.

Ugotovili smo, da derivati antranilne kisline inhibirajo izoencime AKR1C v nizkem mikromolarnem območju, selektivnost za inhibicijo AKR1C3 smo dosegli s substituentami, ki predvidevamo, da tvorijo vodikovo vez s Ser 221, kar smo določili z uporabo računalniške simulacije vezave v aktivno mesto znane tridimenzionalne strukture encima AKR1C3 (pdb koda: 1S2A). Kot najboljši inhibitor AKR1C1 se je izkazala spojina **25** z IC_{50} vrednostjo 3.2 μM , najboljši inhibitor AKR1C2 je bila spojina **35** z IC_{50} vrednostjo 4.9 μM , najboljši inhibitor AKR1C3 pa spojina **26** z IC_{50} vrednostjo 1.9 μM . Kot selektivni inhibitorji izoencima AKR1C3 so se izkazale spojine **26**, **27**, **28**, **31** in **37**.

2 ABSTRACT

Hydroxysteroid-dehydrogenases AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3 belong to protein superfamily of aldo/keto-reductases and are involved in biosynthesis and inactivation of steroid hormones, prostaglandins and xenobiotics. Aldo/keto-reductases catalyze reduction of carbonyl containing substrates to alcohols. Because of their broad spectrum of physiological roles, they are involved in different pathophysiological conditions (hormone-dependent and independent cancers, other hormone-dependent diseases, depression, epilepsy, premenstrual syndrome,...) and represent attractive targets for developing new drugs. We have synthesized 19 new derivatives of anthranilic acid and tested them as inhibitors of isoenzymes AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3. Carboxyl group of anthranilic acid was first protected by formation of methyl ester, then we formed amide bond with derivatives of benzoic acid. The best procedure for the formation of amide bond proved to be the one in which carboxyl group was activated to the corresponding acid chloride using thionyl chloride, while usage of coupling reagents had poor efficiency. Then we introduced a short alkyl chain with Williamson's synthesis of ethers or reductive amination. At the end we hydrolyzed methyl esters and reduced nitro group to amino. Inhibition of the individual isoenzyme was monitored spectrophotometrically in the direction of oxidation, 1-acenaphthol was used as substrate, NAD^+ as coenzyme.

We discovered that derivatives of anthranilic acid inhibit AKR1C isoenzymes in the low micromolar range, selectivity for inhibition of AKR1C3 was achieved with substitutions which we assume form hydrogen bond with Ser 221. This was determined by using computer simulation of binding the inhibitor in the known active site of three-dimensional structure of AKR1C3 (pdb code: 1S2A). Compound **25** proved to be the best inhibitor of isoenzyme AKR1C1 with IC_{50} of 3.2 μM , the best inhibitor of isoenzyme AKR1C2 was compound **35** with IC_{50} of 4.9 μM and the best inhibitor of AKR1C3 was compound **26** with IC_{50} of 1.9 μM . As selective inhibitors of AKR1C3 proved to be compounds **26**, **27**, **28**, **31** and **37**.

3 SEZNAM OKRAJŠAV

3 α ,5 α -THP	3 α ,5 α -tetrahidroprogesteron
5 α -DHP	5 α -dihidroprogesteron
5 α -DHT	5 α -dihidrotestosteron
AKR	aldo/keto-reduktaza
Asp	asparaginska kislina
CDCl ₃	devteriran kloroform
CDI	karbonil diimidazolin
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
ESI	»electrospray« ionizacija
EtOAc	etilacetat
GABA	γ -aminobutanojska kislina
His	histidin
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
HSD	hidroksisteroid dehidrogenaza
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zniža aktivnost encima na polovico
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
Lys	lizin
m	multiplet
MeOH	metanol
MS	masna spektroskopija
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida

NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NMR	jedrska magnetna resonanca
PBS	fosfatni pufer
PG	prostaglandin
q	kvartet
R _f	retencijski koeficient
s	singlet
SDR	kretkoverižna dehidrogenaza/reduktaza (short chain dehydrogenase/reductase)
Ser	serin
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Tyr	tirozin

4 SEZNAM TRIVIALNIH IMEN STEROIDOV

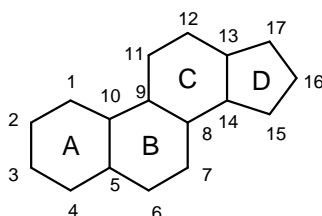
IME STEROIDA	TRIVIALNO IME
5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	3 α -androstandiol
5 α -androstan-3 β ,17 β -diol	3 β -androstandiol
4-androsten-3,17-dion	androstandion
4-androsten-17 β -ol-3-on	testosteron
5 α -androstan-17 β -ol-3-on	5 α -dihidrotosteron
1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol	estradiol
1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-on	estron
4-pregnen-3,20-dion	progesteron
4-pregnen-20 α -ol-3-on	20 α -hidroksiprogesteron
5 α -androstan-3,17-dion	androstandion
5 α -androstan-3 α -ol-17-on	androsteron

5 UVOD

5.1 HORMONSKI SISTEM

5.1.1 POIMENOVANJE STEROIDOV IN NJIHOVA STRUKTURA

Steroidi so sestavljeni iz štirih obročev (A, B, C in D). Kemijsko so ciklopentanoperhidrofenantreni; sestavljeni so iz ciklopentanskega obroča (D) in treh obročev fenantrena (obroči A, B in C). Perhidrofenantren je popolnoma nasičen derivat fenantrena (1). (Slika 1)



Slika 1: Osnovna struktura steroidov in številčenje C-atomov (1)

5.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA STEROIDNIH HORMONOV

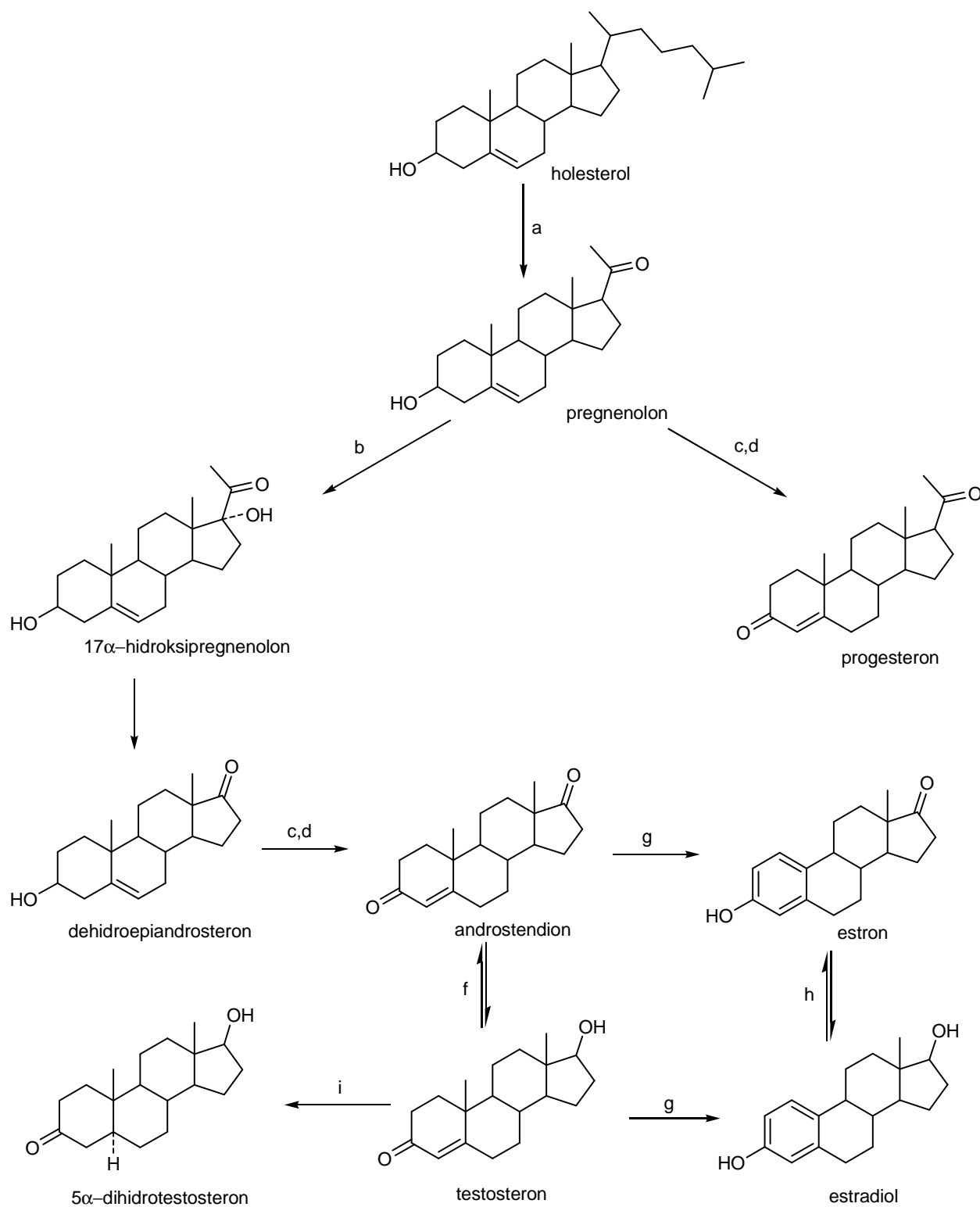
V krvi so prisotni v zelo nizkih koncentracijah (0.1–1.0 nM), povzročajo močne fiziološke učinke na občutljiva tkiva in se vežejo z visoko afiniteto na znotrajcelične receptorje. Na tarčne celice vplivajo tako, da uravnavajo izražanje genov in sintezo proteinov preko tvorbe kompleksov steroid-receptor. Po krvi se lipofilni hormoni prenašajo vezani na serumske proteine. Prosti steroidi difundirajo skozi membrano celice. Tarčne celice imajo steroidne receptorje, ki z visoko afiniteto vežejo steroid. Ti receptorji so topni znotrajcelični proteini, ki lahko tako vežejo steroidne hormone in tudi delujejo kot transkripcijski faktorji preko vezave na specifična mesta DNA (1).

Steroidni hormon vstopi v celico in se veže na steroidni receptor v citoplazmi ali jedru. Vezava povzroči spremembo konformacije in »disociacijo heat« shock proteina, steroidni receptor nato dimerizira in se prenese v jedro. Dimer interagira s točno določenim področjem DNA in z raznimi koaktivatorji in jedrnimi transkripcijskimi faktorji. Začne se prevajanje DNA v mRNA, kar vodi do povečane sinteze proteinov v endoplazemskem retikulumu. Ti proteini vključujejo encime, receptorje in sekretorne dejavnike, ki

uravnavajo celično funkcijo, rast, diferenciacijo ter igrajo glavno vlogo v normalnih fizioloških procesih ter boleznih (1).

5.1.3 BIOSINTEZA

V nadledvični žlezi z encimsko pretvorbo iz holesterola nastaja pregnenolon, ki je prekursor spolnih hormonov in adrenokortikoidov. To pretvorbo katalizira več encimov družine citokromov P450. Pregnenolon se preko encimske oksidacije in izomerizacije dvojne vezi pretvori v številne fiziološko aktivne C21 steroide, adrenokortikoide in ženske spolne hormone, vključno s progesteronom, hidrokortizonom, kortikosteronom in aldosteronom. Oksidativen razpad C-C vezi v stranski verigi pregnenolona ter sledeča encimska oksidacija in izomerizacija vodijo do C19 steroidov, vključno s testosteronom in dihidrotestosteronom. C18 steroidi, ženski spolni hormoni, nastanejo z oksidativno aromatizacijo A obroča androgenih hormonov (1). (Slika 2)



Slika 2: Biosinteza spolnih hormonov iz holesterola. (a) holesterol-dezmolaza (CYP11A1), (b) 17 α -hidroksilaza (CYP17A1), (c, d) 3 β -HDS Δ^5 - Δ^4 izomeraza, (e) 17,20-liaza (CYP17A1), (f) 17 β -HSD tipa 3, (g) aromataza, (h) 17 β -HSD tipa 1, (i) 5 α -reduktaza (1).

5.1.4 SPOLNI HORMONI

Lahko jih razdelimo v tri razrede: estrogeni, progestageni in androgeni. Naravni estrogeni so C-18 steroidi in imajo planaren nenasičen A obroč s 3-fenolno skupino. Najaktivnejši endogeni estrogen je estradiol. Progestageni so C-21 steroidi in imajo skupno 3-keto-4-en strukturo A obroča in keto skupino na mestu 21. Najaktivnejši progestagen je progesteron. Moški spolni hormoni so androgeni, to so C-19 steroidi, in imajo skupne hidroksi ali ketonske skupine na mestih C-3 in C-17. Aktiven androgen, ki ga najdemo v krvi, je testosteron, ima pa še aktivnejši metabolit 5α -dihidrotestosteron (5α -DHT), ki ga najdemo v hormonsko odzivnih tkivih. Vse tri skupine spolnih hormonov so prisotne pri obeh spolih. Produkcija in plazemske koncentracije estrogenov in progestagenov so višje pri ženskah, androgenov pa pri moških (1).

Encimi, ki pretvarjajo aktivno obliko steroidnih hormonov v neaktivno in obratno, delujejo kot molekularna stikala in so znani kot pred-receptorski regulatorni encimi. Tkivno specifično izražanje teh encimov omogoča uravnavanje lokalnih koncentracij aktivnih steroidnih hormonov. Pred-receptorski regulatorni encimi so različni encimi 2. stopnje konjugacije, encimi družine citokromov P450 in hidroskisteroid-dehidrogenaze (2).

5.2 HIDROKSISTEROID-DEHIDROGENAZE

Hidroksisteroid-dehidrogenaze (HSD) pripadajo dvema proteinskima naddružinama, aldo/keto-reduktazam (AKR) in kratkoverižnim dehidrogenazam/reduktazam (SDR). HSD v SDR naddružini so od NAD(P)(H) odvisne oksidoreduktaze in lahko delujejo kot ketosteroid-reduktaze ali hidroksisteroid-oksidadze, kar je odvisno od njihove afinitete NADP(H) ali NAD(H). Človeške HSD iz te naddružine so:

- 3β -HSD tipa 1,
- 3β -HSD tipa 2,
- 11β -HSD tipa 1,
- 11β -HSD tipa 2 in
- vse oblike 17β -HSD razen 17β -HSD tipa 5.

HSD v AKR naddružini so od NAD(P)H odvisne oksidoreduktaze in delujejo v celicah primarno v redukcijah zaradi njihove visoke afinitete do NADP(H). Človeške HSD iz AKR naddružine vključujejo:

- $20\alpha(3\alpha)$ -HSD (AKR1C1),
- 3α -HSD tipa 3 (AKR1C2),
- 17β -HSD tipa 5 (AKR1C3) in
- 3α -HSD tipa 1 (AKR1C4) (3).

5.2.1 KRATKOVERIŽNE DEHIDROGENAZE/REDUKTAZE

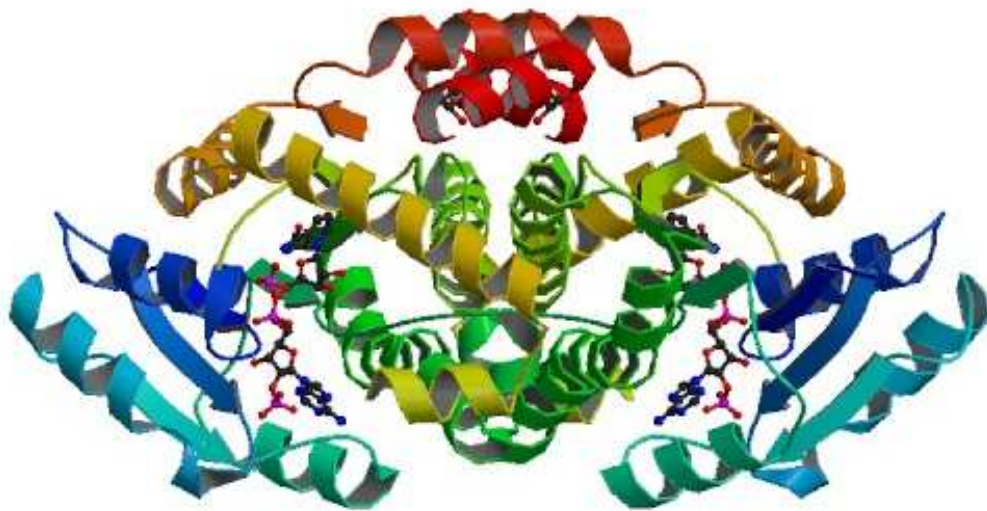
Osnovno strukturo večine SDR encimov predstavlja zaporedje 250 do 350 aminokislinskih preostankov. Čeprav imajo le 15–30% identičnih aminokislinskih preostankov, imajo vsi podobno tridimenzionalno strukturo – enodomenski vzorec zvitja, kjer se izmenjuje 7 ali 8 α -vijačnic s 7 ali 8 β -ploskvami (α/β -vzorec zvitja, znan kot Rossmanovo zvitje). Večina encimov SDR je v dimerni ali tetramerni obliki (Slika 3).

Encimske reakcije sledijo bi-bi mehanizmu, kjer se v aktivno mesto najprej veže koencim, nato pa substrat. Sledi encimska reakcija, aktivno mesto nato najprej zapusti produkt, šele nato koencim. Sproščanje koencima iz aktivnega mesta predstavlja hitrostno omejujočo stopnjo celotne encimsko katalizirane reakcije.

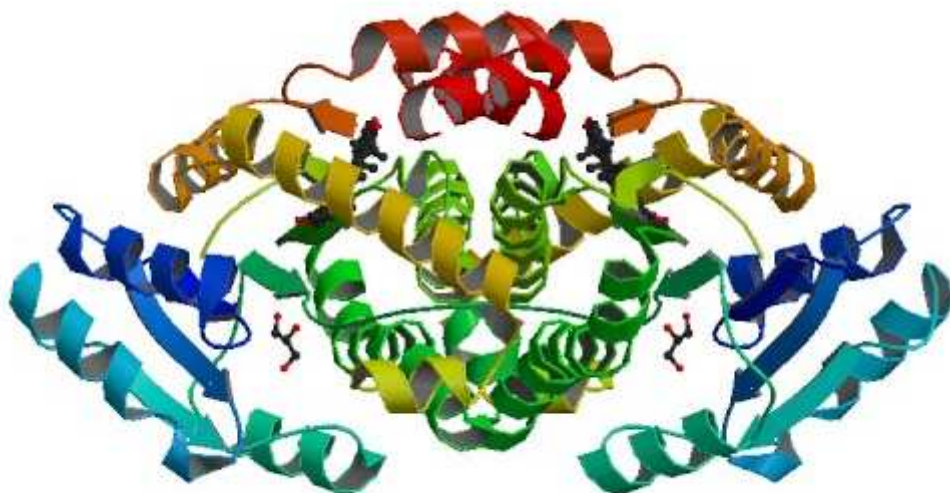
3 β -HSD (3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze/ Δ^5 - Δ^4 -izomeraze) so odgovorne za oksidacijo in izomeracijo Δ^5 -3 β -hidroksisteroidnih prekursorjev v Δ^4 -ketosteroide, katalizirajo torej nujno potreben korak sinteze vseh vrst steroidnih hormonov. Pri človeku sta znani dve izoobliki 3 β -HSD: 3 β -HSD tipa 1, ki se nahaja v placenti in perifernih tkivih, ter 3 β -HSD tipa 2, ki se v glavnem izraža v nadledvični žlezi, jajčnikih in testisih.

11 β -HSD tipa 1 in 2 uravnavata delovanje glukokortikoidnega hormona kortizola. 11 β -HSD tipa 1 reducira kortizon v kortizol in s tem omogoča njihovo vezavo na receptorje, 11 β -HSD tipa 2 pa deluje kot dehidrogenaza in tako zaščiti intrinzično neselektivne periferne mineralokortikoidne receptorje v ledvicah pred aktivacijo s kortizolom, namesto z aldosteronom.

17 β -HSD so encimi vključeni v zadnjo stopnjo biosinteze androgenov in estrogenov in katalizirajo oksidoredukcijske reakcije hidroksi in keto skupine na mestu 17 steroida. Pretvarjajo visoko aktivne 17 β -hidroksisteroide v nizko oz. neaktivne 17-ketosteroide in obratno. Med seboj se razlikujejo po koencimski in substratni specifičnosti, znotrajcelični lokalizaciji in tkivno specifičnem izražanju (4).



Slika 3: Kristalna struktura človeške estrogene 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 1 v kompleksu z NADP (pdb oznaka 1QYV) (5)

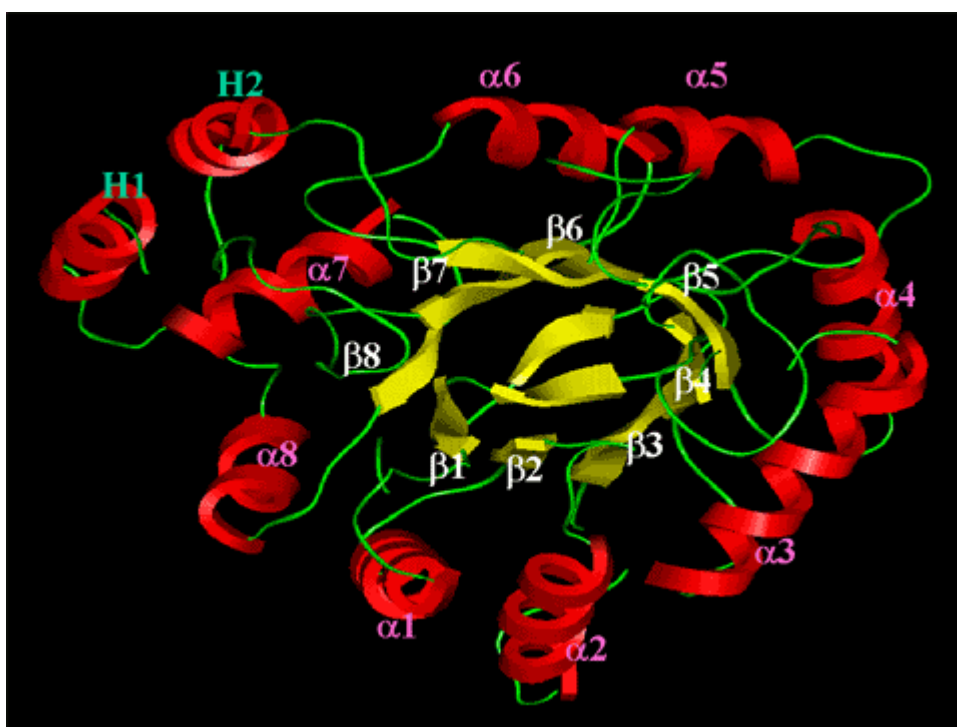


Slika 4: Kristalna struktura človeške 17 β -HSD tipa 1 v kompleksu z 5 α -dihidrotestosteronom (pdb oznaka 3KLM)

5.2.2 ALDO/KETO-REDUKTAZE

5.2.2.1 STRUKTURA

Aldo/keto-reduktaze so citosolni, topni monomerni encimi z maso 37 kDa, ki *in vivo* katalizirajo redukcije ketonov in aldehydov v ustrezne alkohole. Pri tem uporabljajo kot koencim NAD(P)H. Cilindrično jedro sestavljajo β -ravnine, ki so preko zank povezane z α -vijačnicami, le-te pa obkrožajo jedro. Ta značilna tridimenzionalna struktura sodčka (α/β)₈ omogoča vezavo encima v anti-konformaciji (3, 5, 7). (Slika 5) Vse rastline in živali, od kvasovk do človeka, izražajo številne Akr-gene. Proteini AKR so bili odkriti tudi pri mnogih mikroorganizmih (8).

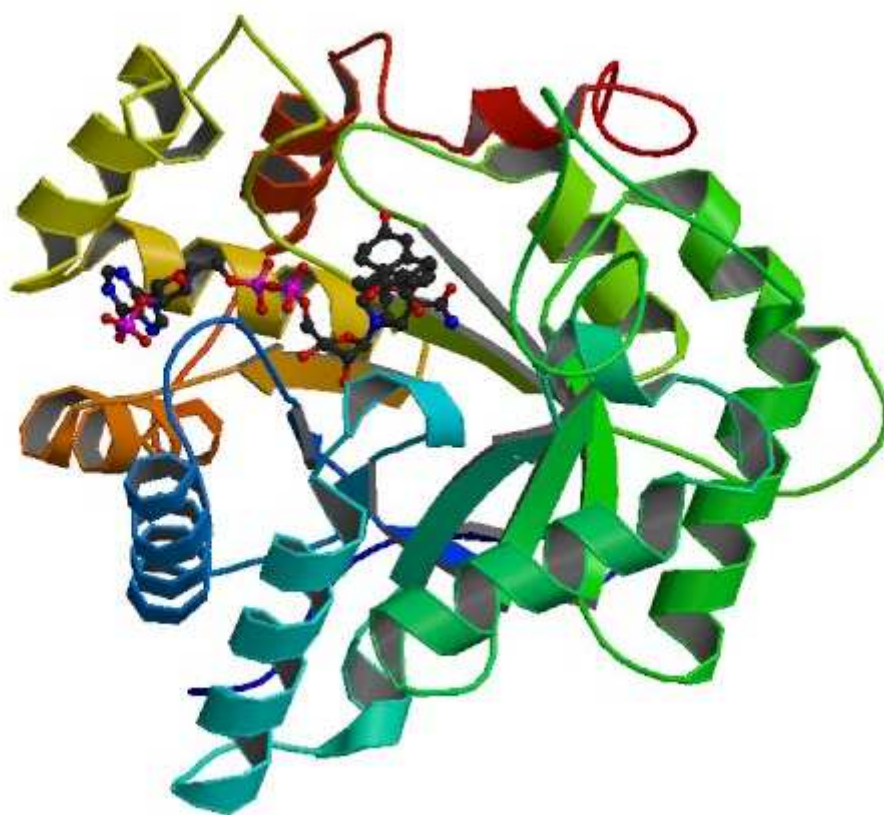


Slika 5: Struktura sodčka (α/β)₈ Aldo/keto-reduktaz (9)

5.2.2.2 POIMENOVANJE

Predstavnike naddružine aldo/keto-reduktaz poimenujemo po dogovorjenih pravilih: koren AKR označuje aldo/keto-reduktaze, arabska številka za korenem označuje družino, črka za številko poddružino in zadnja arabska številka posamezen protein (izoencim). Vsak protein ima lahko zaradi prepoznavanja različnih substratov še druga imena. Naddružina

aldo/keto-reduktaz je sestavljena iz 15 družin (AKR1–AKR15), devet družin se naprej deli v poddružine. Človeške AKR najdemo v treh družinah (AKR1, AKR6 in AKR7) (7, 8). Obstaja 13 človeških AKR, ki so vpleteni v metabolizem sladkornih aldehydov, reaktivnih lipidnih aldehydov, ketoprostaglandinov in ketosteroidov. Metabolizirajo tudi ksenobiotike kot so zdravila in kemični kancerogeni (10). Poddružino AKR1C sestavlja 22 izoencimov, od katerih so štirje človeški: AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 in AKR1C4. Kljub temu, da imajo ohranjenega 86–99% aminokislinskega zaporedja se razlikujejo po substratni specifičnosti, inhibicijskih profilih in razporeditvi po tkivih (7). Zanimivo je, da se izoencima AKR1C1 in AKR1C2 med seboj razlikujeta le v 7 aminokislinah. (Slika 6)



Slika 6: Človeška AKR1C3 v kompleksu s NADH in testosteronom (pdb oznaka 1J96)

(11)

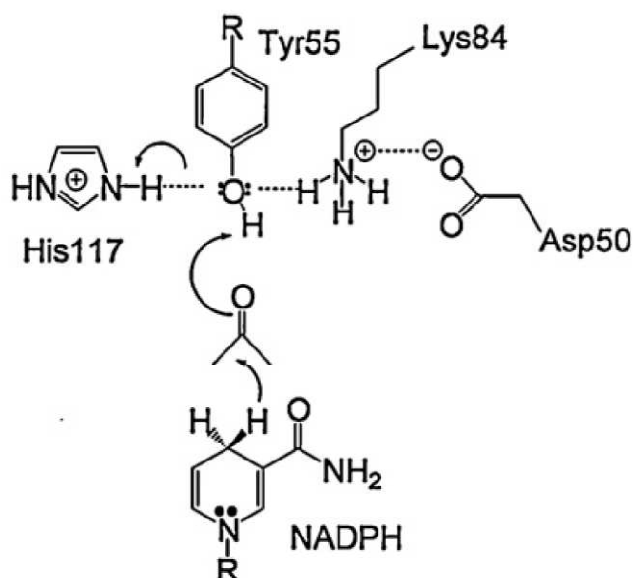
5.2.2.3 KATALITIČNI MEHANIZEM

AKR katalizirajo zaporedne reakcije, ki vodijo v tvorbo centralnega kompleksa (encim + koencim + substrat), v katerem se zgodi kemijska reakcija. Vse zaporedne reakcije brez izjeme potekajo po bi-bi mehanizmu. V prvem koraku se na protein veže koencim, nato se

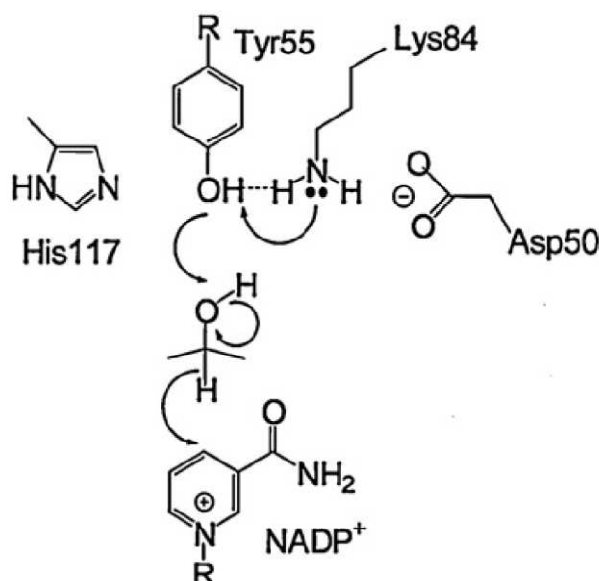
veže steroid, tvori se centralni kompleks in zgodi se kemijska reakcija. Nato se najprej odcepi steroidni produkt, sledi mu koencim. Hitrost reakcije je odvisna od hitrosti sprostitve koencima (3).

Encimi AKR imajo v aktivnem mestu ohranjeno katalitično tetrado Asp50, Tyr55, Lys84 in His117. Pri reakciji, ki jo katalizirajo, se 4-pro-R-hidridni ion prenese s koencima na substrat. Najprej Try55 odda proton substratu in veže proton iz imidazolne skupine His117. S prenosom protona na substrat je olajšan prenos hidridnega iona iz koencima (7). (Slika 7)

REDUKCIJA



OKSIDACIJA



Slika 7: Katalitičen mehanizem za AKR encime (3)

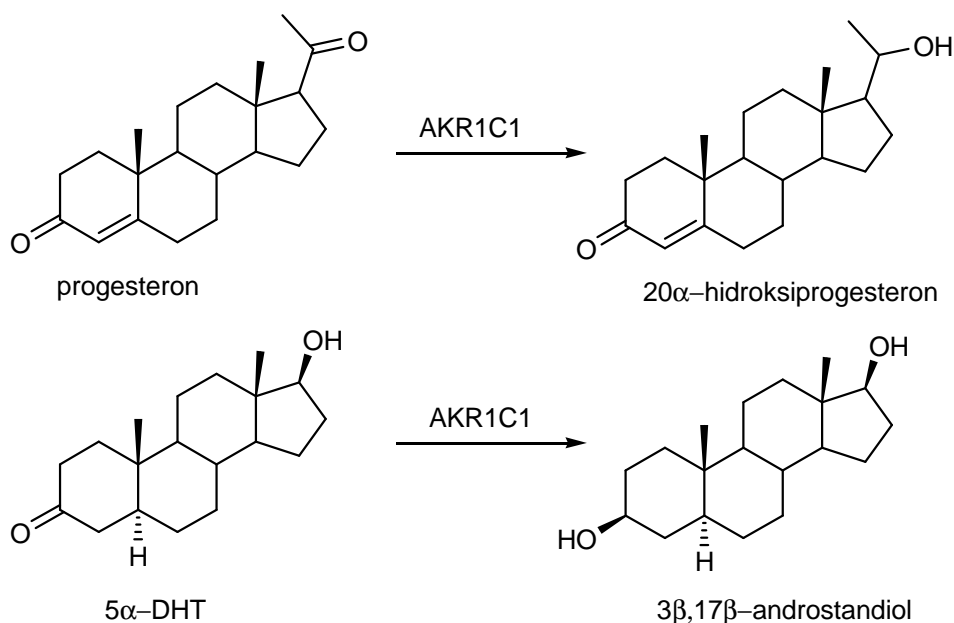
5.2.2.4 ČLOVEŠKI IZOENCIMI AKR1C

V biosintezi in inaktivaciji spolnih hormonov izoencimi AKR1C katalizirajo stereospecifične redukcije karbonilnih funkcionalnih skupin na mestih 3, 17 in 20 steroidnega skeleta. V stereoidogenih tkivih so vključeni v biosintezo androgenov in estrogenov, v perifernih tkivih pa pretvarjajo aktivno obliko le-teh v neaktivno. S tem delujejo kot molekularna stikala, ki na pred-receptorski ravni uravnavajo lokalno koncentracijo hormonov (7). Vsako neravnovesje v metabolizmu spolnih hormonov lahko vodi do povečane proliferacije celic in s tem do kopičenja genetskih napak. Te spremembe lahko vodijo do razvoja hormonsko odvisnih oblik raka in drugih hormonsko odvisnih bolezni (2).

Geni, ki kodirajo človeške izoencime AKR1C, se izražajo v različnih tkivih in posledično so encimi AKR1C vpleteni v mnoge biokemične procese. Jetra so edino tkivo, v katerem se vsi štirje izoencimi nahajajo v približno enaki meri. AKR1C4 najdemo pretežno v jetrih, ostali izoencimi pa so prisotni tudi v drugih tkivih. V pljučih se AKR1C1-AKR1C3 nahajajo v visokih koncentracijah, v prostati najdemo predvsem AKR1C2 in AKR1C3, AKR1C1 pa prevladuje v testisih. V mlečnih žlezah prevladuje AKR1C3, medtem ko v endometriju in maščobnem tkivu najdemo vse tri izoencime. V možganih se nahajata predvsem AKR1C1 in AKR1C2, njuna koncentracija pa je nizka. AKR1C3 pa najdemo tudi v ledvicah in mehurju (2, 12).

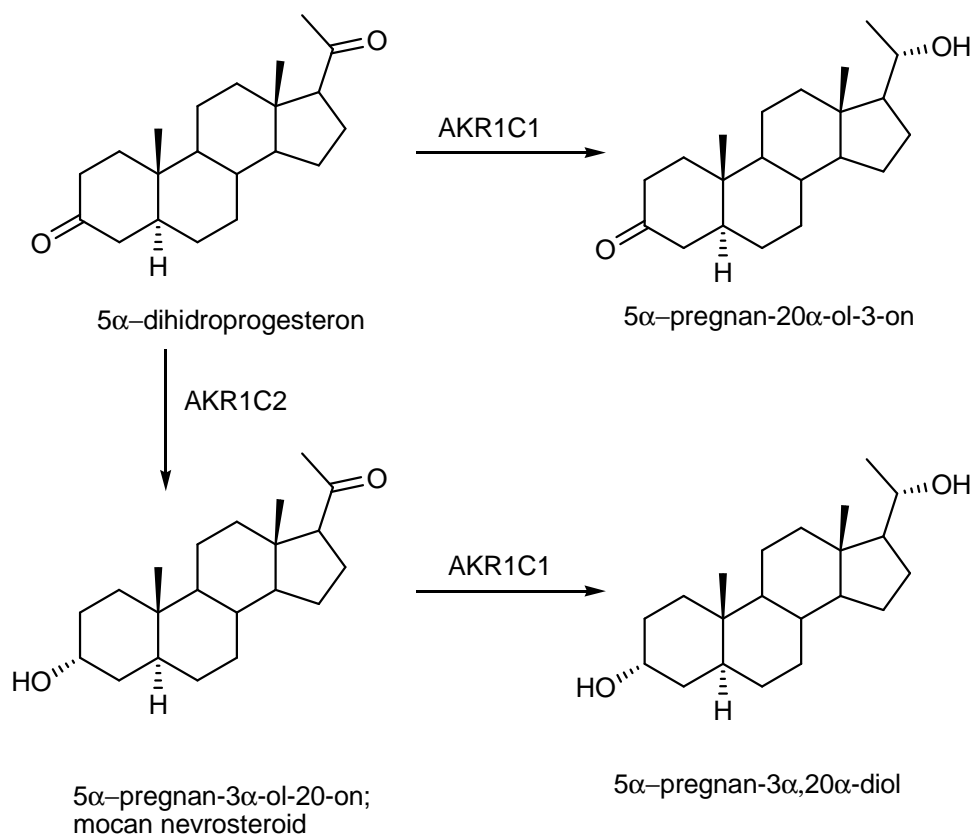
5.3 AKR1C1

AKR1C1 katalizira redukcijo progesterona v manj aktiven 20α -hidroksiprogesteron, s 3β -ketosteroid-reduktazno aktivnostjo pa katalizira inaktivacijo 5α -dihidrottestosterona (5α -DHT) v $3\beta,17\beta$ -androstandiol, ki deluje proapoptotično preko receptorjev za estrogene (ER) β (Slika 8) (7, 13). Tako določa koncentracijo aktivnih ligandov za receptorje za progesteron (PR) in androgene (AR) (7). Neravnovesje med visoko in nizko aktivnimi oblikami androgenov in progestagena je povezano z rakom dojk, prostate, endometrija, jajčnikov, hirzutizmom ter razporeditvijo maščobnega tkiva (2).



Slika 8: Metabolizem progesterona in 5 α -DHT z encimom AKR1C1 (7)

AKR1C1 v možganih sodeluje pri metabolizmu nevrosteroidov. Nevrosteroidi so nevroativni steroidi (endogeni steroidi, ki preko vezave na specifične receptorje spreminjajo vzdražnost nevronov) ali njihovi metaboliti (ne vplivajo na vzdražnost nevronov), ki se sintetizirajo in delujejo v možganih. AKR1C1 katalizira reakcijo inaktivacije 5 α -dihidroprogesterona (5 α -DHP) in 3 α ,5 α -tetrahidroprogesterona (3 α ,5 α -THP). 3 α ,5 α -THP je močan pozitiven alosterični modifikator receptorja za γ -aminobutanojsko kislino (GABA) tipa A. GABA po vezavi na receptor povzroči vdor Cl⁻ ionov v celico in s tem hiperpolarizacijo. Za proženje akcijskega potenciala in prenos informacije je zato potreben večji impulz (7). Ti nevrosteroidi imajo posledično anestetičen, analgetičen, anksiolitičen in antikonvulziven učinek. Spremembe v metabolizmu nevrosteroidov so povezane z depresijo, epilepsijo in predmenstrualnim sindromom (Slika 9) (2, 14). AKR1C1 in AKR1C2 imata skupnega kar 98% aminokislinskega zaporedja, zato je velika verjetnost, da bodo inhibitorji enega encima inhibirali tudi drugega (15).

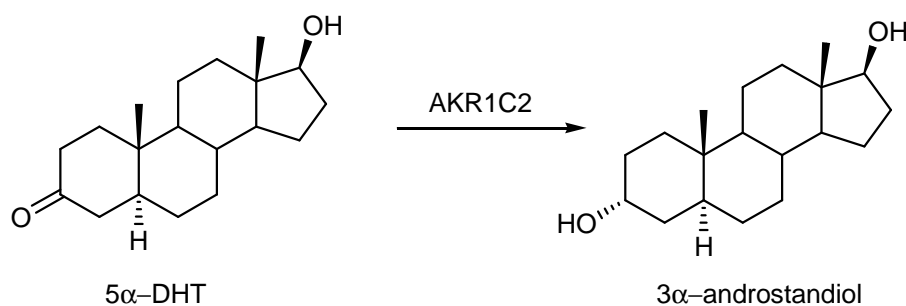


Slika 9: Metabolizem neurosteroidov z encimom AKR1C1 in AKR1C2 (7)

AKR1C1 ima tudi vlogo detoksifikacije produktov lipidne peroksidacije, katalizira redukcijo 4-hidroksi-2-nonenala, ki je eden najpogostejših citotoksičnih produktov lipidne peroksidacije in s tem odstrani aldehydno skupino in konjugiran sistem dvojnih vezi. Produkti lipidne peroksidacije so povezani z boleznimi kot je ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen (7, 14). Preveliko izražanje AKR1C1 gena v rakavih celicah pljuč (16), jajčnikov, materničnega vratu, kože in črevesja je povezano z rezistenco na mnoge kemoterapevtike (cisplatin, karboplatin, adriamicin, doksorubicin, bleomicin). Te učinkovine tvorijo reaktivne kisikove spojine, ki usmerjajo celice do nedelovanja in njihove apoptoze. AKR1C1 zmanjša tvorbo reaktivnih kisikovih spojin, odstranjuje proste radikale in antraciklinske učinkovine. Čeprav popoln mehanizem rezistence še ni popolnoma raziskan, je znano, da je encim AKR1C1 potreben za preživetje in proliferacijo rakavih celic, ki so bile izpostavljene kemoterapevtikom (14). AKR1C1 zato predstavlja dobro tarčo za razvoj novih učinkovin, ki bi izboljšale slabo prognozo rakavih obolenj ter dodatno terapijo v boju proti rezistenci na kemoterapevtike. Inhibitorji AKR1C1 bi se hkrati lahko uporabljali za vzdrževanje nosečnosti in kot učinkovine, ki izboljšujejo delovanje neurosteroidov, ki pozitivno uravnavajo GABA_A receptorje (14).

5.4 AKR1C2

AKR1C2 je predvsem 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaza, ki katalizira redukcijo najbolj aktivnega androgena 5 α -dihidrotestosterona v manj aktiven 3 α ,17 β -androstandiol, ki ima nizko afiniteto do receptorjev za androgene (Slika 10) (7). Na ta način ščiti celice prostate pred preveliko proliferacijo (2). AKR1C2 v možganih sodeluje pri metabolizmu neurosteroidov, katalizira nastanek 3 α ,5 α -tetrahidroprogesterona, najbolj aktivnega neurosteroida pri sesalcih (7). AKR1C2 je vpletena tudi v sintezo in transport žolčnih kislin (12).



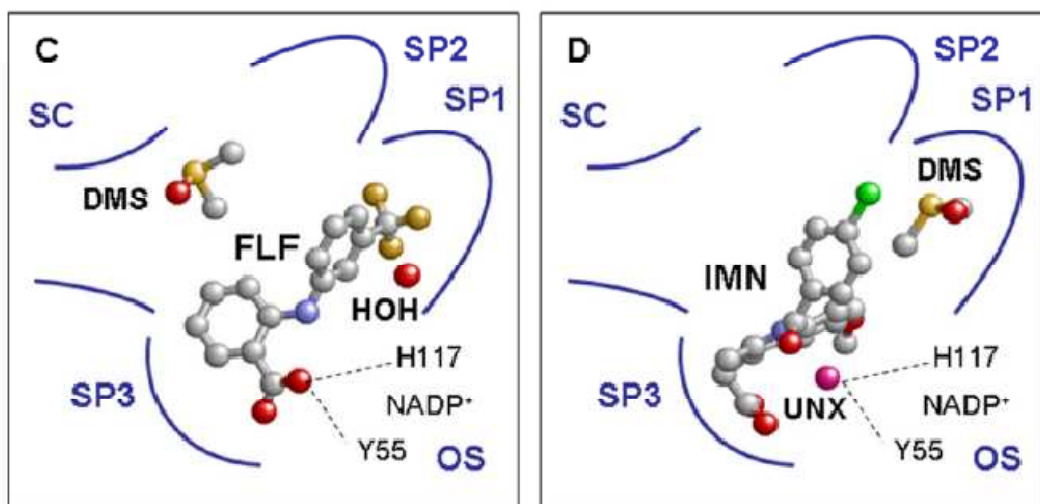
Slika 10: Metabolizem 5 α -DHT z AKR1C2 (7)

5.5 AKR1C3

Encim AKR1C3 je znan tudi kot 17 β -HSD tipa 5 in PGF sintaza. Katalizira pretvorbo prostaglandinov H₂ in D₂ v PGF_{2 α} in 9 α ,11 β -PGF₂. S tem zmanjša koncentracijo 15-deoksi- Δ 12,14-PGJ_{2a}, ki nastaja s spontano reakcijo iz PGD₂ in njegovo vezavo na receptor γ aktiviran s peroksisomskim proliferatorjem (PPAR γ). Aktivacija tega receptorja povzroči prepisovanje genov, ki sprožijo diferenciacijo in/ali apoptozo. V normalnem kostnem mozgu je prisotna velika koncentracija PGD₂, zato se mora tkivo zaščititi pred prekomernim antiproliferativnim in prodiferencijskim delovanjem. AKR1C3 zaradi vpletenosti v metabolizem prostaglandinov sodeluje tudi pri krčenju mehurja, izločanju urina in ima zaščitno vlogo na ravni ledvic (7). Metabolizem prostaglandinov z AKR1C3 preprečuje diferenciacijo levkemičnih celic in inhibicija encima se zato proučuje pri zdravljenju mieloične levkemije. (15, 17) Hkrati ima tudi 17 β -hidroksisteroid-

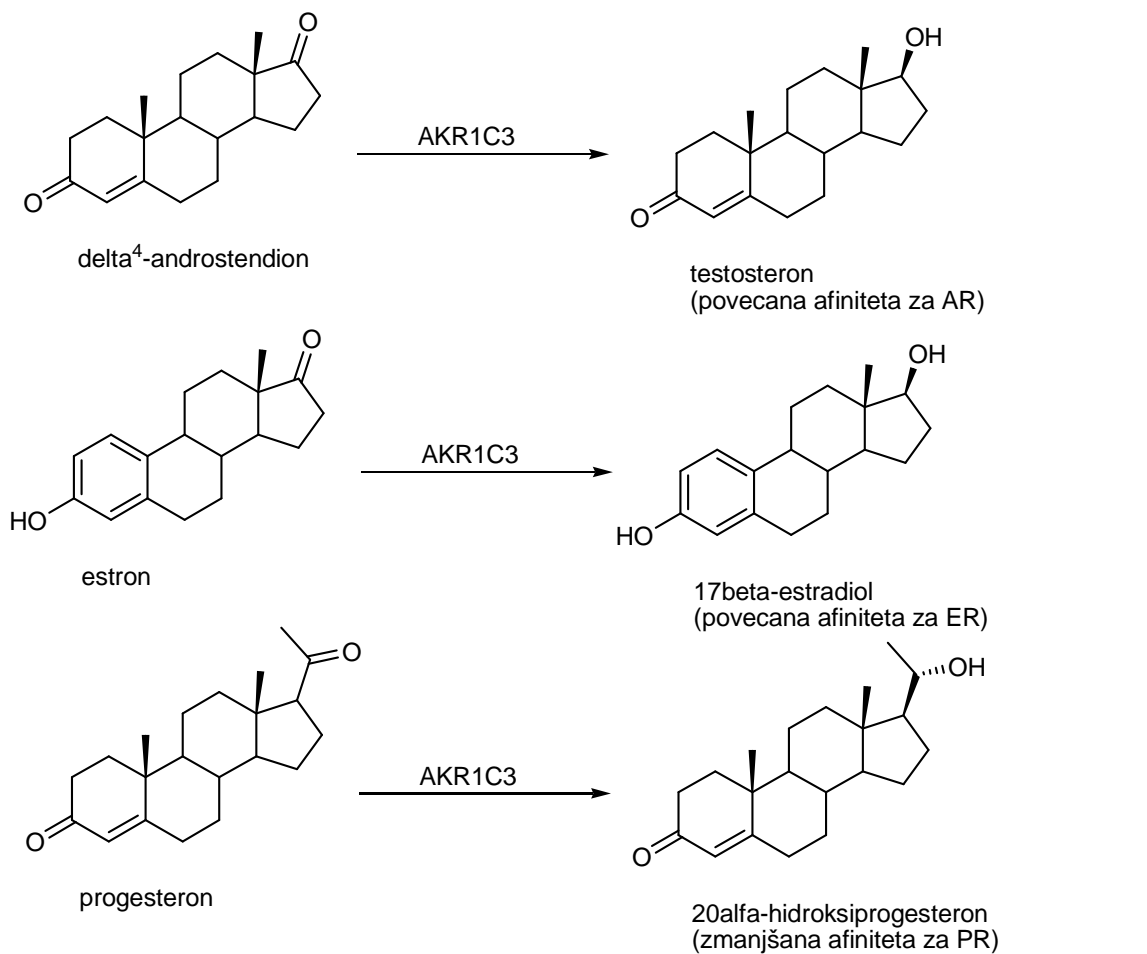
dehidrogenazno aktivnost in katalizira pretvorbo estrona v estradiol ter pretvorbo androstendiona v testosteron (Slika 12) (11, 17). V rakavih celicah prostate in dojke je povečano izražanje AKR1C3 (18). Produkti reakcij, ki jih katalizira AKR1C3 (androgeni, estrogeni, $\text{PGF}_{2\alpha}$ in $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_2$), spodbujajo rast tumorjev, zato AKR1C3 predstavlja tarčo za zdravljenje tako hormonsko odvisnih kot neodvisnih oblik raka (19). V endometriju AKR1C3 poveča raven estrogenov in zniža raven progesterona ter s tem spodbuja proliferacijo rakavih celic endometrija. AKR1C3 stimulira proliferacijo rakavih celic dojke, s povečanjem koncentracije proliferativnega PGF_2 in znižanjem koncentracij antiproliferativnih PGJ_2 produktov pa vpliva na hormonsko odvisne in neodvisne vrste raka. AKR1C3 je vključen tudi razvoj raka prostate ter nerakave bolezni, kot so benigna hiperplazija prostate, dismenoreja in endometrioza (15, 17). Pri načrtovanju inhibitorjev AKR1C3 si želimo čim boljše selektivnost, saj inhibicija vseh izoencimov AKR1C ni zaželena. Pri raku prostate namreč AKR1C1 reducira $5\alpha\text{-DHT}$ v $5\alpha\text{-androstan-}3\beta,17\beta\text{-diol}$ (pro-apoptičen ligand estrogenskih β receptorjev), AKR1C2 pa reducira $5\alpha\text{-DHT}$ v $5\alpha\text{-androstan-}3\alpha,17\beta\text{-diol}$ (šibek androgen). Inhibicija teh dveh encimov bi spodbudila proliferacijo v prostati (15, 17).

Pri vezavi liganda v tarčno mesto so vključeni področja, po katerih se AKR1C3 razlikuje od izoencimov AKR1C1 in AKR1C2. Z upoštevanjem teh razlik bi lahko povečali vezavno afiniteto in selektivnost inhibitorjev AKR1C3. Področje SP1 je večje pri AKR1C3 v primerjavi z ostalimi izooblikami, razlike v področju za vezavo substrata vključujejo aminokislino Ser 118 in Tyr 319, pri ostalih izoencimih so na teh mestih fenilalanini. AKR1C1, AKR1C2 in AKR1C4 imajo manjše SP2 področje, ki ne vključuje aminokislino, ki bi lahko tvorile vodikove vezi, medtem ko AKR1C3 vključuje Ser 129, ki lahko tvori vodikove vezi. Področje SP3 pri izoencimih AKR1C1, AKR1C2 in AKR1C4 vključuje bolj rigidne stranske verige (Slika 11) (17).

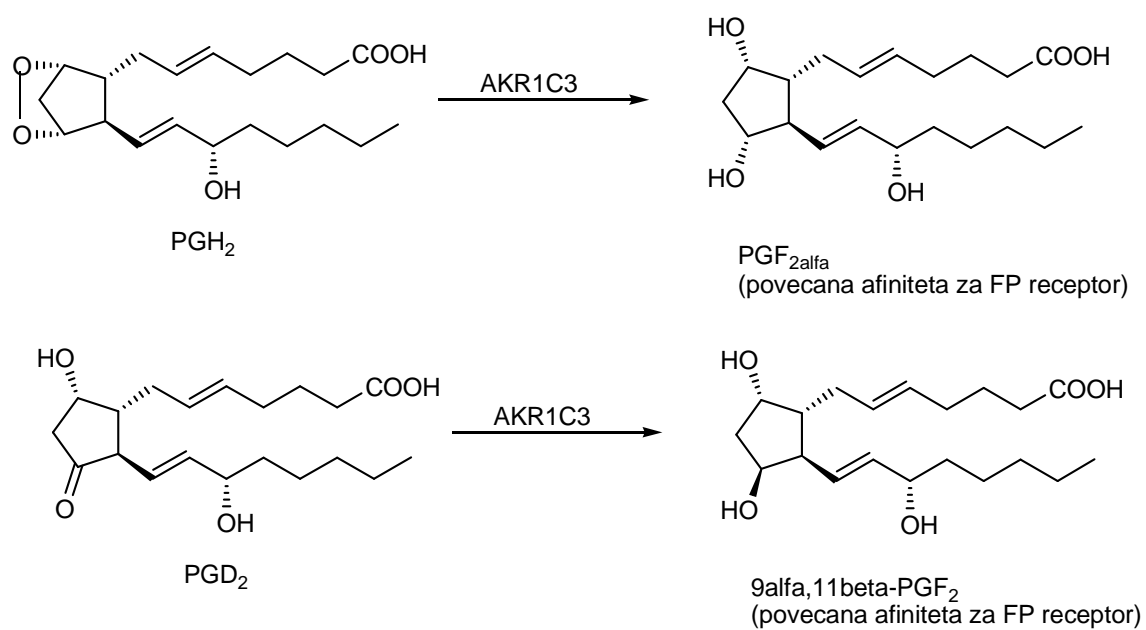


Slika 11: Zasedenost AKR1C3 vezavnih žepkov z inhibitorjema flufenaminsko kislino in indometacinom (17)

STEROIDNI HORMONI



PROSTAGLANDINI

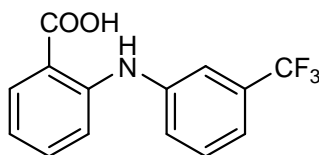


Slika 12: Metabolizem steroidov in prostaglandinov z encimom AKR1C3 (17)

Zaradi pomembne fiziološke vloge so AKR1C encimi, posebej AKR1C1 in AKR1C3, pomembne tarče za razvoj novih zdravilnih učinkovin. Inhibitorji AKR1C1 so zanimivi kot potencialne zdravilne učinkovine za zdravljenje raka endometrija, predmenstrualnega sindroma, epilepsije, depresije in vzdrževanje nosečnosti. AKR1C3 je zanimiva tarča za razvoj učinkovin za zdravljenje hormonsko odvisnih oblik raka kot so rak prostate, dojk in endometrija pa tudi za zdravljenje hormonsko neodvisnih oblik raka (2).

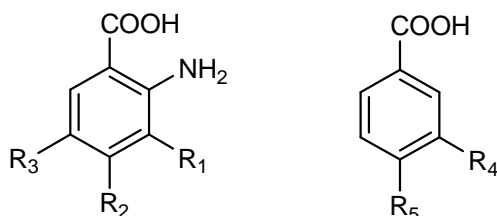
6 NAMEN DELA

Derivati antranilne kisline so v literaturi opisani kot inhibitorji AKR1C encimov. Eden izmed znanih in najbolj aktivnih inhibitorjev je flufenaminska kislina (Slika 13), ki inhibira vse tri izoencime v nizkem mikromolarnem oziroma nanomolarnem območju (14, 15, 17).



Slika 13: Strukturna formula flufenaminske kisline

Namen dela bo sinteza različnih derivatov antranilne kisline kot potencialnih inhibitorjev izoencimov AKR1C1–AKR1C3, pri čemer bomo izhajali iz dveh vrst izhodnih spojin, in sicer iz derivatov antranilne kisline in derivatov benzojske kisline.



V prvi stopnji sinteze bomo zaščitili prosto karboksilno skupino derivata antranilne kisline, nato bomo tvorili amdino vez, sledilo bo uvajanje alkilnih verig na proste hidroksilne ali aminske skupine. Na koncu bomo odstranili zaščito karboksilne skupine in reducirali nitro skupino pri spojinah, kjer je la-ta prisotna.

Vsem sintetiziranim spojinam bomo določili *in vitro* inhibitorno aktivnost na izoencimih AKR1C1–AKR1C3 s spektrofotometrično metodo in na podlagi rezultatov testov sklepali na to, kakšen vpliv imajo različne substituentne na inhibitorno aktivnost. V primeru, da bo kakšna spojina izkazovala inhibitorno aktivnost, bomo s pomočjo tridimenzionalne strukture AKR1C izoencimov z računalniško simulacijo poskušali ugotoviti način vezave spojine v aktivno mesto encima.

7 MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu diplomskega dela smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Aldrich, Fluka, Merck.

Kromatografske metode

Za tankoplastno kromatografijo, s katero smo spremljali potek reakcij ter postopkov čiščenja, smo uporabili plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z debelino nanosenega silikagela 0.20 mm na aluminijastem nosilcu.

Pri kolonski kromatografiji smo uporabljali Merckov Silica Gel 60 z velikostjo por 0.063–0.200 mm.

Za detekcijo spojin na TLC ploščicah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda = 254$ nm).

Za določevanje čistote spojin s HPLC smo uporabili Agilent Eclipse C18 kolono (4.6 × 50 mm, 5 μ m) s pretokom 1.0 mL/ min, detekcijo pri 254 nm, topilni sistem iz: A = H₂O Z 0.1% TFA; B = MeOH. Uporabili smo naslednji gradient: 0–3 min, 40% B; 3–18 min, 40% B → 80% B; 18–23 min, 80% B; 23–30 min, 80% B → 40% B; »run time« = 30 min; T = 25°C.

Določanje tališč

Talilne intervale smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

Spektroskopske metode

Masne spektre spojin so posneli na spektrofotometru Autospec (VG-Analytical) z EI, ESI ter HRMS tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

¹H-NMR spektre so posneli na inštrumentu Bruker Advance DPX 300 v Nacionalnem centru centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in

kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Vzorce so raztopili v devteriranih topilih DMSO-d₆ in CDCl₃, kot interni standard pa so uporabili TMS.

Elementna analiza

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

Nomenklatura spojin

Za risanje strukturnih formul smo uporabljali program ChemDrawUltra, verzija 9.0, podjetja CambridgeSoft.

Spektrofotometrično merjenje aktivnosti spojin s pomočjo BioTek PowerWave XS2

AKR1C1

Reagenti

- 1-acenaftol; c = 30 μM v 0.1 M fosfatnem pufru pH = 9
- encim AKR1C1; c = 2.61 mg/mL; redčen 10 × s PBS pufrom
- Triton X-114 = 1.0% v ddH₂O
- DMSO; 4.8% v končnem volumnu
- NAD⁺; c = 13.08 mg/mL v fosfatnem pufru pH = 9, redčen 23.3 × s Tritonom
- novi derivati antranilne kisline
- fosfatni pufer; c = 0.1 mol/L; pH = 9

Priprava vzorcev za merjenje absorbance

Končni volumen raztopine je 300 μL.

- 1-acenaftol 140 μL
- AKR1C1 5 μL
- NAD⁺ 35 μL
- inhibitor 5 μL
- fosfatni pufer 115 μL

AKR1C2

Reagenti

- 1-acenaftol; $c = 60 \mu\text{M}$ v 0.1 M fosfatnem pufru $\text{pH} = 9$
- encim AKR1C2; $c = 3.64 \text{ mg/mL}$; redčen $10 \times$ s PBS pufrom
- Triton X-114 = 1.0% v ddH₂O
- DMSO; 4.8% v končnem volumnu
- NAD⁺; $c = 13.08 \text{ mg/mL}$ v fosfatnem pufru $\text{pH} = 9$, redčen $23.3 \times$ s Tritonom
- novi derivati antranilne kisline
- fosfatni pufer; $c = 0.1 \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 9$

Priprava vzorcev za merjenje absorbance

Končni volumen raztopine je 300 μL .

- | | |
|--------------------|-------------------|
| • 1-acenaftol | 140 μL |
| • AKR1C2 | 8 μL |
| • NAD ⁺ | 35 μL |
| • inhibitor | 5 μL |
| • fosfatni pufer | 115 μL |

AKR1C3

Reagenti

- 1-acenaftol; $c = 100 \mu\text{M}$ v 0.1 M fosfatnem pufru $\text{pH} = 9$
- encim AKR1C1; $c = 1.94 \text{ mg/mL}$
- Triton X-114 = 1.0% v ddH₂O
- DMSO; 4.8% v končnem volumnu
- NAD⁺; $c = 13.08 \text{ mg/mL}$ v fosfatnem pufru $\text{pH} = 9$, redčen $23.3 \times$ s Tritonom
- novi derivati antranilne kisline
- fosfatni pufer; $c = 0.1 \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 9$

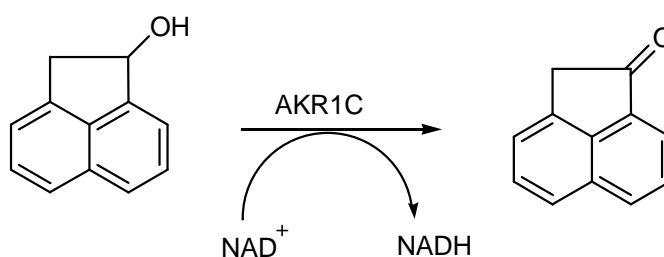
Priprava vzorcev za merjenje absorbance

Končni volumen raztopine je 300 μL .

- 1-acenaftol 140 μL
- AKR1C3 8.5 μL
- NAD^+ 35 μL
- inhibitor 5 μL
- fosfatni pufer 115 μL

POSTOPEK

Inhibicijo encimov AKR1C smo spremljali v smeri oksidacije substrata (1-acenaftol). Zmanšan porast absorbance pri 340 nm pomeni, da je redukcija koencima (NAD^+) manjša in je reakcija oksidacije substrata inhibirana. (Slika 14)



Slika 14: Oksidacija substrata 1-acenaftola z encimom AKR1C

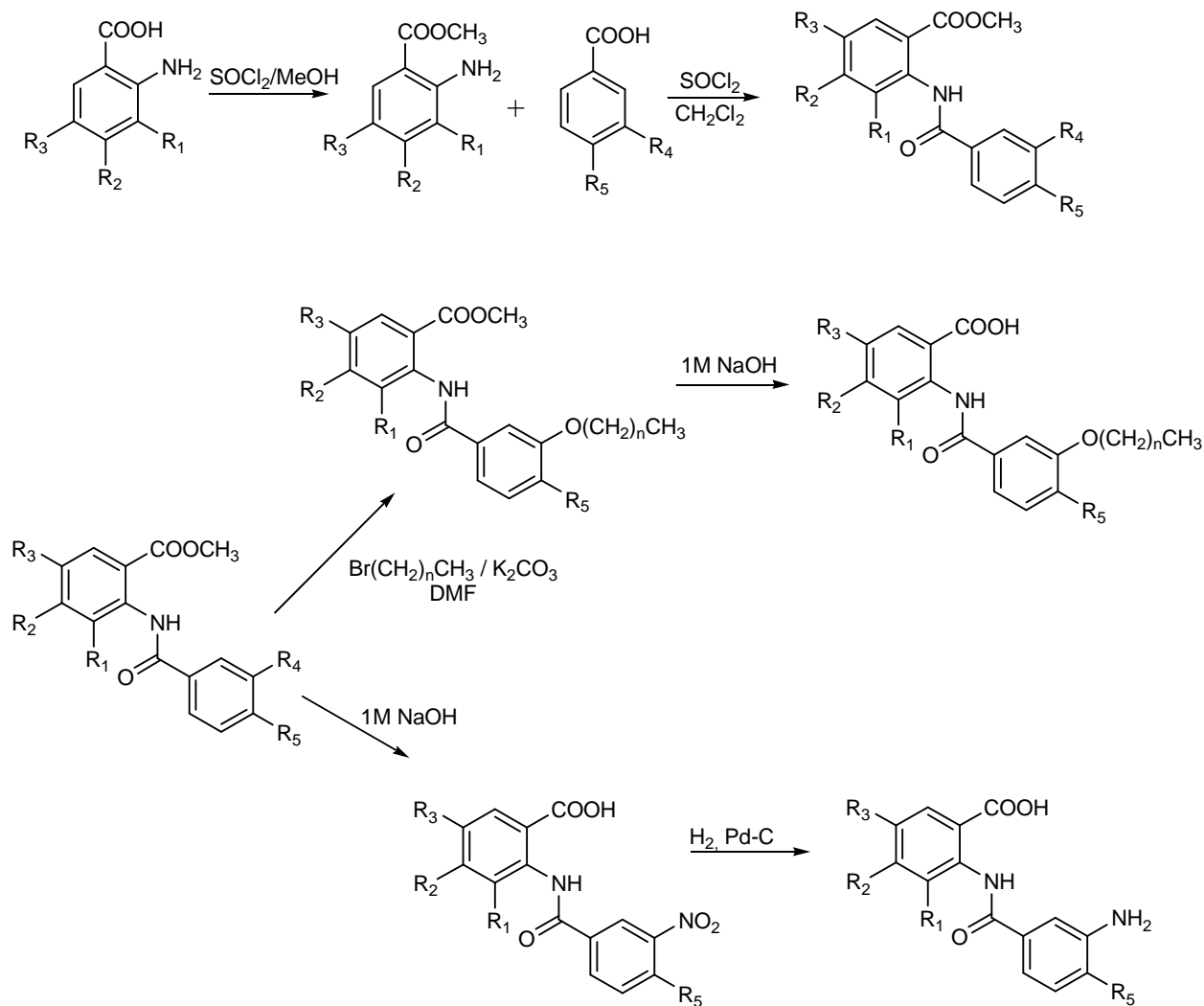
DOLOČEVANJE IC_{50} VREDNOSTI

IC_{50} je koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico. Spojinam, ki so aktivnost encima zmanjšale za več kot 30% pri koncentraciji 10 μM , smo izmerili aktivnost še pri višjih in nižjih koncentracijah inhibitorja pri enakih pogojih. Iz meritev smo izračunali hitrost reakcije brez inhibitorja (v_0) in hitrost ob prisotnosti inhibitorja (v_i) ter izračunali odstotek inhibicije. S pomočjo programa GraphPad Prism Version 4.0 (GraphPad Software Inc) pa smo izračunali IC_{50} .

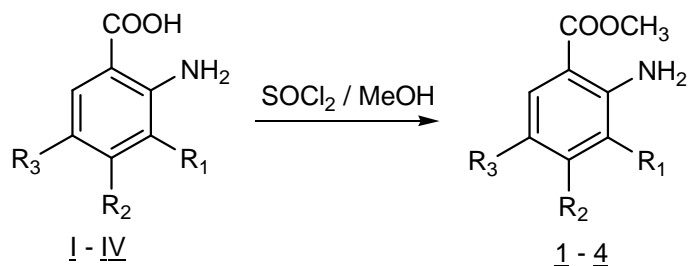
$$\% \text{ inhibicije} = (1 - (v_i/v_0)) \times 100$$

8 EKSPERIMENTALNO DELO

8.1 Splošna reakcijska shema



8.2 1. Stopnja sinteze: uvedba metilne zaščite na karboksilno kislino



Oznaka	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
R ₁	H	CH ₃	H	H
R ₂	H	H	OCH ₃	OH
R ₃	NO ₂	Cl	OCH ₃	H

Splošni sintezni postopek:

Raztopino derivata antranilne kisline I – IV (1.0 mmol) v metanolu (5 mL) smo ohladili na ledeni kopeli. Med mešanjem smo s kapalnikom dokapavali tionil klorid (15 ekvivalentov). Po eni uri mešanja na ledeni kopeli smo reakcijsko zmes prestavili na oljno kopel in mešali pri 65°C 48 ur. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, suhemu preostanku dodali nasičeno vodno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (5 mL) in naalkalili z 2 M raztopino NaOH do pH = 4–10 ter ekstrahirali z EtOAc (3 × 5 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 10 mL), posušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo ustrezne mobilne faze.

Metil 2-amino-5-nitrobenzoat (1) (19)

Kolonska kromatografija: EtOAc : heksan = 1 : 3

Opis: fluorescentno rumeni igličasti kristali

m = 1.512 g

Izkoristek: 56%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): R_f = 0.48

Tališče: 166.0–167.0°C (v literaturi (19): 167.0–169.0°C)

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 197$

HRMS ($m/z = 197$) za $C_8H_9N_2O_4$: izračunan 197.0562 in izmerjen 197.0562

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 3.95 (s, 3H), 6.52 (s, 2H), 6.69 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 8.15 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H)

Metil 2-amino-5-kloro-3-metilbenzoat (2) (20)

Kolonska kromatografija: CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1

Opis: sivo rjavi igličasti kristali

$m = 2.439$ g

Izkoristek: 61%

TLC (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1): $R_f = 0.83$

Tališče: 35.5–37.5°C (v literaturi (20): 33.0–35.0°C)

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 200$

HRMS ($m/z = 200$) za $C_9H_{11}NO_2Cl$: izračunan 200.0478 in izmerjen 200.0472

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.80 (s, 3H), 6.59 (s, 1H), 7.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H)

Metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoat (3) (21)

Kolonska kromatografija: EtOAc : heksan = 1 : 1

Opis: beli kristali

$m = 2.118$ g

Izkoristek: 79%

TLC (etilacetat : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.43$

Tališče: 124.0–124.5°C (v literaturi (21): 127.0–129.0°C)

ESI-MS $[M+H - CH_3OH]^+$: $m/z = 180$

HRMS ($m/z = 180$) za $C_9H_{10}NO_3$: izračunan 180.0661 in izmerjen 180.0647

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.64 (s, 3H), 3.74 (s, 6H), 6.36 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 7.13 (s, 1H)

Metil 2-amino-5-hidroksibenzoat (**4**) (22)

Kolonska kromatografija: EtOAc : heksan = 1 : 1

Opis: sivo rjavi igličasti kristali

m = 1.897 g

Izkoristek: 57%

TLC (etilacetat : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.35$

Tališče: 159.0–161.0°C (v literaturi (22): 160.0–162.0°C)

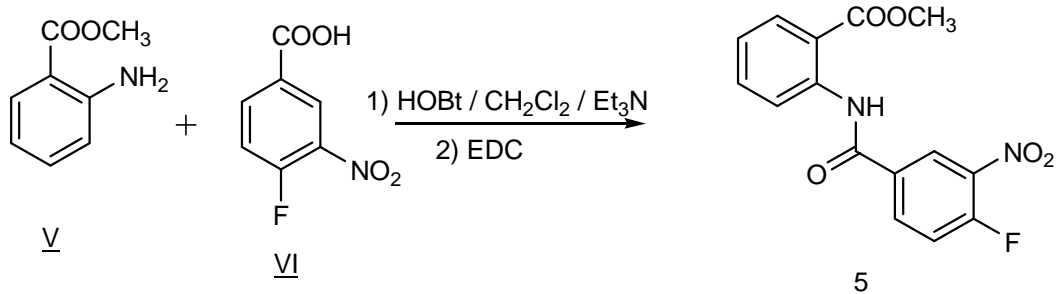
ESI-MS $[M+H]^+$: 168

HRMS ($m/z = 168$) za $C_8H_{10}NO_3$: izračunan 168.0661 in izmerjen 168.0653

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.76 (s, 3H), 6.05 (s, 2H), 6.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.80 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H)

8.3 2. Stopnja sinteze: tvorba amidne vezi

8.3.1 Uporaba HOBt / EDC sklopitvenega reagenta



Postopek:

Derivat metilantranilata **V** (151 mg, 1.0 mmol) in derivat benzojske kisline **VI** (185 mg, 1.0 mmol) smo raztopili v brezvodnem CH_2Cl_2 , ohladili na $0^\circ C$ in dodali HOBt (162 mg, 1.2 mmol) ter Et_3N (303 mg, 418 μL , 3 mmol). Po 5 minutah mešanja smo dodali še EDC (202 mg, 1.3 mmol). Reakcija je nato eno uro potekala pri $0^\circ C$, nato pa 24 ur pri sobni temperaturi. Zaradi slabega poteka reakcije smo nato še 24 ur mešali pri temperaturi $45^\circ C$. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, suhemu preostanku dodali EtOAc (10 mL) in

Postopek:

Derivat benzojske kisline **IV** – **IX** (1 mmol) smo raztopili v CH₂Cl₂ (5 mL), nato smo dodali piridin (1.24 mmol) in SOCl₂ (6.7 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri 45°C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, nato pa reakcijsko zmes spirali s toluenom (3 × 2 mL). Nato smo reakcijsko zmes raztopili v 5 mL toluena, dodali derivat metilantranilata **1** - **4**, **V**, **X**, **XI** in mešali 3 ure pri 110°C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, suhemu preostanku dodali 10% vodno raztopino Na₂CO₃ (10 mL), ekstrahirali v CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), organsko fazo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 10 mL), posušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo prekristalizirali iz ustreznega topila. Po potrebi smo produkt dodatno očistili s kolonsko kromatografijo (23).

Oznaka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>5</u>	H	H	H	NO ₂	F
<u>6</u>	H	H	H	OH	NO ₂
<u>7</u>	H	Cl	H	OH	H
<u>8</u>	H	H	Br	OH	H
<u>9</u>	H	H	Cl	OH	H
<u>10</u>	H	H	NO ₂	OH	H
<u>11</u>	H	H	H	OH	H
<u>12</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	NO ₂	H
<u>13</u>	H	H	Cl	NO ₂	H
<u>14</u>	H	H	OH	NO ₂	F
<u>15</u>	H	H	OH	NO ₂	H
<u>16</u>	CH ₃	H	Cl	NO ₂	H
<u>17</u>	H	H	Br	NO ₂	H
<u>18</u>	H	H	Br	NO ₂	F
<u>19</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H

Metil 2-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)benzoat (5)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: rumeni igličasti kristali

m = 68 mg, izkoristek: 21.5% (1. postopek)

m = 420 mg, izkoristek: 72% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.56$

Tališče: 136.0–138.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 319$

HRMS ($m/z = 200$) za $C_{15}H_{12}N_2O_5F$: izračunan 319.0730 in izmerjen 319.0724

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 4.00 (s, 3H), 7.16–7.21 (m, 1H), 7.43–7.49 (m, 1H), 7.61–7.67 (m, 1H), 8.12 (dd, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.29–8.34 (m, 1H), 8.79 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 12.27 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{11}N_2O_5F$ ($M_r = 318.07$): C, 56.61; H, 3.48; N, 8.80
- Izmerjena (%): C, 56.80; H, 3.24; N, 8.71

Metil 2-(3-hidroksi-4-nitrobenzamido)benzoat (6)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: rumeni kristali

m = 36 mg, izkoristek 11% (2. postopek)

m = 156 mg, izkoristek: 49% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.59$

Tališče: 158.0–161.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 317$

HRMS ($m/z = 317$) za $C_{15}H_{13}N_2O_6$: izračunan 317.0774 in izmerjen 317.0775

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)= 3.99 (s, 3H), 7.16–7.21 (m, 1H), 7.60–7.67 (m, 2H), 7.83 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 9.0$ Hz), 8.87 (dd, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 12.20 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{12}N_2O_6$ ($M_r = 316.07$): C, 56.96; H, 3.82; N, 8.86
- Izmerjena (%): C, 57.31; H, 3.51; N, 8.89

Metil 4-kloro-2-(3-hidroksibenzamido)benzoat (7)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: drobni beli igličasti kristali

m = 129 mg, izkoristek: 42% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.54$

Tališče: 206.0–208.5°C

ESI-MS $[M-H]^-$: m/z = 304

HRMS (m/z = 304) za $C_{15}H_{11}NO_4Cl$: izračunan 304.0377 in izmerjen 304.0380

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.92 (s, 3H), 7.03–7.07 (m, 1H), 7.30–7.44 (m, 4H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 9.93 (s, 1H), 11.68 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{12}NO_4Cl$ ($M_r = 305.05$): C, 58.93; H, 3.96; N, 4.58
- Izmerjena (%): C, 59.10; H, 3.79; N, 4.56

Metil 5-bromo-2-(3-hidroksibenzamido)benzoat (8)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH, čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza EtOAc : heksan = 1 : 1.

Opis: bež kristali

m = 341 mg, izkoristek: 49% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.52$

Tališče: 173.0–178.0°C

ESI-MS $[M-H]^-$: m/z = 348

HRMS (m/z = 348) za $C_{15}H_{11}NO_4Br$: izračunan 347.9871 in izmerjen 347.9881

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.91 (s, 3H), 7.02–7.05 (m, 1H), 7.35–7.40 (m, 3H), 7.87 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.52 (d, $J = 9.0$ Hz), 9.90 (s, 1H), 11.45 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 21.87 min, čistota: 98.81%

Metil 5-kloro-2-(3-hidroksibenzamido)benzoat (9)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 199 mg, izkoristek: 33% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.52$

Tališče: 196.0–200.5°C

ESI-MS $[M+H]^+$: m/z = 306

HRMS (m/z = 306) za $C_{15}H_{13}NO_4Cl$: izračunan 306.0533 in izmerjen 306.0533

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.91 (s, 3H), 7.02–7.04 (m, 1H), 7.35–7.40 (m, 3H), 7.75 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 8.57 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 9.89 (s, 1H), 11.44 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{12}NO_4Cl$ ($M_r = 305.05$): C, 58.93; H, 3.96; N, 4.58
- Izmerjena (%): C, 58.68; H, 3.71; N, 4.56

Metil 2-(3-hidroksibenzamido)-5-nitrobenzoat (10)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: rumeni kristali

m = 145 mg, izkoristek: 23% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.46$

Tališče: 203.0–212.0°C

ESI-MS $[M-H]^-$: m/z = 315

HRMS (m/z = 315) za $C_{15}H_{11}N_2O_6$: izračunan 315.0617 in izmerjen 315.0619

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.98 (s, 3H), 7.06–7.09 (m, 1H), 7.38–7.44 (m, 3H), 8.54 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 9.3$ Hz, 1H), 8.75 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 9.98 (s, 1H), 11.88 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 19.14 min, čistota: 95.35%

Metil 2-(3-hidroksibenzamido)benzoat (11)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: beli igličasti kristali

m = 150 mg, izkoristek: 28% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.46$

Tališče: 199.0–206.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 272$

HRMS ($m/z = 272$) za $C_{15}H_{14}NO_4$: izračunan 272.0923 in izmerjen 272.0914

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.90 (s, 3H), 7.02–7.04 (m, 1H), 7.21–7.26 (m, 1H), 7.36–7.40 (m, 3H), 7.65–7.71 (m, 1H), 8.02 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.88 (s, 1H), 11.58 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{13}NO_4$ ($M_r = 271.08$): C, 66.41; H, 4.83; N, 5.16
- Izmerjena (%): C, 66.19; H, 4.57; N, 5.08

Metil 4,5-dimetoksi-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (12)

Prekristalizacija iz EtOAc.

Opis: fluorescentno rumeni igličasti kristali

m = 583 mg, izkoristek: 59% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 3 : 5): $R_f = 0.26$

Tališče: 189.5–192.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 361$

HRMS ($m/z = 361$) za $C_{17}H_{17}N_2O_7$: izračunan 361.1036 in izmerjen 361.1021

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.82 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 7.48 (s, 1H), 7.92 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.73 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{17}H_{16}N_2O_7$ ($M_r = 360.10$): C, 56.67; H, 4.48; N, 7.77
- Izmerjena (%): C, 56.86; H, 4.33; N, 7.78

Metil 5-kloro-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (13)

Prekristalizacija iz EtOAc.

Opis: beli igličasti kristali

m = 787 mg, izkoristek: 59% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.55$

Tališče: 187.0–188.5°C

ESI-MS $[M+H]^+$: m/z = 335

HRMS (m/z = 335) za $C_{15}H_{12}N_2O_5Cl$: izračunan 335.0435 in izmerjen 335.0428

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.90 (s, 3H), 7.39 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.93 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.36–8.38 (m, 1H), 8.49–8.52 (m, 2H), 8.74 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 11.64 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{11}N_2O_5Cl$ ($M_r = 334.04$): C, 53.83; H, 3.31; N, 8.37
- Izmerjena (%): C, 53.10; H, 2.94; N, 8.18

Metil 2-(3-fluoro-4-nitrobenzamido)-5-hidroksibenzoat (14)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH, dodatno čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza EtOAc : heksan = 1 : 1.

Opis: rjavi igličasti kristali

m = 222 mg, izkoristek: 22% (3. postopek)

TLC (EtOAc: heksan = 1 : 1): $R_f = 0.37$

Tališče: 209.0–211.0°C

ESI-MS $[M-H]^-$: m/z = 333

HRMS (m/z = 333) za $C_{15}H_{10}N_2O_6F$: izračunan 333.0523 in izmerjen 333.0512

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.82 (s, 3H), 7.07 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.81 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 11.1$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.30–8.35 (m, 1H), 8.67 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.98 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{11}N_2O_6F$ ($M_r = 334.06$): C, 53.90; H, 3.32; N, 8.38
- Izmerjena (%): C, 53.98; H, 3.01; N, 8.38

Metil 5-hidroksi-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (15)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: rumeni igličasti kristali

m = 281 mg, izkoristek: 30% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.35$

Tališče: 210.5–212.0°C

ESI-MS $[M-H]^-$: $m/z = 315$

HRMS ($m/z = 315$) za $C_{15}H_{11}N_2O_6$: izračunan 315.0617 in izmerjen 315.0618

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.83 (s, 3H), 7.08 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.46 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.72 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 9.80 (s, 1H), 11.08 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{12}N_2O_6$ ($M_r = 316.07$): C, 56.96; H, 3.82; N, 8.86
- Izmerjena (%): C, 56.92; H, 3.61; N, 8.80

Metil 5-kloro-3-metil-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (16)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: beli igličasti kristali

m = 487 mg, izkoristek: 47% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.79$

Tališče: 153.0–155.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 349$

HRMS ($m/z = 349$) za $C_{16}H_{14}N_2O_5Cl$: izračunan 349.0591 in izmerjen 349.0599

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.30 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 7.69 (s, 2H), 7.86 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.44–8.48 (m, 1H), 8.77 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 10.41 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{16}H_{13}N_2O_5Cl$ ($M_r = 348.05$): C, 55.10; H, 3.76; N, 8.03
- Izmerjena (%): C, 55.32; H, 3.58; N, 8.03

Metil 5-bromo-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (17)

Prekristalizacija z uporabo kombinacije absolutnega EtOH in MeOH v razmerju 10 : 1.

Opis: beli igličasti kristali

m = 1303 mg, izkoristek: 69% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.72$

Tališče: 181.0–182.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 379$

HRMS ($m/z = 379$) za $C_{15}H_{12}N_2O_5Br$: izračunan 378.9930 in izmerjen 378.9942

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.88 (s, 3H), 7.87–7.94 (m, 2H), 8.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.49 (dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.73 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 11.42 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{12}N_2O_5Br$ ($M_r = 377.99$): C, 47.52; H, 2.92; N, 7.39
- Izmerjena (%): C, 47.82; H, 2.72; N, 7.39

Metil 5-bromo-2-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)benzoat (18)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: beli igličasti kristali

m = 1380 mg, izkoristek: 70% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.74$

Tališče: 187.5–188.5°C

ESI-MS $[M-H]^-$: $m/z = 395$

HRMS ($m/z = 395$) za $C_{15}H_9N_2O_5FBr$: izračunan 394.9679 in izmerjen 394.9688

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.87 (s, 3H), 7.81–7.91 (m, 2H), 8.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.32–8.37 (m, 1H), 8.69 (dd, $J = 2.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H), 11.32 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{15}H_{10}N_2O_5FBr$ ($M_r = 395.98$): C, 45.36; H, 2.54; N, 7.05
- Izmerjena (%): C, 45.37; H, 2.35; N, 7.00

Metil 2-(3-hidroksibenzamido)-4,5-dimetoksibenzoat (19)

Prekristalizacija iz absolutnega EtOH.

Opis: temno rjavi igličasti kristali

m = 148 mg, izkoristek: 15% (3. postopek)

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.60$

Tališče: 231.0–235.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 332$

HRMS ($m/z = 332$) za $C_{17}H_{18}NO_6$: izračunan 332.1134 in izmerjen 332.1143

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.79 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 7.00–7.04 (m, 1H), 7.38–7.47 (m, 4H), 8.45 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 11.77 (s, 1H)

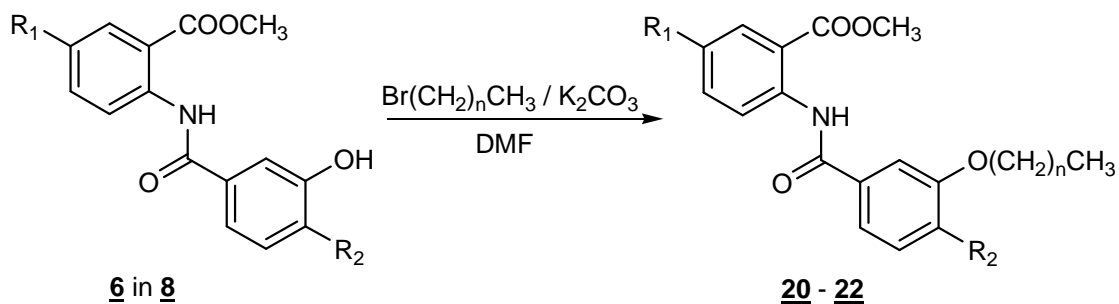
HPLC: retencijski čas: 17.33 min, čistota: 95.45%

8.4 3. Stopnja sinteze: pripajanje alkilne verige

8.4.1 Pripajanje alkilne verige na OH skupino

Postopek:

V inertni atmosferi smo raztopili derivata metil 2-(3-hidroksibenzamido)benzoata 6 in 8 (1 mmol) v DMF (5 mL) dodali K_2CO_3 (5 mmol) in alkil bromid (1.4 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali ob segrevanju (50°C) 24 ur, nato prelili v EtOAc (10 mL) in spirali z vodo (3×10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (3×10 mL). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (24).



Oznaka	R ₁	R ₂	N
<u>20</u>	H	NO ₂	3
<u>21</u>	Br	H	3
<u>22</u>	Br	H	1

Metil 2-(3-butoksi-4-nitrobenzamido)benzoat (20)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH₂Cl₂.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 246 mg, izkoristek: 66%

TLC (CH₂Cl₂): R_f = 0.74

Tališče: 82.0–84.0°C

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z = 395

HRMS (m/z = 395) za C₁₉H₂₀N₂O₆Na: izračunan 395.1219 in izmerjen 395.1202

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.39–1.52 (m, 2H), 1.71–1.80 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.28 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.28–7.33 (m, 1H), 7.62 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.68–7.74 (m, 1H), 7.83 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 11.46 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₉H₂₀N₂O₆ (M_r = 372.13): C, 61.28; H, 5.41; N, 7.52
- Izmerjena (%): C, 61.90; H, 5.57; N, 7.36

Metil 5-bromo 2-(3-butoksibenzamido)benzoat (21)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: EtOAc : heksan = 1 : 3.

Opis: rumeno beli igličasti kristali

m = 383 mg, izkoristek: 65%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 3): R_f = 0.50

Tališče: 94.5–99.0°C

ESI-MS [M+H]⁺: m/z = 406

HRMS (m/z = 406) za C₁₉H₂₁NO₄Br: izračunan 406.0654 in izmerjen 406.0643

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 1.33 (t, *J* = 2.7 Hz, 3H), 1.45–1.50 (m, 2H), 1.72–1.76 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.06 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.21–7.23 (m, 1H), 7.46 (s, 1H),

7.50 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 7.87 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 11.42 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{19}H_{20}NO_4Br$ ($M_r = 405.06$): C, 56.17; H, 4.96; N, 3.45
- Izmerjena (%): C, 56.77; H, 4.69; N, 3.43

Metil 5-bromo 2-(3-etoksibenzamido)benzoat (22)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: EtOAc : heksan = 1 : 3.

Opis: beli igličasti kristali

m = 83 mg, izkoristek: 23%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 3): $R_f = 0.42$

Tališče: 122.0–123.5°C

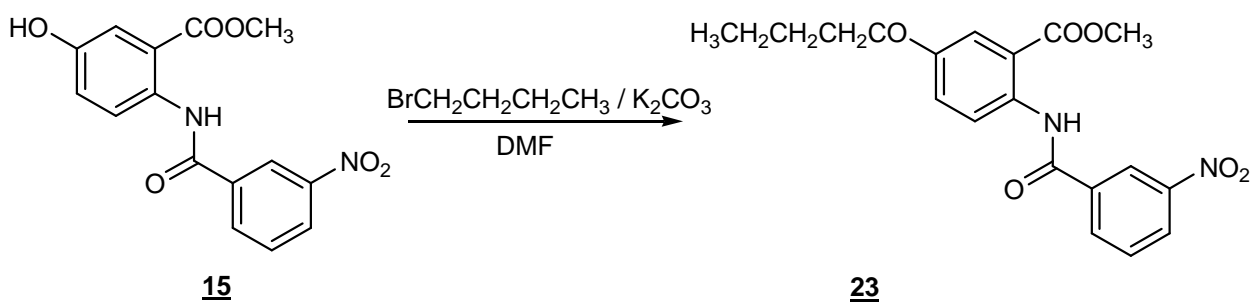
ESI-MS $[M+H]^+$: m/z = 378

HRMS(m/z = 378) za $C_{17}H_{17}NO_4Br$: izračunan 378.0341 in izmerjen 378.0331

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 1.37 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.12 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.19–7.23 (m, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 7.87 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 11.42 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za $C_{17}H_{16}NO_4Br$ ($M_r = 377.03$): C, 53.99; H, 4.26; N, 3.70
- Izmerjena (%): C, 53.91; H, 3.87; N, 3.68



Metil 5-butoksi-2-(3-nitrobenzamido)benzoat (23)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH_2Cl_2 .

Opis: rumeno igličasti kristali

m = 26 mg, izkoristek: 13%

TLC (CH₂Cl₂): R_f = 0.50

Tališče: 113.0–116.0°C

ESI-MS [M+H]⁺: m/z = 373

HRMS (m/z = 373) za C₁₉H₂₁N₂O₆: izračunan 373.1400 in izmerjen 373.1386

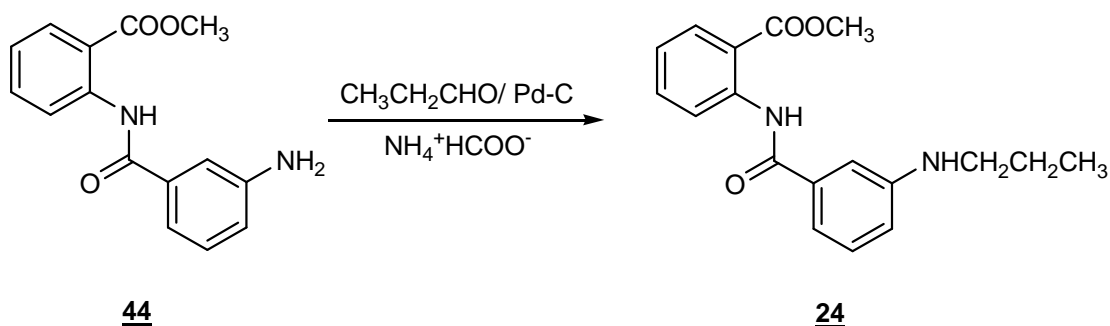
¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.40–1.50 (m, 2H), 1.68–1.75 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 4.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.28 (dd, *J* = 3.1 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.89 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 18.9 Hz, 1H), 8.35–8.37 (m, 1H), 8.45–8.48 (m, 1H), 8.73 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 11.16 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 20.57 min, čistota: 100.00%

8.4.2 Pripajanje alkilne veriga na NH₂ skupino

Postopek:

V bučko smo odmerili 2-propranolol (5 mL), dodali Pd-C (30 mg) in amonijev format (315 mg, 246 μL, 5 mmol), ki smo ga predhodno raztopili v vodi (2 mL). Pri sobni temperaturi smo mešali 1 minuto, da se je Pd-C aktiviral, nato pa smo dodali amin **44** (270 mg, 1 mmol) in aldehyd (58 mg, 72 μL, 1 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 2 uri. Reakcijsko zmes smo filtrirali preko Celita, organsko topilo odparili pod znižanim tlakom, produktu dodali 10 mL CH₂Cl₂ ter stresali s nasičeno vodno raztopino NaCl (3 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1.



Metil 2-(3-(propilamino)benzamido)benzoat (24)

Opis: beli kristali

m = 26 mg, izkoristek: 14%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1): R_f = 0.62

Tališče: 80.0–83.0°C

ESI-MS [M+H]⁺: m/z = 313

HRMS (m/z = 313) za C₁₈H₂₁N₂O₃: izračunan 313.1552 in izmerjen 313.1544

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.54–1.66 (m, 2H), 3.00–3.07 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 5.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 1.7 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.07–7.29 (m, 4H), 7.65–7.71 (m, 1H), 8.02 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.64 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H), 11.57 (s, 1H)

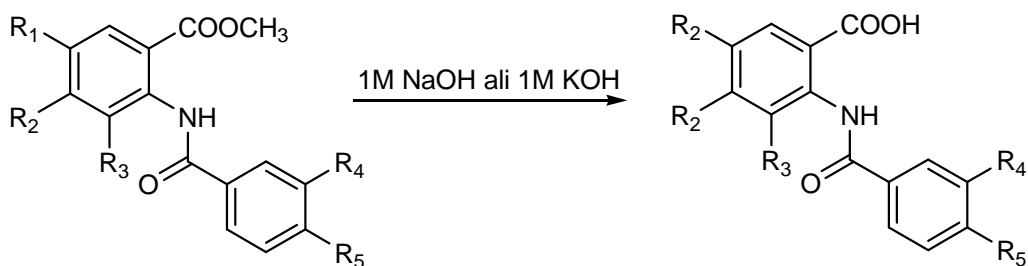
Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₈H₂₀N₂O₃ (M_r = 312.15): C, 69.21; H, 6.45; N, 8.97
- Izmerjena (%): C, 69.01; H, 6.60; N, 8.94

8.5 4. Stopnja sinteze: alkalna hidroliza

Postopek:

Raztopini derivata metil 2-benzamidobenzoata 5–23 (1 mmol) v ustreznem topilu (THF ali dioksan, 5 mL) smo dodali 1 M vodno raztopino NaOH ali KOH (5 mL) ter mešali pri sobni temperaturi, dokler ni zreagirala ves ester, kar smo spremljali s TLC. Organsko topilo smo odparili pod znižanim tlakom, dodali vodo (5 mL) ter ekstrahirali preostanek z EtOAc ali Et₂O (3 × 10 mL). Vodno fazo smo nakisali z 1 M raztopino HCl do pH = 1–2 in ponovno ekstrahirali z organskim topilom (3 × 10 mL). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo dodatno očistili s kolonsko kromatografijo ali prekristalizacijo.



Oznaka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>25</u>	H	H	H	OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	NO ₂
<u>26</u>	Br	H	H	OH	H
<u>27</u>	Cl	H	H	OH	H
<u>28</u>	NO ₂	H	H	OH	H
<u>29</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	NO ₂	H
<u>30</u>	Cl	H	H	NO ₂	H
<u>31</u>	H	H	H	OH	H
<u>32</u>	OH	H	H	NO ₂	H
<u>33</u>	Cl	H	CH ₃	NO ₂	H
<u>34</u>	Br	H	H	NO ₂	F
<u>35</u>	Br	H	H	OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	H
<u>36</u>	Br	H	H	OCH ₂ CH ₃	H
<u>37</u>	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H

2-(3-butoksi-4-nitrobenzamido)benzojska kislina (**25**)

Opis: beli kristali

m = 71 mg, izkoristek: 74%

TLC (CH₃CN : MeOH : H₂O = 3 : 1 : 0.1): R_f = 0.92

Tališče: 174.0–176.5°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 357

HRMS (m/z = 357) za C₁₈H₁₇N₂O₆: izračunan 357.1087 in izmerjen 357.1084

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 1.44 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.72–1.75 (m, 2H), 1.77–1.80 (m, 2H), 4.28 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 1.2 Hz, J = 8.4 Hz, 1H), 7.67–7.72 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 8.07 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 12.14 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 19.50 min, čistota: 100.00%

5-bromo-2-(3-hidroksibenzamido)benzojska kislina (26)

Opis: bež igličasti kristali

m = 67 mg, izkoristek: 70%

TLC (CH₃CN : MeOH : H₂O = 3 : 1 : 0.1): R_f = 0.85

Tališče: 277.0–281.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 334

HRMS (m/z = 334) za C₁₄H₉NO₄Br: izračunan 333.9715 in izmerjen 333.9711

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.00–7.04 (m, 1H), 7.33–7.41 (m, 3H), 7.84 (dd, J = 2.7 Hz, J = 9.0 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 9.93 (s, 1H), 12.03 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 19.54 min, čistota: 100.00%

5-kloro-2-(3-hidroksibenzamido)benzojska kislina (27)

Opis: beli igličasti kristali

m = 80 mg, izkoristek: 84%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.38

Tališče: 277.5–280.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 290

HRMS (m/z = 290) za C₁₄H₉NO₄Cl: izračunan 290.0220 in izmerjen 290.0223

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.01–7.04 (m, 1H), 7.35–7.38 (m, 3H), 7.72 (dd, J = 2.7 Hz, J = 9.0 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.72 (d, J = 9 Hz, 1H), 12.05 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 18.89 min, čistota: 100.00%

2-(3-hidroksibenzamido)-5-nitrobenzojska kislina (28)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 77 mg, izkoristek: 55%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.27

Tališče: 267.0–268.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 301

HRMS (m/z = 301) za C₁₄H₉N₂O₆: izračunan 301.0461 in izmerjen 301.0469

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 7.04–7.10 (m, 1H), 7.39–7.42 (m, 3H), 8.49 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.94 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 9.95 (s, 1H), 12.80 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 17.00min, čistota: 99.18%

4,5-dimetoksi-2-(3-nitrobenzamido)benzojska kislina (29)

Prekristalizacija iz mešanice CH₃CN/MeOH (5:1)..

Opis: belo rumeni kristali

m = 183 mg, izkoristek: 30%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1): R_f = 0.27

Tališče: 277.5–280.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 345

HRMS (m/z = 345) za C₁₆H₁₃N₂O₇: izračunan 345.0723 in izmerjen 345.0718

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.80 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 7.51 (s, 1H), 7.91 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.36–8.38 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.46–8.50 (m, 1H), 8.74 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 12.51 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₆H₁₄N₂O₇ (M_r = 346.082): C, 53.44; H, 4.02; N, 7.79
- Izmerjena (%): C, 53.60; H, 3.58; N, 7.76

5-kloro-2-(3-nitrobenzamido)benzojska kislina (30)

Prekristalizacija iz CH₃CN (150 mL).

Opis: beli prizmasti kristali

m = 302 mg, izkoristek: 41%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1): R_f = 0.67

Tališče: 257.0–259.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 319

HRMS (m/z = 319) za C₁₄H₈N₂O₅Cl: izračunan 319.0122 in izmerjen 319.0123

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.34 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.51 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.73–8.75 (m, 2H), 12.46 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₄H₉N₂O₅Cl (M_r = 320.02): C, 52.43; H, 2.83; N, 8.74
- Izmerjena (%): C, 52.26; H, 2.61; N, 8.73

2-(3-hidroksibenzamido)benzojska kislina (31) (25)

Opis: beli igličasti kristali

m = 41 mg, izkoristek: 46%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1): R_f = 0.47

Tališče: 215.0–223.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 256

HRMS (m/z = 256) za C₁₄H₁₀NO₄: izračunan 256.0610 in izmerjen 256.0615

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.00–7.04 (m, 1H), 7.17–7.23 (m, 1H), 7.35–7.38 (m, 3H), 7.63–7.69 (m, 1H), 8.06 (dd, *J* = 1.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 12.11 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 14.34 min, čistota: 100.00%

5-hidroksi-2-(3-nitrobenzamido)benzojska kislina (32)

Opis: rumeni kristali

m = 143 mg, izkoristek: 86%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1): R_f = 0.19

Tališče: 248.0–251.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 301

HRMS (m/z = 301) za C₁₄H₉N₂O₆: izračunan 301.0461 in izmerjen 301.0460

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.08 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.32–8.37 (m, 2H), 8.44–8.48 (m, 1H), 8.73 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 9.71 (s, 1H), 11.86 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₄H₁₀N₂O₆ (M_r = 302.05): C, 55.63; H, 3.33; N, 9.27
- Izmerjena (%): C, 55.42; H, 3.07; N, 9.15

5-kloro-3-metil-2-(3-nitrobenzamido)benzojska kislina (33)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1, prekrystalizacija iz CH₂Cl₂.

Opis: beli igličasti kristali

m = 90 mg, izkoristek: 33%

TLC (CH₂Cl₂: MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.34

Tališče: 203.0–205.5°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 333

HRMS (m/z = 333) za C₁₅H₁₀N₂O₅Cl: izračunan 333.0278 in izmerjen 333.0281

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 2.27 (s, 3H), 7.66 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 12.5 Hz, 2H), 7.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.45 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 10.44 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₅H₁₀N₂O₅Cl (M_r = 334.04): C, 53.83; H, 3.31; N, 8.37
- Izmerjena (%): C, 53.74; H, 3.00; N, 8.26

5-bromo-2-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)benzojska kislina (34)

Prekrystalizacija iz EtOAc.

Opis: rumeni kristali

m = 57 mg, izkoristek: 35%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.13

Tališče: 286.0–288.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 381

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 7.44 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 84.2 Hz, 1H), 7.82–7.87 (m, 1H), 8.06–8.22 (m, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.45 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.54 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 8.9 Hz, 1H), 12.04 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₄H₈N₂O₅BrF (M_r = 381.96): C, 43.89; H, 2.10; N, 7.31
- Izmerjena (%): C, 43.29; H, 2.30; N, 7.13

HPLC: retencijski čas: 22.72 min, čistota: 100.00%

5-bromo-2-(3-butoksibenzamido)benzojska kislina (35)

Opis: beli kristali

m = 161 mg, izkoristek: 94%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.65

Tališče: 206.0–209.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 390

HRMS (m/z = 390) za C₁₈H₁₇NO₄Br: izračunan 390.0341 in izmerjen 390.0342

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.42–1.50 (m, 2H), 1.69–1.78 (m, 2H), 4.05 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.18–7.24 (m, 1H), 7.45–7.52 (m, 3H), 7.83 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 12.18 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₈H₁₈NO₄Br (M_r = 391.04): C, 55.12; H, 4.63; N, 3.57
- Izmerjena (%): C, 55.27; H, 4.43; N, 3.50

5-bromo-2-(3-etoksibenzamido)benzojska kislina (36)

Opis: beli kristali

m = 50 mg, izkoristek: 82%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.60

Tališče: 226.5–229.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 364$

HRMS ($m/z = 364$) za $C_{16}H_{15}NO_4Br$: izračunan 364.0184 in izmerjen 364.0185

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 1.37 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 4.12 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.18–7.22 (m, 1H), 7.45–7.50 (m, 3H), 7.85 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 12.06 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 21.20 min, čistota: 99.05%

2-(3-hidroksibenzamido)-4,5-dimetoksibenzojska kislina (37)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza: CH_2Cl_2 : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1.

Opis: beli kristali

$m = 31$ mg, izkoristek: 42%

TLC (CH_2Cl_2 : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1): $R_f = 0.30$

Tališče: 266.0–272.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 318$

HRMS ($m/z = 318$) za $C_{16}H_{16}NO_6$: izračunan 318.0978 in izmerjen 318.0969

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.79 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 7.99–7.03 (m, 1H), 7.34–7.38 (m, 3H), 7.50 (s, 1H), 8.51(s, 1H), 9.87 (s, 1H), 12.24 (s, 1H), 13.52 (s, 1H)

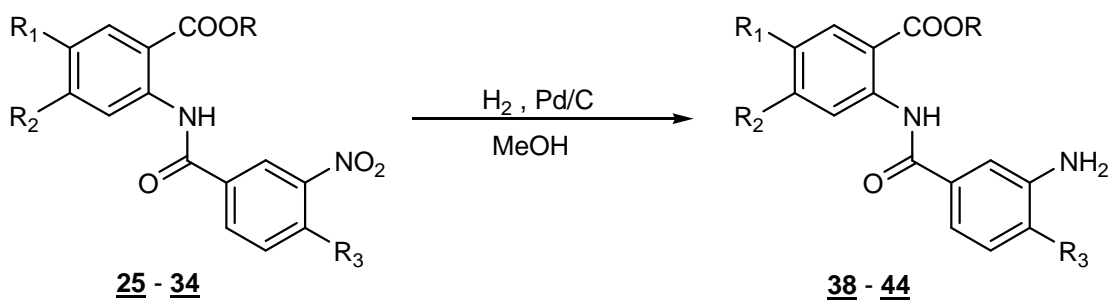
HPLC: retencijski čas: 14.06 min, čistota: 95.54%

8.6 5. Stopnja sinteze: redukcija nitro skupine

8.6.1 Katalitsko hidrogeniranje

Postopek:

Raztopino derivata metil 2-(3-nitrobenzamido)benzoata 25–34 (1 mmol) v MeOH smo dobro prepihali z argonom in dodali Pd/C (10% mase izhodne spojine) ter ponovno dobro prepihali z argonom. Po 30–60 minutah uvajanja vodika v reakcijsko zmes smo le to filtrirali preko Celita. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Po potrebi smo produkt dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.



Oznaka	R	R ₁	R ₂	R ₃
<u>38</u>	CH ₃	H	H	F
<u>39</u>	H	H	H	Obu
<u>40</u>	H	H	H	H
<u>41</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	H
<u>42</u>	H	OH	H	H
<u>43</u>	CH ₃	H	H	H
<u>44</u>	CH ₃	H	H	F
<u>45</u>	H	H	H	F

Metil 2-(3-amino-4-fluorobenzamido)benzoat (38)

Opis: sivi igličasti kristali

m = 91 mg, izkoristek: 63%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): R_f = 0.60

Tališče: 181.0–182.0°C

ESI-MS [M+H]⁺: m/z = 289

HRMS (m/z = 289) za C₁₅H₁₄N₂O₃F: izračunan 289.0988 in izmerjen 289.0986

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.90 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 7.08–7.17 (m, 1H), 7.20–7.25 (m, 2H), 7.42 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 19.7 Hz, 2H), 7.65–7.70 (m, 1H), 8.02 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 11.49 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 17.30 min, čistota: 97.03%

2-(3-amino-4-butoksibenzamido)benzojska kislina (39)

Opis: rjavi kristali

m = 40 mg, izkoristek: 97%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.60

Tališče: 189.0–191.0°C

ESI-MS [M+Na]⁺: m/z = 351

HRMS (m/z = 351) za C₁₈H₂₀N₂O₄Na: izračunan 351.1321 in izmerjen 351.1320

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 0.96 (t, J= 7.5Hz, 3H), 1.49–1.52 (m, 2H), 1.74–1.77 (m, 2H), 4.03 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 5.26 (s, 2H), 6.68 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.87–6.93 (m, 1H), 7.22–7.28(m, 1H), 7.47 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 8.00 (dd, J = 1.8 Hz, J = 10.4 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 1.8 Hz, J = 8.1 Hz, 1H), 15.17 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 20.28 min, čistota: 89.31%

2-(3-aminobenzamido)benzojska kislina (40) (26)

Opis: bež igličasti kristali

m = 86 mg, izkoristek: 54%

TLC (CH₃CN : MeOH : H₂O = 3 : 1 : 0.1): R_f = 0.67

Tališče: 224.5–227.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 255

HRMS (m/z = 255) za C₁₄H₁₁N₂O₃ : izračunan 255.0770 in izmerjen 255.0774

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 6.79 (dd, J = 1.5 Hz, J = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.16–7.22 (m, 3H), 7.61–7.67 (m, 1H), 8.05 (dd, J = 1.5 Hz, J = 7.9 Hz, 1H), 8.72 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 12.07 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 9.11 min, čistota: 95.69%

2-(3-aminobenzamido)-4,5-dimetoksibenzojska kislina (41)

Opis: rjavi kristali

m = 22 mg, izkoristek: 19% (čiščenje s kolonsko kromatografijo, MF: CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 9 : 1 : 0.1)

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.40

Tališče: 225.0–227.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 315

HRMS (m/z = 315) za C₁₆H₁₅N₂O₅: izračunan 315.0981 in izmerjen 315.0984

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.76 (s, 3H), 3.83(s, 3H), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.10–7.19 (m, 3H), 7.54 (s, 1H), 8.50 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 8.73 min, čistota: 72.83%

2-(3-aminobenzamido)-5-hidroksibenzojska kislina (42)

Opis: siv prah

m = 52 mg, izkoristek: 72%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.34

Tališče: 175.0–178.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 271

HRMS (m/z = 271) za C₁₄H₁₁N₂O₄: izračunan 271.0719 in izmerjen 271.0720

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 6.75 (dd, *J* = 1.6 Hz, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.97–7.05 (m, 2H), 7.13–7.18 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 9.46 (s, 2H), 12.19 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 4.01 min, čistota: 80.91%

Metil 2-(3-aminobenzamido)benzoat (43)

Opis: svetlo rjavi kristali

m = 474 mg, izkoristek: 94%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): R_f = 0.44

Tališče: 207.0–210.0°C

ESI-MS [M+H]⁺: m/z = 271

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.91 (s, 3H), 7.09 (s, 1H), 7.22–7.28 (m, 1H), 7.40–7.29 (m, 3H), 7.66–7.72 (m, 1H), 8.03 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 11.55 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 11.34 min, čistota: 99.13%

Metil 2-(3-amino-4-fluorobenzamido)benzoat (44)

Opis: svetlo rjavi kristali

m = 331 mg, izkoristek: 98%

TLC (EtOAc : heksan = 1 : 1): $R_f = 0.58$

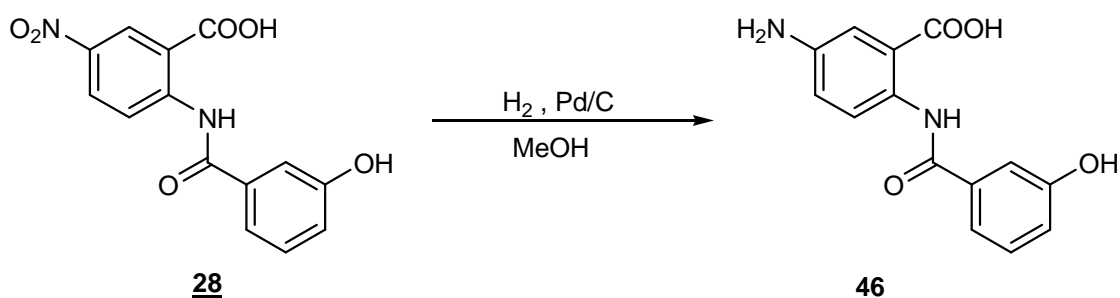
Tališče: 170.0–174.0°C

ESI-MS $[M+H]^+$: $m/z = 289$

HRMS ($m/z = 289$) za $C_{15}H_{14}N_2O_3F$: izračunan 289.0988 in izmerjen 289.0981

1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 3.89 (s, 3H), 7.18–7.28 (m, 3H), 7.47 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 1H) 7.64–7.70 (m, 1H), 8.01 (dd, $J = 1.3$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 11.49 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 17.29 min, čistota: 99.39%



Oznaka	R	R ₁
46	H	OH

5-amino-2-(3-hidroksibenzamido)benzojska kislina (46)

Opis: rjavi kristali

m = 21 mg, izkoristek: 78%

TLC (MeOH): $R_f = 0.69$

Tališče: 241.0–249.0°C

ESI-MS $[M+Na]^+$: $m/z = 295$

HRMS ($m/z = 295$) za $C_{14}H_{12}N_2O_4Na$: izračunan 295.0695 in izmerjen 295.0692

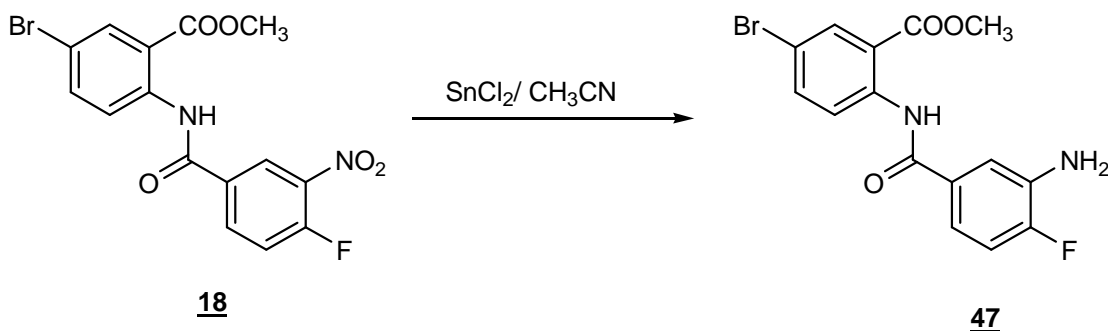
1H -NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) = 6.78 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.93–7.00 (m, 1H), 7.25–7.38 (m, 4H), 8.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 9.78 (s, 1H), 11.23 (s, 1H)

HPLC: retencijski čas: 15.64 min, čistota: 96.02%

8.6.2 Redukcija nitro skupine s kositrovim kloridom

Postopek:

V bučko smo natehtali metil 5-bromo-2-(4-fluoro-3-nitrobenzamid)benzoat **18** (396 mg, 1 mmol) ter suspendirali v CH₃CN, nato smo dodali SnCl₂ (1128 mg, 5 mmol) in mešali 1 uro pri 90°C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, nato pa produkt očistili s kolonsko kromatografij, MF: CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1 (27).



5-bromo-2-(4-fluoro-3-nitrobenzamid)benzoat (**47**)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1

Opis: rjavi kristali

m = 35 mg, izkoristek = 26%

TLC (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1): R_f = 0.42

Tališče: 181.0–184.0°C

ESI-MS [M-H]⁻: m/z = 365

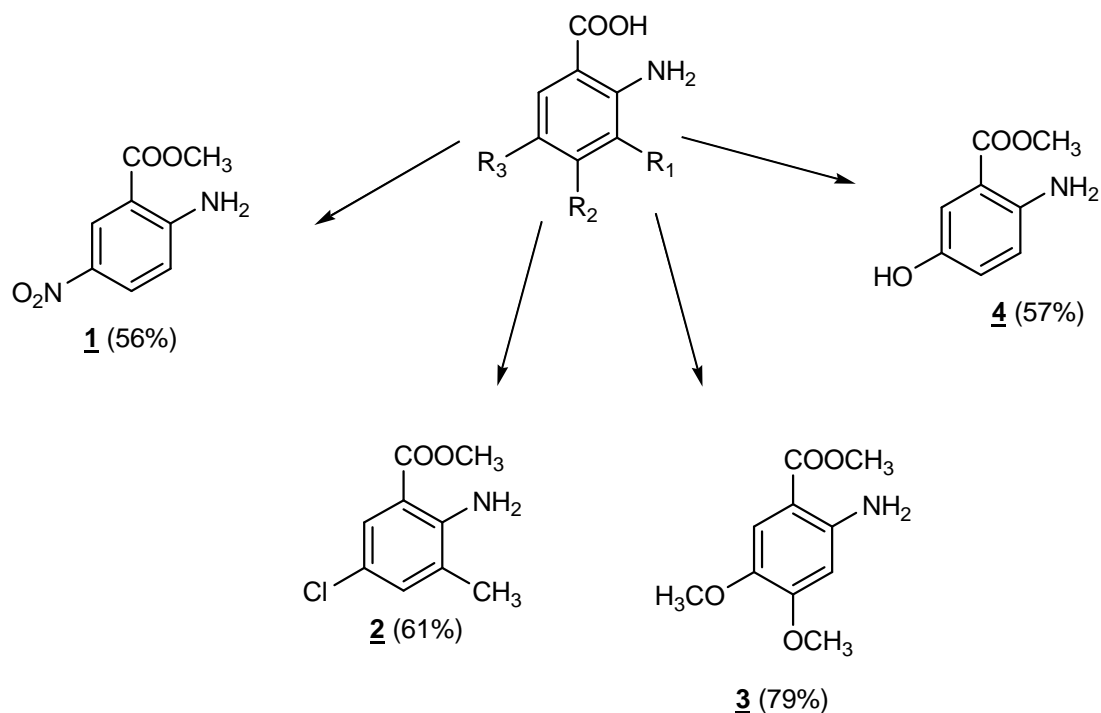
¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm)= 3.85 (s, 3H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 2.6 Hz, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 12.06 (s, 1H)

Elementna analiza:

- Izračunana (%) za C₁₅H₁₂N₂O₃BrF (M_r = 366.00): C, 47.79; H, 3.77; N, 6.56
- Izmerjena (%): C, 47.79; H, 3.77; N, 6.90

9 RAZPRAVA

9.1 1. Stopnja sinteze: uvedba metilne zaščite na karboksilno kislino



Slika 15: Shematski prikaz sinteze derivatov metil antranilata

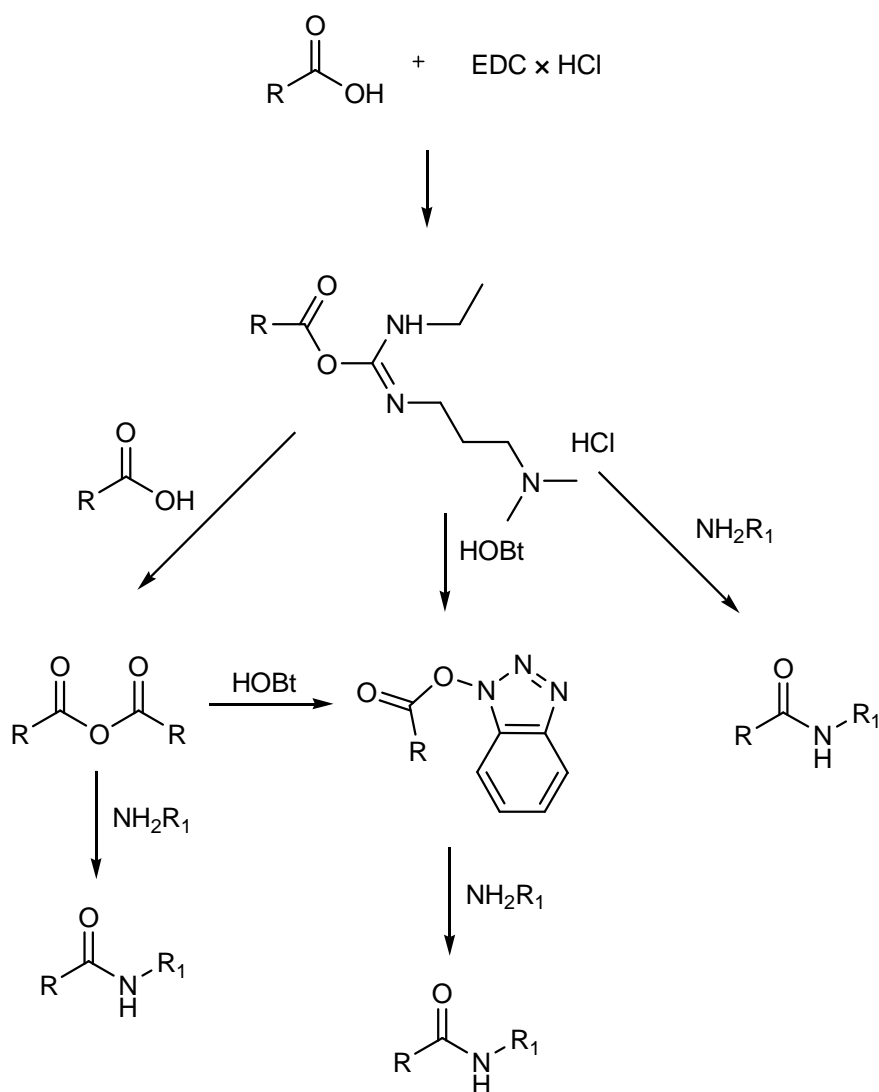
Reakcijski pogoji : SOCl_2 , MeOH, 65°C , 24 ur

Metilni ester smo tvorili kot zaščito karboksilne skupine v spojini, saj bi drugače na tem mestu lahko potekale neželene stranske reakcije. Da bi povečali reaktivnost karboksilne skupine, smo v prvi stopnji tvorili kislinski klorid s tionil kloridom, ki poveča elektrofilnost karbonilnega ogljikovega atoma. V drugi stopnji reakcije se tvori ester z MeOH. Reakcija je eksotermna in reakcijska zmes se močno segreje, zato smo jo na začetku izvajali na ledeni kopeli, po eni uri pa smo pričeli mešati ob segrevanju (65°C), da smo povečali izkoristek reakcije. Vse produkte smo izolirali z zadovoljivim izkoristkom (56–79%).

9.2 2. Stopnja sinteze: tvorba amidne vezi

9.2.1 Uporaba HOBt / EDC sklopitvenega reagenta

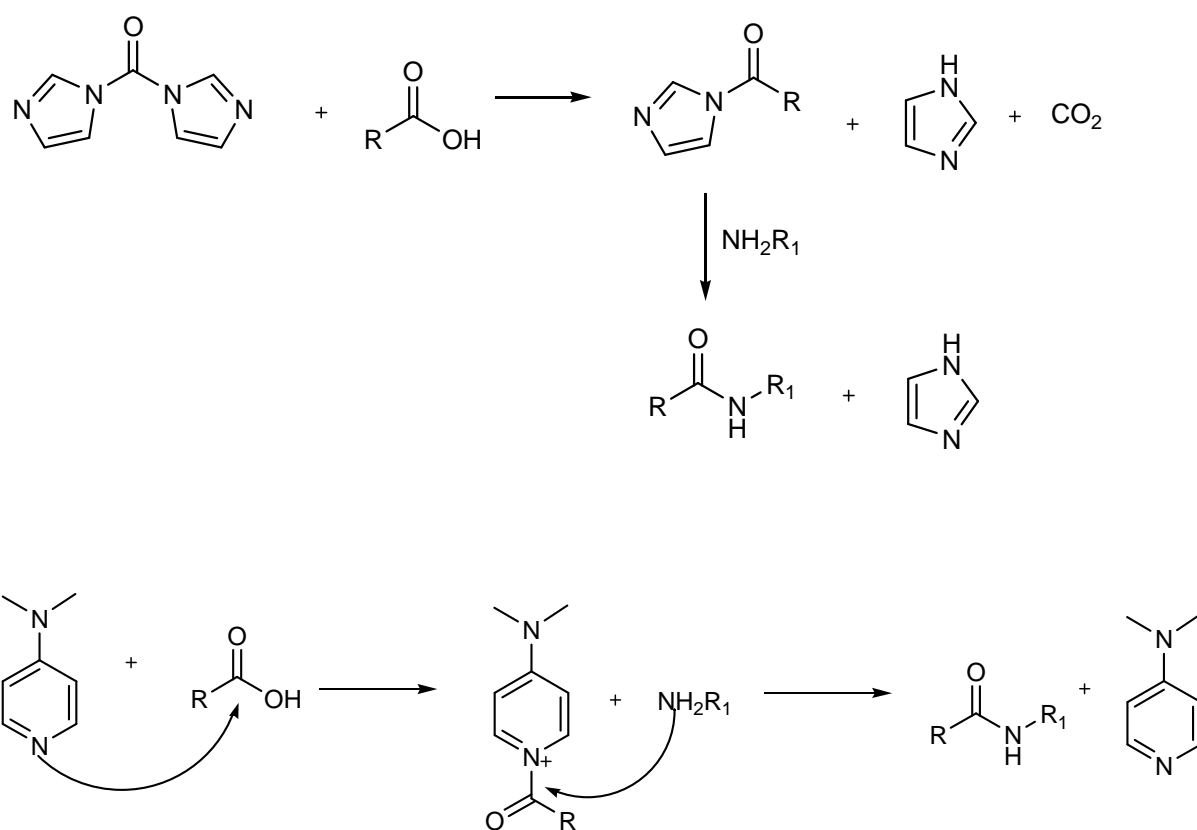
Amidno vez smo poskusili tvoriti tudi z uporabo kombinacije reagentov EDC in HOBt. V prvi stopnji smo z EDC povečali elektrofilnost karbonilnega ogljikovega atoma preko tvorbe aktiviranega estra. HOBt v reakciji sodeluje kot pomožen reagent za boljši izkoristek. Reakcija je sicer potekla, vendar je bil izkoristek nizek, kar je verjetno posledica steričnih ovir na orto mestu glede na COOH skupino. Zaradi nizkega izkoristka omenjene reakcije smo se pri sintezi naših spojinah raje odločili za tvorbo amida preko kislinskega klorida (uporaba tionil klorida).



Slika 16: Sinteza amidne vezi z uporabo HOBt / EDC sklopitvenih reagentov

9.2.2 Uporaba CDI / DMAP sklopitvenega reagenta

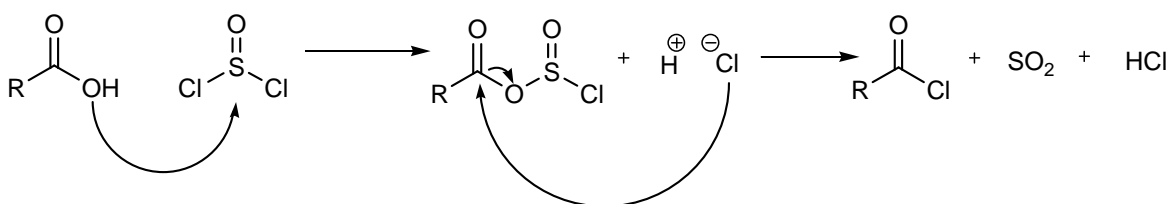
Za tvorbo amidne vezi smo uporabili kombinacijo reagentov CDI in DMAP. Karbonil diimidazol (CDI) je sklopitveni reagent, uporablja se za aktivacijo karboksilne skupine, saj olajša nukleofilni napad in s tem nastanek amidne vezi (pri reakciji nastane acilimidazol, ki nato reagira z aminom). DMAP v reakciji sodeluje kot nukleofilni katalizator (29). Podobno kot v primeru uporabe EDC / HOBT je reakcija potekla s slabim izkoristkom, kar je verjetno posledica steričnih ovir.



Slika 17: Sinteza amidne vezi z uporabo CDI / DMAP sklopitvenih reagentov

9.2.3 Tvorba amidne vezi s tionil kloridom

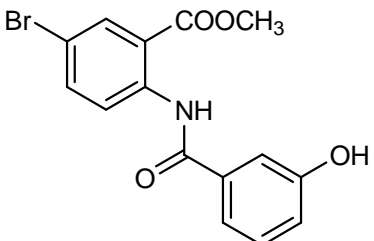
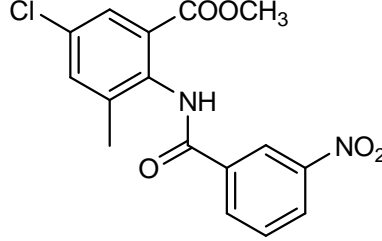
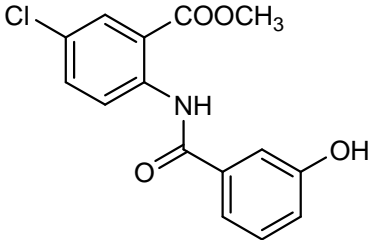
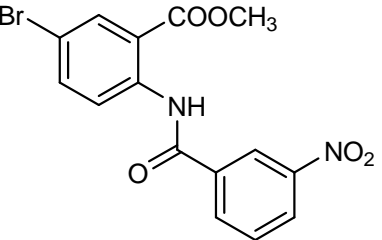
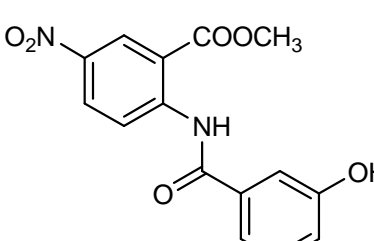
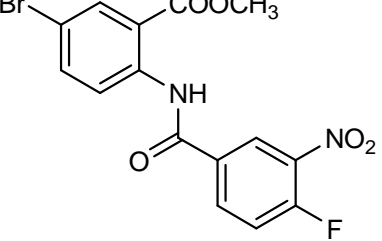
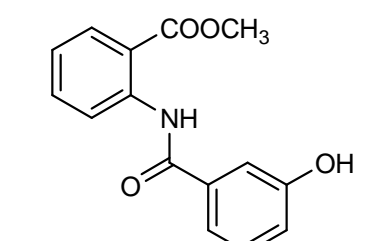
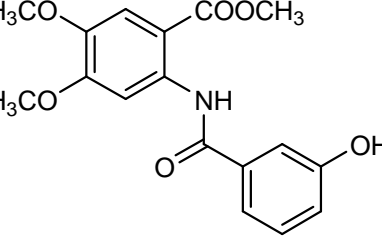
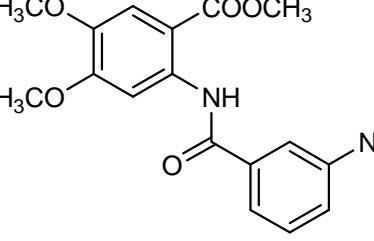
Karboksilno skupino smo v prvi stopnji pretvorili v bolj reaktiven kislinski klorid, kateri je tako bolj polariziran in nukleofilni napadaminske skupine je olajšan. V reakcijsko zmes smo dodali bazo, ki nevtralizira sproščeno HCl in tako omogoči potek reakcije. Prisotnost organske baze tako vzdržuje bazičen pH skozi vso reakcijo (23, 30).



Slika 18: Sinteza amidne vezi z uporabo tionil klorida

Tabela 1: Strukturne formule sintetiziranih amidov ter izkoristki sintez.

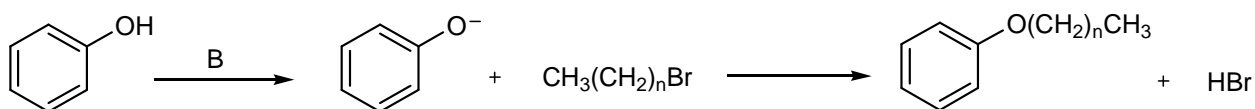
Št.	Struktura	Izkoristek	Št.	Struktura	Izkoristek
<u>5</u>		21% (HOBt/ EDC), 71% (SOCl ₂)	<u>13</u>		59% (SOCl ₂)
<u>6</u>		11% (CDI/ DMAP), 49% (SOCl ₂)	<u>14</u>		22% (SOCl ₂)
<u>7</u>		42% (SOCl ₂)	<u>15</u>		30% (SOCl ₂)

<u>8</u>		49% (SOCl ₂)	<u>16</u>		49% (SOCl ₂)
<u>9</u>		33% (SOCl ₂)	<u>17</u>		69% (SOCl ₂)
<u>10</u>		23% (SOCl ₂)	<u>18</u>		70% (SOCl ₂)
<u>11</u>		28% (SOCl ₂)	<u>19</u>		15% (SOCl ₂)
<u>12</u>		59% (SOCl ₂)			

Amidno vez smo torej sintetizirali na tri različne načine z namenom, da bi našli postopek, ki bo dajal najboljše rezultate. Najvišji izkoristki so bili ob pretvorbi karboksilne kisline v kislinski klorid, zato smo ta postopek uporabili pri večini sintez.

9.3 3. Stopnja sinteze: pripajanje alkilne verige

9.3.1 Pripajanje alkilne verige na OH skupino



Slika 19: Williamsonova sinteza etra

Sinteza etra je potekla po S_N2 mehanizmu, pri katerem v prvi stopnji z bazo najprej odcepimo proton fenolne hidroksilne skupine, zatem poteče reakcija z ustreznim alkilbromidom (29). Izkoristki reakcij so bili od 13 do 66%.

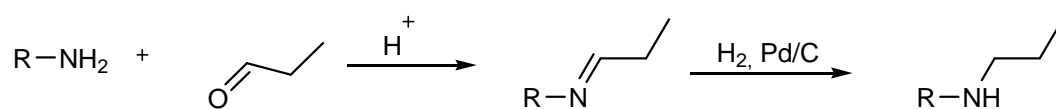
Tabela 2: Strukturne formule amidov z verigo na OH skupini in izkoristki reakcij.

Oznaka	Struktura	Izkoristek
<u>20</u>		66%
<u>21</u>		65%
<u>22</u>		23%

<u>23</u>		13%
-----------	--	-----

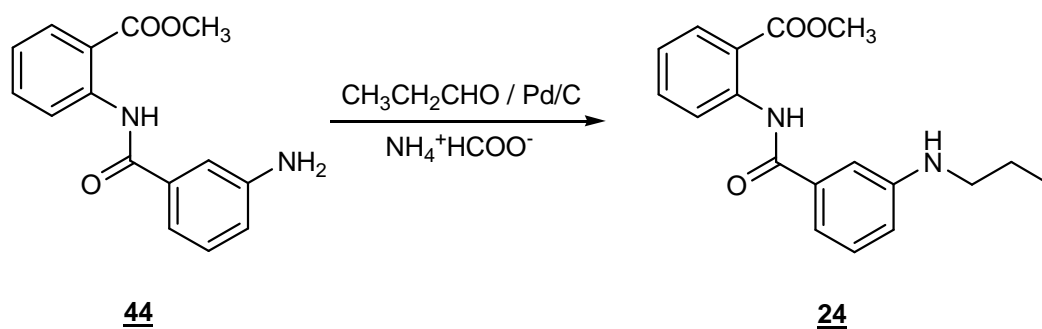
9.3.2 Pripajanje alkilne verige na NH₂ skupino

Za pripajanje alkilne verige na NH₂ skupino smo izbrali reduktivno aminiranje, saj smo se na ta način izognili nastanku terciarnih aminov kot stranskih produktov.



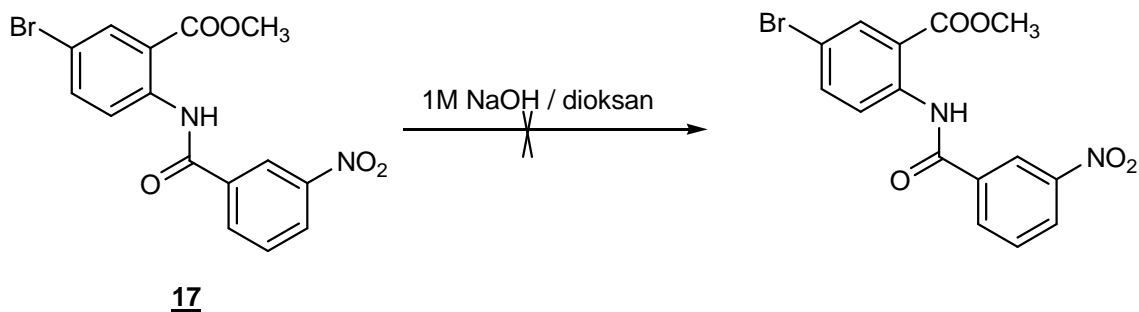
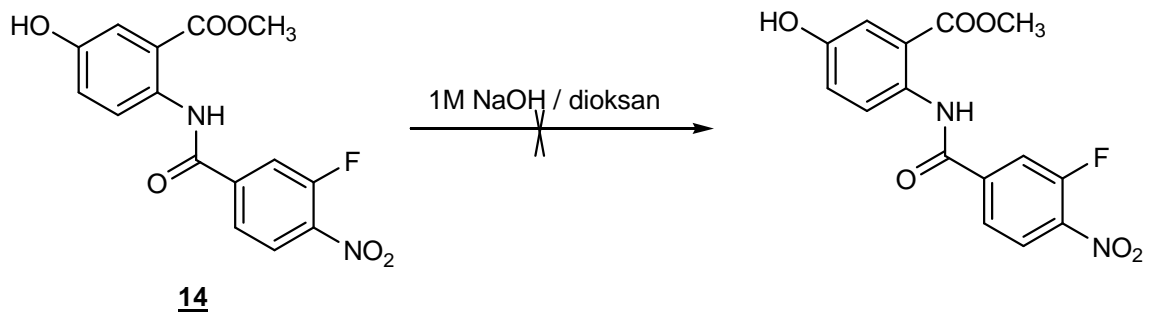
Slika 20: Reduktivno aminiranje

V prvi stopnji je nastal imin, ki smo ga nato reducirali do amina z uporabo Pd/C kot katalizatorja (29). Reakcija je potekla z nizkim izkoristkom (14%).



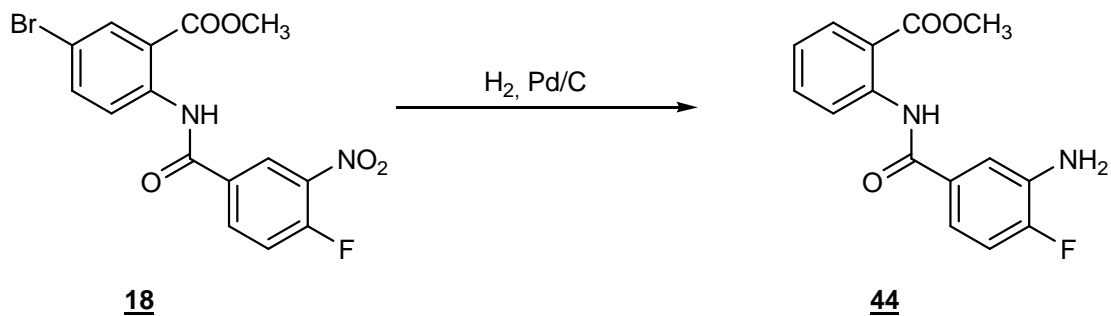
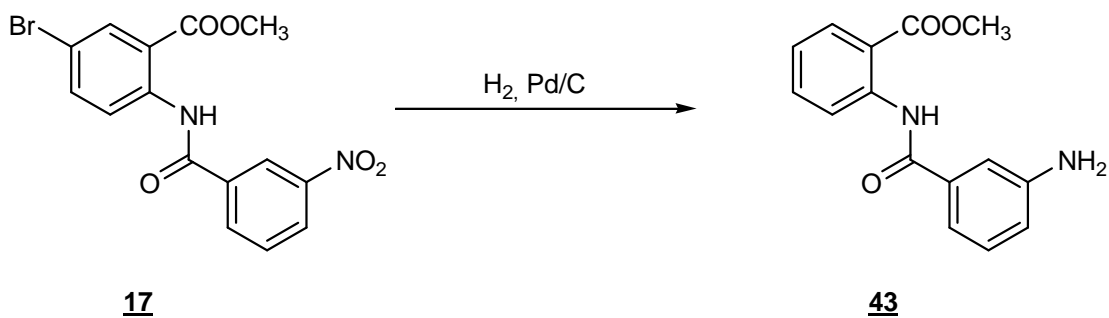
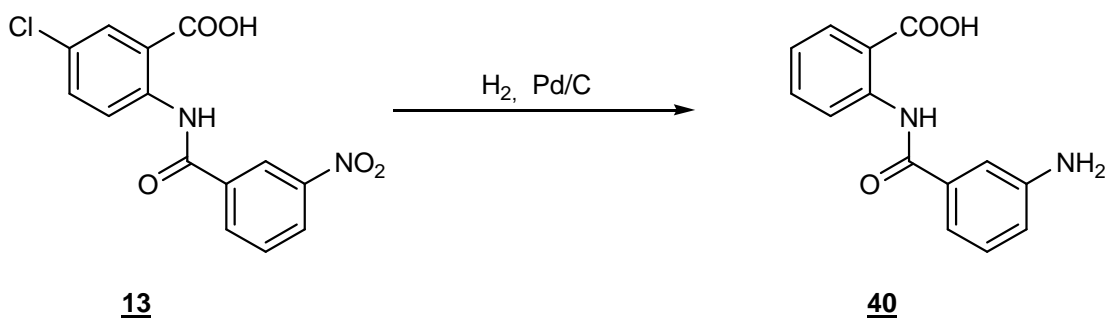
9.4 4. Stopnja sinteze: alkalna hidroliza

Metilno zaščito smo izbrali, ker je obstojna pri katalitskem hidrogeniranju ter pri pH= 1–10. Odstranjevali smo jo v predzadnji ali zadnji stopnji sinteze. Uporabili smo 1 M raztopino NaOH, ki pa se je v nekaterih primerih izkazala za premočno bazo, saj je prišlo do hidrolize amidne vezi. Zaradi tega smo poskušali skrajšati reakcijski čas, bazo pa smo zamenjali s KOH. Kot topilo smo uporabljali dioksan, THF ali pa kombinacijo obeh z namenom izboljšati topnost izhodnega amida. Izkoristki reakcij so bili od 30 do 94%, v dveh primerih pa je bila hidroliza neuspešna (hidroliza **14** in **17**). V primeru spojine **14** je prišlo do hidrolize amidne vezi z 1 M raztopino NaOH, enako se je zgodilo tudi ob uporabi KOH kot baze, reakcijo smo ves čas spremljali s TLC, kjer je bilo vidno, da ester ostaja nehidroliziran (na TLC je bilo vidnih več lis, ker je bila mobilna faza kislinska, smo lahko ločili med kislino, ki je ostala na začetku in estrom, ki je potoval po TLC plošči). Podobne ugotovitve smo dobili pri hidrolizi spojine **17**, kjer smo se metilne zaščite poskušali znebiti z 1 M NaOH in 2 M NaOH, reakcijsko zmes smo tudi segrevali (75°C). Prišlo je do delnega hidrolize amida, metilna zaščita pa je ostala.

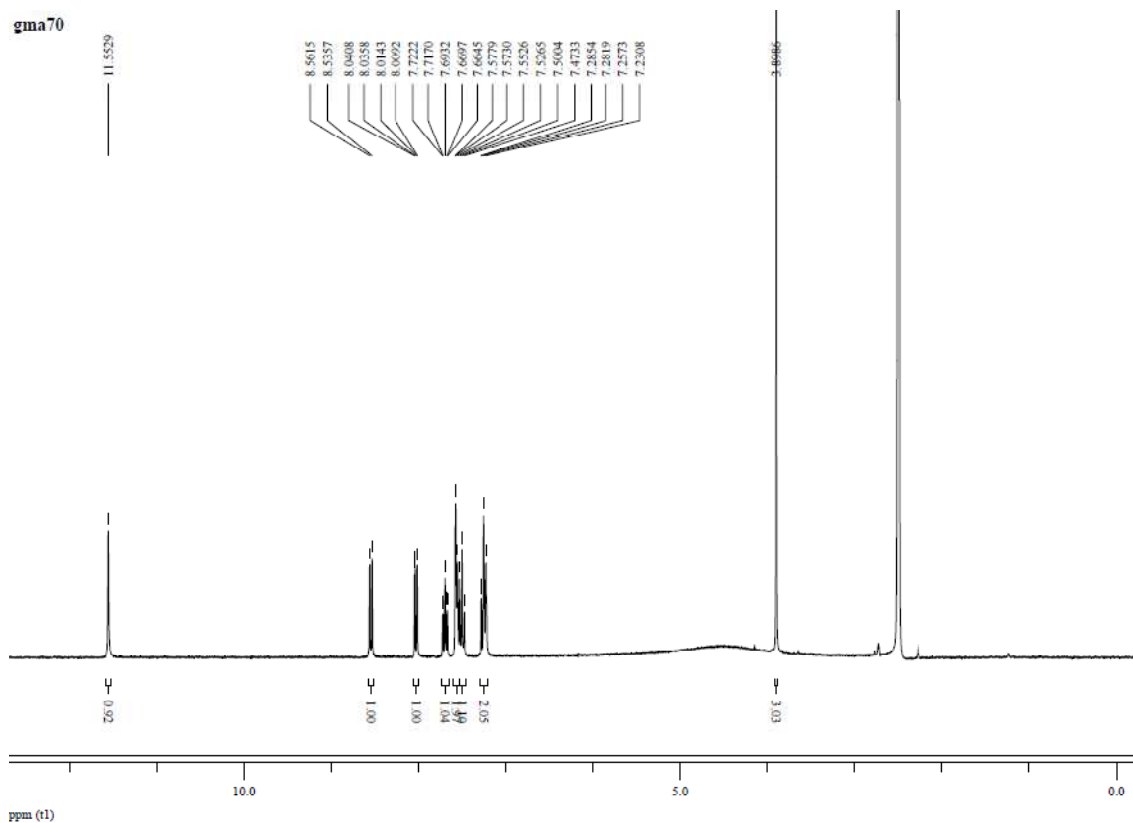


9.5 5. Stopnja sinteze: redukcija nitro skupine

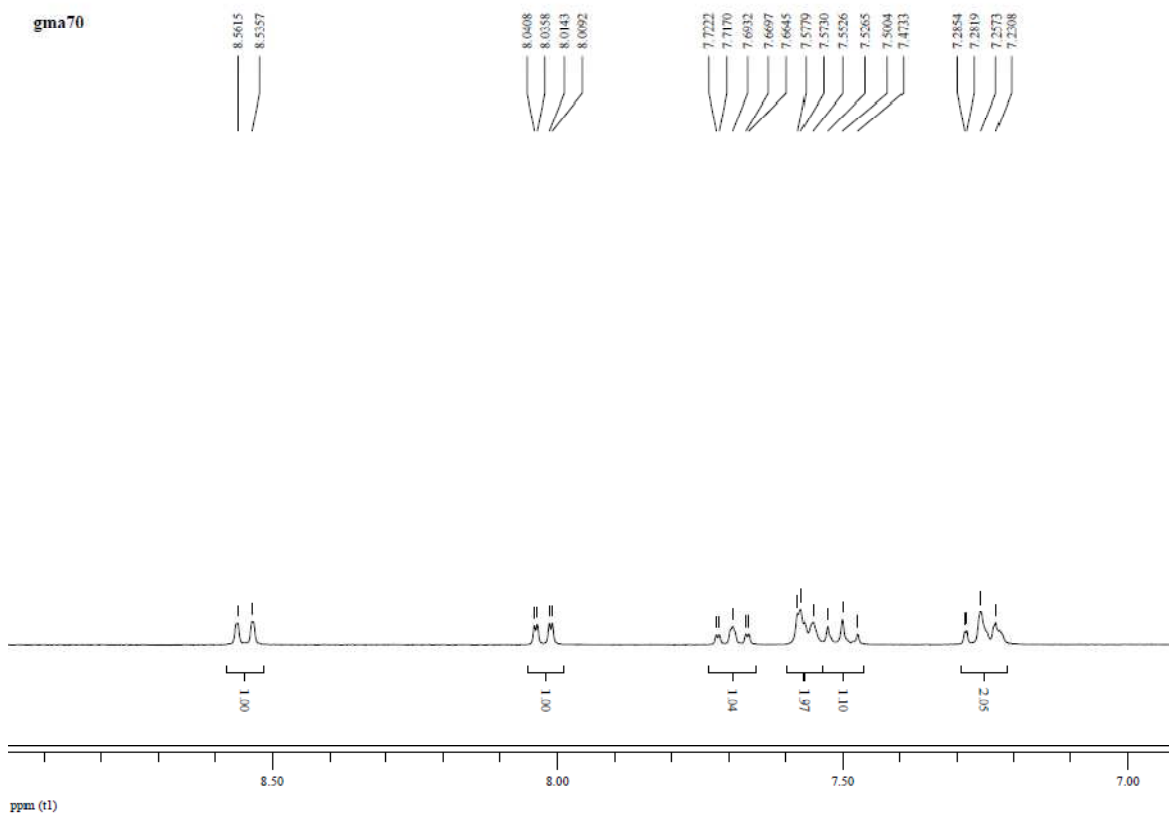
Za redukcijo nitro skupine v aminosko smo izbrali katalitsko hidrogeniranje. Reakcija je tekla v vodikovi atmosferi s katalizatorjem Pd/C, katerega prednost so številne pore in posledično velika specifična površina, kamor se adsorbira vodik. Reakcije so potekle v kratkem času (30–60 min) in z visokimi izkoristki (do 99%). V nekaterih primerih (to se je zgodilo pri sintezi spojin **40**, **43** in **44**) smo opazili, da je pri spojinah, ki so imele na aromatskem obroču vezan brom ali klor, prišlo do nukleofilne substitucije halogena z atomom vodika. To smo ugotovili s pomočjo $^1\text{H-NMR}$ spektra. Po pregledu literature smo ugotovili, da so odstranitev halogena s katalitskim hidrogeniranjem opisali že leta 1946 (27, 28).



Na slikah 21 in 22 lahko vidimo $^1\text{H NMR}$ spekter spojine **43**.



Slika 21 : ^1H NMR spekter spojine **43**



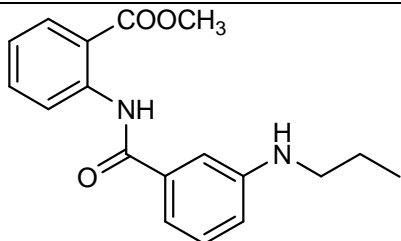
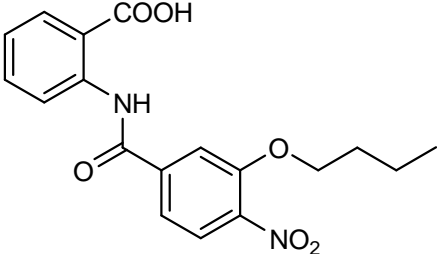
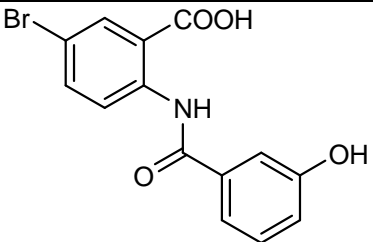
Slika 22: ^1H NMR spekter spojine **43**, povečan aromatski del

Da bi preprečili izgubo aromatskega halogena, smo postopek zamenjali za redukcijo z SnCl_2 . Reakcija je potekla z nizkim izkoristkom (26%) v primerjavi s hidrogeniranjem, to pa je bila najbrž posledica tudi slabe topnosti produkta v večini organskih topil (eter, toluen, CH_2Cl_2 , etanol, EtOAc,...) in zaradi tega oteženi izolaciji.

9.6 Rešetanje spojin kot inhibitorjev encimov AKR1C

Inhibicijo smo spremljali spektrofotometrično v smeri oksidacije substrata, katerega koncentracija je bila $30\ \mu\text{M}$ pri testiranju na izoencimu AKR1C1, $60\ \mu\text{M}$ pri testiranju na izoencimu AKR1C2 in $100\ \mu\text{M}$ pri testiranju na encimu AKR1C3. Inhibicije smo merili pri koncentraciji inhibitorja $10\ \mu\text{M}$.

Tabela 3: Povprečne inhibicije na encimih AKR1C, merjene pri koncentraciji inhibitorja $10\ \mu\text{M}$.

Oznaka	Struktura	Povprečna inhibicija AKR1C1	Povprečna inhibicija AKR1C2	Povprečna inhibicija AKR1C3
<u>24</u>		30.6%, obarjanje pri višji koncentraciji	26.4%	NI
<u>25</u>		70.8% $\text{IC}_{50} = 3.2\ \mu\text{M}$	58.3% $\text{IC}_{50} = 6.5\ \mu\text{M}$	47.2% $\text{IC}_{50} = 7.5\ \mu\text{M}$
<u>26</u>		21.6%	16.7%	89.6% $\text{IC}_{50} = 1.9\ \mu\text{M}$

<u>27</u>		17.4%	6.7%	77.8% IC ₅₀ = 2.2 μM
<u>28</u>		11.8%	10.4%	87.9% IC ₅₀ = 2.6 μM
<u>29</u>		22.2%	NI	3.5%
<u>30</u>		NI	23.4%	3.4%
<u>31</u>		NI	NI	42.1% IC ₅₀ = 12.7 μM
<u>32</u>		NI	31.6%, obarjanje pri višji koncentraciji	1.9%
<u>33</u>		NI	22.5%	NI

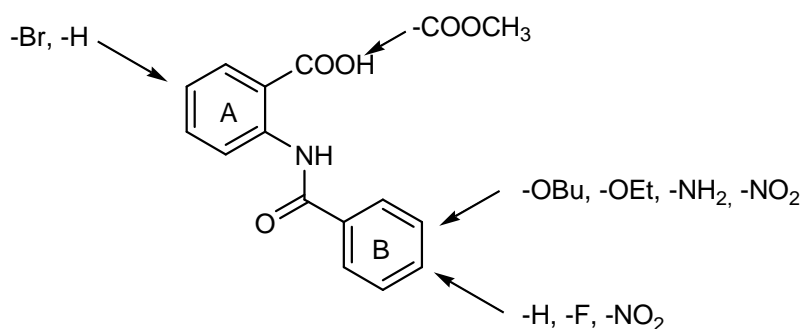
<u>34</u>		53.2% IC ₅₀ = 8.4 μM	33.6% IC ₅₀ = 15.6 μM	5.6%
<u>35</u>		65.9% IC ₅₀ = 4.9 μM	70.5% IC ₅₀ = 4.9 μM	30.4%
<u>36</u>		31.9% IC ₅₀ = 20.6 μM	36.8% IC ₅₀ = 17.1 μM	19.1%
<u>37</u>		11.8%	29.4%	70.2% IC ₅₀ = 5.2 μM
<u>40</u>		8.0%	Ni	2.2%
<u>41</u>		18.0%	20.2%	5.6%
<u>42</u>		9.7%	28.7%	5.6%

<u>46</u>		17.1%	10.4%	13.4%
<u>47</u>		41.6% IC ₅₀ = 10.7 μM	19.5%	48.7% IC ₅₀ = 11.3 μM

9.6.1 Razlaga odnosa med strukturo in delovanjem

9.6.1.1 Inhibitorji AKR1C1

Med testiranjem 19 derivatov antranilne kisline so kot inhibitorji encima AKR1C1 izstopale predvsem spojine **25**, **34**, **35**, **36** in **47**. Kot najboljša se je izkazala spojina **25**.



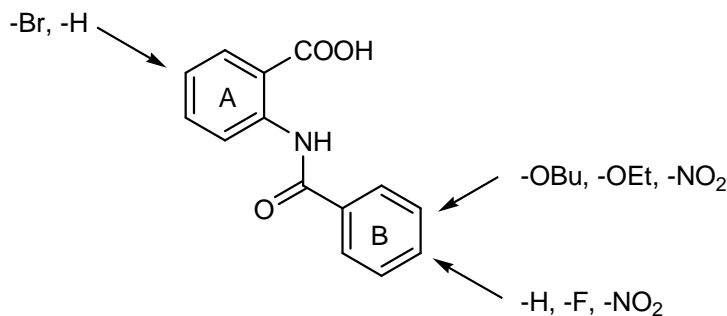
V primeru, da je hidroksilna skupina na 3. mestu B obroča prosta, se inhibitorna aktivnost močno zniža. Ugodna je le zamenjava hidroksilne skupine z amino ali nitro skupino, vendar mora biti v tem primeru na mestu 4. B obroča prisoten fluor. Če med seboj primerjamo spojini **35** in **36**, ugotovimo, da daljšanje alkilne verige pripomore k večji inhibiciji.

Iz tabele 3 je razvidno, da se je kot najboljši inhibitor AKR1C1 izkazala spojina **25** z IC₅₀ vrednostjo 3.2 μM, sledijo spojine **35** z IC₅₀ 4.9 μM, **34** z IC₅₀ 8.4 μM, **47** z IC₅₀ 10.7 μM

in **36** z 20.7 μM . Za več kot 30% je encimsko aktivnost znižala tudi spojina **24**, ki pa ji nismo mogli določiti IC_{50} vrednosti, ker se je obarjanjala pri višji koncentraciji.

9.6.1.2 Inhibitorji AKR1C2

Na encimu AKR1C2 so kot dobri inhibitorji izstopale predvsem spojine **25**, **34**, **35** in **36**, izmed katerih se je kot najboljša izkazala spojina **35**.

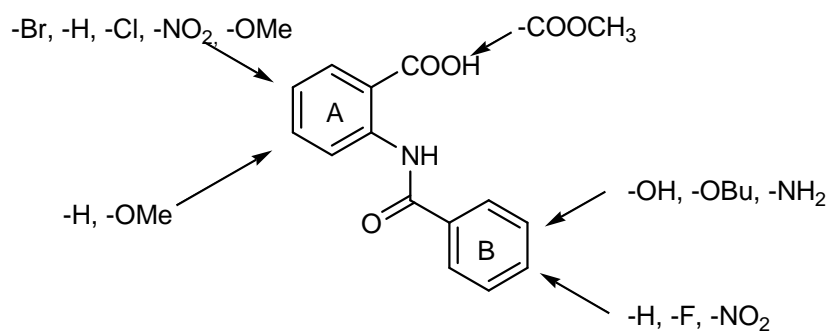


V primeru, da je hidroksilna skupina na 3. mestu B obroča prosta, se podobno kot v primeru inhibitorjev AKR1C1 inhibitorna aktivnost bistveno zniža. Ugodna je le zamenjava z nitro skupino, vendar mora biti v tem primeru obroč B na para mestu substituiran s fluorom. Zamenjava hidroksilne skupine z amino skupino na tem mestu ni ugodna. Po primerjavi IC_{50} vrednosti smo ugotovili (primerjava spojin **35** in **36**), da uvedba daljše alkilne verige pripomore k boljši inhibiciji. Najboljši inhibitor je bila spojina **35** z IC_{50} vrednostjo 4.9 μM , sledijo pa spojine **25** z IC_{50} 6.5 μM , **34** z IC_{50} 15.6 μM in **36** z IC_{50} 17.1 μM .

Za več kot 30% je encimsko aktivnost znižala tudi spojina **32**, ki pa ji nismo mogli določiti IC_{50} vrednosti, ker se je obarjala pri višji koncentraciji.

9.6.1.3 Inhibitorji AKR1C3

Med testiranjem derivatov antranilne kisline so kot dobri inhibitorji AKR1C3 izstopale predvsem spojine **25**, **26**, **27**, **28**, **31**, **37**, **47**. Kot najboljša spojina se je izkazala **26**.

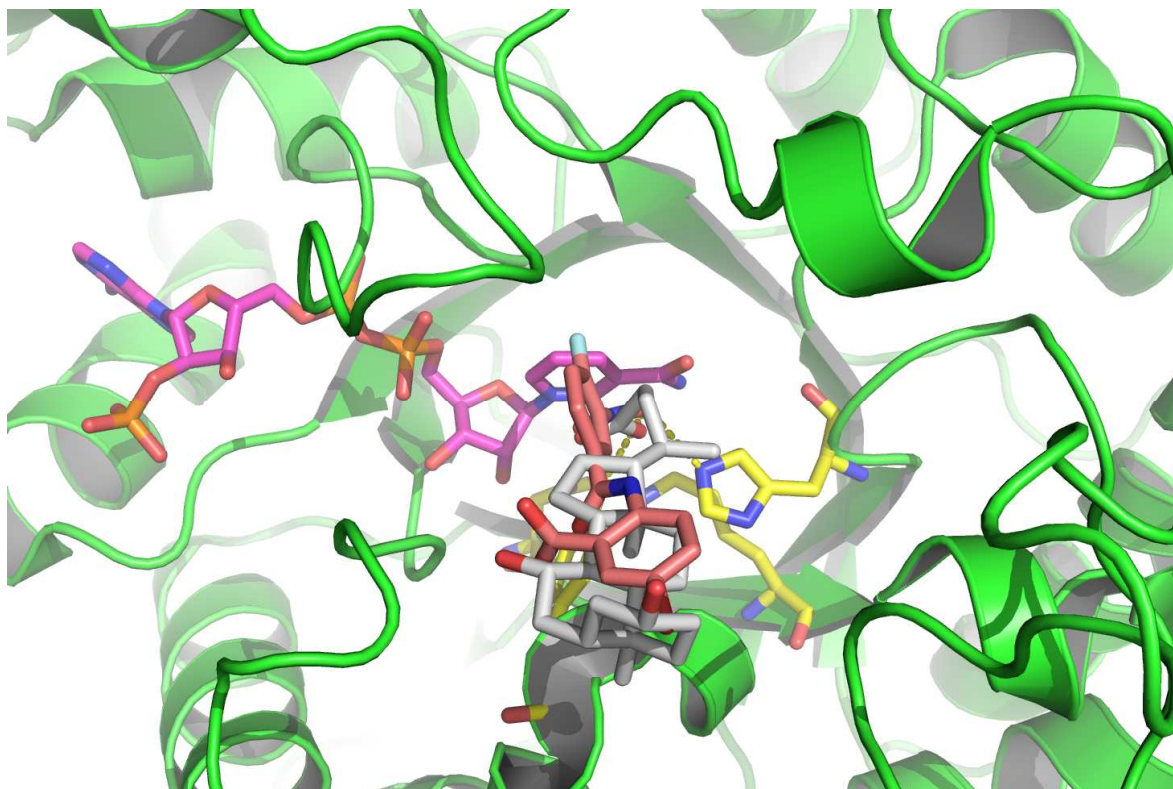


V nasprotju s spojinami, ki inhibirajo AKR1C1 in AKR1C2, pa za spojine, ki selektivno inhibirajo AKR1C3 velja, da morajo imeti na 3. mestu B obroča prosto hidroksilno skupino. Ta prosta hidroksilna skupina (kot donor vodikove vezi) verjetno tvori vodikovo vez s serinom 221. V primeru spojine **25**, ki ima hidroksilno skupino zaetreno in vodikove vezi ne more tvoriti, vlogo verjetne tvorbe vodikove vezi s Ser 221 prevzame nitro skupina na orto mestu glede na hidroksilno, zaradi tvorbe vodikove vezi se selektivnost in dobra inhibitorna aktivnost ohrani. Tako se vodikova vez med encimom in inhibitorjem ohrani, le da v tem primeru spojina preko nitro skupine deluje kot akceptor vodikove vezi (glej poglavje 9.6.4). Ker je za etre značilno, da tvorijo šibke vodikove vezi, je razumljivo, da se inhibicija pri spojinah, ki imajo na mestu 3. B obroča hidroksilno skupino zaetreno (in nimajo nitro skupine ob alkoksi verigi), zniža (npr. spojini **35** in **36**). Na obroču A na para mestu glede na amidno vez je zaželena nepolarna skupina, obroč je lahko substituiran s klorom, bromom, nitro ali metoksi skupino. Če je na tem mestu vezana bolj polarna skupina, kot je to pri spojinah **42** in **46**, aktivnost spojine pade.

Najboljši inhibitorji so bile spojina **26** z IC₅₀ vrednostjo 1.9 μM, sledijo spojine **27** z IC₅₀ 2.2 μM, **28** z IC₅₀ 2.6 μM in **37** z IC₅₀ 5.2 μM.

9.6.2 Model vezave spojine 35 v aktivno mesto AKR1C1

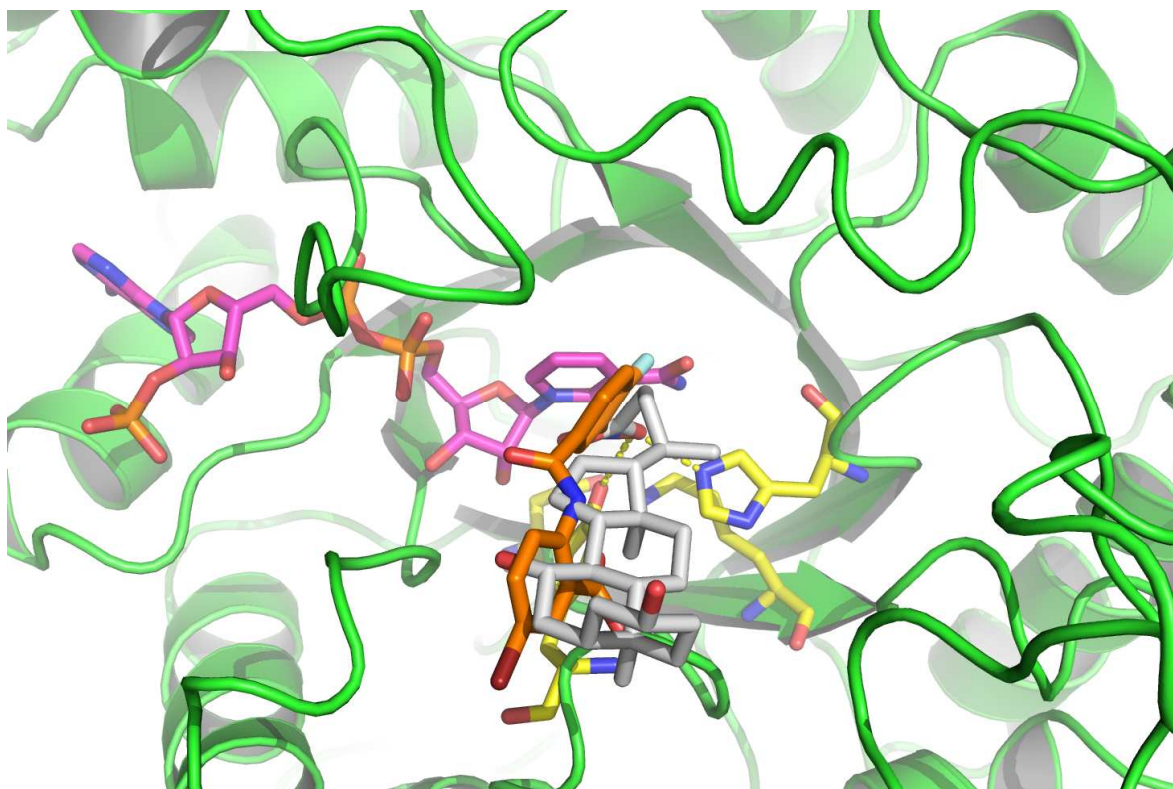
Za bolj nazorno razlago vezave inhibitorjev AKR1C1 v aktivno mesto smo se uporabili računalniško simulacijo vezave v aktivno mesto znane tridimenzionalne strukture encima AKR1C1 (pdb koda: 3C3U). Uporabili smo program FlexX. Na sliki 23 je vidna katalitične tetrada, steroid (sive barve) in spojina 35, ki je obrnjena tako kot steroid. Vidni sta dve predpostavljene vodikovi vezi med inhibitorjem in katalitičnimi aminokislinami.



Slika 23: Predpostavljen način vezave spojine 35 v aktivno mesto encima AKR1C1. Na sliki so prikazani kofaktor (vijoličen), inhibitor (rdeč), katalitične aminokisliline (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) in steroid (siv).

9.6.3 Model vezave spojine 35 v aktivno mesto AKR1C2

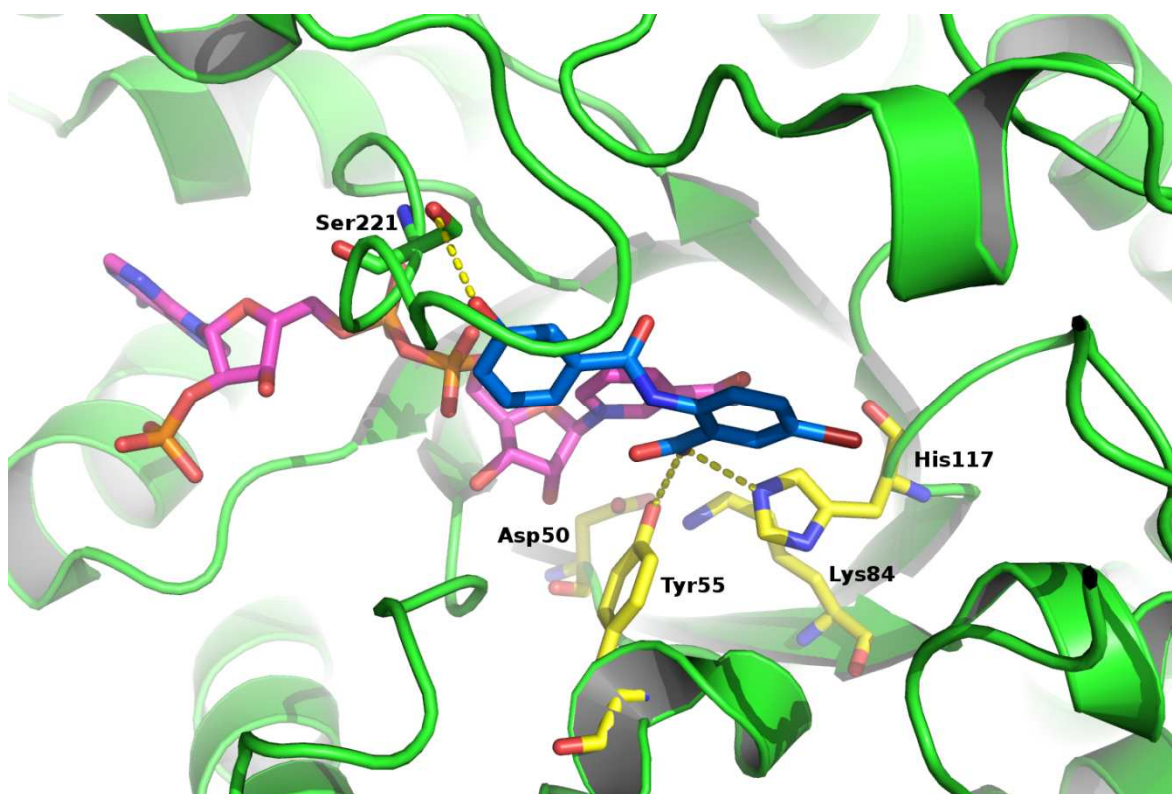
Za bolj nazorno razlago vezave inhibitorjev AKR1C2 v aktivno mesto smo se uporabili računalniško simulacijo vezave v aktivno mesto znane tridimensionalne strukture encima AKR1C2 (pdb koda: 1IHI). Na sliki 24 je vidna katalitične tetrada, steroid (sive barve) in spojina 35, ki je obrnjena tako kot steroid. Vidni sta dve predpostavljene vodikovi vezi med inhibitorjem in katalitičnimi aminokislinami.



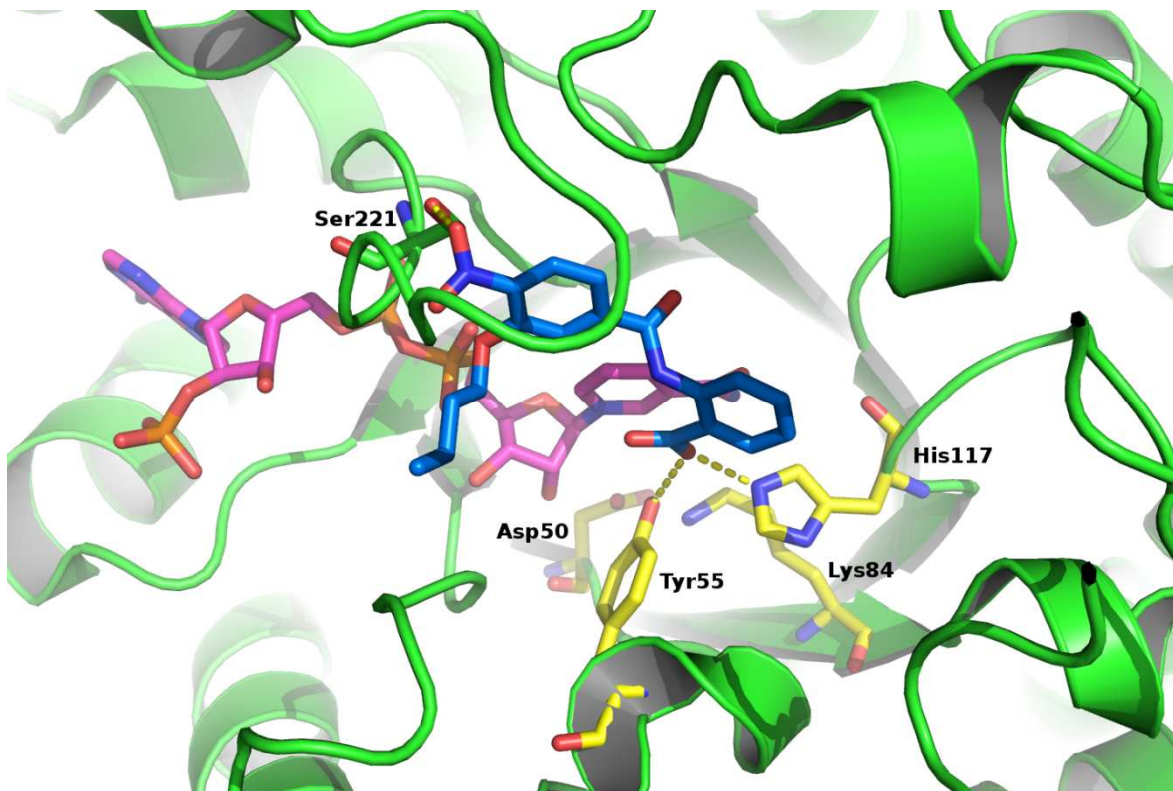
Slika 24: Predpostavljen način vezave spojine 35 v aktivno mesto encima AKR1C2. Na sliki so prikazani kofaktor (vijoličen), inhibitor (rdeč), katalitične aminokisliline (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) in steroid (siv).

9.6.4 Model vezave spojin 25 in 26 v aktivno mesto AKR1C3

Za bolj nazorno razlago vezave inhibitorjev AKR1C3 v aktivno mesto smo se uporabili računalniško simulacijo vezave v aktivno mesto znane tridimenzionalne strukture encima AKR1C3 (pdb koda: 1S2A). Na slikah 25 in 26 je vidna katalitične tetrada in tvorba vodikove vezi s serinom 221. Tvorita se tudi vodikovi vezi med Tyr 55 in His 117 ter derivatom antranilne kisline. Spojini 25 in 26 sta torej stabilizirani v aktivnem mestu encima AKR1C3 s kar tremi vodikovimi vezmi.



Slika 25: Predpostavljen način vezave spojine 26 v aktivno mesto encima AKR1C3. Na sliki so prikazani kofaktor (vijoličen), inhibitor (moder), katalitične aminokislone (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) in Ser 211 s katerim inhibitor tvori vodikovo vez (vodikova vez se tvori med serinom in hidroksilno skupino na meta mestu B obroča).



Slika 26: Predpostavljen način vezave spojine 25 v aktivno mesto encima AKR1C3. Na sliki so prikazani kofaktor (vijoličen), inhibitor (moder) , katalitične aminokisline (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) in Ser 211 s katerim inhibitor tvori vodikovo vez (vodikova vez nastane med serinom in nitro skupino na para mestu B obroča).

10 SKLEP

Kot potencialne inhibitorje aldo/keto-reduktaz AKR1C1, AKR1C2 in AKR1C3 smo sintetizirali in biokemijsko ovrednotili 19 novih derivatov antranilne kisline, ki se razlikujejo predvsem v substituentah na meta mestu A obroča ter meta in para mestu B obroča glede na amidno vez.

Najboljšim inhibitorjem smo določili IC_{50} vrednosti. Spojine so se izkazale kot dobri inhibitorji s selektivnim delovanjem predvsem na izoencim AKR1C3. Na podlagi rezultatov smo lahko določili strukturne lastnosti, potrebne za selektivno delovanje na izoencim AKR1C3. Izpostaviti je potrebno predpostavljeno vodikovo vez, ki se tvori s Ser 221 v aktivnem mestu AKR1C3 in hidroksilno skupino na meta mestu B obroča oziroma nitro skupino na para mestu B obroča. V kolikor želimo selektivnost delovanja preusmeriti na izoencima AKR1C1 in AKR1C2, moramo hidroksilno skupino zaetriti z alkilno verigo. Daljšanje alkilne verige pripomore k boljši inhibiciji. Pri teh dveh encimih na tem mestu torej ni tvorbe vodikove vezi.

Določene IC_{50} vrednosti so v nizkem mikromolarnem območju, spojine s selektivnim inhibitornim delovanjem na AKR1C izoencime pa predstavljajo izhodišče za razvoj učinkovin za zdravljenje tako hormonsko odvisnih kot neodvisnih oblik raka, predmenstrualnega sindroma, epilepsije, depresije in vzdrževanja nosečnosti.

11 VIRI

- (1) Lemke T. L., Williams D. A.; Foye's principles of medicinal chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 877-883.
- (2) Brožič P., Turk S., Lanišnik Rižner T., Gobec S.; Inhibitors of aldo-keto reductases AKR1C1-AKR1C4, *Current Medicinal Chemistry*, 2011;18(17): 2554–2565.
- (3) Penning T. M.; Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011; 125(1-2): 46–56.
- (4) Brunskole M., Lanišnik Rižner T., Stojan J.; Encimi iz naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz kot nove farmakološke tarče, *Farmaceutski vestnik* 2009; 3: 159–164.
- (5) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1QYV>.
- (6) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3KLM>.
- (7) Brožič P., Gobec S., Lanišnik Rižner T.; Izoencimi aldo/keto-reduktaz iz podružine 1C kot tarče za razvoj zdravnih učinkovin, *Farmaceutski vestnik* 2009; 5: 265–270.
- (8) Barski O. A., Tipparaju S. M., Bhatnagar A.; The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification, *Drug Metabolism Reviews*, 2008; 40: 553–624.
- (9) http://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.shtml.
- (10) Penning T. M., Drury J. E.; Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007; 464(2): 241–250.
- (11) <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1J96>.
- (12) Penning T. M., Burczynski M. E., Jez J. M., Hung C. F., Lin H. K., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K.; Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of human aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the activation and formation of male and female sex hormones, *Biochemical Journal*, 2000; 351: 67–77.
- (13) Lanišnik Rižner T., Lin H. K., Peehl D. M., Steckelbroeck S., Bauman D. R., Penning T. M.; Human type 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells, *Endocrinology*, 2003; 144(7): 2922–2932.

- (14) El-Kabbani O., Dhagat U., Hara A.; Inhibitors of human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1), *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011; 125(1-2): 105–111.
- (15) Adeniji A. O., Twenter B. M., Byrns M. C., Jin Y., Winkler J. D., Penning T. M.; Discovery of substituted 3-(phenylamino)benzoic acids as potent and selective inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011; 21: 1464–1468.
- (16) Seo D. C., Sung J. M., Cho H. J., Yi H., Seo K. H., Choi I. S., Kim D. K., Kim J. S., AM A. E. A., Shin H. C.; Gene expression profiling of cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells, *Molecular cancer*, 2007.
- (17) Byrns M. C., Jin Y., Penning T. M.; Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011; 125(1-2): 95–104.
- (18) Penning T. M., Byrns M. C.; Steroid transforming aldo-keto reductases and cancer, *Annals of New York Academy of Sciences*, 2009; 1155: 33–42.
- (19) Makosza, Mieczyslaw; *Journal of Organic Chemistry* 1998, V63(15), P4878-4888.
- (20) Dong W., Xu J., Xiong L., Liu X., Li Z.; Synthesis, structure and biological activities of some antranilic acid esters containing N-pyridylpyrazole, *Chinese Journal of Chemistry*, 2009; 27: 579–586.
- (21) Kumaraswamy, G.; *Organic Preparations and Procedures International* 2004, V36(4), P341-345.
- (22) Hara, Osamu; *Tetrahedron* 2004, V60(42), P9381-9390.
- (23) Chang T. C., Huang M. L., Hsu W. L., Hwang J. M., Hsu L. Y.; Synthesis and biological evaluation of ebselen and its acyclic derivatives, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003; 51(12): 1413–1416.
- (24) Plante J., Campbell F., Malkova B., Kilner C., Warrinera S. L., Wilson A. J.; Synthesis of functionalised aromatic oligamide rods, *Organic Biomolecular Chemistry*, 2008; 6: 138–146.
- (25) Gerhard S., Holger J., Herrmann M., Sabater-Lüntzel C., Vössing T.; Antranilsäureamide und deren derivate als kosmetische und pharmazeutische wirkstoffe, DE 102 54 872 A1 2004.06.03.
- (26) Ulven T., Friumerer T., Rist Ø., Kostenis E., Högberg T.; CRTH2 receptor ligands for therapeutic use, WO 2005/115374 A1, 8 December 2005.

- (27) Rai G., Jeong J. M., Lee Y. S., Kim H. W., Lee D. S., Chung J. K., Lee M. C.; Ionic liquid mediated efficient reduction of nitroarenes using stannous chloride under sonication, *Tetrahedron Letters*, 2005; 46: 3987–3990.
- (28) Altzlyan R., Phillips A. P.; *The catalytic hydrogenolysis of halogen compounds*, 1946.
- (29) Clayden J., Greeves N, Warren S., Wothers P.; *Organic chemistry*, Oxford university press, 2001, P354-356, 420, 621.
- (30) Montalbetti C. A. G. N., Falque V.; Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, 2005; 61: 10872–10852.