

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIJELA VESELINOVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIJELA VESELINOVIĆ

**Sinteza in *in vitro* vrednotenje kinetike metabolizma
bazedoksifena**

**Synthesis and *in vitro* evaluation of metabolic kinetics of
bazedoxifene**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo in Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Lucije Peterlin Mašič in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm. in asist. dr. Juriju Trontlju za strokovno pomoč in napotke pri izdelavi diplomskega dela. Velika zahvala gre asist. dr. Tihomirju Tomašiču za ves trud, potrpežljivost in skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo. Najlepša hvala tudi vsem ostalim iz Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi med izdelavo diplomskega dela kakorkoli pomagali.

Iskreno se zahvaljujem tudi asist. Tini Trdan, mag. farm. za dragocene nasvete, optimizem in pomoč pri delu v laboratoriju predvsem pa za moralno podporo, ko sem jo v času nastajanja diplomskega dela najbolj potrebovala. Zahvaljujem se tudi diplomski komisiji za pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini in prijateljem za vsestransko podporo in ker brez izjem vedno verjamejo vame in me spodbujajo ter vsem tistim, ki jih nisem omenila, a so mi v času študija stali ob strani in mi pomagali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Danijela Veselinović

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, junij 2011

VSEBINA

VSEBINA	ii
POVZETEK	iv
1. UVOD	1
1.1. OSTEOPOROZA	1
1.1.1. Kostna remodelacija	2
1.1.2. Razširjenost	3
1.1.3. Etiopatiogeneza osteoporoze	4
1.1.4. Dejavniki tveganja	5
1.1.5. Oblike osteoporoze	6
1.1.6. Preprečevanje in zdravljenje	7
1.1.7. Bazedoksifen - selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM)	10
1.2. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE (UGT)	14
1.2.1. Klasifikacija	14
1.2.2. Ekspresija UGT encimov	15
1.3. PREUČEVANJE METABOLIZMA IN PRIDOBIVANJE METABOLITOV BAZEDOKSIFENA	15
1.3.1. Mikrosomi	15
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI	18
3.1.1. Sinteza bazedoksifena	18
3.1.2. Sinteza metabolitov bazedoksifena	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Sinteza bazedoksifena	19
3.2.2. Časovno spremljanje nastajanja metabolitov bazedoksifena	21
3.2.3. Analitika	22
4. EKSPERIMENTALNI DEL	24
4.1. Reakcijske sheme	24
4.1.1. Sinteza 1-(4-benziloksifenil) propan-1-ona (01)	26
4.1.2. Sinteza 1-(4-benziloksifenil)-2-bromopropan-1-ona (02)	27
4.1.3. Sinteza 5-(benziloksi)-2-(4-(benziloksi)fenil)-3-metil-1 <i>H</i> -indola (03)	28
4.1.4. Sinteza etilnega estra 2-[4-(hidroksimetil)fenoksi] očetne kisline (04)	29
4.1.5. Sinteza etilnega estra 2-[4-(bromometil)fenoksi] očetne kisline (05)	30
4.1.6. Sinteza etilnega estra 2-{4-[5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-3-metil-1 <i>H</i> -indol-1-ilmetil]-fenoksi} očetne kisline (06)	31
4.1.7. Sinteza etilnega estra 2-{4-[5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-3-metil-1 <i>H</i> -indol-1-ilmetil]-fenoksi} etanola (07)	32
4.1.8. Sinteza 5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-1-[4-(2-bromo-etoksi)-benzil]-3-metil-1 <i>H</i> indola (08)	33
4.1.9. Sinteza 5-benziloksi-2-fenil-3-metil-1-[4-(2-azepan-1-il-etoksi) benzil]-1 <i>H</i> -indola (09)	34
4.1.10. Sinteza 2-(4-hidroksi-fenil)-3-metil-1-[4-(2-azepan-1-il-etoksi)benzil]-1 <i>H</i> -indol-5-ola (10)	36
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	38
5.1. Biosinteza metabolitov bazedoksifena	38
5.1.1. ANALIZA INKUBACIJSKE ZMESI z jetrnimi mikrosomi	38
5.1.2. ČASOVNO SPREMLJANJE NASTANKA METABOLITOV BAZEDOKSIFENA Z JETRNIMI MIKROSOMI	41

5.2.	Sinteza bazedoksifena	43
5.2.1.	Uvedba zaščitne skupine na hidroksilno skupino 1-(4-hidroksifenil)propan-1-ona - <i>Williamsonova sinteza etrov</i>	43
5.2.2.	Sinteza spojine (03) z Bischler Möhlau-jeva sintezo indolov	44
5.2.3.	Sinteza spojine 06 – <i>N</i> -alkiliranje indola	45
5.2.4.	Nukeofilna substitucija – Appelova reakcija	45
5.2.5.	Redukcija z LiAlH_4	48
5.2.6.	Odstranitev zaščitne skupine s končnega produkta – <i>katalitsko hidrogeniranje</i>	48
6.	SKLEP	50
7.	LITERATURA	51

POVZETEK

Bazedoksifen je učinkovina iz skupine selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev (SERM), ki se uporabljajo za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze pri ženskah, ki so v menopavzi. Razviti so bili z namenom, da nadomestijo zdravljenje osteoporoze s hormonsko nadomestno terapijo, saj ta zdravila povečajo tveganje za nastanek raka na dojkah in maternici. Zdravilo, ki vsebuje novo učinkovino bazedoksifen, je v Evropski Uniji pridobilo dovoljenje za promet aprila 2009. V ZDA je zdravilo še vedno v tretji fazi kliničnega preskušanja, saj je Ameriški urad za zdravila in hrano zahteval izvedbo še dodatnih kliničnih študij za dopolnitev podatkov o varnostnem profilu zdravila.

Podatki o metabolizmu bazedoksifena so zelo skopi, zato smo se odločili preučiti njegove metabolite. Zaradi nedostopnosti učinkovine na tržišču, smo najprej izpeljali načrt sinteze bazedoksifena. Z dobljenimi analiznimi rezultati smo potrdili strukturo sintetiziranega bazedoksifena. Z uporabo človeških jetrnih mikrosomov kot *in vitro* modelom smo nato spremljali kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena. Bazedoksifen se eliminira predvsem s konjugacijo z glukuronsko kislino, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva. *In vitro* nastane predvsem bazedoksifen-4'-glukuronid, medtem ko je glavni *in vivo* metabolit bazedoksifen-5-glukuronid (40-95%), manj je bazedoksifen-4'-glukuronida (0-20%), nastaja pa tudi bazedoksifen-4',5-diglukuronid, ki ga v *in vitro* pogojih nismo zaznali. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da človeški jetrni mikrosomi niso najboljši *in vitro* model za preučevanje metabolizma bazedoksifena. Potrebne so nadaljnje študije za ugotavljanje metabolizma bazedoksifena, pri katerih je treba uporabiti kompleksnejše *in vitro* modele. Kljub temu so rezultati te naloge koristni za razlago in načrtovanje nadaljnjih raziskav metabolizma bazedoksifena.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

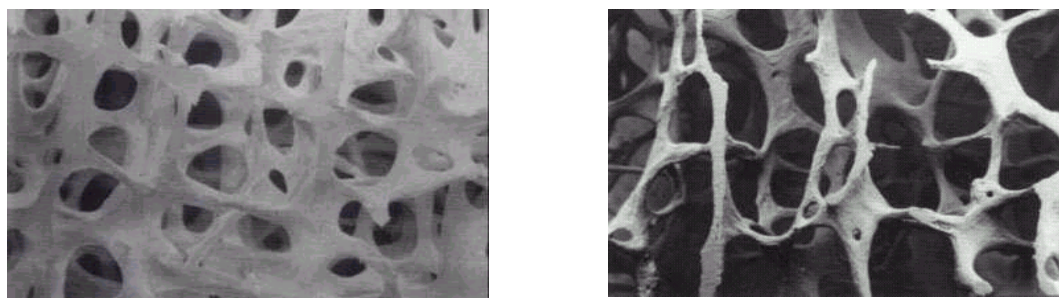
BMD	mineralna kostna gostota (ang. »bone mineral density«)
CE	konjugirani estrogen (ang. »conjugate estrogen«)
CYP450	družina citokromov P450
DMSO	dimetilsulfoksid
ER α , ER β	estrogenski receptor alfa, estrogenski receptor beta
FDA	Agencija za zdravila in prehrano (ang. »Food and Drug Administration«)
HDL	lipoproteini visoke gostote (ang. »high density cholesterol«)
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje
ITM	indeks telesne mase
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
LDL	lipoproteini nizke gostote (ang. »low density cholesterol«)
LC/MS/MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. »high pressure liquid chromatography«) sklopljena s tandemskim masnim detektorjem
M4	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-4'-glukuronid
M5	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-5-glukuronid
M6	metabolit bazedoksifena: bazedoksifen-5,4'-diglukuronid
MKG	mineralna kostna gostota
PBM	povprečna kostna masa (ang. »peak bone mass«)
PTH	parathormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega faktorja kappa - B
RKR	randomizirana klinična raziskava
SD	standardna deviacija
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
TSEC	ang. »Tissue – Selective Estrogen Complexes«
UDP	uridindifosfat
UGT	UDP- glukuronozil-transferaza
WHI	Women's Health Initiative

1. UVOD

1.1. OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (angl. bone mineral density - BMD) in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva, kar vodi do večje krhkosti kosti in pogostnosti zlomov. Že majhna obremenitev lahko povzroči zlom. Najpogostejša mesta, kjer se pojavijo zlomi, so kolk, zapestje in hrbtenica (vretenca). Zaradi daljše življenjske dobe postaja osteoporoza vse večji zdravstveni problem, saj tekom življenja kar 40 - 50% žensk in 13 - 22% moških doživi zlom kot posledico osteoporoze (1).

Na sliki 1 lahko vidimo primerjavo med normalno kostno strukturo (na levi) in osteoporotično (na desni).



Slika 1: Mikroskopska slika kosti.

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne gostote kosti, diagnozo pa lahko potrdimo tudi na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov. Za diagnozo osteoporoze je pogoj zmanjšanje mineralne kostne gostote za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (2). Po definicijah SZO je razlika med normalno kostjo, osteopenijo in osteoporozo v odstopanju števila SD od kostne mase zdravega 30-letnika (preglednica I) (3).

Preglednica I : Opredelitev osteoporoze po kriterijih SZO.

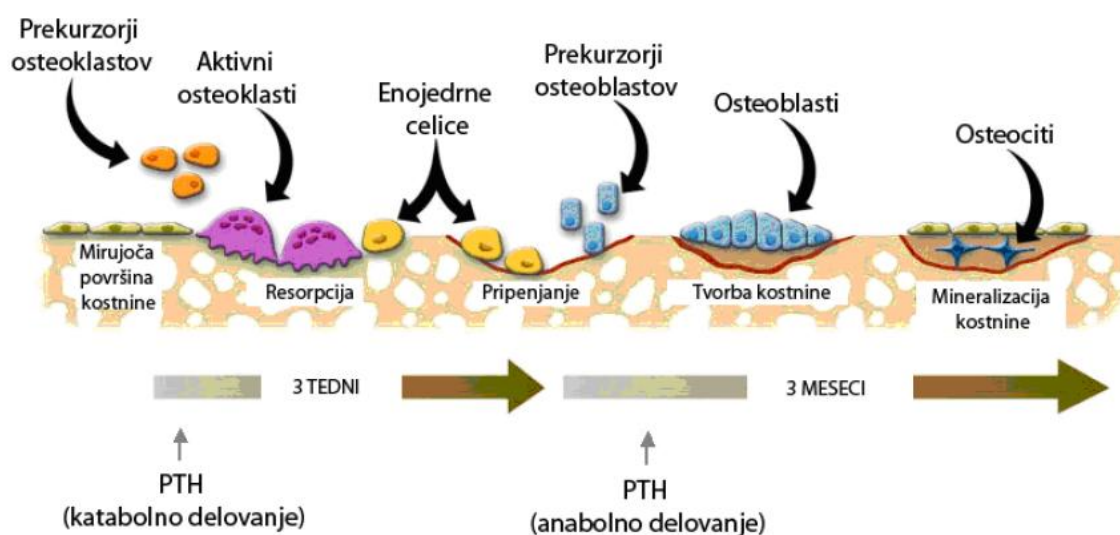
Opredelitev	Mineralna kostna gostota
Normalno	T-vrednost znotraj 1 SD glede na referenčno vrednost
Osteopenija	T-vrednost je od 1 do 2,5 SD manjša od referenčne vrednosti

Osteoporoza	T-vrednost je 2,5 SD manjša od referenčne vrednosti
Huda osteoporoza	T-vrednost je več kot 2,5 SD manjša od referenčne vrednosti

1.1.1. Kostna remodelacija

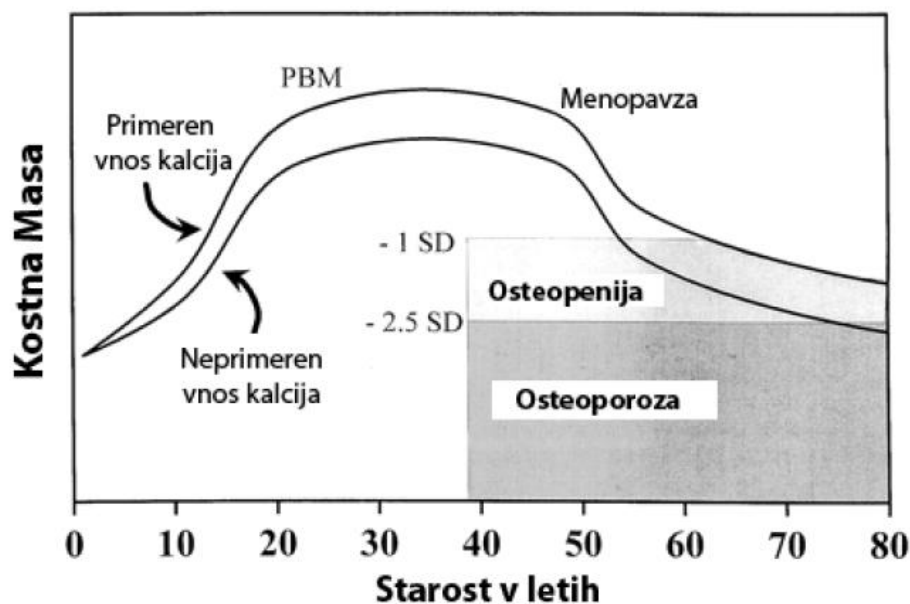
Kostnina je dinamično tkivo, ki se nahaja v ravnotežju nenehne tvorbe in razgradnje (4, 5, 6). Ta proces imenujemo kostna remodelacija (slika 2). Osteoklasti se tipično povezujejo in odstranjujejo kostnino v obdobju treh tednov. Za tem delujejo osteoblasti in odlagajo nov kostni matriks (4, 7). Nova kostnina se odlaga v koncentričnih krogih, imenovanih lamele (4).

Proces kostne remodelacije



Slika 2: Faze kostne remodelacije (8).

Remodelacija je uravnavana z estrogenom, parathormonom, RANK ligandom, calcitoninom, vitaminom D, prostaglandini, interleukini, rastnimi faktorji, družino TNF in nekaterimi ostalimi hormoni in citokini (9, 10).



Slika 3: Doseganje kostne mase pri ženskah (11). (PBM: angl.: peak bone mass- najvišja kostna masa)

Najvišja kostna masa (angl.: peak bone mass - PBM) se doseže pri tridesetih letih (slika 3). Moški dosežejo večjo, to je povezano z dejstvom, da mišične kontrakcije inducirajo napetost v kosti, čemur sledi kostna remodelacija in s tem povečanje kostne mase in njene moči (12). Mišice pa so ena izmed tarč delovanja moških spolnih hormonov, androgenov. Ti povečajo rast mišične mase (13).

1.1.2. Razširjenost

Osteoporoza je najpogostejša metabolična bolezen kosti, za katero trpi vsaka tretja ženska in vsak šesti moški po 80. letu (2). Zlomi, ki nastanejo zaradi osteoporoze, so velik ne samo epidemiološki, ampak tudi socio-zdravstveni problem. Po 50. letu starosti je tveganje za zlom, ki nastane zaradi osteoporoze, približno 40% in je podobno tveganju za koronarno srčno bolezen. V Evropi približno 11,5 % žensk v starosti 50–54 let in 35% v starosti 75–79 let utrpi vsaj en zlom vretenca (14). Incidenca zlomov zaradi osteoporoze narašča z leti starosti. Po 45. letu so najbolj pogosti zlomi zapestja, po 65. letu pa začne eksponentno naraščati zlom kolka. Glede na to, da se prebivalstvo stara, se pričakuje, da se bo število osteoporotičnih zlomov podvojilo (15).

V populaciji, stari 80 let, bo 1 na 3 ženske in 1 na 5 moških utrpelo zlom stegenice. Incidenca zlomov se podvoji z vsakim že utrpelimi zlomom, ki nastane zaradi osteoporoze po 45. letu starosti. Zato je ena od poglavitnih nalog preprečiti prvi zlom (9).

Najbolj pogosti so zlomi vretenc (slika 4), najbolj ogožujoči za življenje pa zlomi kolka.



Slika 4: Izguba višine, značilna za kompresijske zlome vretenc (16).

1.1.3. Etiopatiogeneza osteoporoze

V dobi rasti se povečuje količina kortikalne kosti do 25. leta in trabekularne kosti do približno 30. leta starosti (17). Do 30. leta je tako dosežena največja kostna masa, kar je v 50 – 80% odvisno predvsem od genetske zasnove posameznika. Negenetski dejavniki, ki na rast in razvoj kosti vplivajo negativno, so pomanjkanje kalcija v prehrani, pomanjkanje telesne dejavnosti, pozna puberteta, daljša obdobja amenoreje in druge kronične bolezni (2).

Naslednji dve desetletji življenja zaznamujeta enakomerna izgradnja in razgradnja kosti (10). Po 40. letu začne rahlo prevladovati razgradnja kosti pri obeh spolih enako, ki pa se pri pomenopavzalnih ženskah (po 50. letu) naglo pospeši (18). To je povezano s pomanjkanjem estrogenov, ki so močni zaviralci resorpcije kosti, saj zmanjšujejo količino osteoklastov in s tem preprečujejo atrofijo kosti (10). V tem obdobju ženske izgubljajo letno kar 3 – 5% kostne mase, moški pa le 0,5%, predvsem na račun izgube trabekularne kosti. Kortikalna kost prične usihati v kasnejšem starostnem obdobju (2).

Kasneje v starosti se pridružijo še drugi mehanizmi, ki pospešujejo nižanje mineralne kostne gostote. To so zvišana koncentracija parathormona, znižana koncentracija kalcitriola in zmanjšanje absorpcije kalcija iz črevesja. Pri moških osteoporoza povzroči

tudi zmanjševanje izločanja androgenov iz testisov in nadledvičnih žlez. Ne smemo pa zanemariti vpliva estrogenov, ki prav tako ohranjajo trdnost kosti pri moških (2).

1.1.4. Dejavniki tveganja

Razdelimo jih lahko na endogene in eksogene (Preglednica II). Med endogene štejemo ženski spol, belo in rumeno raso, starost nad 50 let in pozitivno družinsko anamnezo. Eksogeni pa so hipogonadizem, zdravljenje z glukokortikoidi, prenizka telesna teža, predhodni zlomi, kajenje, imobilizacija, alkohol, pomanjkanje vitamina D (18).

Preglednica II: Dejavniki tveganja za osteoporozo.

Eksogeni dejavniki tveganja	Endogeni dejavniki tveganja
Telesna neaktivnost	Spol
Kajenje	Starost
Pitje alkohola	Rasa
Prenizka telesna teža	Pozitivna družinska anamneza
Zdravila: glukokortikoidi, heparin, antikonvulzivi, ciklosporin	Hormonski: prezgodnja menopavza, obdobja amenoreje
Kronične bolezni jeter, ledvic, revmatoidni artritis	
Endokrine bolezni: Cushingov sindrom, hipertiroidizem, hipogonadizem	
Malo kalcija v prehrani	

Pomanjkanje estrogena v perimenopavzi je odločilni dejavnik tveganja za nastanek pomenopavzne osteoporoze. Zato se v naravni in tudi umetni menopavzi, ki je posledica kirurške kastracije, zmanjša najprej trabekularni, spužvasti del kosti, po 70. letu starosti pa še trši, kortikalni del kosti. Izguba kostne mase se začne že med 20. in 30. letom starosti, vendar je ta izguba do menopavze nepomembna. Po 30. letu starosti resorpcija kosti prekaša njeno izgradnjo za približno 0,7 % na leto. Ženske izgubijo 37 % celotne trabekularne mase in 6 % kortikalne mase do 50. leta starosti. Največja izguba MKG je v prvih letih po menopavzi, in sicer 5 % na leto, z nekoliko upočasnjeno izgubo MKG v poznejših letih (1–1,5 % na leto). Povečana kostna resorpcija poveča raven kalcija v serumu in hkrati zmanjša vsrkavanje le-tega iz črevesja (14).

1.1.5. Oblike osteoporoze

Osteoporoza je povezana z neravnovesjem v aktivnosti osteoblastov in osteoklastov in izgubo kostnine zaradi povečane stopnje resorpcije (12). Ločimo dve skupini osteoporoze: lahko je **primarna** ali **sekundarna** (Preglednica III). Največkrat pride do primarne osteoporoze, sekundarna večinoma nastane kot posledica različnih bolezni ali terapij (10).

Primarno osteoporozo delimo v dva tipa:

◇ Tip I: postmenopavzalna osteoporoza

Tip I je posledica pomanjkanja estrogena, kar poveča ekspresijo nekaterih citokinov in s tem resorpcijo kostnine (12). Za to vrsto so najbolj značilni zlomi vretenc v notranji porozni kostnini (trabekularna kostnina). Faktorji tveganja za razvoj osteoporoze pri postmenopavzalnih ženskah so: kavkazijski ali azijski izvor, prezgodnja menopavza (zadnja menstruacija pred 40. letom starosti), zgodnja menopavza (zadnja menstruacija pred 45. letom starosti) (19), pojav osteoporoze v družini, nizek indeks telesne mase (ITM), nekakovostna in slaba prehrana, fizična neaktivnost, kajenje, pretirano uživanje alkohola.

◇ Tip II: Senilna osteoporoza

Prizadane starostnike obeh spolov, starejše od 70 let. Ženske prizadane v dvakrat večjem številu kot moške. Za to vrsto pa so značilni zlomi zunanje, kortikalne kostnine dolgih kosti, kot je na primer zlom vratu stegenice. Nastane lahko kot posledica starostnega pomanjkanja vitamina D, zato pride do hipokalcemije in zaradi tega do kompenzatornega povišanja parathormona (PTH) in s tem kostne resorpcije (12).

Preglednica III: Delitev osteoporoze na primarno in sekundarno.

Primarna osteoporoza	◇ Postmenopavzalna (tip I)
	◇ Senilna (tip II)
	◇ Juvenilna
	◇ Nosečnostna
Sekundarna osteoporoza	◇ Endokrine bolezni (hipogonadizem, hipertiroza, hiperparatiroidizem, hiperkorticizem)

	◇ Bolezni prebavil (subtotalna gastrektomija, malabsorpcijski sindrom, kronični obstruktivni ikterus, primarna biliarna ciroza, alaktazija)
	◇ Bolezni kostnega mozga (multipli mielom, sistemska mastocitoza, diseminiran karcinom)
	◇ Drugi vzroki (imobilizacija, KOPB, alkoholizem, transplantacije organov, dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi, heparinom, ciklosporinom; revmatoidni artritis)

1.1.6. Preprečevanje in zdravljenje

S preventivo osteoporoze je potrebno pričeti že zgodaj, v mladosti, z zdravim načinom življenja. To pomeni primerno prehrano, ki vsebuje dovolj kalcija, veliko telesne aktivnosti, gibanje po soncu, izogibanje kajenju in pitju alkohola. Poleg tega lahko pri ženskah po menopavzi pričnemo z dodajanjem kalcijevih pripravkov in vitamina D, prav tako pri moških po 65. letu starosti.

Žal pa samo s temi ukrepi ne moremo popolnoma preprečiti izgube kostne mase. V ta namen uporabljamo zdravila, ki pospešujejo tvorbo nove kosti ali zavirajo njeno resorpcijo. *Zaviralci resorpcije kosti* so: estrogeni, selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM), tibolon, kalcitonin, bifosfonati, kalcij in vitamin D. *Pospeševalca tvorbe nove kosti* pa sta: teriparatid in natrijev fluorid, slednji sicer ni več v uporabi (2, 18, 20).

Teriparatid

Gre za humani rekombinantni parathormon, ki stimulira tvorbo nove kosti, predvsem trabekularne, če je aplikacija parenteralna v odmerku 20 µg dnevno. V primerjavi z anti-resorpcijskimi zdravili je opazno 2 – 3 kratno večje povečanje mineralne kostne gostote, tveganje za zlome vretenc in kolka pa je zmanjšano za 55 – 65% v roku 18 mesecev. Trenutno je to najučinkovitejše zdravilo za večanje mineralne kostne mase, vendar tudi najdražje in z najmanj opravljenimi raziskavami, zato ga uporabljamo kratkotrajno in le pri najtežjih oblikah osteoporoze.

Hormonsko nadomestno zdravljenje

Estrogen je vključen v praktično vse vidike metabolizma kalcija in kosti; receptorji za estrogen so prisotni tako v osteoblastih, kot v osteoklastih. Preko svojih receptorjev estrogen zmanjšuje kostno premeno in hkrati ohranja ravnovesje med izgradnjo in razgradnjo kosti. Razen tega estrogen ohranja zadostno koncentracijo kalcija v krvi, tako da zviša koncentracijo kalcija iz gastrointestinalnega trakta verjetno tako, da poveča občutljivost tankega črevesja na delovanje vitamina D (5).

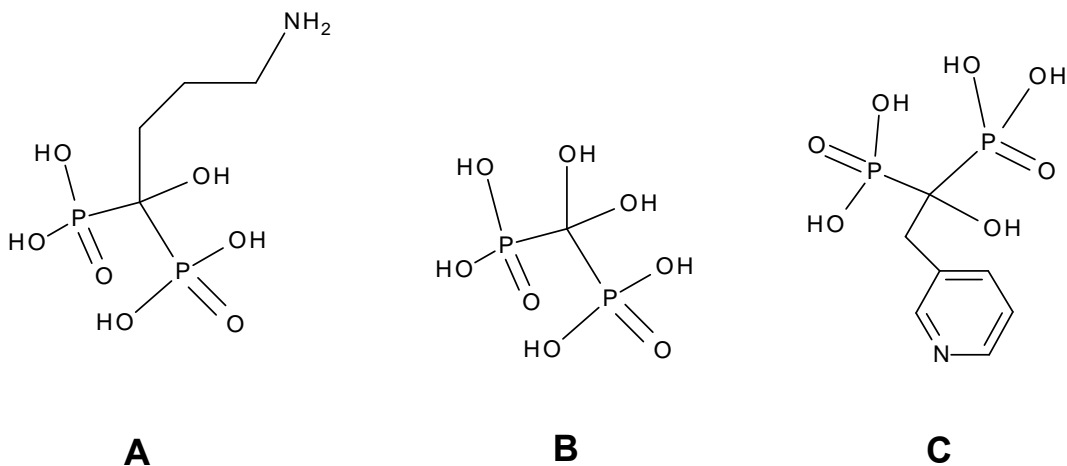
V zadnjih letih – zlasti po izsledkih randomizirane klinične raziskave (RKR) Women's Health Initiative (WHI) – se je spremenil odnos do preventive in zdravljenja osteoporoze. Uporaba hormonskega nadomestnega zdravljenja (HNZ) ni več terapija prvega izbora, ampak samo možnost za ženske, ki imajo v perimenopavzi in zgodnji menopavzi klimakterične težave in izrazita tveganja za zlome. In sicer samo takrat, ko ima vpliv zdravljenja večjo korist od tveganja.

HNZ zmanjša incidenco zlomov tudi pri ženskah z normalno MKG (nizko tveganje za zlome) in ne samo pri tistih, ki imajo povečano tveganje za zlome in/ali osteoporozo. Še vedno pa ostaja nejasno, kakšna je zaščita estrogena proti zlomu po opustitvi HNZ. Nekateri poročajo, da HNZ ki je predpisano v zgodnji pomenopavzi, zadovoljivo zagotavlja zaščito proti zlomu še 3–5 let, čeprav kritiki HNZ trdijo, da eno leto po opustitvi zdravljenja ni več zaščite in se MKG vrne na izhodiščne vrednosti (4, 5). Glavna indikacija za HNZ je zdravljenje klimakteričnih težav, kar povzroči izboljšanje kakovosti življenja v pomenopavzi (18, 21). Indikacije za HNZ: preventiva osteoporoze in izjemoma zdravljenje osteoporoze. Po objavljenih izsledkih WHI študije, zlasti ko gre za odnos koristi in tveganja pri dolgotrajnem zdravljenju, danes velja, da HNZ ni zdravilo prvega izbora tako pri preventivi kot pri zdravljenju osteoporoze (6, 7).

Bifosfonati

Alendronat, etidronat, risedronat so analogi pirofosfatov s podobno kemijsko strukturo (slika 5), ki se nalagajo v kosti in se tam vežejo na kristale hidroksiapatita, kjer delujejo preko dveh mehanizmov. Prvič, zmanjšajo sposobnost osteoklastov, da bi resorbirali kost in drugič, pospešujejo apoptozo osteoklastov (programirano celično smrt). V kosti se zadržijo več let, zato je njihov učinek opazen tudi po ukinitvi terapije. Še ena ugodna lastnost je, da so bifosfonati v terapevtskih odmerkih izredno sistemsko netoksični.

Njihova slaba lastnost pa je, da se po peroralni aplikaciji zelo slabo resorbirajo v črevesju. Zato je tableto potrebno vzeti zjutraj na prazen želodec z velikim kozarcem vode in nato počakati vsaj 30 minut pred zaužitjem druge hrane ali pijače. Ob zdravljenju z bifosfonati je potrebno dodati tudi pripravke kalcija (0,5 – 1 mg dnevno), pogosto tudi vitamina D.



Slika 5: Strukturne formule bifosfonatov; alendronska kislina (A), etidronska kislina (B), risedronska kislina (C).

Kalcitonin

Deluje kot zelo šibek zaviralec kostne razgradnje, ki pri bolnicah s pomenopavzno osteoporozo le za tretjino zmanjša tveganje za zlome vretenc, nima pa učinka na druge zlome, zato ga danes predpišemo le še izjemoma (9).

Kalcij in vitamin D

Zadosten vnos kalcija in vitamina D tvori osnovo vsakega zdravljenja osteoporoze in je obvezen dodatek pri zdravljenju osteoporoze z antiresorpcijskimi zdravili (3).

V prvih treh tednih zapolnimo zaloge s holekalciferolom (vitamin D3) 2000 E (50 ug) dnevno ali 14.000 E tedensko (Plivit D3 10 kapljic dnevno ali 70 kapljic 1 x tedensko). Nadaljujemo z vzdrževalnim odmerkom holekalciferola 800–1000 E dnevno ali 5600–7000 E tedensko. Bolnicam z osteoporozo priporočamo tudi 1000–1200 mg kalcija dnevno v hrani ali obliki nadomestkov (9).

SERM

Skupina zdravil, ki jo imenujemo selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM), je bila razvita z namenom, da nadomesti zdravljenje osteoporoze s hormonsko nadomestno terapijo, saj ta zdravila povečajo tveganje za nastanek raka na dojkah in maternici (22).

SERM so spojine, ki delujejo kot estrogenski agonisti v nekaterih tkivih ter kot estrogenski antagonisti v drugih tkivih. Po kemični zgradbi se razlikujejo in nimajo steroidne zgradbe kot estrogen, ampak se vseeno vežejo tako na α kot na β estrogenske receptorje. V uporabi sta dva razreda strukturno različnih spojin, in sicer trifeniletalni derivati, med katere spadata tamoksifen in toremifen, ter benzotiofenski derivati, med katere spada raloksifen. Sedaj so razvili tudi bazedoksifen, ki pa ima v svoji zgradbi indolni obroč in se razlikuje tako od raloksifena kot od tamoksifena (23).

1.1.7. Bazedoksifen - selektivni modulator estrogenskih receptorjev (SERM)

Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev so skupina učinkovin, ki na estrogenske receptorje nekaterih organov delujejo kot agonisti estrogena, na druge pa kot antagonisti. Klinično pomembni so tisti, ki delujejo kot agonisti estrogena na kosti in srčno-žilni sistem in kot antagonisti na dojke in maternico (npr. raloksifen in bazedoksifen). To pomeni, da ohranijo ugodne učinke na kosti in srčno-žilni sistem in ob tem ne povzročajo proliferacije endometrija in ne povečajo tveganja za raka na dojkah (23).

Bazedoksifen je novo registrirana učinkovina, ki jo uvrščamo v 3. generacijo selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev (SERM). Po strukturi je derivat indola. Učinkovina je bila razvita na podlagi raloksifena z namenom, da bi izboljšali njegove lastnosti. Bazedoksifen ima zelo dobro estrogensko in antiestrogensko delovanje tako *in vivo* kot *in vitro*. Deluje v vseh tkivih, ki imajo estrogenske receptorje, in sicer v kosteh, maternici, dojkah, krvnih žilah in v jetrih. Veže se na α in β estrogenske receptorje (ER α in ER β) (23). Ugotovili so, da ima bazedoksifen okoli štirikrat višjo afiniteto do ER α (IC₅₀=26 nM) kot do ER β (IC₅₀=99 nM). Kljub temu pa je ta razlika v afiniteti premajhna, da bi se *in vivo* pokazala velika selektivnost v delovanju na α in β receptorje. Selektivnost α estrogenskih receptorjev ni pomembno merilo za SERM, ker še vedno ni znano, kateri tip estrogenskih receptorjev je zaslužen za zelene učinke SERM na kosteh (24).

Strukturna formula bazedoksifena je predstavljena na sliki 6. Bazedoksifen deluje kot:

- estrogenski *agonist v kosteh*: v kosti zmanjša število in aktivnost osteoklastov in poveča kostno gostoto;
- estrogenski *agonist v jetrih*: niža nivo LDL in celokupnega holesterola, ob tem pa nivo HDL ostane nespremenjen;
- estrogenski *antagonist na tkivo maternice*: pomembna prednost pred drugimi SERM, npr. tamoksifenom, saj tako ne privede do hipertrofije endometrija;
- estrogenski *antagonist na tkivo dojke*: zmanjša obolevnost za rakom dojke, ki ima prisotne estrogenske receptorje, ne vpliva pa na invazivni rak dojke brez estrogenskih receptorjev.

Bazedoksifen ima lahko tudi neželene učinke, med katerimi sta najpomembnejša povečanje pojavnosti vročinskih oblivov in tvorba krvnih strdkov (25, 26). Lahko se uporablja v obliki monoterapije ali pa v kombinaciji s konjugiranimi estrogeni za preprečevanje in zdravljenje pomenopavzalne osteoporoze in pri tej kombinaciji ne pride do povečanja pogostnosti vročinskih oblivov zaradi bazedoksifena, temveč se slednji zmanjšajo (27).

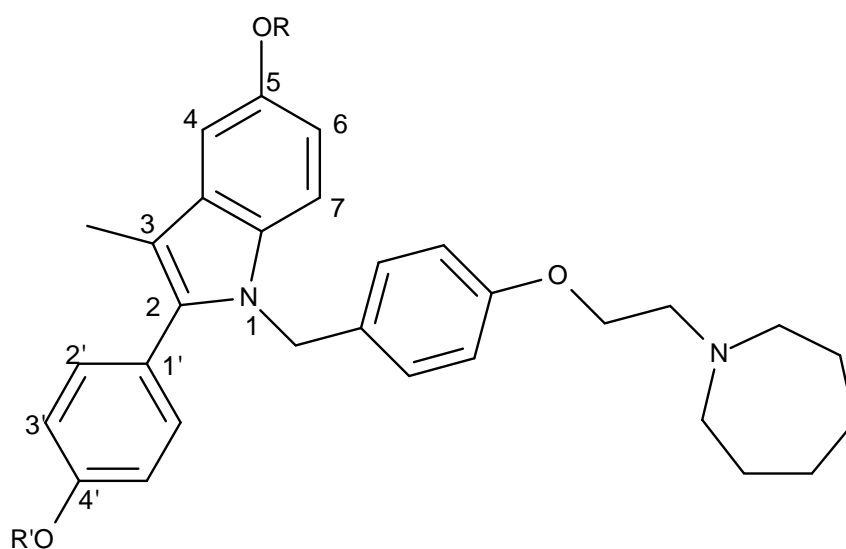
Predklinične študije o varnosti bazedoksifena so potrdile, da ima bazedoksifen varnejši toksikološki profil od raloksifena na tkivo maternice. V raziskavi na podganah so pri odmerkih 0,5 mg/kg bazedoksifena opazili 35% povečanje mase endometrija, medtem ko se je pri enakem odmerku raloksifena masa endometrija povečala za 85,2% (28). Prav tako so pri bazedoksifenu v primerjavi z raloksifenom opazili manj možnosti za tvorbo oksidativnih metabolitov, katerim bi lahko pripisali nekatere neželene učinke SERM (29).

1.1.7.1. Farmakokinetika bazedoksifena

Bazedoksifen je izpostavljen obsežnemu predsistemskemu metabolizmu, zato je njegova absolutna biološka uporabnost po peroralni aplikaciji nizka in sicer približno 6.2% (17). Tvorijo se predvsem glukuronidi bazedoksifena, oksidacija s citokromi skupine CYP450 pa je zanemarljiva. Glavni metabolit je bazedoksifen-5-glukuronid – M5 (40-95%), manj je bazedoksifen-4'-glukuronida – M4 (0-20%), nastaja pa tudi bazedoksifen-4',5-di-glukuronid (slika 6). Metabolizem bazedoksifena naj bi potekal tako v jetrih kot tudi izven njih, plazemska razpolovna doba ($t_{1/2}$) bazedoksifena pa znaša približno 28 ur (30, 31).

Dolga razpolovna doba in sekundarni vrh v profilu odvisnosti koncentracije od časa kažeta na to, da pride pri bazedoksifenu do sistemske interkonverzije glukuronidov bazedoksifena do bazedoksifena in enterohepatične cirkulacije.

V kliničnih študijah so ugotovili, da je čas za doseg maksimalne plazemske koncentracije (c_{max}) 1-2 h po aplikaciji; vezava na proteine večja kot 99 % in čas za doseg stacionarnega stanja 7 dni (32). Z uporabo radioaktivno označenega bazedoksifena so ugotovili, da je poglavitna pot odstranjevanja iz telesa z blatom, z urinom pa se odstrani manj kot 1% odmerka (24).



	R	R'
Bazedoksifen	H	H
bazedoksifen-5-glukuronid (M5)		H
bazedoksifen-4'-glukuronid (M4)	H	
bazedoksifen-5,4'-glukuronid (M6)		

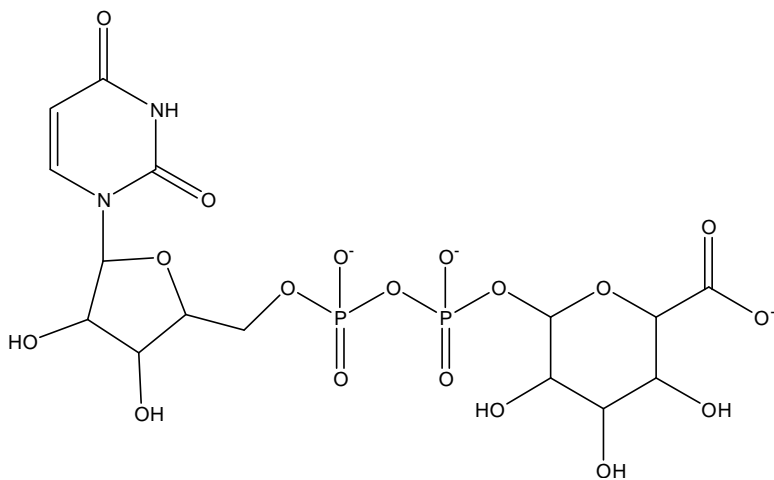
Slika 6: Struktura bazedoksifena in njegovih metabolitov.

1.1.7.2. Kombinacija bazedoksifena s konjugiranimi estrogeni (CE)

V kliničnem razvoju je tudi kombinacija bazedoksifena s konjugiranim estrogenom, kot prva TSEC (ang. »Tissue – Selective Estrogen Complexes«) terapija. S to kombinacijo izkoristimo vse dobre lastnosti zdravljenja pomenopavzalnih težav s hormoni, hkrati pa ne delujemo stimulatorno na dojke in endometrij ter se tako ne poveča verjetnost za nastanek raka na teh dveh tkivih. V drugi fazi kliničnih študij na 412 zdravih ženskah v pomenopavzi so ugotovili, da se je pri uporabi te kombinirane terapije zmanjšala debelina endometrija, signifikantno zmanjšalo število vročinskih oblivov in resorpcija kostnega tkiva, kar se je potrdilo tudi v obsežni klinični študiji tretje faze (33).

1.2. ENCIMI URIDIN DIFOSFAT GLUKURONOZILTRANSFERAZE (UGT)

Tvorba glukuronidov je ena glavnih in najpogostejših poti druge faze metabolizma ksenobiotikov do vodotopnih spojin, ki se v končni fazi izločajo v žolč in urin. Poleg tega se zaradi spremembe kemične strukture spremeni tudi njihova biološka aktivnost – v glavnem se njihova afiniteta za vezavo na receptor zmanjša. Zaradi velikih zalog glukuronske kisline v jetrih in velikega števila funkcionalnih skupin, ki lahko tvorijo glukuronide (fenoli, alkoholi, karboksilne kisline in amini), je ta pot metabolizma bistvenega pomena. V reakciji pride do kondenzacije ksenobiotika, v našem primeru bazedoksifena, z aktivirano obliko glukuronske kisline: uridin difosfat glukuronske kisline (UDPGA, na sliki 7), kar katalizirajo encimi iz družine UDP-glukuronoziltransferaz (UGT). Pri tem nastajajo O-glukuronidi (etrskega ali estrskega tipa) ter N-glukuronidi (34), lahko pa nastanejo tudi kemično reaktivni acil-glukuronidi, npr. z indometacinom, diklofenakom, zomepirakom, valprojsko kislino in drugimi.



Slika 7: Strukturna formula uridin difosfat glukuronske kisline (UDPGA).

1.2.1. Klasifikacija

Glukuronoziltransferaze označujemo z oznako UGT skupaj s številko družine, kateri sledi črka, npr. A ali B, ki označuje poddružino. Za omenjeno črko stoji še ena številka, ki označuje točno določeno obliko encima iz poddružine (npr. UGT1A4). Omenjene encime uvrščamo v družine in poddružine glede na aminokislinsko zaporedje: znotraj družine

imajo encimi 50 % enakega zaporedja aminokislin, v poddružini pa homologija zavzema okoli 60 % strukture proteinov. Družini UGT1 in UGT2 najbolj učinkovito uporabljata UDPGA kot substrat, zato sta tudi najpomembnejši pri metabolizmu učinkovin (35).

1.2.2. Ekspresija UGT encimov

V organizmu so encimi UGT izraženi v enterocitih (epitelij tankega in debelega črevesa), v hepatocitih, ledvicah in možganih. V jetrih so potrdili prisotnost naslednjih izoform iz poddružine 1A: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9. V tankem črevesju pa UGT1A1, UGT1A4, UGT1A8, UGT1A10. Zadnja dva izmed naštetih se nahajata le izven jeter (21). Tako kot CYP, se tudi UGT v celici v največji meri nahajajo v endoplazemskem retikulumu (ER). Toda za razliko od CYP, UGT niso obrnjene na citosolno, temveč na luminalno stran. Membrana endoplazemskega retikuluma (ER) tako predstavlja difuzijsko bariero za substrate in kosubstrat, UDP-glukuronsko kislino (UDPGA), in tudi za produkte.

1.3. PREUČEVANJE METABOLIZMA IN PRIDOBIVANJE METABOLITOV BAZEDOKSIFENA

Pri raziskovanju metabolizma učinkovin si pomagamo z *in vitro* metodami, ki so cenejše in dostopnejše kot *in vivo* metode. Nudijo nam prve podatke o kinetiki, hkrati pa predstavljajo sistem z omejenim številom spremenljivk. Ti modeli, ki poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu, so lahko celični (tkivne rezine, izolirani in kultivirani hepatociti, jetrne celične linije), kot tudi subcelični (od najbolj kompleksnega k najenostavnejšemu: jetrni homogenat, S9 frakcija, mikrosomi, peroksisomi, mitohondriji in citosol). Za raziskovanje metabolizma basedoksifena in za pridobivanje njegovih metabolitov, smo si kot modelni sistem izbrali mikrosome.

1.3.1. Mikrosomi

Mikrosomi spadajo med subcelične frakcije. So majhni membranski vezikli, veliki 20-200 nm. Nastanejo iz gladkega endoplazmatskega retikuluma pri homogenizaciji tkiva in ultracentrifugiranju. Mikrosomi so najenostavnejši *in vitro* model pridobljen iz jeter. V njih so prisotni encimi prve in tudi nekateri encimi druge faze metabolizma zdravil. Tako vsebujejo encime CYP P450, flavinske monooksigenaze (FMO), epoksidne hidrolaze, glukuronoziltransferaze, esteraze, amidaze, mikrosomalne glutation-S-transferaze in

metiltransferaze (36, 37, 38). Z njimi lahko napovedujemo poti razgradnje učinkovine in identificiramo ter pridobivamo standarde metabolitov. Uporabni so tako za določanje parametrov encimske kinetike kot tudi za napovedovanje intrinzičnega očistka.

Pridobivanje mikrosomov je relativno enostavno.

2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo izvedli sintezo bazedoksifena, saj učinkovina v času nastajanja diplomskega dela še ni bila dostopna na tržišču. Bazedoksifen, ki spada v skupino selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev, je Evropska agencija za zdravila v Evropi registrirala za preventivo in zdravljenje osteoporoze, FDA pa je zahtevala izvedbo še dodatnih kliničnih študij za dopolnitev podatkov v varnostnem profilu zdravila.

Diplomsko delo bo sestavljeno iz dveh delov. V prvem delu bomo bazedoksifen sintetizirali. Izhajali bomo iz 4-hidroksipropifenona, pri katerem bomo najprej z benzilbromidom zaščitili fenolno skupino, nato pa uvedli bromo skupino na α -C atom glede na karbonilno skupino. Z dodatkom 4-benziloksianilinijevega klorida bomo pridobili 5-(benziloksi)-2-(4-(benziloksi)fenil)-3-metil-1*H*-indol. Ta strukturni fragment, ki ima v svoji zgradbi indolni obroč, ima ključno vlogo pri vezavi tako na α kot na β estrogenske receptorje. Pri sintezi drugega fragmenta bomo izhajali iz 4-(hidroksimetil)fenola in etil bromoacetata ter pripravili etilni ester 2-[4-(hidroksimetil)fenoksi]ocetne kisline. Nadalje bomo po mehanizmu nukleofilne substitucije z Appelovo reakcijo sintetizirali ustrezen alkil bromid, ki ga bomo z reakcijo alkiliranja uvedli kot stransko verigo na indolni obroč. V nadaljnjih stopnjah (redukcija, uvedba heksametenimina na stransko verigo, ki je pripet na indolni obroč, odstranitev zaščitne skupine) bomo sintetizirali želeno učinkovino, bazedoksifen.

V drugem delu bomo z uporabo človeških jetrnih mikrosomov kot *in vitro* modelom spremljali kinetiko nastajanja metabolitov bazedoksifena.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Sinteza bazedoksifena

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Kemika, Merck).

3.1.2. Sinteza metabolitov bazedoksifena

- bidestilirana voda – Milli-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), na Fakulteti za farmacijo UL, Ljubljana,
- DMSO – dimetil sulfoksid; 99%, Kemika, $M = 78,13 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,099 - 1,101$
- metanol, Sigma
- haloperidol, Sigma
- raztopina A (UGT Reaction Mix solution A, BD Biosciences), vsebuje 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronske kisline (UDPGA) v vodi
- raztopina B (UGT Reaction Mix solution B, BD Biosciences), vsebuje 250 mM TRIS-HCl, 40 mM MgCl_2 in 0,125 mg/mL alameticina v vodi.

Človeški jetrni mikrosomi (pooled), 20 mg/ml, gre za združene mikrosome več različnih dajalcev (Human liver microsomes CMV negative pooled, BD Biosciences),

Aparature:

- LC/MS/MS sistem: - UPLC: Agilent 1290 Infinity,
- MS: Agilent 6460 Triple quad,
- tehtnica Mettler toledo AB54-S,
- termični stresalnik, Tehnica, Vortemp 56EVC,
- centrifuga Sigma 3K30,
- hladilno-grelna plošča, Cole-Parmer[®], Chilling/Heating Block,
- ročno mešalo, Tehnica, Vibromix 114,
- pipete, Eppendorf Research:
 - 0,5 – 10 μL

- 2 – 20 μL
- 20 – 200 μL
- 100 – 1000 μL
- 1 – 10 mL

- PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN:

- **Priprava osnovnih raztopin bazedoksifena:** zatehtali smo 13,23 mg bazedoksifena in ga raztopili v 1,08 mL DMSO. Dobili smo 26 mM raztopino bazedoksifena, ki smo jo potem ustrezno redčili za inkubacijo z mikrosomi.

- PRIPRAVA RAZTOPINE METANOLA S HALOPERIDOLOM: (interni standard)

V 1000 mL bučko smo zatehtali 0,5 mg haloperidola in dopolnili do vrha z metanolom. Tako smo dobili raztopino metanola s haloperidolom s koncentracijo 0,5 mg/L.

- PRIPRAVA MOBILNE FAZE

Pri analitiki na LC/MS/MS smo uporabljali dve mobilni fazi:

- 0,1 % mravljična kislina v vodi : 1 mL mravljične kisline smo s prečiščeno vodo razredčili na 1L
- 0,1 % mravljična kislina v 98 % acetonitrilu: v 1 L bučo smo odpipetirali 20 mL prečiščene vode, dodali 1 mL mravljične kisline in z acetonitrilom razredčili do oznake.

3.2. METODE

3.2.1. Sinteza bazedoksifena

Določevanje tališča

Tališča smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

Kromatografske metode

Za izvedbo *tankoplastne kromatografije (TPK)* smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Nemčija) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim

fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm.

Za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm (Merck, Nemčija) in različne mobilne faze. Za čiščenje produktov s *flash kolonsko kromatografijo* smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck, Nemčija) in različne mobilne faze.

Za *visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC)* za čiščenje produktov v okviru sinteze smo uporabili instrument Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-vis detektorjem (254 nm). Kot stacionarno fazo smo uporabili kolono Phenomenex Luna HC-C18 (4,6 * 250 mm), pretok 1 mL/min, kot eluent pa 0.1 % trifluoroocetno kislino v vodi (A) in metanol (B). Uporabili smo gradient 10 % B do 80 % B v 20 min, 80 % B do 90 % B do 21 min in nato 90 % B do 23 min.

Na sistemu za kromatografsko ločbo srednjega pritiska Isolera smo uporabili kolono Biotage SNAP Cartridge (KP-C18-HS, 60g) kot stacionarno fazo in metanol:0.1 % trifluoroocetna kislina (gradient od 10 % do 95 %).

Spektroskopske metode

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na Bruker Advance DPX300 spektrometru pri 300,13 MHz v DMSO-d₆ in CDCl₃ s TMS kot internim standardom v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri produktov sinteze so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI ali ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Elementna analiza

Elementne analize ogljika, vodika in dušika so bile opravljene z analizatorjem Perkin Elmer 240 C na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Poimenovanje in risanje spojin

Za risanje struktur spojin in za njihovo poimenovanje smo uporabljali računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 (Cambridge Soft).

3.2.2. Časovno spremljanje nastajanja metabolitov basedoksifena

Poskus smo izvedli na človeških jetrnih mikrosomih. Postopek za izvedbo je bil naslednji:

1. Mikrosome smo vzeli tik pred poskusom iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili na -80 °C. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.
2. Pripravili smo zmes mikrosomov: k 23,5 µL mikrosomov smo dodali 235,7 µL raztopine B in 70,7 µL prečiščene vode. Zmes smo dobro premešali na ročnem mešalu in postavili na led za 15 min.
3. K zmesi smo dodali 776 µL ustrezne koncentracije donorske raztopine basedoksifena in dobro premešali. Koncentracije testirane učinkovine v končnih inkubacijskih zmesih so bile 15 µM, 30 µM, 100 µM.
4. Sledila je predinkubacija: zmes smo postavili v inkubator za 10 min pri temperaturi 37 °C in hitrosti mešanja 65 obratov/minuto.
5. Po 10 min smo dodali 94,2 µL raztopine A, dobro premešali in postavili v inkubator (37 °C, hitrost mešanja 65 obratov/minuto).
6. Po točno določenem času (tabela 1) smo odpipetirali 100 µL inkubata in ga dodali k 300 µL ledeno hladnega metanola s haloperidolom (interni standard), ki smo ga že prej pripravili v epice in hladili na ledu.

Tabela 1: Čas inkubacije

Čas (min)	0	10	20	30	60	90	120	180	240	300	360
-----------	---	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----

7. Epice smo dobro premešali in jih postavili v zamrzovalnik na -20 °C za 2 noči.
8. Epice smo premešali in centrifugirali 15 min pri 16.000 g in 4 °C.
9. Supernatant smo analizirali z LC-MS/MS:

Končni inkubat je vseboval naslednje komponente.

- 0,4 mg/mL mikrosomov,
- 2 mM uridin 5'-difosfoglukuronsko kislino (UDPGA),
- 50 mM TRIS-HCl,
- 8 mM MgCl₂,
- 0,025 mg/mL alameticina,
- 15 μM, 30 μM ali 100 μM bazedokisfen.

3.2.3. Analitika

Tabela 2: Program gradientnega izpiranja na kromatografski koloni Phenomenex Kinetex C18 50x2,0mm po injiciranju vzorca

čas od začetka injiciranja (min)	% mobilne faze B	pretok (mL/min)
0,25	10	0,80
0,50	20	0,65
1,00	30	0,65
1,80	50	0,65
2,00	50	0,65
2,01	10	0,65
2,50	10	0,65

Tabela 3: Identifikacija bazedoksifena in njegovih metabolitov z LC/MS/MS

analit	MRM prehod (m/z)	fragmentor	kolizijska energija [eV]	polarnost	retencijski čas [min]
BAZ	471 > 126	200	32	+	1,633
M4	647 > 471	200	28	+	1,296
M5	647 > 471	200	28	+	1,567
M6	823 > 471	200	40	+	-
HAL	376 > 165	200	32	+	1,502

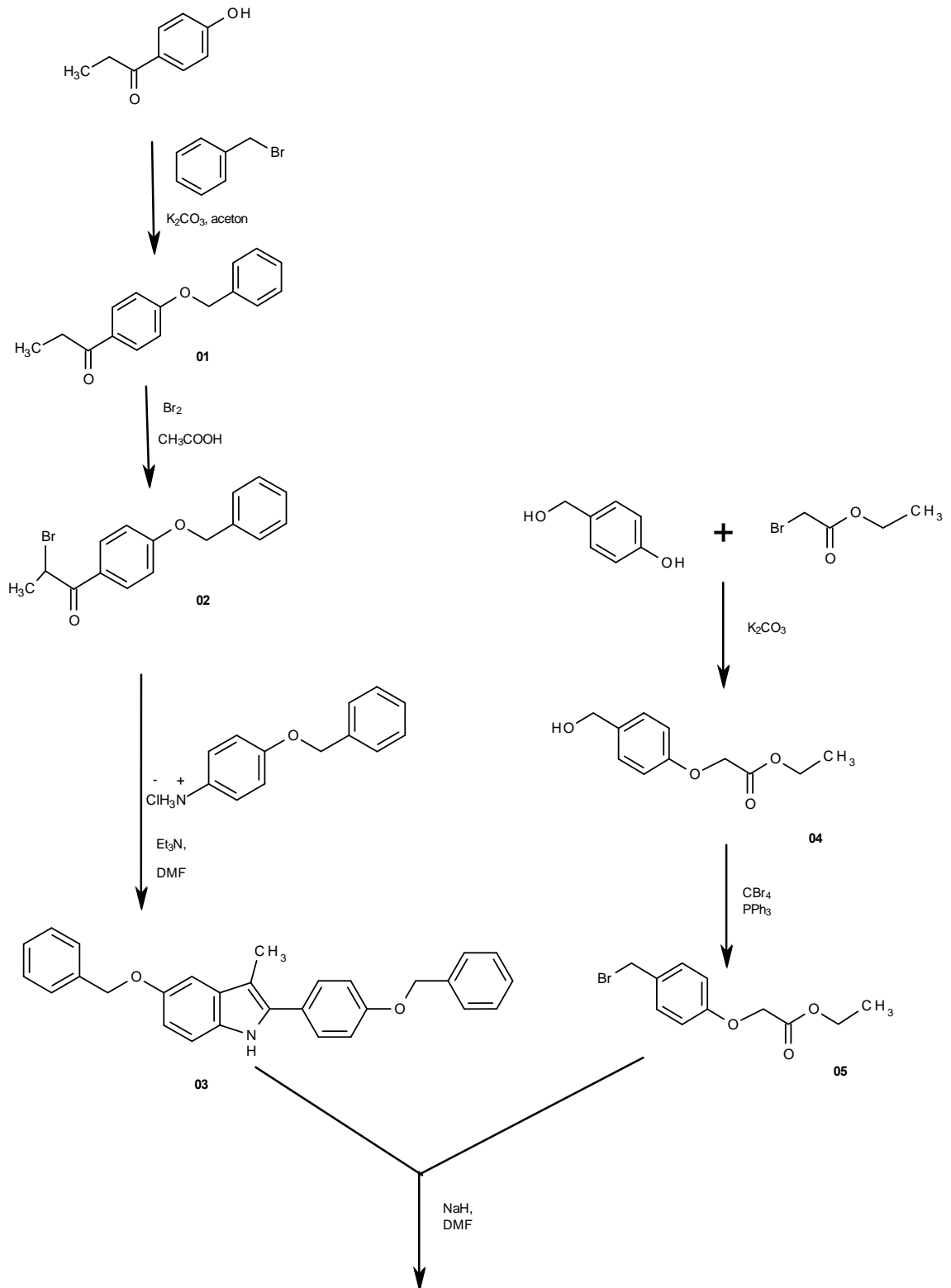
Ostali pogoji:

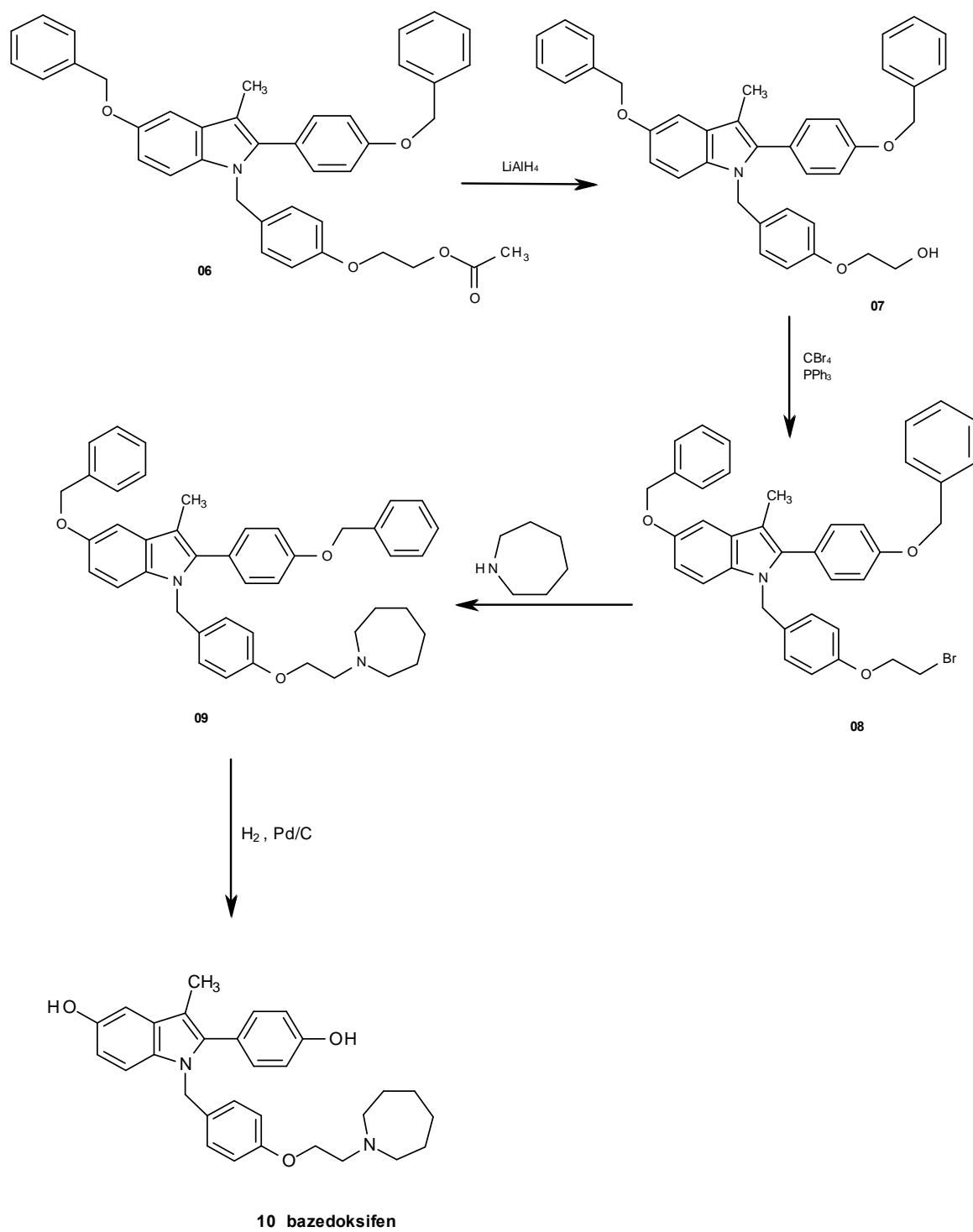
- Za detekcijo bazedoksifena, haloperidola in M4:
 - Volumen injiciranja: 0,1 μ L
 - Čas detekcije na MS: 1,1 – 2 min
- Za detekcijo haloperidola in M5
 - Volumen injiciranja: 1 μ L
 - Čas detekcije na MS: 1,1 – 1,61 min

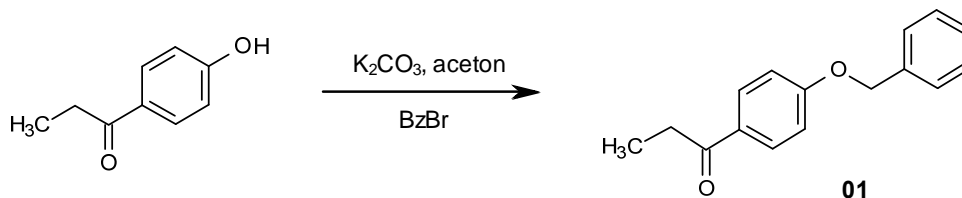
Diglukuronida bazedoksifena (M6) nismo zaznali v nobenem od inkubatorov.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Reakcijske sheme

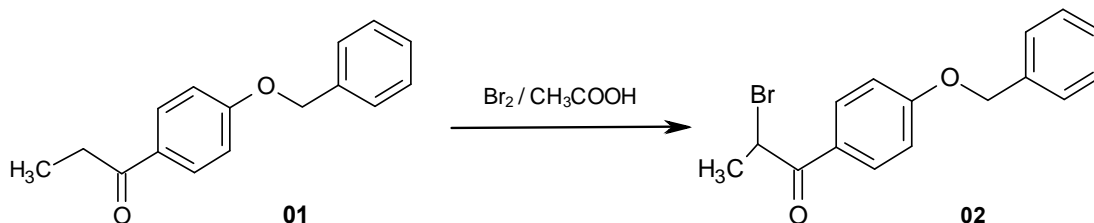




4.1.1. Sinteza 1–(4–benziloksifenil) propan–1–ona (**01**)

4-Hidroksipropifenon (20.005 g, 133.21 mmol) smo raztopili v 200 mL acetona, dodali smo K_2CO_3 (18.407 g, 133.18 mmol) in 15.83 mL (133 mmol) benzil bromida. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pod refluxom pri 60 °C. Po končanem mešanju smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, da se je K_2CO_3 oboril in ga filtrirali z odsesavanjem pod znižanim tlakom. Filtratu smo odparili topilo pod znižanim tlakom in dobili 31.427 g bele trdne spojine (**01**).

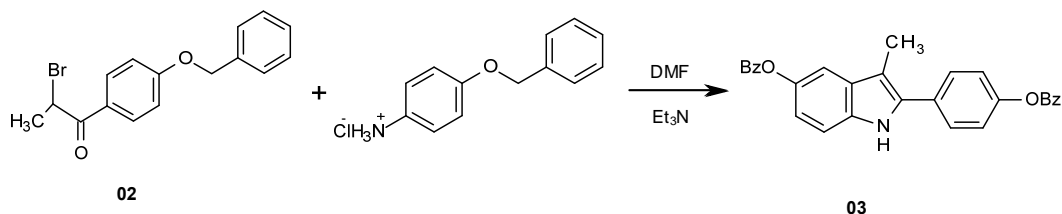
Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2$	$M = 240,30 \text{ g/mol}$
Opis	bela trdna spojina	
Izkoristek	98.18 %	
Rf	0.64 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
Tališče	98 - 100°C	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 1.24 (t, 3H, $J = 7.28 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_3$), 2.97 (q, 2H, $J = 7.28 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 5.15 (s, 2H, $\text{Ph}-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}$), 7.03 (d, 2H, $J = 8.88 \text{ Hz}$, 2 x Ar- <u>H</u>), 7.48-7.31 (m, 5H, Ar- <u>H</u>), 7.97 (d, $J = 8.86 \text{ Hz}$, 2H, 2 x Ar- <u>H</u>)	

4.1.2. Sinteza 1-(4-benziloksifenil)-2-bromopropan-1-ona (**02**)

Spojino **01** (10.041 g, 41.79 mmol) smo suspendirali v oetni kislini (50 mL) in ohladili na 0°C na ledeni kopeli. Počasi smo po kapljicah dodajali Br_2 (41.79 mmol, 2.15 mL) in reakcijsko zmes mešali 2h pri sobni temperaturi. Po dveh urah se je raztopina iz rjave barve obarvala v rumeno barvo. Dodali smo vodo (150 mL) in produkt ekstrahirali z etrom (2 x 100 mL). Organsko fazo smo nato še spirali z vodo, NaHCO_3 in nasičeno raztopino NaCl , sušili z Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo. Dobili smo 5.22 g svetlo rumene spojine **02**.

Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$	$M = 319.19 \text{ g/mol}$
Opis	svetlo rumena trdna spojina	
Izkoristek	39.25 %	
Rf	0.72 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
Tališče	$73\text{-}75^\circ\text{C}$	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 1.91 (d, 3H, $J = 6.63 \text{ Hz}$, $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 5.17 (s, 2H, Ph- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O), 5.27 (q, 1H, $J = 6.63 \text{ Hz}$, $-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_3$), 7.05 (d, 2H, $J = 8.96 \text{ Hz}$, 2 x Ar- $\underline{\text{H}}$), 7.50-7.31 (m, 5H, Ar- $\underline{\text{H}}$), 8.03 (d, 2H, $J = 8.97 \text{ Hz}$, 2 x Ar- $\underline{\text{H}}$)	

4.1.3. Sinteza 5-(benziloksi)-2-(4-(benziloksi)fenil)-3-metil-1H-indola (**03**)



V bučko z 20 mL DMF smo dodali spojino **02** (7.36 g, 23.15 mmol) in 4-benziloksianilinijev klorid (6.545 g, 27.79 mmol). Reakcijsko zmes smo 10 minut preprihovali z argonom, da smo izpodrinili kisik in mešali na magnetnem mešalu. Nato smo dodali še trietilamin (8.10 mL) in segrevali 2 uri pri temperaturi 120 °C. Po končanem segrevanju smo zmes ohladili (vendar ne na sobno temperaturo), zopet dodali 4-benziloksianilin (7.073 g, 30.03 mmol) in segrevali ponovno 2 uri pri 150 °C (za zaprtje obroča poteče Bischlerjeva sinteza indolov). Dodali smo še dodaten 4-benziloksianilin (0.738 g, 3.13 mmol) in segrevali nadaljnjih 30 minut. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo, nato pa produkt ekstrahirali.

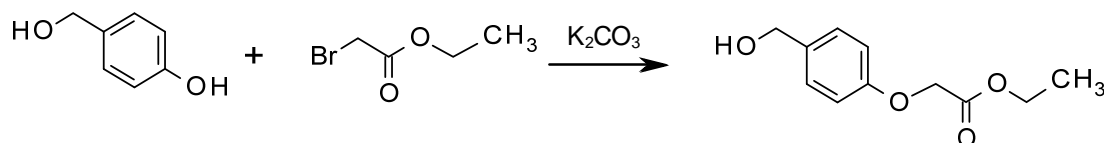
Izolacija:

- V bučko smo reakcijski zmesi dodali 100 mL H₂O in ekstrahirali z etilacetatom (2 x 120 mL).
- Organsko fazo smo spirali z 1 N NaOH (100 mL), H₂O (100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (100 mL).
- Naša spojina je ostala v organski fazi, ki smo jo sušili z Na₂SO₄, odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom.
- Dobili smo oborino temno rjave barve, ki smo jo spirali z MeOH (50 mL) in filtrirali z odsesavanjem. Filtrat smo zlili v bučko, dodali eter (50 mL) in zopet filtrirali z odsesavanjem. Ker je produkt netopen v metanolu in etru, se je iz raztopine oboril, medtem ko so nečistote ostale raztopljene v topilu.
- Še dvakrat smo izmenično spirali z MeOH (50 mL) in etrom (50 mL). Tako smo počasi odstranili nečistote in iz temno rjave oborine dobili belkast produkt.

Dobili smo 5.227 g spojine **03**.

Elementna sestava	C ₂₉ H ₂₅ NO ₂	M = 419.51 g/mol
Opis	belkasta trdna spojina	
Izkoristek	53.8 %	
Rf	0.74 (MF = EtAc:PE = 1:1)	
Tališče	147-150°C	
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] 2.41 (s, 3H, -CH ₃), 5.16 (d, J = 4.72 Hz, 4H, 2 x Ph-CH ₂ -O), 6.95 (dd, 1H, 1J = 2.38, 2J = 8.67 Hz, Ar-H), 7.14-7.07 (m, 3H, Ar-H), 7.56-7.29 (m, 13H, Ar-H), 7.84 (s, 1H, -NH)	

4.1.4. Sinteza etilnega estra 2-[4-(hidroksimetil)fenoksi] očetne kisline (04)



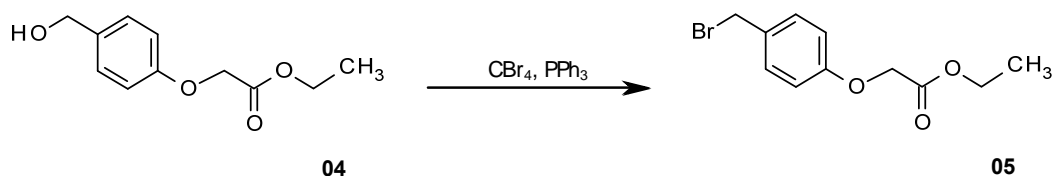
4-(Hidroksimetil)fenol (10.001 g, 80.90 mmol) smo raztopili v 100 mL DMF. Dodali smo kalijev karbonat (14.7 g, 106.6 mmol) in etil bromoacetat (5.88 mL, 49.7 mmol). Nastalo suspenzijo smo mešali in 2 h segrevali pri temperaturi 90°C, nato pa smo topilo odparili pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 2 M K₂CO₃ (100 mL) in ekstrahirali z EtOAc (100 mL), nato pa organsko fazo spirali z 2M K₂CO₃, nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄ in filtrirali. Topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom in dobili 10.298 g oljne spojine, svetlo rumene barve. Ker smo s TLC kromatografijo ugotovili prisotnost majhne količine izhodne spojine (4-(hidroksimetil)fenola), smo produkt čistili s kolonsko kromatografijo (flash), kjer smo kot mobilno fazo uporabili DKM/MeOH = 40/1.

Dobili smo 8.246 g čiste spojine **04**.

Elementna sestava	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	M = 210.23 g/mol
Opis	svetlo rumena oljna spojina	

Izkoristek	48.7 %
Rf	0.27 (MF = DKM:MeOH = 40:1)
Tališče	147-150°C
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] 1.27 (t, 3H, <i>J</i> = 7.15 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 2.58 (s, 1H, -OH), 4.23 (q, 2H, <i>J</i> = 7.14 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 4.54 (s, 2H, -CH ₂ -OH), 4.57 (s, 2H, -CO-CH ₂ -O), 6.85 (d, 2H, <i>J</i> = 8.73 Hz, 2 x Ar-H), 7.24 (d, 2H, <i>J</i> = 8.72 Hz, 2 x Ar-H)

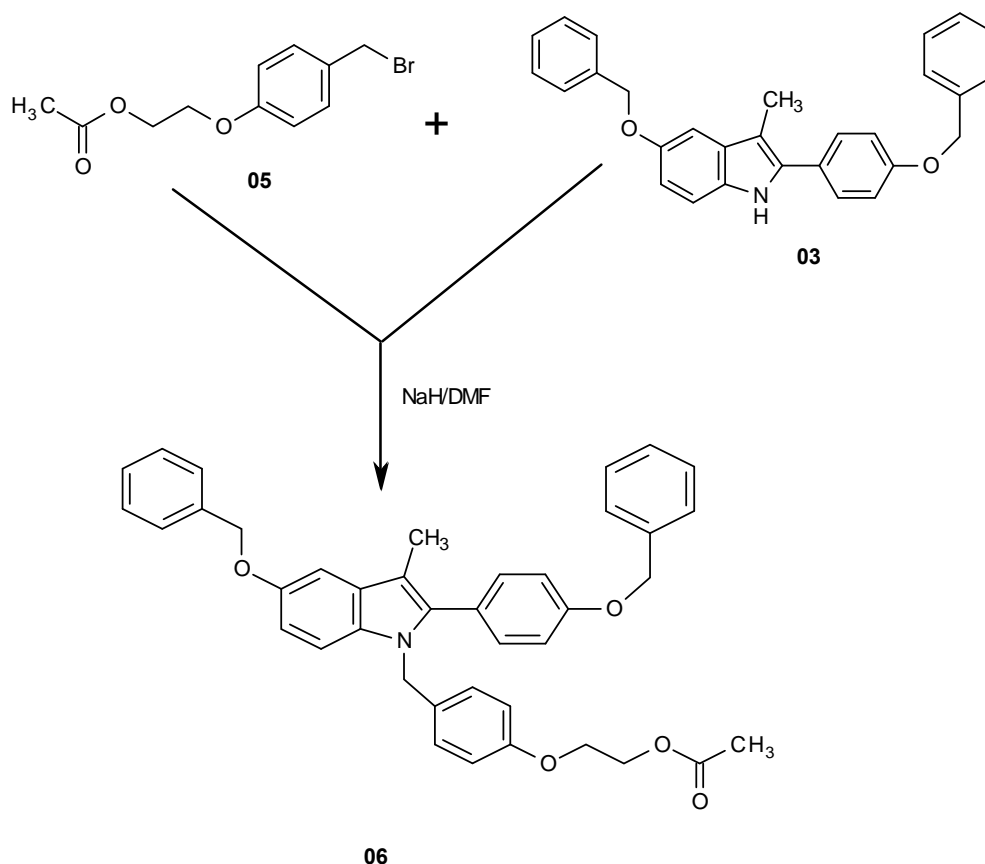
4.1.5. Sinteza etilnega estra 2-[4-(bromometil)fenoksi] očetne kisline (05)



Raztopini spojine **04** (2.133 g, 10.15 mmol) v THF (40 mL) smo dodali CBr₄ (5.047 g, 15.22 mmol) in PPh₃ (2.661 g, 10.14 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 3 h pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, preostanek pa čistili s kolonsko kromatografijo (flash), kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc/heksan = 4 : 1. Dobili smo 1.651 g spojine **05**.

Elementna sestava	C ₁₁ H ₁₃ BrO ₃	M = 273 g/mol
Opis	svetlo rumena oljna spojina	
Izkoristek	59.6 %	
Rf	0.36 (MF = EtOAc: heksan = 1:4)	
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] 1.31 (t, 3H, <i>J</i> = 7.14 Hz, -CH ₂ -CH ₃), 4.29 (q, 2H, <i>J</i> = 7.14 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4.57 (s, 2H, -CH ₂ -Cl), 4.63 (s, 2H, -CO-CH ₂ -O), 6.90 (d, 2H, <i>J</i> = 8.73 Hz, 2 x Ar-H), 7.33 (d, 2H, <i>J</i> = 8.74 Hz, 2 x Ar-H).	

4.1.6. Sinteza etilnega estra 2-{4-[5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-3-metil-1*H*-indol-1-ilmetil]-fenoksi} očetne kisline (06)



Spojino **03** (2.554 g, 6.09 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF-u (20 mL), ohladili na 0°C in dodali NaH (0.098 g, 7 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 20 min pri 0°C. Nato smo počasi dodajali spojino **05** (1.662 g, 6.09 mmol), ki smo jo predhodno raztopili v 10 mL DMF. Zmes smo mešali pri sobni temperaturi še 18 h.

Po končani reakciji smo produkt izolirali na sledeči način:

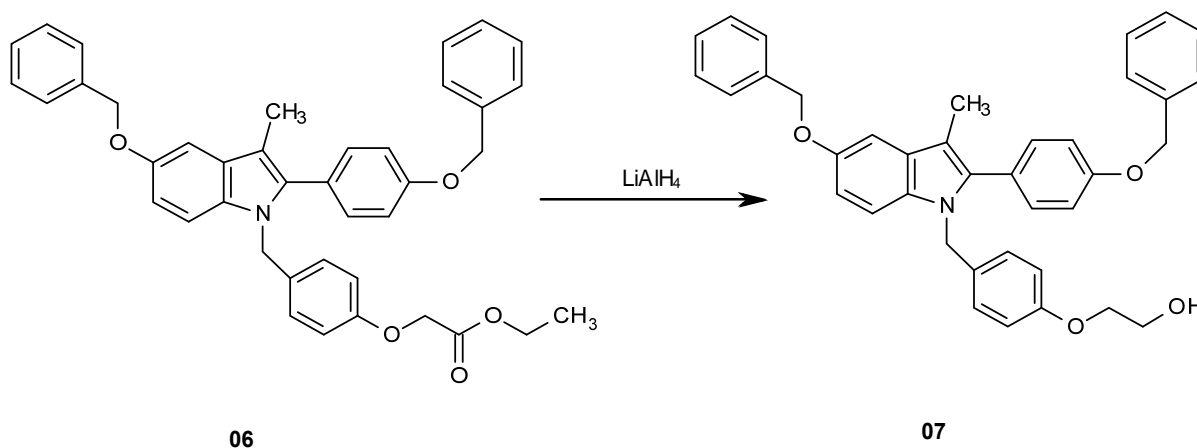
V reakcijsko zmes smo dodali vodo (20 mL) in ekstrahirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄ in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo izolirali s kolonsko kromatografijo (flash), kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc/heksan = 1/4. Ker se končna zmes v mobilni fazi ni raztapljala, smo jo raztopili v manjši količini THF ter dodali 10 g silikagela. Vse skupaj smo

postavili na rotavapor ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Nastal je suh silikagel z adsorbirano zmesjo za ločevanje.

Dobili smo 0.947 g spojine **06**.

Elementna sestava	C ₄₀ H ₃₇ NO ₅	M = 611.725 g/mol
Opis	svetlo rumena trdnaspojina	
Izkoristek	25.4 %	
Rf	0.23 (MF = EtOAc: heksan = 1:4)	
Tališče	128-131°C	
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] 1.18 (t, 3H, <i>J</i> = 7.11 Hz, -O-CH ₂ -CH ₃), 2.16 (s, 3H, -CH ₃), 4.13 (q, 3H, <i>J</i> = 7.11 Hz, -O-CH ₂ -CH ₃), 4.67 (s, 2H, -CO-CH ₂ -O), 5.12 (s, 2H, O-CH ₂ -Ph), 5.15 (s, 2H, O-CH ₂ -Ph), 5.17 (s, 2H, Ph-CH ₂), 6.85-6.72 (m, 5H, Ar-H), 7.23-7.10 (m, 4H, Ar-H), 7.51-7.28 (m, 12H, Ar-H)	

4.1.7. Sinteza etilnega estra 2-{4-[5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-3-metil-1*H*-indol-1-ilmetil]-fenoksi} etanola (**07**)



Spojino **06** (0.200 mg, 0.327 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF-u (10 mL). Bučko smo opremili s septumom za zagotovitev brezvodnih pogojev. Zmes smo ohladili na 0°C, nato pa po kapljicah dodali LiAlH₄ (0.373 ml, 1 M). Potek reakcije smo spremljali s TLC

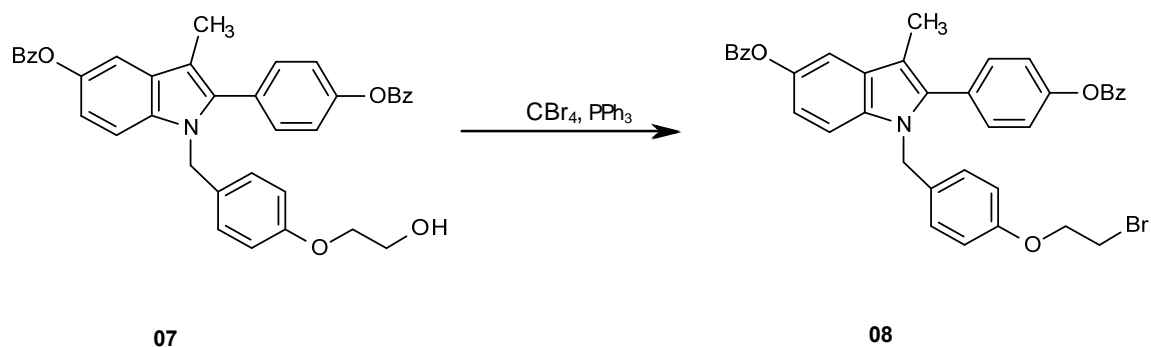
kromatografijo. Po 30 min je izhodna spojina zreagirala. Počasi smo dodali destilirano vodo v taki količini, da smo nevtralizirali prebitni reducent LiAlH_4 .

Izolacija

V bučko smo dodali 1M HCl (10 mL–15 mL) in ekstrahirali z EtOAc (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 . Rastopino smo prefiltrirali in odparili topilo. Dobili smo 0.138 g spojine **07**.

Elementna sestava	$\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{NO}_4$	M = 569,725 g/mol
Opis	belkasta pena	
Izkoristek	74.2 %	
Rf	0.19 (MF = EtOAc: heksan = 2:3)	
Tališče	108-111°C	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)	δ [ppm] 2.16 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.65 (t, 2H, $J = 4.98$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3.88 (t, 2H, $J = 5.01$ Hz, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 5.12 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.15 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.16 (s, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2$) 6.93-6.79 (m, 2H, Ar-H), 7.24-7.09 (m, 5H, Ar-H), 7.52-7.27 (m, 14H, Ar-H)	

4.1.8. Sinteza 5-benziloksi-2-(4-benziloksi-fenil)-1-[4-(2-bromo-etoksi)-benzil]-3-metil-1H indola (**08**)

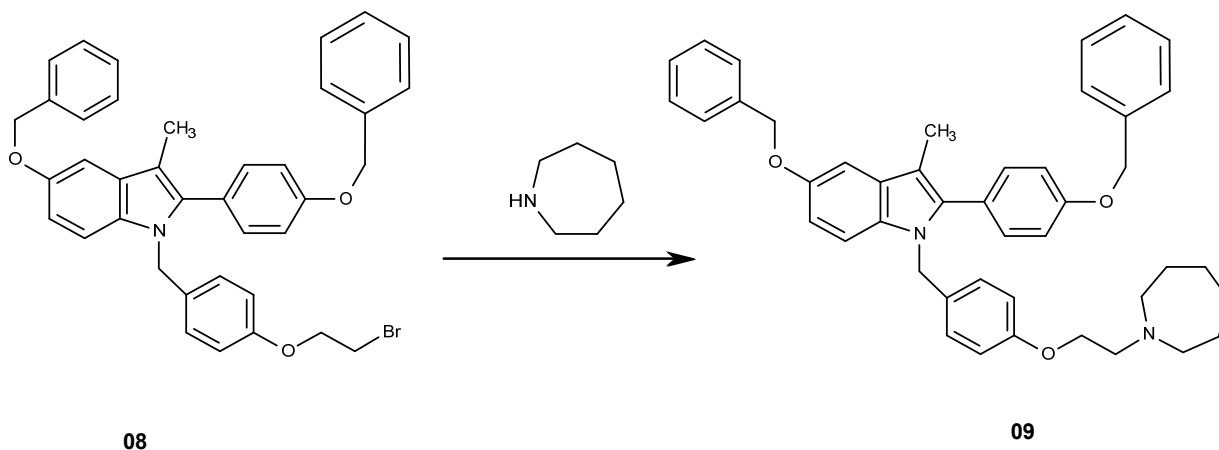


Spojino **07** (0.447 g, 0.784 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF-u (10 – 15 mL). Dodali smo CBr_4 (0.390 g, 1.175 mmol) in PPh_3 (0.309 g, 1.178 mmol), nato smo

reakcijsko zmes mešali 3 h pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo. Ker je po 3 h v reakcijski zmesi izhodna spojina bila še vedno prisotna, smo dodali še 0.5 ekvivalenta CBr_4 (0.130 mg) in 0.5 ekvivalenta PPh_3 (0.102 mg). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč. Izhodna spojina je bila v reakcijski zmesi še vedno prisotna, zato smo produkt izolirali s kolonsko kromatografijo (flash), kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc /heksan = 1/4. Dobili smo 0.185 spojine **08**.

Elementna sestava	$\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{BrNO}_3$	$M = 632.59 \text{ g/mol}$
Opis	trdna, rumenkasta spojina	
Izkoristek	37.3 %	
Rf	0.54 (MF = EtOAc: heksan = 2:3)	
Tališče	152-155°C	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6)	δ [ppm] 2.16 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.74 (t, 2H, $J = 5.39 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 4.22 (t, 2H, $J = 5.39 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 5.12 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.15 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.17 (s, 2H, $\text{Ph}-\text{CH}_2$), 6.84-6.76 (m, 4H, Ar-H), 7.15-7.10 (m, 3H, Ar-H), 7.23-7.19 (m, 1H, Ar-H), 7.51-7.28 (m, 13H, Ar-H).	

4.1.9. Sinteza 5-benziloksi-2-fenil-3-metil-1-[4-(2-azepan-1-il-etoksi)benzil]-1H-indola (**09**)



Spojino **08** (0.185 mg, 0.292 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF-u (10 mL), dodali smo heksametilenimin (0.330 mL) in 5 h segrevali pri temperaturi refluxa (66°C). Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo. Izhodna spojina je bila še vedno prisotna v reakcijski zmesi, zato smo jo pustili čez noč, da je reakcija potekla s čimboljšim izkoristkom.

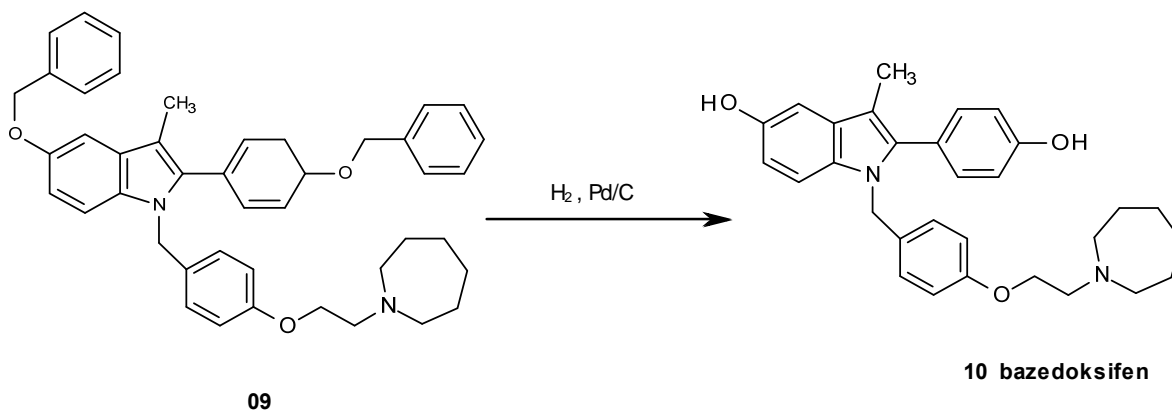
Izolacija

Ker je THF topen v vodi in EtOAc, smo ga najprej odparili pod znižanim tlakom. Dodali smo EtOAc (10 mL), nato spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 10 mL) in dodali sušilno sredstvo Na₂SO₄. Raztopino smo prefiltrirali in topilo odparili.

Produkt smo izolirali s kolonsko kromatografijo (flash), kjer smo kot mobilno fazo uporabili DKM/MeOH = 20/1. Dobili smo 0.080 g spojine **09**.

Elementna sestava	C ₄₄ H ₄₆ N ₂ O ₃	M = 650,85 g/mol
Opis	bela, trdna spojina	
Izkoristek	42.1 %	
R _f	0.32 (MF = DKM: MeOH = 20:1)	
Tališče	97-100°C	
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1.58-1.44 (m, 8H), 2.15 (s, 3H), 2.64-2.56 (m, 4H), 2.76 (t, 2H, <i>J</i> = 5.9 Hz), 3.90 (t, 2H, <i>J</i> = 5.9 Hz), 5.11 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.73 (s, 4H), 6.80 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2.4 Hz), 7.14-7.10 (m, 3H), 7.19 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.29 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.36-7.30 (m, 2H), 7.41-7.36 (m, 4H), 7.47 (d, 4H, <i>J</i> = 8.3 Hz).	

4.1.10. Sinteza 2-(4-hidroksi-fenil)-3-metil-1-[4-(2-azepan-1-il-etoksi)benzil]-1H-indol-5-ola (10)



Spojino **09** (0.080 g, 0.123 mmol) smo raztopili v mešanici THF/EtOH (20 mL) in prepihali z argonom, da smo izpodrinili zrak in ustvarili inertno atmosfero. Dodali smo katalizator 10 % Pd/C (15 mg). Med mešanjem smo reakcijsko zmes prepihavali z H_2 , da smo odstranili preostanek argona. Bučko smo opremili z balonom, napolnjenim z H_2 in mešali pri sobni temperaturi nadaljnjih 48 h. Opozorilo: pri delu s katalizatorjem je potrebna previdnost, saj se lahko vžge.

Po končanem katalitskem hidrogeniranju smo reakcijsko zmes odfiltrirali preko guča. Katalizator, ki je ostal na guču smo 4 x sprali z etanolom, nato pa topilo odparili pod znižanim tlakom. Pd/C smo pospravili v vsebnik z odpadnim katalizatorjem. Dobili smo 42 mg končne spojine **10**.

Elementna sestava	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$	$M = 470,60 \text{ g/mol}$
Opis	trdna, temno bela spojina	
Izkoristek	72,6 %	
Rf	0.09 (MF = DKM: MeOH = 9:1)	
Tališče	110-113°C	

¹ H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] 1.63-1.47 (m, 8H, 4 x -CH ₂), 2.10 (s, 3H, -CH ₃), 2.79-2.61 (m, 4H, 2 x -CH ₂), 3.19-3.15 (m, 2H, N-CH ₂ -CH ₂ -O), 4.02-3.90 (m, 2H, -CH ₂ -CH ₂ -O), 5.10 (s, 2H, Ph-CH ₂ -N), 6.58 (dd, 1H, <i>J</i> = 8.66, 2.31 Hz, Ar-H), 6.78-6.74 (m, 4H, Ar-H), 6.81 (d, 1H, <i>J</i> = 2.19 Hz, Ar-H), 6.85 (d, 2H, <i>J</i> = 8.60 Hz, Ar-H), 7.06 (d, 2H, <i>J</i> = 8.67 Hz, Ar-H), 7.16 (d, 2H, <i>J</i> = 8.56 Hz, Ar-H), 8.67 (s, 1H, -OH), 9.64 (s, 1H, -OH)			
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3404; 2923; 2855; 1611; 1510; 1459; 1354; 1241; 1168; 1031; 920; 838; 794; 608; 520.			
MS (ESI+)	m/z (%) = 471,3 (100, MH ⁺)			
Čistost	97,5% (HPLC)			
ELEMENTNA ANALIZA C ₃₀ H ₃₄ N ₂ O ₃		% C	% H	% N
	Izračunana vrednost	73,74	7,43	5,73
	Izmerjena vrednost	73,57	7,19	5,59

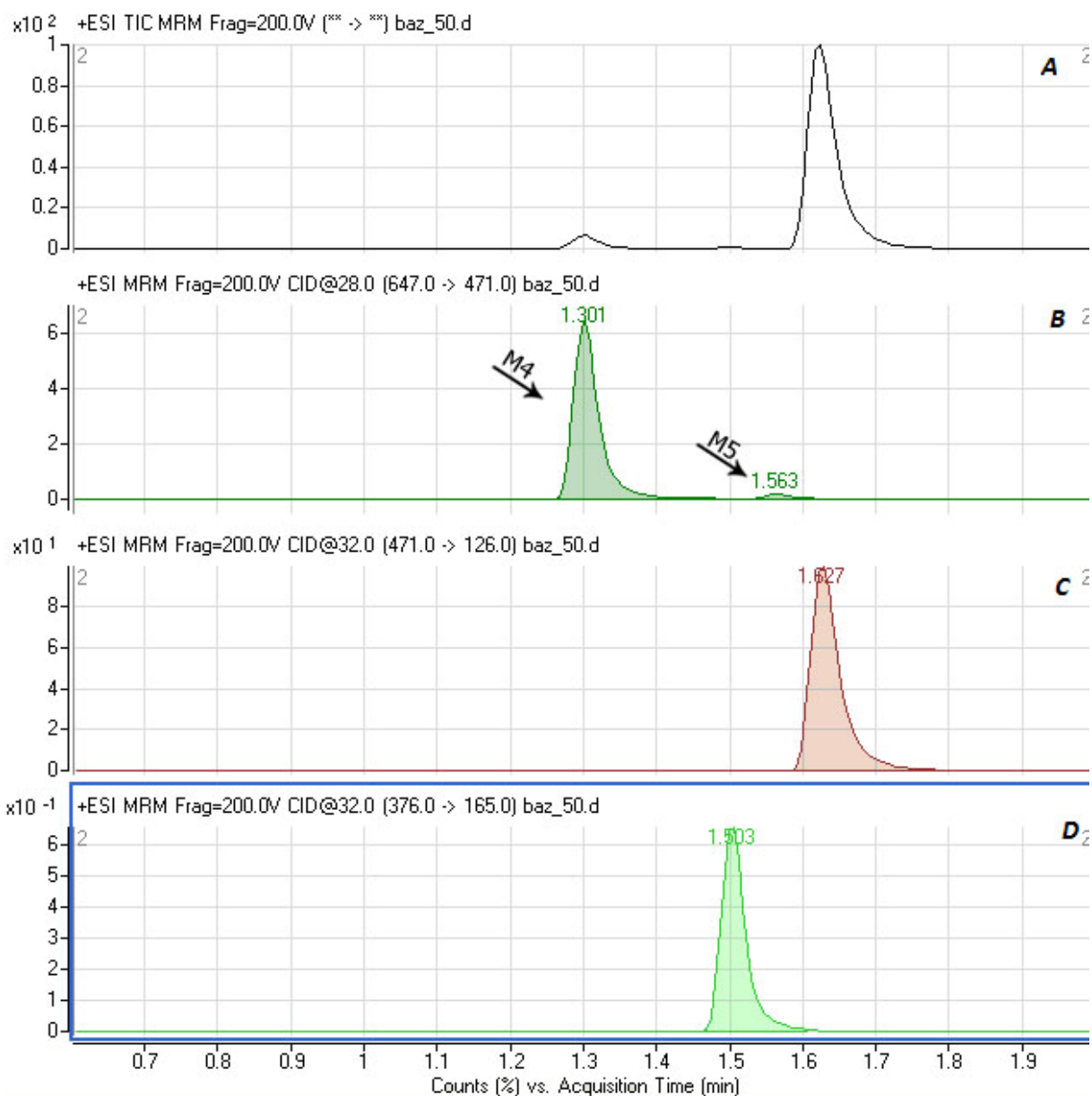
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. *Biosinteza metabolitov bazedoksifena*

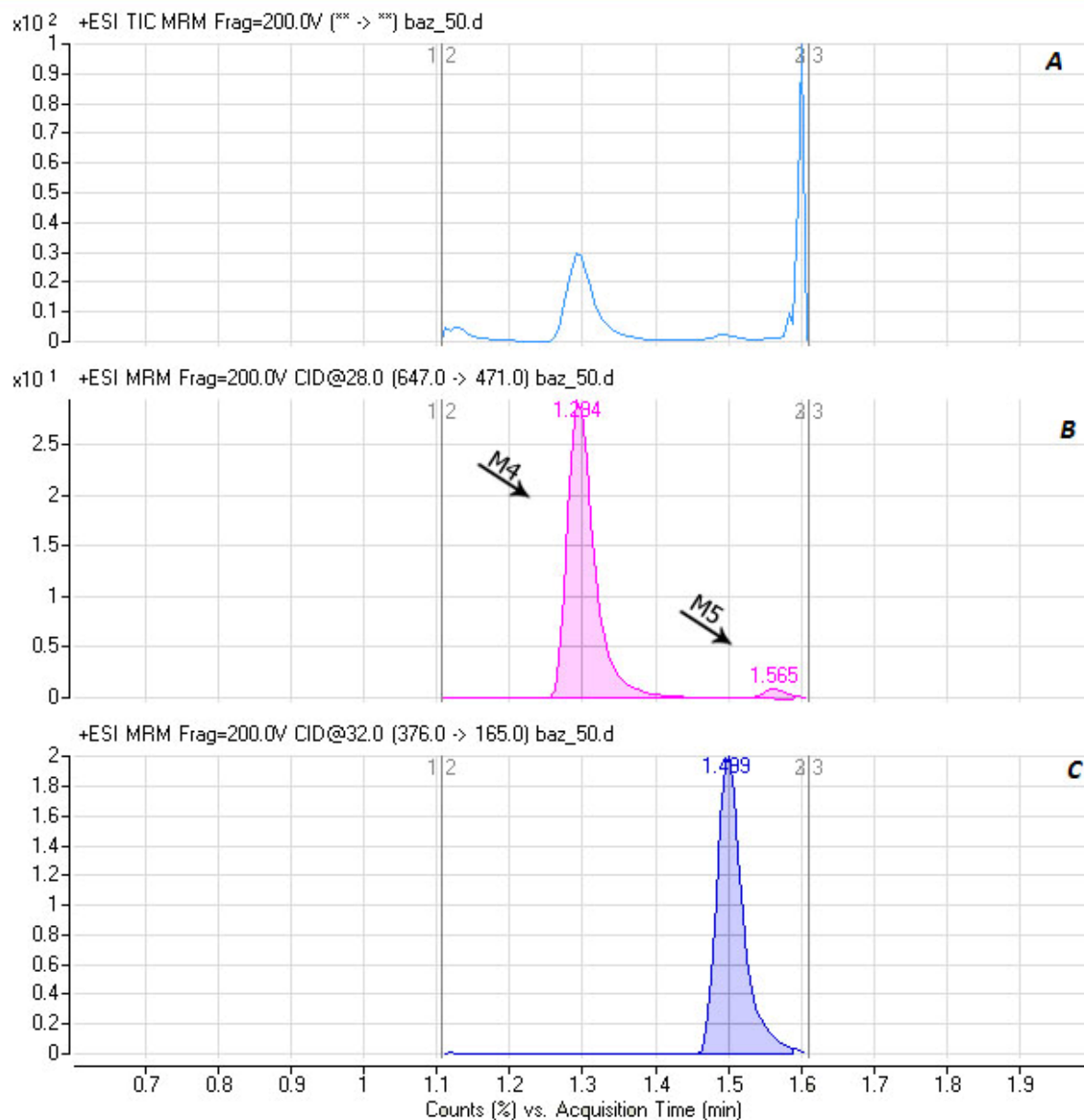
5.1.1. ANALIZA INKUBACIJSKE ZMESI z jetrnimi mikrosomi

Na koncu vsakega poskusa smo z LC/MS/MS izmerili odzive vzorcev in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracije nastalih metabolitov v inkubacijski zmesi.

Na spodnjih slikah so predstavljeni kromatogrami inkubacijskih zmesi. Na prvi sliki smo injicirali 0,1 μ L vzorca in spremljali M4, bazedoksifen in haloperidol. Ker je bil odziv M5 pri tem volumnu injiciranja prenizek, smo ponovili injiciranje z 1 μ L vzorca in spremljali M4, M5 in haloperidol.



Slika 8: Kromatogram po injiciranju 0,1 μ L vzorca. A - celokupni kromatogram (Total Ionic Chromatogram, TIC), B –masni prehod za M4 in M5, C – masni prehod za bazedoksifen, D – masni prehod za haloperidol (interni standard)

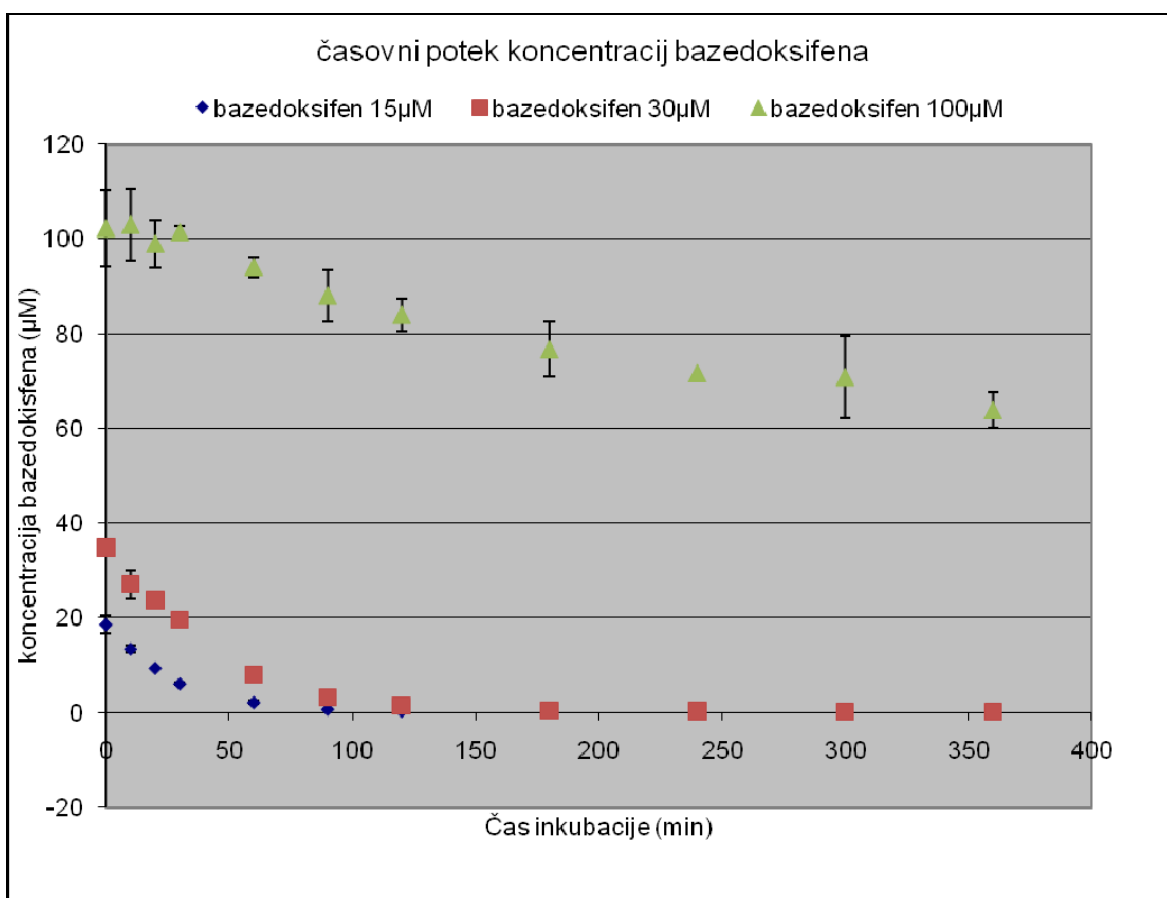


Slika 9: Kromatogram po injiciranju 1 μ L vzorca. A - celokupni kromatogram (Total Ionic Chromatogram, TIC), B –masni prehod za M4 in M5, C – masni prehod za haloperidol (interni standard)

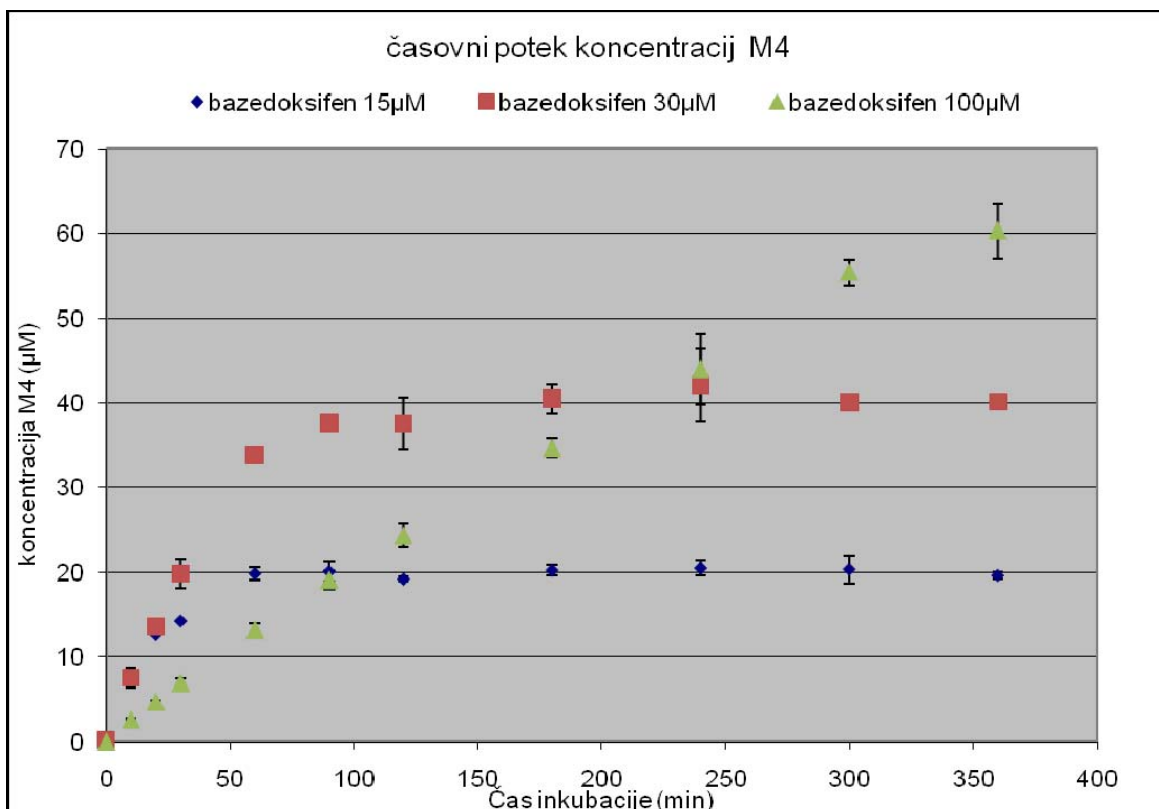
5.1.2. ČASOVNO SPREMLJANJE NASTANKA METABOLITOV BAZEDOKSIFENA Z JETRNIMI MIKROSOMI

Rezultate LC/MS/MS analize smo prikazali v obliki grafov, ki prikazujejo časovni potek metabolizma testirane učinkovine oz. nastajanja njenih metabolitov v inkubacijski zmesi.

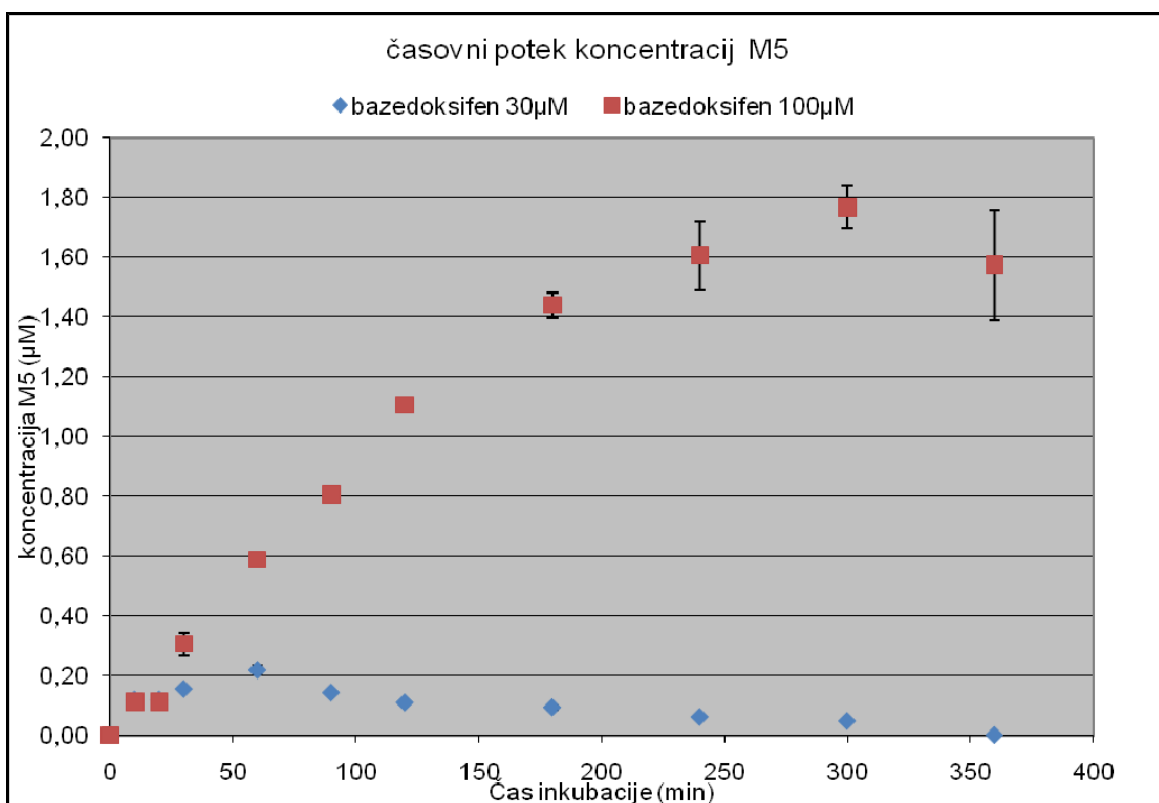
Na grafih (slika 10, 11, 12) je prikazan časovni potek metabolizma basedoksifena oz. nastajanja metabolitov M4 in M5. Posamezna točka je povprečna hitrost nastajanja metabolita izmerjena v treh paralelkah, zato je predstavljena s povprečno vrednostjo in standardno deviacijo.



Slika 10: Časovni potek metabolizma različnih koncentracij basedoksifena v inkubacijah z jetrnimi mikrosomi.



Slika 11: Časovni potek nastajanja metabolita M4 v inkubacijah z jetrnimi mikrosomi.



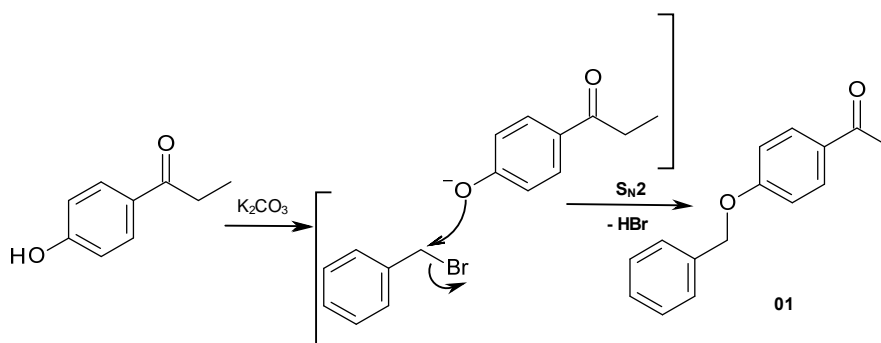
Slika 12: Časovni potek nastajanja metabolita M5 v inkubacijah z jetrnimi mikrosomi.

Iz grafov lahko vidimo, da koncentracija bazedoksifena linearno pada, dokler le-tega ne zmanjka. Naklona linearnega dela sta enaka pri nižjih koncentracijah bazedoksifena, pri visoki koncentraciji pa je naklon nekoliko nižji, kar nakazuje na pojav substratne inhibicije v območju višjih koncentracij spojine. Substratno inhibicijo smo opazili tudi v primeru nastajanja metabolita M4, saj je le-ta v primeru 100 μM bazedoksifena nastajal počasneje kot v primeru 15 in 30 μM bazedoksifena. Pri metabolitu M5, smo opazili, da ga je pri koncentraciji 15 μM bazedoksifena nastalo najverjetneje premalo, da bi ga lahko detektirali. V inkubaciji s 100 μM bazedoksifenom pa se lepo vidi nastajanje metabolita M5.

5.2. Sinteza bazedoksifena

5.2.1. Uvedba zaščitne skupine na hidroksilno skupino 1-(4-hidroksifenil)propan-1-ona - *Williamsonova sinteza etrov*

Zaščita hidroksilne skupine je bila potrebna, saj bi prosta OH-skupina vstopala v stranske reakcije pri nadaljnji sintezi in tako zmanjševala izkoristek ter oteževala čiščenje glavnega produkta. S tvorbo benzilnega etra pogosto zaščitimo hidroksilno skupino, in sicer z Williamsonovo sintezo etrov (slika 13), ki je organska sintezna reakcija za pridobivanje simetričnih in asimetričnih etrov. V reakciji sodelujeta alkoksidni ion in primarni organohalid. S tvorbo benzilnega etra smo zaščitili fenolno skupino 1-(4-hidroksifenil)propan-1-ona. V prvi stopnji smo pripravili alkoksidni ion, ki je reaktiven, zato smo ga pripravili *in situ*. Za *in situ* pripravo alkoksidnega iona smo uporabili bazo K_2CO_3 , ki je odtegnila proton 4-hidroksipropifenonu. V drugi stopnji je potekla bimolekularna nukleofilna substitucija ($\text{S}_{\text{N}}2$) med alkoksidnim ionom in benzilbromidom.

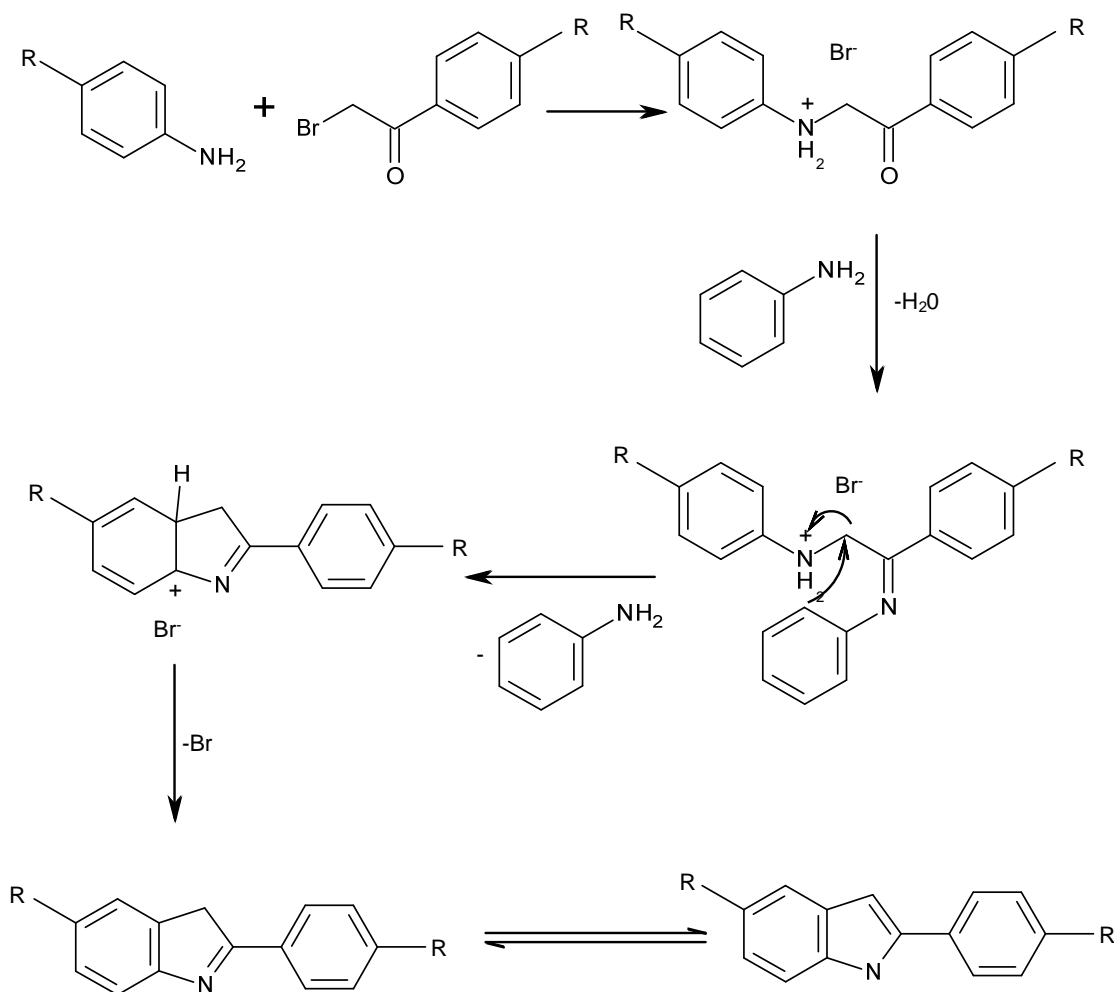


Slika 13: Williamsonova sinteza etrov.

5.2.2. Sinteza spojine (03) z Bischler Möhlau-jeva sintezo indolov

Indol smo sintetizirali s pomočjo kemijske reakcije, ki se imenuje Bischler Möhlau-jeva sinteza indolov (slika 14). Iz α -bromo-acetofenona in prebitnega anilina nastane 2-aril-indol.

Prva dva koraka vključuje reakcija α -bromo-acetofenona z molekulami anilina, pri kateri nastane intermediat. Nabit anilin tvori zmerno izstopajočo skupino za nadaljnjo elektrofilno ciklizacijo za tvorbo intermedjata, ki se hitro aromatizira in tautomerizira do želenega indola.



Slika 14 : Bischler Möhlau-jeva sinteza indolov.

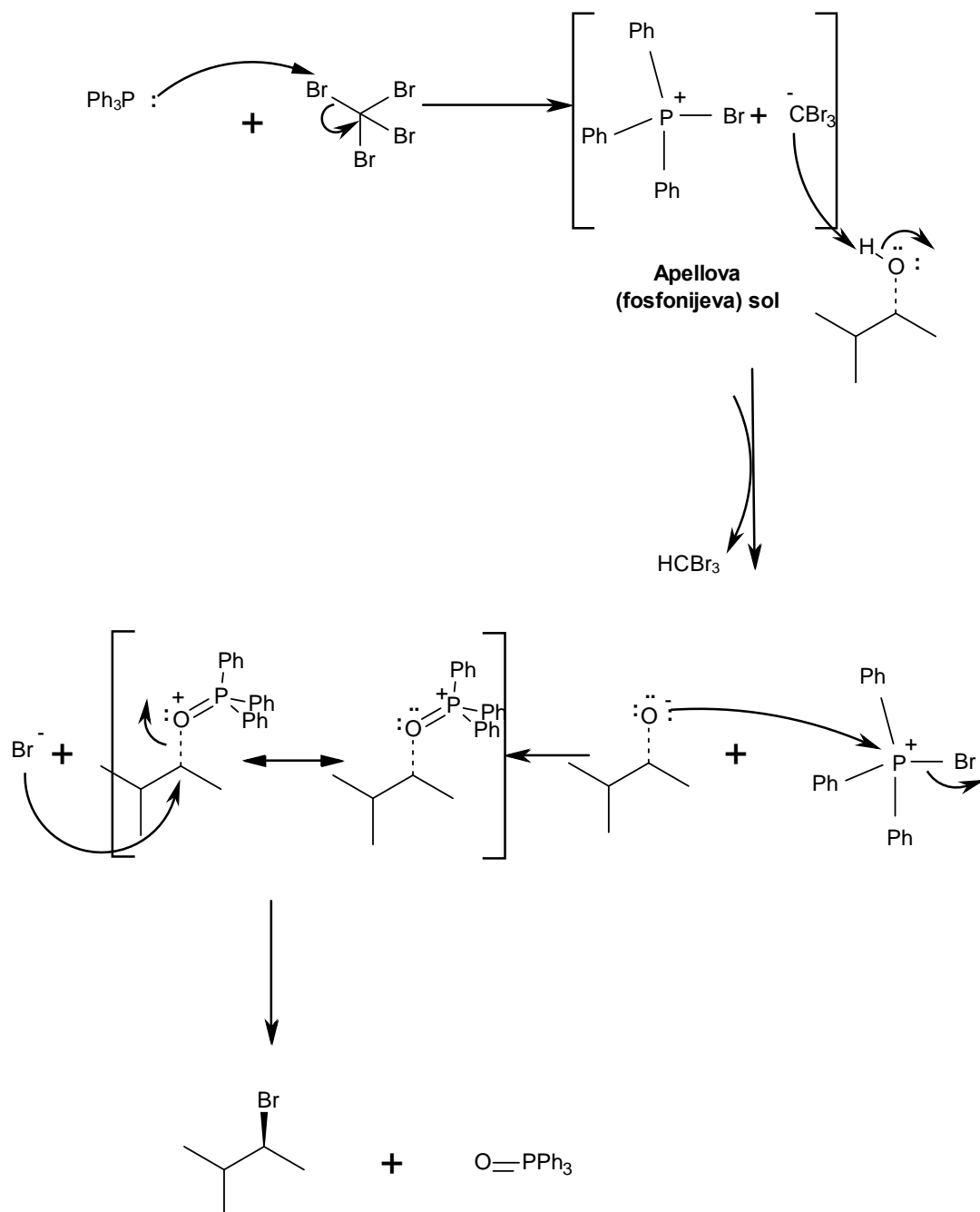
5.2.3. Sinteza spojine 06 – N-alkiliranje indola

Spojino **06** smo pripravili z N-alkiliranjem indolovega derivata. Indolni derivat smo z dodatkom NaH pretvorili v resonančno stabiliziran indolni anion, katerega negativni naboj je lokaliziran pretežno na dušiku in C-3 atomu. Zato se lahko kot nukleofil vključi v reakcijo alkiliranja.

5.2.4. Nukeofilna substitucija – Appelova reakcija

Spojini **05** in **08** smo sintetizirali z Appel-ovo reakcijo, s katero smo pod milimi pogoji pretvorili alkoholno skupino v alkil bromid. Reakcija poteka po mehanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$.

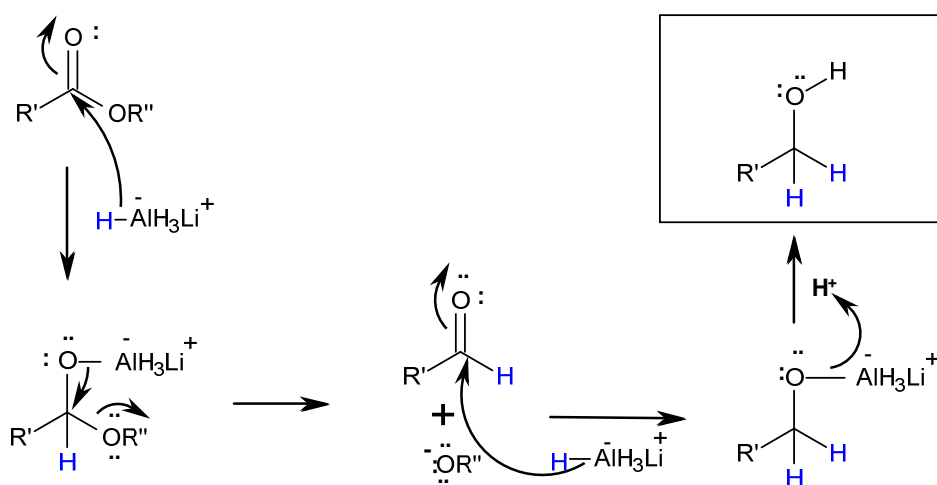
Začetna stopnja Appel-ove reakcije je tvorba *fosfonijeve soli* (*Appelova sol*), ki nastane z reakcijo s CBr_4 in PPh_3 . Z deprotonacijo alkohola in tvorbo tribromokarboaniona (CBr_3^-), nastane alkoksadni ion. Z nukleofilno zamenjavo bromida z alkoksidom nastane oksifosfonijev intermediat. Okso skupina se nato pretvori v izstopajočo skupino in poteče reakcija po mehanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$, kjer nastane želeni alkil bromid in trifenilfosfin oksid. Gonilna sila v tej reakciji je pripisana tvorbi trdnega trifenilfosfin oksida, ki je ločen od preostale reakcijske zmesi (39, 40).



Slika 15: Mehanizam Appelove reakcije.

5.2.5. Redukcija z LiAlH₄

Spojino **07** smo reducirali z LiAlH₄, ki je zadosti močan in reaktiven donor hidridnih ionov, da reagira z manj reaktivnimi (v primerjavi z aldehidi in ketoni) estri karboksilnih kislin (41). Za razlago mehanizma predpostavljajo, da je litijev aluminijev hidrid v raztopini v glavnem kot ionski agregat močno solavtiziranih litijevih ionov in alumohidridnih ionov (AlH₄⁻). Za redukcijo z LiAlH₄ potrebujemo brezvodne pogoje, kot topilo smo uporabili tetrahidrofuran (THF). Z vodo reagira LiAlH₄ zelo burno. Ker je reakcija močno eksotermna in se pri njej sprošča vodik, se ta lahko vžge. Drugače pa reakcija poteka hitro in brez stranskih reakcij.



Slika 16: Mehanizem redukcije estra.

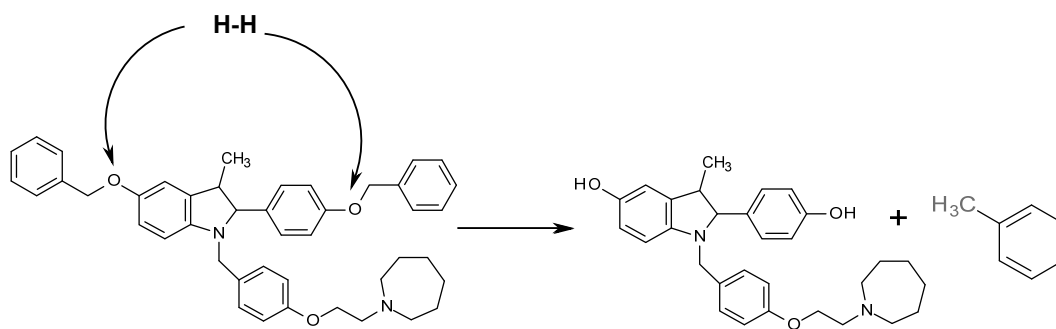
5.2.6. Odstranitev zaščitne skupine s končnega produkta – *katalitsko* *hidrogeniranje*

Za sintezo končnega produkta smo morali izvesti še katalitsko hidrogeniranje za odstranitev benzilne zaščite.

Reakcija organskih spojin z vodikom v prisotnosti katalizatorja omogoča enostavno metodo pretvorbe v ustrezne spojine. Kot katalizatorje uporabljamo aktivne substance z visoko katalizatorsko sposobnostjo ter dolgo življenjsko dobo. Na katalitski učinek vplivajo: kristalna mreža aktivnih spojin, velikost zrn (čimbolj je drobnozrnat, tem bolj je učinkovit), čim večja specifična površina, mehanska odpornost.

Ponavadi takšne katalizatorje vežemo na nosilce, s katerimi dosežemo enakomerno porazdelitev po veliki površini, s tem pa se poveča tudi reaktivnost. To so lahko različni silikati, karbonati ali aktivno oglje. Mi smo kot katalizator uporabili žlahtno kovino Pd (paladij), ki je vezan na aktivno oglje.

Po končani reakciji smo s TLC ugotovili, da pri majhnem deležu izhodne spojine zaščita OH skupine na mestu 5 ni bila odstranjena. Pri 90% izhodne spojine **09** je odstranitev obeh zaščitnih OH skupin bila uspešna. Zato smo katalizator odfiltrirali, topilo odparili in s kolonsko kromatografijo ločili zeleno končno spojino **10** in vmesno spojino **09a**, kjer je bila potrebna odščita še druge OH skupine. Postopek katalitskega hidrogeniranja smo s spojino **09a** ponovili in uspešno dobili končno spojino **10**.



Slika 17: Reakcija katalitskega hidrogeniranja.

6. SKLEP

- Uspešno smo razvili metodo sinteze bazedoksifena, izolacije, čiščenja in karakterizacije. Uspešnost postopka nam potrjuje visoka čistost spojine (97,5 %).
- Razvili smo metodo za *in vitro* preučevanje metabolizma bazedoksifena z mikrosomi.
- Razvili smo metodo za detekcijo in kvantifikacijo bazedoksifena in njegovih metabolitov v inkubatih bazedoksifena z mikrosomi.
- Ugotovili smo, da *in vitro* nastane predvsem bazedoksifen-4'-glukuronid, medtem ko je bazedoksifen-5-glukuronid najpomembnejši metabolit *in vivo*. Zaradi tega sklepamo, da človeški jetrni mikrosomi pri naših pogojih inkubacije niso najboljši *in vitro* model za preučevanje metabolizma bazedoksifena.
- Za preučevanje metabolizma bazedoksifena bi bili morda bolj primerni primarni hepatociti humanega izvora, kjer načeloma obstaja boljša povezava med *in vitro* ter *in vivo* rezultati.

7. LITERATURA

1. Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2005; 16 Suppl 2: S3-S7.
2. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. *Interna medicina*, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 916-25.
3. Kocijančič A. Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 571-3.
4. Metcalfe D. The pathophysiology of osteoporotic hip fracture. *McGill journal of medicine: MJM: an international forum for the advancement of medical sciences by students*, 2008; 11(1):51-7.
5. Kamel HK, O'Connell MB. Therapeutic options in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Suppl to J Manag Care Pharm*, 2006; Vol. 12, No. 6, S-a.
6. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005; 115(12):3318-25.
7. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S, Total oxidative/ anti- oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *J Rheumatol Int*, 2008; 28: 317-321.
8. Slika 2: Faze kostne remodelacije. Dostop preko spleta:
<http://www.umich.edu/news/Releases/2005/feb05/img/bone.jpg>, dne 20.04.2011.
9. Franić D. Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2009; 78: I-143-50.
10. Herma S, et al. *Ortopedija*, 2. izdaja, Ljubljana, samozaložba, 2006.

11. Slika 3: Doseganje kostne mase pri ženskah. Dostop preko spleta: <http://www.jacn.org/cgi/content-nw/full/19/6/715/F1>, dne 20.04.2011.
12. Kamel HK, O'Connell MB. Therapeutic options in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. July Suppl to Journal of Managed Care Pharmacy, 2006; Vol. 12, No. 6, S-a.
13. Zofková I. Hormonal aspects of the muscle-bone unit. J Physiological Research, 2008;57 Suppl 1:S159-69.
14. Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. Lancet, 1993; 341: 801-5.
15. Kanis J. Pathogenesis of osteoporosis and fracture. V: Kanis J. Osteoporosis. Oxford: Blackwell Science; 1994, 22-55.
16. Slika 4: Izguba višine, značilna za kompresijske zlome vretenc. Dostop preko spleta: http://z.hubpages.com/u/298167_f260.jpg, dne 20.04.2011.
17. Patat A, McKeand W, Baird-Bellaire S, et al, Absolute/relative bioavailability of bazedoxifene acetate in healthy postmenopausal women. Clin Pharmacol Ther, 2003; 73: 43.
18. Kumar PJ, Clark ML, Clinical Medicine, 6th edition, Elsevier Saunders, Edinburgh 2005, 593 – 598.
19. Helena Meden-Vrtovec, Prezgodnja menopavza: Vzroki, diagnostika in zdravljenje. Zdrav vestn 2007; 76: 551-7.
20. Watts BN, Current Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, V: Klippel H.J. Primer on the rheumatic diseases, 13th edition, Springer New York, 2008, 592-598.

21. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol.* 2001; 59(3): 405-14.
22. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N: Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288 (1): 49-57.
23. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Martini G, Nuti R. Bazedoxifene for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2008; 4 (6): 1229-1242.
24. Assessment Report for Conbriza, dostop preko spleta: <http://www.ema.europa.eu>, dne 10.04.2011.
25. Komm BS, Kharode YP, Bodine PVN, et al. Bazedoxifene acetate: a selective estrogen receptor modulator with improved selectivity. *Endocrinology* 2005; 146: 3999-4008.
26. Gruber C, Gruber D. Bazedoxifene. *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5: 1086-1093.
27. Biskobing D. Update on bazedoxifene: A novel selective estrogen receptor modulator. *Clin. Interv. Aging.* 2007; 2(3).
28. Komm BS, Kharode YP, Bodine PVN, et al. Bazedoxifene acetate: a selective estrogen receptor modulator with improved selectivity. *Endocrinology* 2005; 146: 3999-4008.
29. Chen Q, Ngui JS, Doss GA, et al. Cytochrome P450 3A4-Mediated Bioactivation of Raloxifene: Irreversible Enzyme Inhibition and Thiol Adduct Formation. *Chem Re. Toxicol.* 2002; 15, 907-914.
30. Ermer J, McKeand W, Sullivan P, et al: Bazedoxifene acetate dose proportionality in healthy postmenopausal women. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73: 46.

31. Chandrasekaran A, McKeand W, Sullivan P, DeMario W, Stoltz R, Scatina J. Metabolic Disposition of [14C] Bazedoxifene in healthy postmenopausal women. Wyeth Research 2009.
32. Chandrasekaran A, Ermer J, McKeand W, et al. Bazedoxifene acetate metabolic disposition in healthy postmenopausal women (abstract P47). Clin Pharmacol Ther, 2003; 73.
33. Archer DF. Tissue-Selective Estrogen Complexes A Promising Option for the Comprehensive Management of Menopausal Symptoms. Drugs Aging, 2010; 27 (7): 533-544.
34. Gibson GG, Skett P. Introduction to drug metabolism, Nelson Thornes, Velika Britanija, 2001: 68-70.
35. David B. Buckley and Curtis D. Klaassen. Tissue- and Gender-Specific mRNA expression of UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) in Mice. Drug Metab. Dispos. 2007; 35: 121-127.
36. Maria Jose Gomez-Lechon, Jose Vincente Castell, Maria Teresa Donato. Hepatocytes- the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. Chemico-biological interactions 2007; 168 (1):30-50.
37. Woolf TF. Handbook of Drug Metabolism. Marcel Dekker, New York, Basel 1999.
38. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC, Desai PB. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. Toxicol. In Vitro. 2006; 20(2):135-5334, 35, 36.
39. Appelova reakcija, dostop preko spleta: http://en.wikipedia.org/wiki/Appel_reaction, dne 10.04.2011.

40. Appelova reakcija, dostop preko spleta:

<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/appel-reaction.shtm>, dne 10.04.2011.

41. Paula Yurkanis Bruice, University Of California, Santa Barbara, Pearson International Edition: Essential Organic Chemistry: 330.