

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA POLJANEC

**SINTEZA IMIDAZOLSKIH DERIVATOV TOKSINA KLATRODINA  
S POTENCIALNIM APOPTOTIČNIM DELOVANJEM**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012



ANA POLJANEC

**SINTEZA IMIDAZOLSKIH DERIVATOV TOKSINA KLATRODINA  
S POTENCIJALNIM APOPTOTIČNIM DELOVANJEM**

**THE SYNTHESIS OF IMIDAZOLE DERIVATIVES OF TOXIN  
CLATHRODIN WITH POTENTIAL APOPTOTIC EFFECT**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Eksperimentalni del diplomske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za nasvete in strokovno pomoč. Še posebej se zahvaljujem somentorju doc. dr. Žigi Jakopinu, mag.farm. za ves vložen trud, čas, pomoč in vodenje pri izvajjanju eksperimentalnega dela. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi pomagali pri opravljanju eksperimentalnega dela, še posebej ge. Damijani Zalar. Posebno zahvalo pa namenjam družini in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani in me spodbujali.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko naložo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ana Poljanec

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.  
Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

**VSEBINA**

<b>I. POVZETEK .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>II. SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>v</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. ALKALOIDI .....	2
1.1.1. Delitev alkaloidov .....	3
1.1.1.1. Pravi alkaloidi .....	3
1.1.1.2. Protoalkaloidi .....	4
1.1.1.3. Psevdoalkaloidi .....	4
1.1.2. Interakcije alkaloidov .....	5
1.1.3. Toksičnost alkaloidov .....	5
1.1.4. Alkaloidi v naravi in njihova uporaba .....	6
1.2. OROIDINSKI ALKALOIDI .....	6
1.3. KLATRODIN .....	10
1.3.1. Klatrodin in vpliv na natrijeve kanalčke .....	10
1.3.1.1. Natrijevi kanalčki .....	10
1.3.1.2. Vpliv na kanalčke .....	14
1.3.2. Klatrodin in vpliv na apoptozo .....	15
1.3.2.1. Apoptoza .....	15
1.3.2.1.1. Intrinzična pot .....	16
1.3.2.1.2. Ekstrinzična pot .....	17
1.3.2.2. Vpliv na apoptozo .....	18
2. NAMEN DELA .....	23
2.1. REAKCIJSKE SHEME .....	25
3. MATERALI IN METODE .....	28
3.1. MATERIALI .....	28
3.2. METODE .....	28
3.2.1. Kromatografske metode .....	28

3.2.2. Spektroskopske metode.....	29
3.2.3. Določanje tališča .....	30
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>31</b>
4.1. SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-NITROFENIL)-2,3-DIHIDRO-1 <i>H</i> -IMIDAZO[1,2- <i>a</i> ]PIRIMIDIN-4-IJEVEGA BROMIDA (1).....	31
4.2. SINTEZA 2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOLA (2).....	32
4.3. SINTEZA TERC-BUTIL-2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (3).....	33
4.4. SINTEZA TERC-BUTIL -2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (4).....	34
4.5. SINTEZA METIL 2-(2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-IL)ACETATA (5) .....	35
4.6. SINTEZA METIL 2-(2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-IL)ACETATA (6) .....	36
4.7. SINTEZA 1-BENZIL-4-(4-NITROFENIL)-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-2-AMINA (7).....	37
4.8. SINTEZA 4-(4-AMINOFENIL)-1-BENZIL-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-2-AMINA (8) .....	38
4.9. SINTEZA TERC-BUTIL 4-(4-((1 <i>H</i> -PIROL-2-IL)METILAMINO)FENIL)-2-AMINO-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (9) .....	39
4.10. SINTEZA TERC-BUTIL 4-(4-((1 <i>H</i> -IMIDAZOL-4-IL)METILAMINO)FENIL)-2-AMINO-1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (10) .....	41
4.11. SINTEZA TERC-BUTIL 2-AMINO-4-(4-((TIOFEN-2-IL)METILAMINO) -1 <i>H</i> -IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (11) .....	42
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>45</b>
5.1. CIKLOKONDENZACIJA IN SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLA .....	45
5.2. ZAŠČITA Z BOC-ANHIDRIDOM TER UVEDBA BENZILBROMIDA IN METILBROMOACETATA NA IMIDAZOLNI DUŠIK.....	46
5.3. REDUKCIJA NITRO SKUPINE .....	48
5.4. REDUKTIVNO AMINIRANJE.....	48
5.5. TVORBA AMIDNE VEZI.....	50
5.6. ODSTRANJEVANJE DI-TERC-BUTILKARBONATA (BOC ZAŠČITE) .....	52
5.7. TESTIRANJE APOPTOTIČNE AKTIVNOSTI.....	54
<b>6. SKLEPI .....</b>	<b>56</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>58</b>

## I. POVZETEK

Alkaloidi so sekundarni metaboliti rastlin, živali in gliv, praviloma sestavljeni iz heterocikličnega sistema in alifatske verige. Večina alkaloidov ima močan biološki učinek in deluje na različne organske sisteme. Nevrotoksin klatrodin, ki ga proizvajajo sružve *Agelas clathrodes*, sodi med oroidinske alkaloide in je znan po svojem antiserotonergičnem in antiholinergičnem učinku. Ugotovili so tudi, da ima zaviralni učinek na natrijeve kanalčke in vpliv na apoptozo celic.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali derivate nevrotoksina klatrodina s potencialnim apoptotičnim učinkom. Iz začetnih reagentov 2-aminopirimidina in 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona smo, z reakcijami ciklokondenzacije, hidrazinolize, zaščite imidazolnega obročnega dušika in redukcije nitro skupine, sintetizirali ključni intermediat **4** (*terc*-butil-2-amino-4-(4-aminofenil)-1H-imidazol-1-karboksilat). V nadaljevanju smo z intermediatom **4** izvedli reakcije reduktivnega aminiranja z različnimi aldehidi, da smo prišli do končnih spojin *terc*-butil 4-((1*H*-pirol-2-il)metilamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**9**), *terc*-butil 4-(4-((1*H*-imidazol-4-il)metilamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**10**) in *terc*-butil 2-amino-4-(4-((tiofen-2-il)metilamino)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**11**). Namesto *terc*-butiloksikarbonilne skupine smo na imidazolni obročni dušik uvedli benzilno in metil acetatno skupino, a se tovrstne spojine v nadaljnjih reakcijah niso pokazale kot ustrezne, saj jih ni bilo mogoče reduktivno aminirati. Končni spojini **9** in **10** so testirali na njun vpliv na apoptozo in izkazali sta se kot spojini z nizko apoptotično aktivnostjo.

## ABSTRACT

Alkaloids are secondary metabolites of plants, animals and fungi, which usually consist of heterocyclic system and aliphatic chain. Most of them exert a strong biological effect on various organic systems. Neurotoxin clathrodin, produced by sponges *Agelas clathrodes*, belongs to oroidin alkaloids and it has antiserotonergic and antiholinergic effect. They have also discovered that clathrodin has an inhibitory effect on sodium channels and effect on cell apoptosis.

In the framework of my thesis we synthesized derivatives of neurotoxin clathrodin with potential apoptotic effect. The starting reagents 2-aminopyrimidin and 2-bromo-1-(4-nitrophenyl)ethanone underwent cyclocondensation, followed by hydrazinolysis, protection of imidazole nitrogen and reduction of nitro group afford the key intermediate **4** (*tert*-butyl-2-amino-4-(4-aminophenyl)-1H-imidazole-1-carboxylate). Afterwards we performed reductive amination reactions with intermediate **4** and various aldehydes thereby producing the final compounds *tert*-butyl 4-((1*H*-pyrrole-2-yl)methylamino)phenyl)-2-amino-1H-imidazole-1-carboxylate (**9**), *tert*-butyl 4-((1*H*-imidazole-4-yl)methylamino)phenyl)-2-amino-1H-imidazole-1-carboxylate (**10**) and *tert*-butyl 2-amino-4-(4-((thiophene-2-yl)methylamino)phenyl)-1H-imidazole-1-carboxylate (**11**). Instead of (using only) *tert*-butyloxycarbonylic group we also used benzyl and methyl acetate groups on the imidazole nitrogen, however these substituents have not proved as appropriate in further reactions, since reductive amination reactions with such compounds were not possible. The final compounds **9** and **10** were tested for their influence on apoptosis and they have shown a low apoptotic effects.

## II. SEZNAM OKRAJŠAV

<b>Akt</b>	kinaza, ki uravnava apoptozo
<b>Apaf-1</b>	<i>apoptosis protease activating factor 1</i> -aktivacijski faktor apoptotičnih proteaz
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>Bad</b>	<i>Bcl-2 associated death promoter</i> – z Bcl-2 povezani promotorji smrti
<b>Bak</b>	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> – Bcl-2 homologni antagonist/ubijalec
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2 associated x protein</i> – z Bcl-2 povezan x protein
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i> – B-celica limfoma 2
<b>Bcl-xL</b>	<i>B-cell lymphoma extra large</i> – ekstra velike B-celice limfoma
<b>BID</b>	<i>BH3 interacting domain agonist</i> – agonist, ki reagira z BH3 domeno
<b>Bik</b>	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i> – Bcl-2 antagonist/ubijalec
<b>Bim</b>	<i>Bcl-2 like protein</i> – Bcl-2 podoben protein
<b>BOC</b>	di-terc-butil dikarbonat
<b>Bok</b>	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i> – z Bcl-2 povezan ubijalec jajčnikov
<b>CD95</b>	receptor smrti
<b>d</b>	dublet
<b>DD</b>	<i>death domain</i> – domena smrti
<b>DED</b>	<i>death effector domain</i> – efektor domene smrti
<b>DISC</b>	<i>death inducing signaling complex</i> – signalni kompleks, ki inducira smrt
<b>DMAP</b>	4-(N',N'-dimetilamino)piridin
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i> - deoksiribonukleinska kislina
<b>ESI</b>	<i>electrospray ionization</i> – ionizacija z elektro-razprševanjem
<b>FADD</b>	<i>Fas associated death domain</i> – s Fas povezana domena smrti
<b>Fas</b>	<i>apoptosis stimulating fragment</i> – fragment, ki stimulira apoptozo

<b>FasI</b>	Fas ligand
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography –</i> visokoločljivostna tekočinska kromatografija
<b>HRMS</b>	<i>high resolution mass spectrometry –</i> masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>ICAD</b>	<i>caspase activated DNase inhibitor –</i> s kaspazami aktiviran inhibitor DNAze
<b>IC50</b>	50-odstotna inhibitorna koncentracija
<b>IL</b>	interleukin
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b>m</b>	multiplet
<b>Mcl-1</b>	<i>myeloid cell leukemia 1-</i> mieločna celica leukemije 1
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex –</i> glavni histokompatibilni kompleks
<b>Mr</b>	molekulska masa
<b>MS</b>	masna spektroskopija
<b>NMM</b>	N-metilmorfolin
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance –</i> jedrska magnetna resonanca
<b>PARP</b>	<i>poly(ADPribose)polymerase –</i> poli(ADPriboza)polimeraza
<b>Pd/C</b>	paladij na ogljiku
<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>s</b>	singlet
<b>Smac/DIABLO</b>	mitohondrijski protein
<b>T</b>	temperatura
<b>t</b>	triplet
<b>TBTU</b>	N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography -</i> tankoplastna kromatografija
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor -</i> tumorje nekrotizirajoči faktor
<b>TNRF</b>	<i>tumor necrosis factor receptor –</i> receptor tumor nekrotizirajočega faktorja

**TRAIL**

*TNF - related apoptosis- inducing ligand* – s TNF povezan  
induktor apoptoze

## 1. UVOD

Rastline so avtotrofni organizmi in so glavni vir hrane tako za živali kot za mikroorganizme. Rastline ne morejo zbežati ali se fizično boriti proti rastlinojedcem, prav tako nimajo pridobljenega imunskega sistema (protiteles), ki bi jih zavaroval pred patogenimi bakterijami, gobami, virusi in paraziti. Zaradi tega so razvile različne strategije za borbo proti rastlinojedcem, mikroorganizmom, parazitom in virusom ter tudi pri borbi s sosednjimi rastlinami za prostor, svetlobo, vodo in hrano.

Rastline so razvile tako fizikalne kot kemijske načine obrambe. Med fizikalne sodijo: neprebavljiva celična stena s celulozo, ligninom ali kalozo, hidrofobna povrhnjica (penetracijska bariera), debelo lubje in korenine (proti izgubi vode), bodice in trni (proti rastlinojedcem) ter visoka sposobnost za regeneracijo delov rastline ob poškodbi.

Poleg fizikalnih načinov pa imajo rastline visoko sposobnost za proizvajanje raznolikih kemijskih produktov, ki so poznani tudi pod imenom sekundarni metaboliti. Kemijski način obrambe vključuje tudi makromolekulske spojine, kot so proteini, polisaharidi in politerpeni, vendar so le-te manj raznolike in izrazite, kot sekundarni metaboliti, ki imajo nižjo molekulsko maso in so jih v rastlinah identificirali že več kot 100.000. Mednje sodijo tudi alkaloidi.

Sekundarni metaboliti so večinoma multifunkcionalni, saj ima v večini primerov posamezen alkaloid lahko več bioloških vlog. Tekom razvoja je prišlo do spremembe strukture alkaloidov, tako da sedaj posamezen alkaloid vsebuje več funkcionalnih skupin, ki lahko interagirajo s tarčnimi molekulami. (1)

Carl F.W.Meissner je leta 1819 prvi uporabil izraz alkaloid. Izraz izhaja iz korena latinske besede alkali, ki pa dejansko izhaja iz arabske besede *al qualja*, kar pomeni »pepel rastlin«. Pepel rastlin je bil, v preteklosti, vir pridobivanja bazičnih snovi. Od tod tudi povezava med arabsko besedo *al qualja* in izrazom alkaloidi.

Začetek študij alkaloidov sega v 19. stoletje, ko je nemški kemik Friedrich Sertürner izoliral morfij iz opija. Pomemben prispevek h kemiji alkaloidov sta dodala še francoska raziskovalca Pierre Joseph in Joseph Bienaimé Caventou, ki sta odkrila kinin (1820) in strihnin (1818). V tistem času so odkrili tudi ksantin (1817), atropin (1819), kofein (1820), nikotin (1828), kolhicin (1833), spartein (1851) in kokain (1860). Prvo popolno sintezo alkaloida, in sicer koniina, je leta 1886 izvedel nemški kemik Albret Ladenburg. Koniin je sintetiziral z reakcijo med 2-metilpiridinom in acetaldehidom ter sledečo redukcijo

nastalega 2-propenilpiridina z natrijem. Kemični razvoj alkaloidov se je pospešil v 20. stoletju s pojavom spektroskopskih in kromatografskih metod. To je doprineslo k hitrejši identifikaciji alkaloidov in tako je bilo do leta 2008 identificiranih že več kot 12.000 alkaloidov, po nekaterih virih pa že celo več kot 21.000. (1, 2)

### 1.1. Alkaloidi

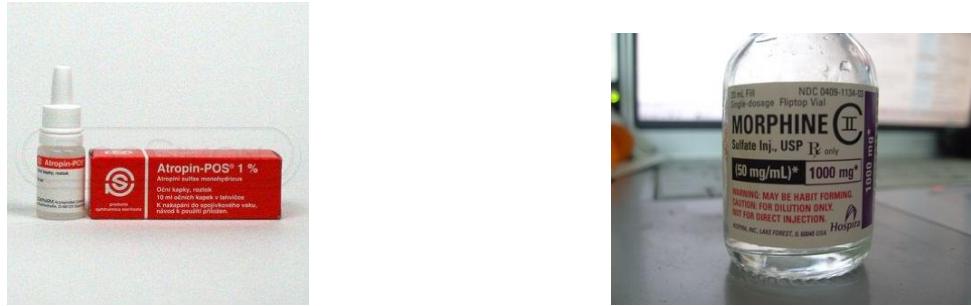
Alkaloide večinoma proizvajajo rastline. Najbolj so razširjeni v kritosemenkah (slika 1), medtem ko jih praprotnice, mahovi in golosemenke (slika 1) le redko vsebujejo. V rastlinah se nahajajo na različnih mestih, največ pa jih je v semenu, skorji in koreninah. Navadno so vezani na rastlinske kisline (jabolčna, vinska, mlečna) in čreslovine, redkeje pa so v prosti obliki. Na količino alkaloidov v rastlinah vplivajo klima, letni čas, sestava tal in drugi dejavniki. Večinoma imajo močan biološki učinek in jih zaradi tega uvrščamo med strupe. Različni alkaloidi imajo učinke na različne organske sisteme (npr. kokain na periferno in osrednje živčevje, atropin na holinergični sistem itd.). Vsi, razen nikotina, ki je tekočina, so trdne snovi brez barve in vonja, a z grenkim okusom. Alkaloidi so v vodi slabo topni, v organskih topilih (eter, kloroform) pa dobro. Zanje velja, da so optično aktivni. Večina alkaloidov je bazičnih, kar je razvidno tudi iz imena (koren besede alkaloid; alkal-), medtem ko sta teobromin in teofolin amfoterna. Na bazičnost vpliva razpoložljivost prostega elektronskega para na dušiku. Sestavljeni so iz heterocikličnega sistema, ki vsebuje dušik in ogljik ter alifatske verige, ki lahko vsebuje druge elemente. (3, 4)



Slika 1: Kritosemenka (5), golosemenka (6) in alga (7).

Tudi v medicini njihova uporaba ni tuja, saj imajo različna farmakološka delovanja. Delujejo antiaritmično (ajmalin), antiholinergično (atropin (slika 2), skopolamin), protitumorno (vinblastin, vinkristin), antihipertenzivno (vinkamin), proti kašlju (kodein), anestetično (kokain), analgetično (morphin (slika 2)), inhibitorno na acetilholin esterazo (fizostigmin), mišično relaksantno (tubokurarin), antipiretično (kvinin), simpatomimetično

(ergot alkaloidi). Prav tako pa se alkaloidi lahko zlorabljajo kot psihoaktivne droge (opij, kokain, hašiš). Alkaloidi so strukturno podobni nekaterim nevrotransmiterjem (acetilholin, noradrenalin) in zaradi tega povzročijo blokado njihove vezave na receptor. (2, 8)



Slika 2: Farmacevtska oblika atropina (9) in morfina (10).

### 1.1.1. Delitev alkaloidov

Alkaloide po Wintersteinu in Tieru lahko razdelimo glede na njihove značilnosti:

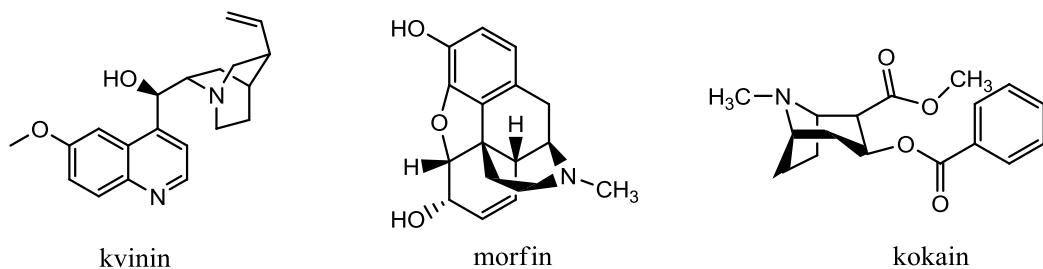
- glede na toksičnost
- glede na bazične lastnosti
- glede na pozicijo dušika
- glede na sintezo iz aminokislin ali njihovih neposrednih derivatov
- glede na razširjenost v naravi.

Prav tako jih lahko delimo glede na kemijsko strukturo, biološki učinek in biosintezno pot. (1, 11)

Glede na njihov biosintezni izvor in položaj dušika jih delimo v tri skupine:

#### 1.1.1.1. Pravi alkaloidi

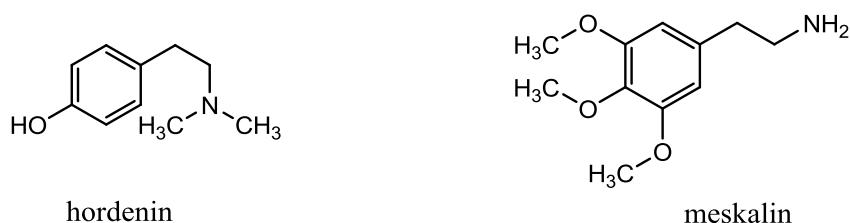
Pravi alkaloidi izhajajo iz aminokislin in vsebujejo heterocikličen obroč z dušikom. So zelo reaktivni in biološko aktivni tudi v nizkih odmerkih ter imajo grenak okus. Vsi razen nikotina, ki je rjava tekočina, so bele trdne snovi. Večina je kristaliničnih substanc, ki reagirajo s kislinami in tvorijo soli. V rastlinah se lahko pojavijo v prosti obliki, v obliki soli ali v obliki dušikovega oksida. Primarni predhodniki pravih alkaloidov so aminokisline L-ornitin, L-lizin, L-fenilalanin/L-tirozin, L-triptofan in L-histidin. Med prave alkaloide sodijo npr. kokain, kvinin, dopamin in morfin (slika 3).



Slika 3: Strukturne formule pravih alkaloidov kvinin, morfina in kokaina (11).

### 1.1.1.2. Protoalkaloidi

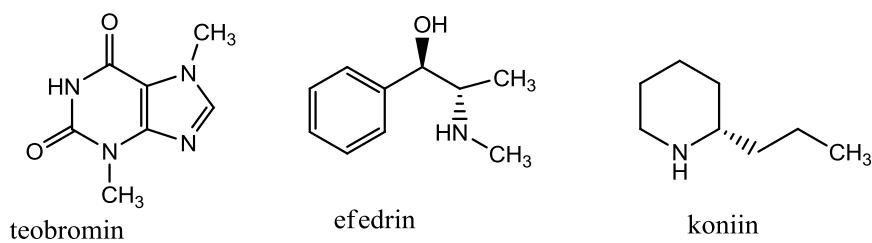
Protoalkaloidi so produkti aminokislin, ki imajo dušikov atom izven aromatskega obroča in se biosintetizirajo iz L-tirozina in L-triptofana. Kljub temu, da imajo zaprt obročni sistem, so strukturno enostavniji alkaloidi. Predstavljajo manjšino vseh alkaloidov. Mednje sodita hordenin in meskalin (slika 4).



Slika 4: Strukturni formuli protoalkaloidov hordenina (12) in meskalina (13).

### 1.1.1.3. Psevdoalkaloidi

Psevdoalkaloidi ne nastanejo iz aminokislin, so pa povezani z njihovo presnovno potjo. Nastanejo lahko tudi iz neaminskih prekurzorjev, saj se dušikov atom zelo pozno vnese v molekulo. V to skupino sodijo npr. koniin, kapsaicin, efedrin, kofein in teobromin (slika 5). (11)



Slika 5: Strukturne formule psevdoalkaloidov teobromina (14), efedrina (15) in koniina (16).

### 1.1.2. Interakcije alkaloidov

Med alkaloidi razlikujemo med tistimi, ki lahko tvorijo kovalentne vezi s proteini in nukleinskimi kislinami in tistimi, ki modulirajo konformacijo proteinov in nukleinskih kislin z nekovalentnimi vezmi.

Do tvorbe kovalentnih vezi pride pri interakciji med proteini in naslednjimi funkcionalnimi skupinami alkaloidov:

- aldehidna skupina z aminsko in tiolno skupino
- eksociklična metilenska skupina s tiolno skupino
- epoksid s proteini in DNA
- kinonska struktura s kovinskimi ioni ( $\text{Fe}^{2+}$  /  $\text{Fe}^{3+}$ )

Nekovalentne vezi pa nastanejo pri interakciji določenih skupin alkaloidov in proteinov:

- ionska vez (alkaloid s fenolno hidroksilno skupino, ki lahko disociira do fenolatnega iona)
- vodikova vez (aldehid s hidroksilno, karbonilno ali keto skupino)
- van der Waalsove in hidrofobne interakcije (lipofilne substance).

Molekule, ki vsebujejo dušik, kot so alkaloidi, amini in peptidi, lahko tvorijo s pozitivno nabitim dušikovim atomom ionsko vez z negativno nabito karboksilno skupino glutaminske in asparaginske kisline v proteinih. Kovalentne in nekovalentne vezi modulirajo konformacijo proteina, ki je pomembna za njegovo aktivnost, kar lahko vodi do izgube ali zmanjšanja aktivnosti proteina, in posledično do inhibicije encima, inaktivacije receptorja ali motnje pomembnih interakcij med samimi proteini. (1)

### 1.1.3. Toksičnost alkaloidov

Številni alkaloidi so znani po svojih toksičnih učinkih na živalih in ljudeh. Večina smrtonosnih alkaloidov sodi v skupino nevrotoksinov, drugi pa imajo citotoksične učinke. Citotoksični učinki se pokažejo, ko celična membrana postane prepustna, ali ko pride do inhibicije elementov citoskeleta.

DNA je prav tako možna tarča alkaloidov, saj se planarni in lipofilni alkaloidi lahko vrinejo med par komplementarnih nukleotidov v dvojni vijačnici DNA, kar lahko moti njeno podvajanje, popravljanje in delovanje DNA topoizomeraze. Nekateri alkaloidi (pirolizidinski alkaloidi) tvorijo kovalentne vezi z bazami DNA, kar lahko privede do mutacij in nastanka tumorjev.

Citotoksični učinki niso specifični za živali, ampak vplivajo tudi na bakterije, rastline in viruse. (1)

#### **1.1.4. Alkaloidi v naravi in njihova uporaba**

Že od nekdaj so alkaloidi znani po svoji biološki aktivnosti. Uporabljali so jih v šamanizmu, tradicionalni medicini z rastlinami za zdravljenje bolezni in kot orožje za obrambo in med lovom. Ljudje še vedno iščejo možnosti za njihovo varno uporabo in posledično koristi za zdravje. Lahko jih označimo kot najbolj uporabne in hkrati najbolj nevarne produkte narave. Največ alkaloidov vsebujejo višje razvite rastline. Hegnauer je določil, da se rastline, ki vsebujejo več kot 0,01% alkaloidov, označijo kot rastline z alkaloidi, saj v manjših koncentracijah alkaloidi nimajo aktivnosti in vpliva na biološke tarče. (11)

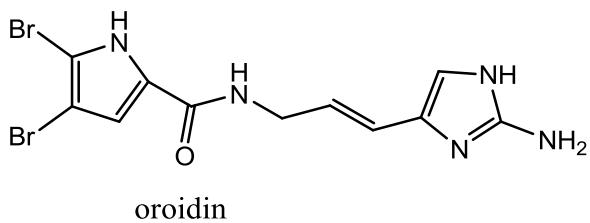
### **1.2. Oroidinski alkaloidi**

Morski organizmi vsebujejo različne kemijske spojine, kar predstavlja enega izmed odgovorov na stresne dejavnike v okolju (kemična obramba). V proizvodnji biološko aktivnih sekundarnih metabolitov prednjačijo spužve. Njihovi sekundarni metaboliti delujejo protivirusno, protivnetno (inhibicija sproščanja arahidonske kisline), protirakavo (inhibicija proteinske kinaze), antimalarialsko, antibiotično in protiglivno. (17, 18, 19)

Preglednica I: Sekundarni metaboliti spužev - njihova struktura, delovanje in izvor (20, 21, 22, 23).

Metabolit	Delovanje	Izvor
<b>Avarol</b> 	protivnetno, protivirusno	<i>Dysidea avara</i>
<b>Leukaskandrolid</b> 	antibiotično, protiglivno	<i>Leucascandra caveolata</i>
<b>Menzamin A</b> 	protimalarično, protibakterijsko, citotoksično	<i>Haliclona sp.</i>
<b>Aureol</b> 	citotoksično, antivirusno,	<i>Smeonspongia aurea</i>

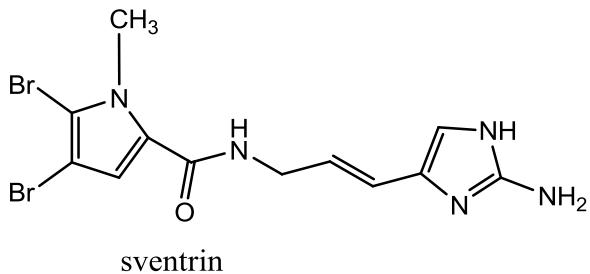
Oroidinski alkaloidi so poznani tudi pod imenom bromopirolni alkaloidi. Prvi predstavnik te skupine je oroidin, ki so ga izolirali leta 1971 iz spužve rodu *Agelas oroides*, kasneje pa še iz drugih spužev. Oroidin (slika 6) je glavni metabolit iz te skupine alkaloidov. Številni drugi alkaloidi vsebujejo pirol-imidazolni fragment in jih štejemo med derivate oroidina s C<sub>11</sub>N<sub>5</sub> strukturo. Ugotovili so, da se spužve iz rodu *Agelas* s pomočjo bromopirolnih alkaloidov branijo pred plenilskimi ribami. Tudi celice spužev so zaradi delovanja teh alkaloidov varne pred mikroorganizmi. Bromopirolni alkaloidi niso pomembni samo zaradi svoje zaščitne vloge in kemotoksičnosti, ampak tudi zaradi svojih številnih farmakoloških učinkov (antiadrenergični, antiserotonergični, antihistaminski, protiglivni).



Slika 6: Strukturna formula oroidina, glavnega predstavnika oroidinskih alkaloidov (1).

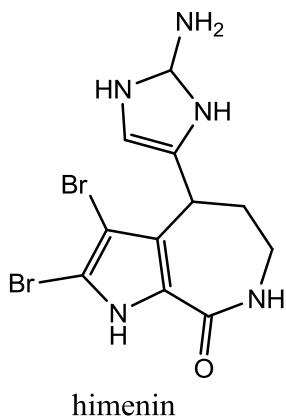
Glede na kemijsko strukturo jih delimo na:

- linearne monomere oroidina - vsebujejo strukturo oroidina, brez dodatnih alkilnih ali alkilaminskih vezi (slika 7)



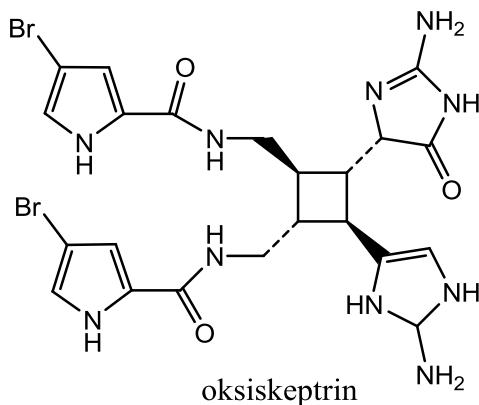
Slika 7: Strukturna formula linearne monomera oroidina, sventrina (1).

- policiklične derivate oroidina - produkti ciklizacije oroidina ali oroidinu podobnih monomerov (slika 8)



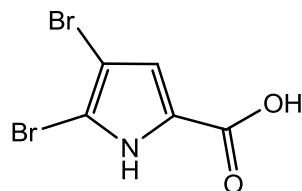
Slika 8: Strukturna formula policikličnega derivata oroidina, himenina (1).

- enostavne ali ciklizirane dimere oroidina (slika 9)



Slika 9: Strukturna formula cikliziranega dimera oroidina, oksiskeptrina (1).

- druge bromopirolne alkaloide - niso vključeni v prejšnje skupine, ker ne vsebujejo pirol-imidazolnega fragmenta (slika 10) (1)



Slika 10: Strukturna formula bromopirolnega alkaloida, 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline (1).

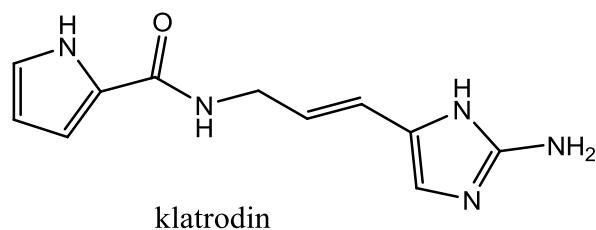
### 1.3. Klatrodin

Nevrotoksin klatrodin proizvajajo spužve rodu *Agelas clathrodes* (slika 11), ki jih najdemo v Karibskem morju.



Slika 11: Morska spužva rodu *Agelas clathrodes* (24, 25).

Klatrodin (slika 12), ki je 2,3-debromo derivat oroidina, ima antiserotonergično in antiholinergično aktivnost, prav tako pa vpliva tudi na natrijeve kanalčke. Pri testiranju delovanja klatrodina na natrijeve kanalčke so namreč ugotovili, da vpliva na zmanjšanje njihove prevodnosti. Stopnja bromiranja pirolnega obroča naj bi vplivala na njegovo učinkovitost, saj se učinek delovanja testiranih alkaloidov (oroidin in himenidin) povečuje s številom bromovih atomov v strukturi. (1)



Slika 12: Strukturna formula klatrodina (1).

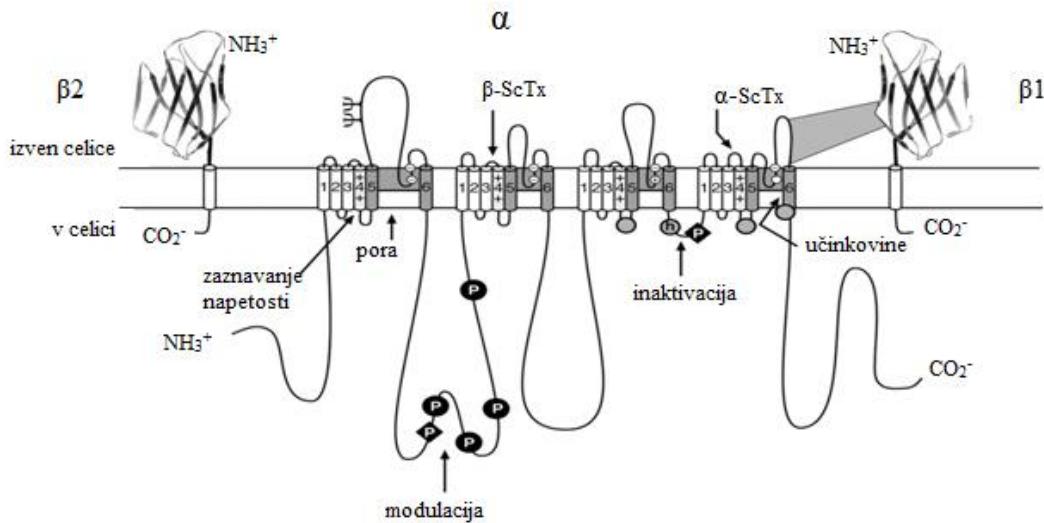
#### 1.3.1. Klatrodin in vpliv na natrijeve kanalčke

##### 1.3.1.1. Natrijevi kanalčki

Napetostno odvisni natrijevi kanalčki pripadajo veliki družini napetostno odvisnih kationskih kanalčkov, ki omogočajo prehod natrija, kalija ali kalcija skozi depolarizirano

membrano. Natrijevi kanalčki, ki se nahajajo v nevronih in skeletnih mišicah, imajo  $\alpha$ -podenoto in  $\beta$ -podenoto, medtem ko v srčnih mišicah njihova struktura še ni poznana. (26)

$\alpha$ -podenota je sestavljena iz štirih domen (I-IV), vsaka od teh pa ima šest transmembranskih segmentov (S1-S6) ter znotrajcelične in zunajcelične zanke (P-zanke). Na vsaki strani je pripeta ena  $\beta$ -podenota ( $\beta 1$  in  $\beta 2$ ), ki je sestavljena iz zunajcelične domene (podobna imunoglobulinom), transmembranskega segmenta in krajše znotrajcelične domene.  $\beta 1$ -odenota se veže na zunajcelični segment  $\alpha$ -odenote, in sicer na šesti segment (S6) četrte domene (IV).  $\alpha$ -odenota določa ionsko selektivnost, poleg tega pa vsebuje poro za prenos ionov, napetostne senzorje, vrata za različna odprta in zaprta stanja kanalčka in vezavna mesta. Natrijevi kanalčki so heterodimerni ali heterotrimerni, kar pomeni, da vsebujejo eno  $\alpha$ -odenoto ter eno ali obe  $\beta$ -odenoti. Sočasna ekspresija obeh podenot poveča hitrost aktivacije in inaktivacije kanalčka (slika 13).



Slika 13: Struktura in delovanje natrijevih kanalčkov (27).

Preglednica II: Tipi natrijevih kanalčkov sesalcev glede na α- oz. β-podenoto (28).

Tip kanalčka	Primarna tkiva, kjer se nahajajo
Na <sub>v</sub> 1.1	centralni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.2	centralni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.3	centralni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.4	skeletne mišice
Na <sub>v</sub> 1.5	srce
Na <sub>v</sub> 1.6	centralni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.7	periferni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.8	periferni živčni sistem
Na <sub>v</sub> 1.9	periferni živčni sistem
Na <sub>x</sub>	maternica, astrociti, hipotalamus

Ker se natrijevi kanalčki še vedno upirajo kristalizaciji, v primerjavi s številnimi kalijevimi kanalčki, so za določitev njihove sekundarne strukture uporabili cirkularni dihroizem (CD) spektroskopijo, pri kateri so potrebne le manjše količine prečiščenih natrijevih kanalčkov. Poleg CD spektroskopije so uporabili tudi sinhrotronski sevalni cirkularni dihroizem, s katerim so razširili območje nižjih valovnih dolžin (180-200 nm) in s tem odkrili dodatne lastnosti v sekundarni strukturi kanalčkov. Prečiščene kanalčke iz jegulje (*Electrophorus electricus*) so vnesli v planarni lipidni dvosloj in nato preučili njihovo funkcijo, učinek deglikozilacije in vezave učinkovin.

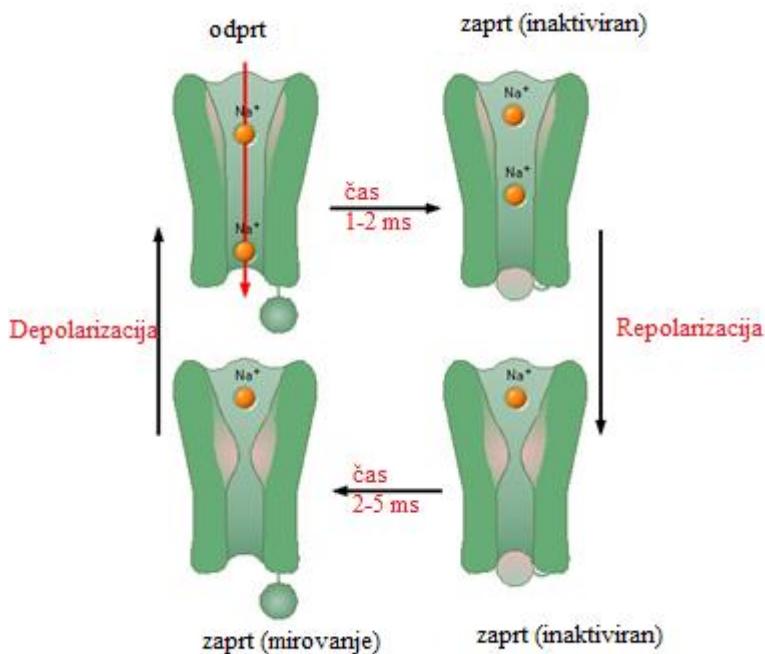
Približno 30 % mase natrijevih kanalčkov predstavljajo ogljikovi hidrati, v obliki verige sestavljene iz N-acetylheksozamina in sialične kisline. Ugotavljali so, kakšen vpliv ima odstranitev le-teh na funkcijске in strukturne lastnosti visoko prečiščenih kanalčkov. Po encimski deglikozilaciji so kanalčke vnesli v lipidni dvosloj. V prisotnosti batrahotosinska (alkaloid), ki prepreči hitro inaktivacijo, so lahko preučevali posamične dogodke v

aktiviranem kanalčku in ugotovili, da je imel deglikoziliran kanalček slabšo prevodnost od kanalčka s prvotno strukturo. Te elektrofiziološke spremembe so posledica elektrostatičnega učinka zaradi zmanjšanja negativnega naboja (prisoten v ogljikovih hidratih - sialična kislina) v prostoru pred vstopom v kanalček. Iz rezultatov proučevanja natrijevih kanalčkov so sklepali, da ogljikovi hidrati v njih ne vplivajo na funkcijске in strukturne lastnosti kanalčkov, ampak imajo učinek na njihovo prevodnost. (29)

Pri ugotavljanju sekundarne strukture natrijevih kanalčkov so preizkus opravili tudi na napetostno odvisnih natrijevih kanalčkih iz *Arcobacter butzleri* (NavAb). Bakterijski kanalčki družine NaChBac so pomemben model za študije povezave med strukturo in funkcijo bolj kompleksnih natrijevih in kalcijevih kanalčkov vretenčarjev, saj je NaChBac homotetramer in je njegov farmakološki profil podoben farmakološkemu profilu natrijevih in kalcijevih kanalčkov. Bakterijski natrijevi kanalčki so zelo selektivni za natrij, vendar se z enostavno mutagenezo lahko pretvorijo v kanalčke selektivne za kalcij. Družina NaChBac verjetno predstavlja prednika natrijevih in kalcijevih kanalčkov vretenčarjev. Z analizo NavAb od *Arcobacter butzleri* dobimo vpogled v strukturo natrijevih in kalcijevih kanalčkov, ki so napetostno odvisni, ionoselektivni in jih lahko blokirajo različna zdravila. (30)

Za aktivacijo napetostno-odvisnega natrijevega kanalčka mora priti do premika transmembranskega segmenta S4, ki vsebuje štiri do osem ponovljivih motivov pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov (arginin), čemur sledita še dva hidrofobna aminokislinska ostanka. Njihov premik je posledica depolarizacije membrane. Kljub premiku segmenta S4, proti zunajcelični strani celične membrane, ob spremembi transmembranske napetosti, ta segment, ohrani svojo transmembransko pozicijo tudi v aktivnem stanju.

Za inaktivacijo je odgovorna znotrajcelična zanka med domenama III in IV  $\alpha$ -podenote. Vrata za inaktivacijo se prepognejo pri glicinskem paru in se pomaknejo v strukturo kanalčka ter s tem blokirajo poro. Hitra inaktivacija je potrebna za sposobnost prevajanja akcijskega potenciala in regulacijo vzdražnosti živčnih in mišičnih celic (slika 14). (31)

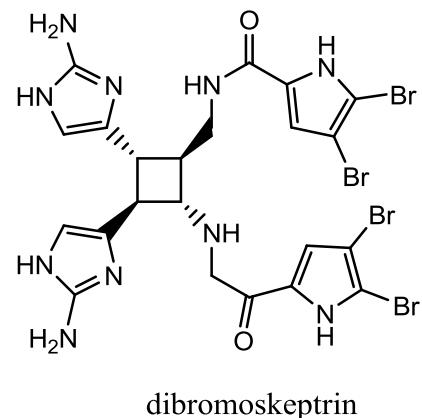
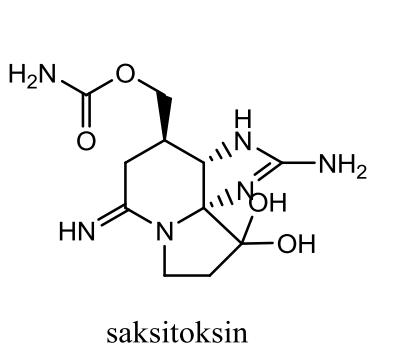


Slika 14: Aktivacija in inaktivacija natrijevih kanalčkov (32).

### 1.3.1.2. Vpliv na kanalčke

Morski organizmi proizvajajo produkte s specifičnim učinkom na receptorje in kanalčke v živčnem in mišičnem sistemu, zaradi česar so odlični za preučevanje.

Klatrodin in dibromoskeptrin (slika 15) sta alkaloida z nevrotoksičnim učinkom. Oba sta za 27 - 40 % zmanjšala povprečno maksimalno amplitudo aktivnih natrijevih kanalčkov v celicah izoliranih iz simpatičnega ganglija piščančjih zarodkov. Klatrodin in dibromoskeptrin se vežeta na mesto v kanalčku, kamor bi se vezal saksitoksin. (33) Saksitoksin (slika 15) je nevrotoksični alkaloid, ki je prisoten v morskih bitjih. Povzroči depolarizacijo nevronov, tako da blokira napetostno-odvisne natrijeve kanalčke in zaradi tega pride do paralize mišic. (34) S študijo so ugotovili, da dibromoskeptrin zavira vezavo saksitoksina za 90 %, klatrodin pa zgolj za 30 %. Ob vezavi, na vezavno mesto saksitoksina, ti spojini vplivata na natrijeve kanalčke preko različnih mehanizmov, in sicer dibromoskeptrin jih inaktivira, medtem ko klatrodin zmanjša njihovo prevodnost. (33)



Slika 15: Strukturni formuli saksitoksina (35) in dibromoskeptrina (36).

### 1.3.2. Klatrodin in vpliv na apoptozo

#### 1.3.2.1. Apoptoza

Celice se delijo in umirajo, kar je pomembno predvsem v tkivih, ki se obnavljajo. Celična smrt je lahko posledica nekroze ali apoptoze. Nekroza je posledica fizikalnih poškodb, medtem ko je apoptoza genetsko nadzorovana celična smrt. Apoptoza sprožijo različni dražljaji, kot so okolje, virusne okužbe, nepravilno uravnavanje nadzora rasti celic, poškodba celic ter zlasti izguba povezav celica-celica ali celica-substrat. Apoptoza torej prepreči, da bi poškodovane celice ostajale v tkivu in predstavlja varnostni mehanizem. Pri apoptizi ne pride do vnetnega odgovora kot pri nekrozi, saj pride do uničenja celic na način, ki minimalno prizadene okoliške celice in tkivo. (37)

Glavno vlogo pri uravnavanju apoptoze imajo encimi imenovani kaspaze, ki sodijo med aspartat-specifične cisteinske proteaze. Pri sesalcih poznamo 14 podtipov kaspaz, izmed katerih podtipi 2, 3, 6, 7, 8, 9 in 10 sodijo med apoptotične kaspaze, in sicer podtipi 2, 8, 9 in 10 sprožijo apoptozo, medtem ko jo kaspaze podtipov 3, 6 in 7 izvršijo. V celicah so kaspaze prisotne v obliki neaktivnih proencimov, sestavljenih iz treh podenot, N-terminalne podenote, velike podenote s cisteinom v aktivnem mestu in C-terminalne podenote. Po aktivaciji nastanejo tetramerji iz dveh majhnih in dveh velikih podenot. (38, 40) Kaspaze cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartat. Tetrapeptidno zaporedje je označeno s črkami P1, P2, P3 in P4. Na mestu P1, ki se nahaja na C-terminalnem koncu, je vedno aspartat. Na mestu P2 so različne aminokisline, na mestu P3 je navadno glutamat, mesto P4 pa določa substratno specifičnost posameznih kaspaz in se nahaja na N-terminalnem koncu. (39, 41)

Kaspaza 3 je glavna izvršilna kaspaza, ki skupaj s kspazami 6 in 7 razgrajuje številne celične proteine. Kaspaza 3 deluje na ICAD (caspase activated DNase inhibitor) in sicer se s cepitvijo ICAD aktivira nukleaza, ki razgradi molekulo DNA na fragmente različnih velikosti.(38) Kaspaza 3 pa cepi tudi jedrni protein PARP (poly(ADPribose)polymerase), ki omogoča obnovo molekule DNA. (42)

Obstajata dve poti, ki vodita v apoptozo:

- intrinzična (notranja) pot
- ekstrinzična (zunanja) pot

#### **1.3.2.1.1. Intrinzična pot (slika 16)**

Intrinzična pot poteka preko mitohondrijev in jo regulirajo proteini iz družine Bcl-2, za katere je značilno, da v svojem zaporedju vsebujejo eno ali več konzervativnih domen (BH1, BH2, BH3, BH4).

Glede na funkcijo delimo proteine družine Bcl-2 v dve skupini:

- aktivatorji apoptoze - proapoptotični proteini (Bid, Bax in Bad)
- inhibitorji apoptoze – antiapoptotični proteini (Bcl-2, Mcl-1 in Bcl-xl)

Glede na strukturo pa delimo proteine družine Bcl-2 v tri skupine:

- antiapoptotični proteini z vsemi štirimi domenami (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 in A-1)
- proapoptotični proteini z domenami BH1, BH2 in BH3 (Bax, Bak in Bok)
- proapoptotični proteini z BH3 domeno (Bid, Bad in Bim)

Razmerje med proapoptotičnimi in antiapoptotičnimi proteini družine Bcl-2 vpliva na proces apoptoze.

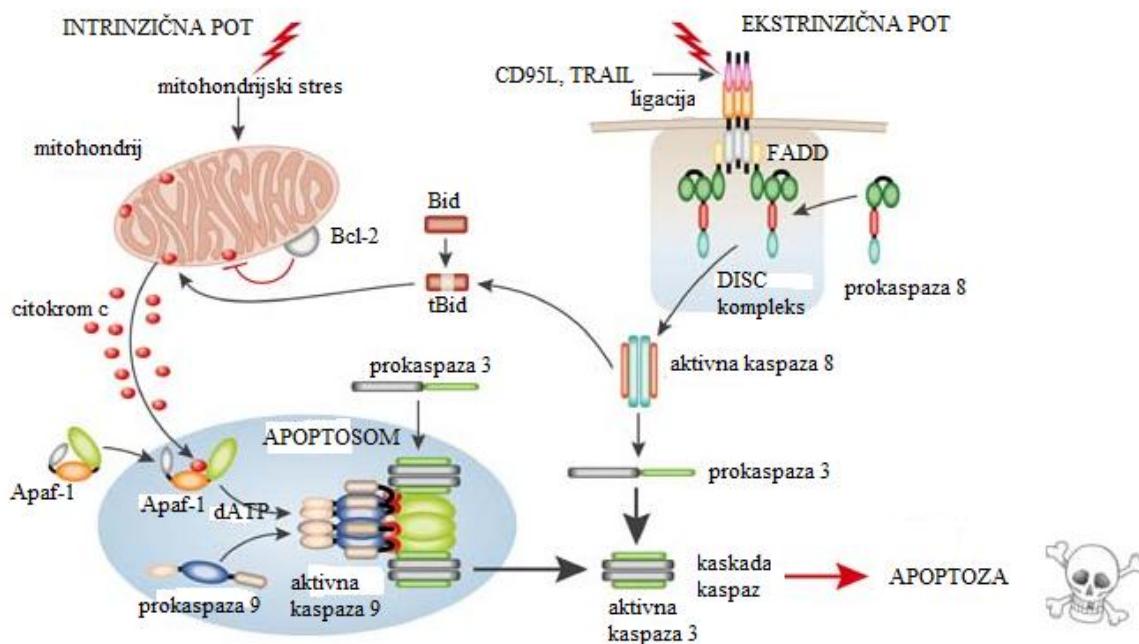
Antiapoptotični proteini se nahajajo na zunanjih mitohondrijskih membranah, proapoptotični pa so prisotni tudi v citosolu. Znotrajcelični signali za apoptizo (poškodbe DNA, rakaste transformacije, virusne okužbe, stresne razmere) povzročijo konformacijske spremembe in prenos proapoptotičnih proteinov na mitohondrijsko membrano. Na mitohondrijski membrani proapoptotični proteini reagirajo z antiapoptotičnimi proteini, kar povzroči nastanek por in sproščanje citokroma c, induksijskega faktorja apoptoze, proteina

Smac/DIABLO (antagonist inhibitorjev apoptoze) in drugih proapoptotičnih faktorjev. (38, 43) Sproščeni citokrom c se veže na Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1), v odvisnosti od ATP povzroči njegovo oligomerizacijo, tako da nastane kompleks med Apaf-1, citrokromom c in prokaspazo podtipa 9. Ta kompleks se imenuje apoptosom, ki aktivira prokaspazo podtipa 9 do kaspaze podtipa 9, ta pa nato aktivira kaspazi podtipov 3 in 7. (44)

#### **1.3.2.1.2. Ekstrinzična pot** (slika 16)

Ekstrinzična pot poteka preko receptorjev smrti, med katere sodijo receptorji TNFR-1, CD 95 in TRAIL. Ti receptorji imajo na zunanjji strani s cisteinom bogata mesta, ki jih prepozna specifični ligandi. Na notranji strani (citoplazemski strani) pa vsebujejo DD (death domain) področje, kamor se veže adaptorska molekula. Adaptorske molekule imajo dve vezavni mesti. Z domeno DD se vežejo na DD področje receptorja z domeno DED (death effector domain) pa na istoimensko domeno prokaspaze 8. Aktivirana kaspaza 8 nato aktivira izvršilne kaspaze.

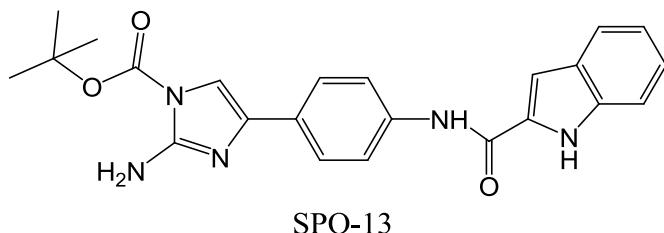
V določenih celicah ne zadostuje samo aktivacija receptorjev smrti za sprožitev kaskade, ampak je potrebno signal ojačati z aktivacijo mitohondrijske poti. Ti dve poti povezuje protein BID (BH3 interacting domain agonist). Kaspaza 8 povzroči njegovo cepitev, nato se protein pomakne do mitohondrija in pomaga drugim proapoptotičnim proteinom pri inducirjanju sproščanja citrokroma c in drugih proapoptotičnih mitohondrijskih faktorjev. (39, 45)



Slika 16: Intrinzična in ekstrinzična pot apoptoze (46).

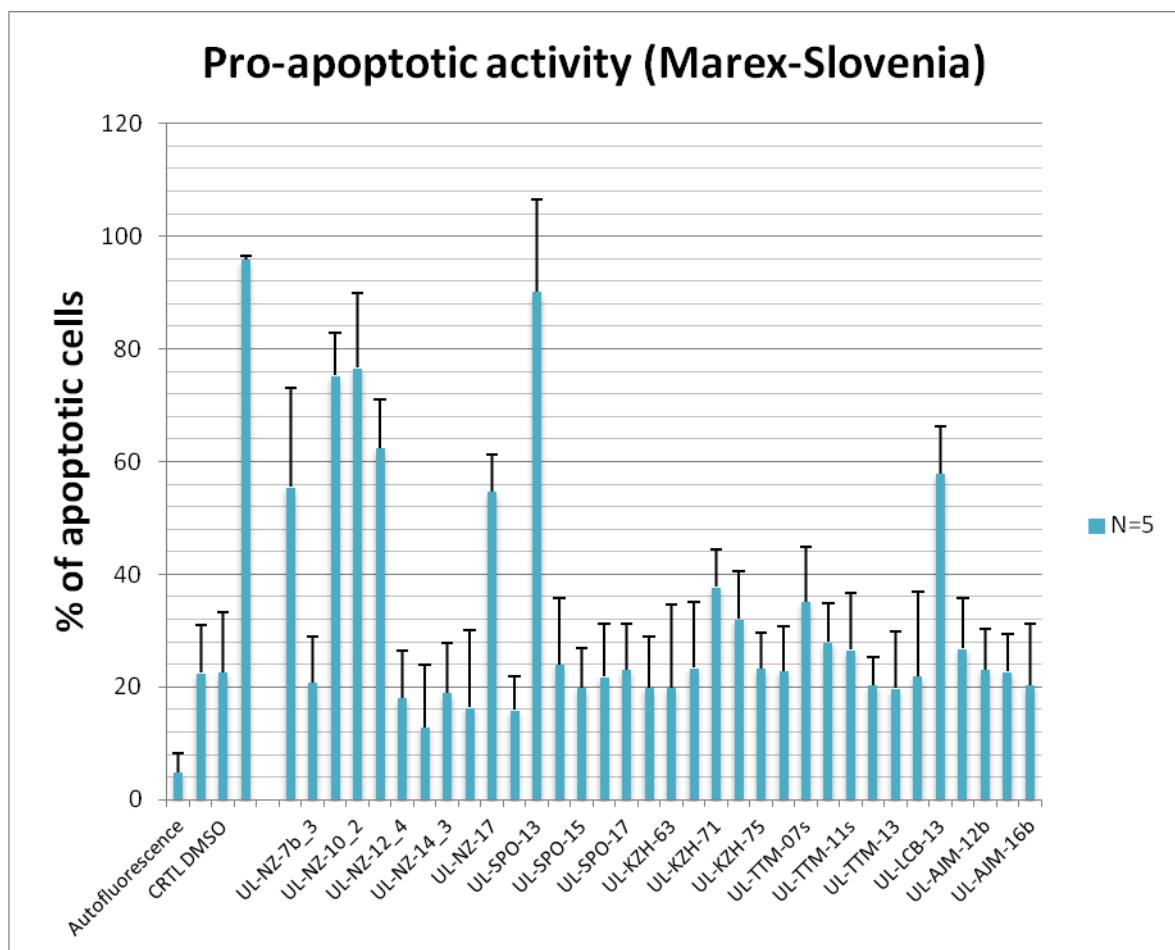
### 1.3.2.2. Vpliv na apoptozo

V okviru projekta Marex, kjer ugotavljajo povezavo med strukturo in delovanjem derivatov nevrotoksičnega klatrodina, so sintetizirali spojino vodnico **SPO-13** (slika 17).



Slika 17: Strukturna formula spojine vodnice (**SPO-13**) (47).

Spojino vodnico in druge spojine so testirali na njihov vpliv na apoptozo in rezultati so prikazani na spodnjem grafu.



Slika 18: Odstotek apoptotičnih celic pri testiranju posameznih spojin.

Graf prikazuje odstotek apoptotičnih celic pri testiranjih posameznih spojin, katerih strukture so poznane, ni pa še poznana povezava med njihovo strukturo in delovanjem.

Preglednica III: Posamezne spojine in njihova učinkovitost na apoptozo celic.

Oznaka spojine	Struktura spojine	Ime spojine	Koncentracija	% apoptotičnih celic
		klatrodin	50 μM	25.2
		oroidin	50 μM	34.7

NZ-17		5-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1H-imidazol-3-ijev klorid	50 µM	54.7
NZ-4c		N-(3-(2-amino-1-(1H-pirol-2-karbonil)-1H-imidazol-5-il)fenil)-1H-pirol-2-karboksamid	50 µM	55.5
LCB-13		N-((2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)metil)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid	50 µM	57.8
NZ- 11_4		terc-butil 2-amino-5-(3-(1-(terc-butoksikarbonill)pirolidin-2-karboksamido)fenil)-1H-imidazol-1-karboksilat	50 µM	62.4
NZ-8		terc-butil 5-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat	50 µM	75.2
SPO-13		terc-butil 4-(4-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat	50 µM	90.1

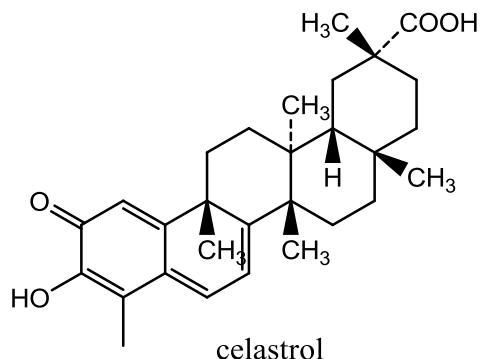
Na podlagi tega grafa lahko vidimo, da ima največjo apoptotično aktivnost spojina **SPO-13**, iz katere smo izhajali pri načrtovanju novih spojin, ki bi dale vpogled v odnos med strukturo in delovanjem. Poleg te spojine dobro apoptotično aktivnost izkazujejo tudi spojine, ki imajo aromatsko aminske skupine na meta mestu glede na imidazol.

Pri apoptotičnem testiranju so ugotovili, da je proapoptotični učinek spojine vodnice (**SPO-13**) primerljiv z učinkom celastrola ( $50 \mu\text{M}$ ).

Celastrol (slika 19) je naravna spojina pridobljena iz tradicionalne kitajske zdravilne rastline *Tripterygium wilfordii* Hook. Zanimiva je zaradi svojega potencialnega protivnetnega in protitumornega delovanja, še vedno pa niso jasni molekulski mehanizmi celastrola, ki povzročajo apoptozo rakavih celic. S študijami so že ugotavljali učinek celastrola na celice pljučnega raka (NSCLC) A549 *in vitro* in ugotovili, da celastrol povzroča tako koncentracijsko odvisno kot tudi časovno odvisno inhibicijo rasti celic A 549 z  $\text{IC}_{50} 2,12 \mu\text{M}$  v 48 urah. Celastrol inducira tudi apoptozo celic A 549, kar potrjuje obarvanje z aneksinom V/propidijevim jodidom in fragmentacija DNA. Za apoptozo povzročeno s celastrolom je značilna cepitev kaspaz podtipov 9, 8 in 3 in proteina PARP, zmanjšanje ekspresije Fas in Fasl in redukcija mitohondrijskega membranskega potenciala. Celastrol tudi inducira sprostitev citokroma c in vpliva na ekspresijo proapoptotičnega Bax in antiapoptotičnega Bcl-2 ter inhibira fosforilacijo Akt. Ti rezultati kažejo, da celastrol povzroči apoptozo človeških celic NSCLC A549 preko aktivacije tako mitohondrijske kot s Fasl posredovane poti. (48)

Zaradi svojega močnega antioksidativnega in protivnetnega delovanja, predstavlja celastrol eno izmed možnosti za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznjijo so znaki nevronske degeneracije povezani z označevalci mikroglialne aktivacije, vnetjem in oksidativnimi poškodbami. Prisotnost nitrotirozina v celičnih telesih nevronov pri Alzheimerjevi bolezni potrjuje, da naj bi peroksinitril prispeval h patogenezi bolezni. Učinkovina z antioksidativnim in protivnetnim učinkom naj bi preprečevala nevronske degeneracije pri Alzheimerjevi bolezni. Ugotovili so, da celastrol v nanomolarnih koncentracijah zavira produkcijo citokinov TNF- $\alpha$  in IL-1 $\beta$ , prav tako pa tudi zmanjša izražanje molekul MHC razreda II, ki jih proizvajajo mikroglije. Nižje koncentracije celastrola, ki so jih aplicirali podganam, so signifikantno izboljšale njihovo zmogljivost spomina, učenja in psihomotorično aktivnost. Močan antioksidativni učinek in protivnetno delovanje celastrola vplivata na kognitivne funkcije in zaradi tega bi lahko bila učinkovina

primerna za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, ki jih spremlja vnetje, kot je Alzheimerjeva bolezen.

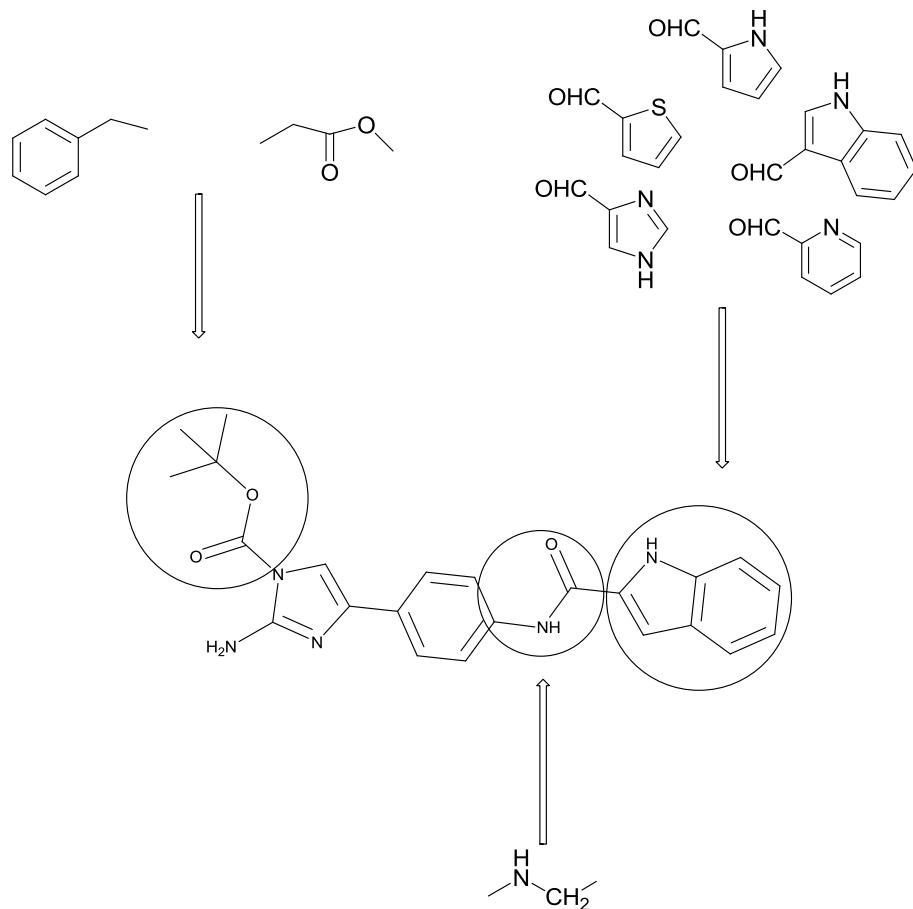


Slika 19: Strukturna formula celastrola (49).

## 2. NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela bomo poskušali sintetizirati imidazolne derivate nevrotoksičnega klatrodina in jih ustrezzo spektroskopsko in fizikalno-kemijsko karakterizirati. Pri načrtovanju spojin bomo izhajali iz spojine *terc*-butil 4-(4-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat (**SPO-13**), za katero je že bila ugotovljena visoka učinkovitost na apoptozo celic.

Da bi ugotovili povezavo med strukturo in delovanjem za spojine, ki oponašajo delovanje nevrotoksičnega klatrodina, bomo temu primerno spremnigli posamezne fragmente vezane na spojini vodnici (**SPO-13**), saj bo to lahko pripomoglo k nadalnjim ugotovitvam povezave med strukturo in delovanjem. V ta namen bomo amidno vez spojine vodnice reducirali do ustrezne metilen aminske, z uporabo reduktivnega aminiranja. Namesto *terc*-butilosikarbonilne skupine pa bomo na imidazolni dušik poskusili uvesti tudi drugačne substituente, kot sta benzilna in metil acetatna skupina (slika 20).



Slika 20: Spremembe na spojini vodnici (**SPO-13**).

V prvi stopnji bomo sintetizirali 2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2-*a*]pirimidin-4-ijev bromid (**1**), ki ga bomo nato s hidrazinolizo v mikrovalovnem reaktorju pretvorili v 2-amino-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol (**2**). Tega bomo v nadaljevanju zaščitili z BOC-anhidridom in tako dobili *terc*-butil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**3**), ki ga bomo s sledečim katalitskim hidrogeniranjem pretvorili do *terc*-butil -2-amino-4-(4-aminofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**4**), ki je izhodna spojina za nadaljnje reakcije reduktivnega aminiranja. Uporabili bomo različne aldehyde: pirol-2-karboksaldehid, imidazol-4-karboksaldehid, indol-3-karboksaldehid, tiofen-2-karboksaldehid in piridin-2-karboksaldehid. Sintetizirati bomo poskušali *terc*-butil 4-((1*H*-pirol-2-il)metilamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**9**), *terc*-butil 4-((1*H*-imidazol-4-il)metilamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**10**), *terc*-butil 2-amino-4-((tiofen-2-il)metilamino)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**11**), *terc*-butil 4-((1*H*-indol-3-il)metillamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**12**), in *terc*-butil 2-amino-4-(4-(piridin-2-il)metilamino)fenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**13**).

Poleg tega pa bomo na imidazolni dušik spojine **2** poskusili uvesti še druge substituente namesto *terc*-butiloksikarbonilne skupine. Uporabili bomo benzilbromid in metilbromoacetat ter tako dobili metil 2-(2-amino-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-1-il)acetat (**5**) in 1-benzil-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazol-2-amin (**7**). Obe spojini bomo katalitsko hidrogenirali in tako predvidoma pripravili metil 2-(2-amino-4-(4-aminofenil)-1*H*-imidazol-1-il)acetat (**6**) in 4-(4-aminofenil)-1-benzil-1*H*-imidazol-2-amin (**8**).

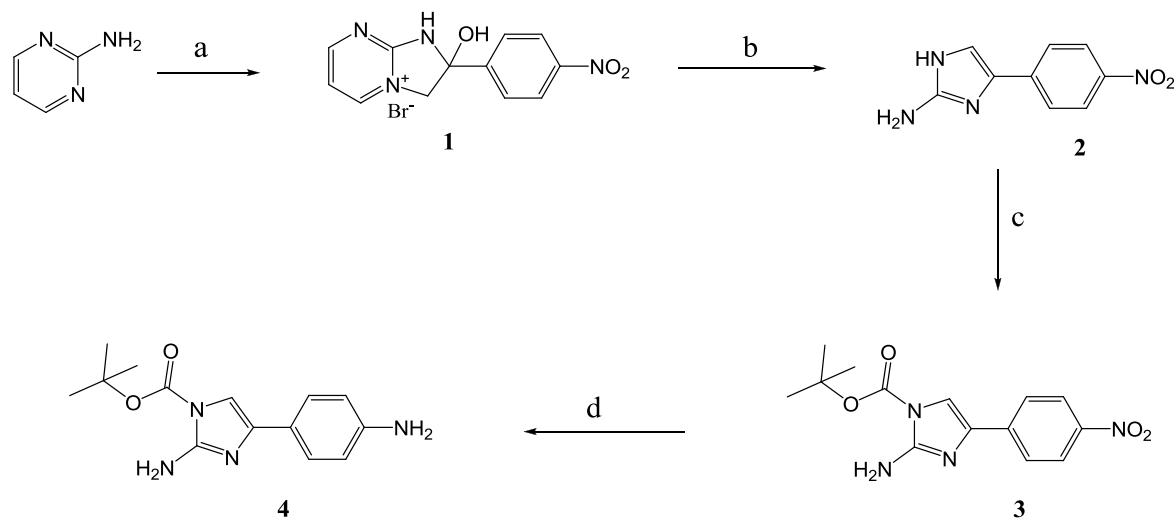
Poskusili bomo sintetizirati tudi naslednje amidne analoge spojine **SPO-13**: N-(4-(2-amino-1-benzil-1*H*-imidazol-4-il)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamid (**17**) in metil 2-(4-(4-(1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-il)acetat (**18**), pri čemer bomo kot kislino uporabili pirol-2-karboksilno kislino. Na spojini (**8**) bomo poskusili izvesti reduktivno aminiranje s pirol-2-karboksaldehidom in tako pripraviti 4-(4-((1*H*-pirol-2-il)metilamino)fenil)-1-benzil-1*H*-imidazol-2-amin (**14**).

Spojini **9** bomo z reakcijo acidolize poskusili odstraniti BOC-zaščito in s tem dobili 4-((1*H*-pirol-2-il)metilamino)fenil)-2-amino-1*H*-imidazol-1-ijev klorid (**16**).

Produkte vseh sinteznih stopenj bomo nazadnje očistili in potrdili njihovo strukturo z NMR, IR in MS, čistoto pa s HPLC, elementno analizo in določitvijo intervala temperature tališča.

## 2.1. REAKCIJSKE SHEME

Reakcijska shema 1: Sinteza intermediata **4**.



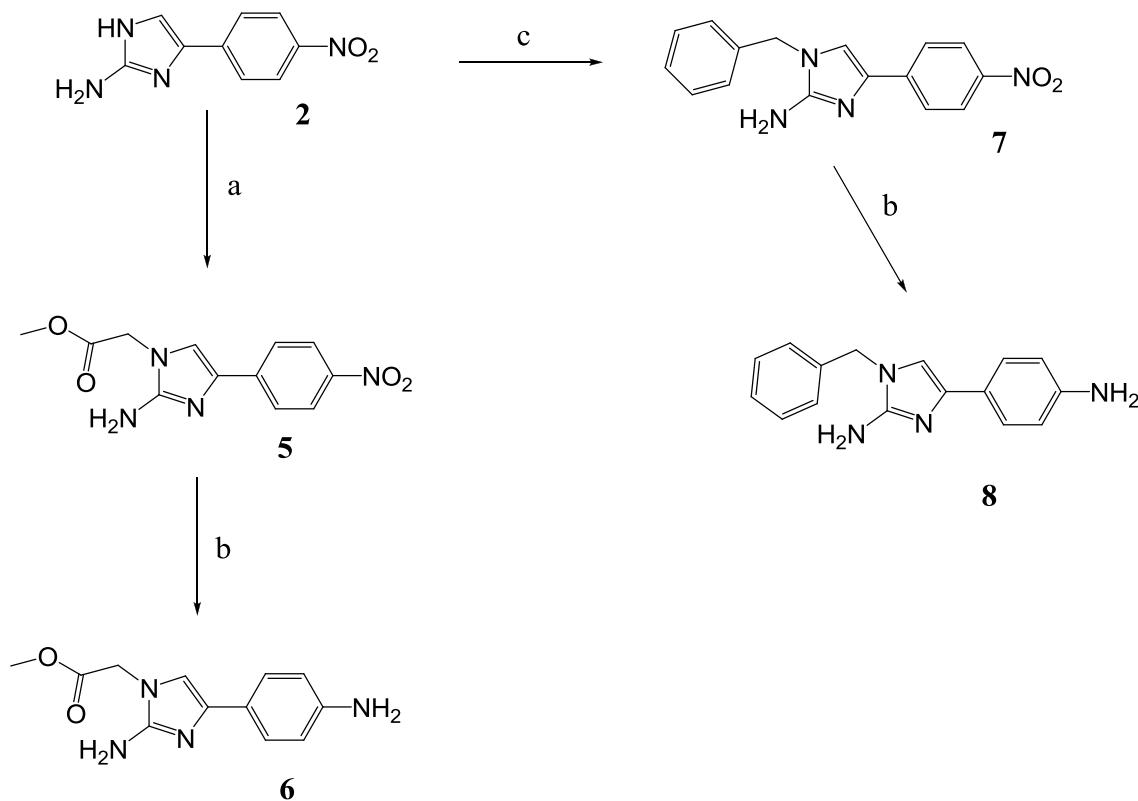
**a:** 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanon, DMAP, acetonitril, T= 85°C

**b:** 55 % hidrazin hidrat, absolutni etanol, mikrovalovni reaktor

**c:** DMAP, BOC-anhidrid, destilirana voda, metanol, T= 60°C

**d:** vodik, Pd/C, THF

Reakcijska shema 2: Uvedba substituentov na imidazolnem dušiku in sledеča redukcija nitro skupine.

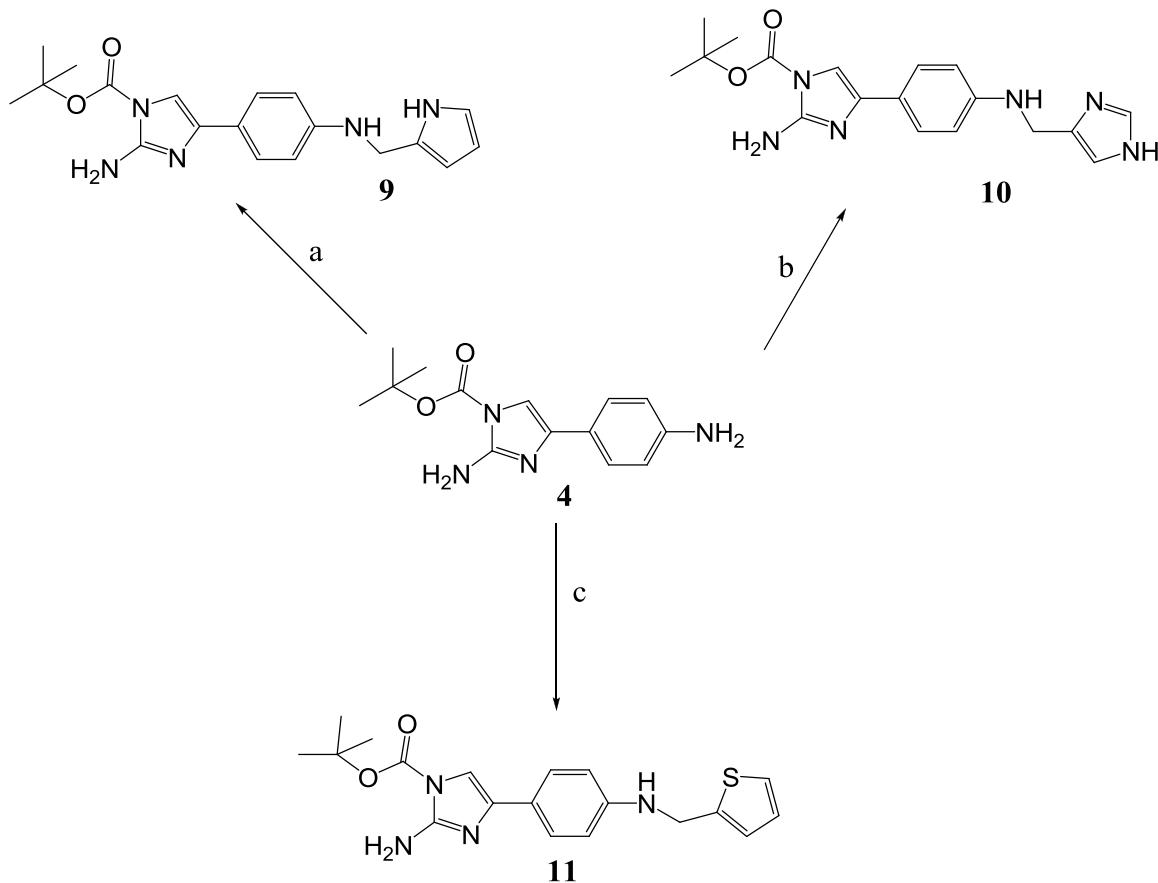


**a:** metilbromoacetat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , acetonitril, destilirana voda,  $\text{NaCl}$ ,  $T = 60^\circ\text{C}$

**b:** vodik,  $\text{Pd/C}$ , THF

**c:** benzilbromid,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetonitril

Reakcijska shema 3: Reakcije reduktivnega aminiranja.



**a:** pirol-2-karboksaldehid, CH<sub>3</sub>COOH, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, THF

**b:** imidazol-4-karboksaldehid, CH<sub>3</sub>COOH, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, THF

**c:** tiofen-2-karboksaldehid, CH<sub>3</sub>COOH, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, THF

### 3. MATERALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

- **Reagenti in topila**

Pri sinteznem delu in kromatografskih ločbah smo uporabili reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Janssen in Merck. Uporabili smo jih brez čiščenja in sušenja.

- **Poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12.0, proizvajalca CambridgeSoft.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

S pomočjo tankoplastne kromatografije smo spremljali potek reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij. Uporabljali smo plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20x20 cm. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda=254$  nm in orositvena reagenta ninhidrin za detekcijo aminov in 2,4-dinitrofenilhidrazin za detekcijo aldehidov.

- **Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje spojin. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60) proizvajalca Merck s premerom delcev 0,04-0,063 mm (flash silikagel) in kot mobilno fazo smo uporabili različna topila.

- **Mobilne faze**, ki smo jih uporabili:

**MF1:** etilacetat/heksan = 1/1

**MF2:** diklorometan/metanol = 9/1

**MF3:** diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub> (prepihanje MF z NH<sub>3</sub>)

**MF4:** etilacetat

**MF5:** diklorometan/metanol = 20/1 + NH<sub>3</sub> (prepihanje MF z NH<sub>3</sub>)

**MF6:** diklorometan/metanol = 30/1 + NH<sub>3</sub> (prepihanje MF z NH<sub>3</sub>)

### 3.2.2. Spektroskopske metode

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Uporabljali smo devterirano topilo DMSO-d<sub>6</sub>. Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRec 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektre so bili posneti na spektrometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo.

- **Masna spektrometrija (MS)**

Masni spektri in HR-MS spektri so bili posneti na spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass z ESI tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan.

- **Elementna analiza (CHN)**

Vsebnosti elementov C, H in N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

- **HPLC**

HPLC analize so bile izvedene na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z detektorjem G1365B UV-VIS pri valovni dolžini λ=254 nm, kolono Luna C18 (4,6 × 150 mm) in pretoku 1 mL/min. Kot mobilno fazo smo uporabili acetonitiril v 0,1 % TFA ter metodo z gradientom 10 – 30 % acetonitrila v 25 minutah, 30 – 80 % acetonitrila od 25. do 27. minute in nato 80 – 10 % acetonitrila od 27. do 29. minute, pri 30. minuti pa se konča z elucijo.

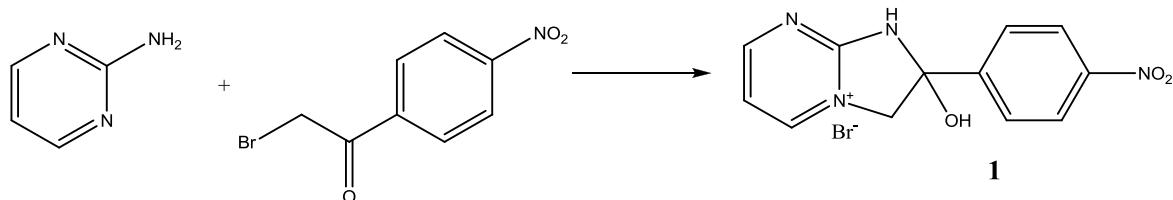
### **3.2.3. Določanje tališča**

Tališča smo določili s talilnim mikroskopom znamke Leica z ogrevalno mizico in niso korigirana.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-NITROFENIL)-2,3-DIHIDRO-1*H*-IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIMIDIN-4-IJEVEGA BROMIDA (1)

#### Reakcija:



#### Postopek:

V 100 ml bučko zatehtamo 1.715 g (18.0 mmol) 2-aminopirimidina in 5.28 g (21.6 mmol) 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona. Zmes raztopimo v 24 ml acetonitrila in dodamo še konico spatule 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Segrevamo v oljni kopeli pri temperaturi 85°C. Po 2.5 h s TLC zaznamo konec reakcije in reakcijsko zmes razredčimo z 20 ml acetona ter nastalo oborino odfiltriramo z odsesavanjem. Spiramo z 2x20 ml acetona in 2x20 ml etra. Produkt zberemo na petrijevki in čez noč sušimo v sušilniku pri 30°C.

#### Rezultati:

**Izgled:** Rumeni kristali

**Izkoristek:** 78.13 % (4.766 g)

**Rf:** 0 (MF 1: etilacetat/heksan = 1/1, MF 2: diklorometan/metanol = 9/1)

**Tališče:** nad 300°C, lit. 320°C (50)

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3410, 3007, 2919, 2148, 1654, 1438, 1407, 1317, 1020, 953, 902, 708

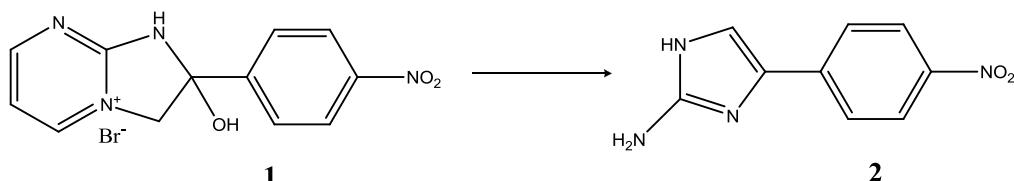
#### **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 4.72 (d, 2H, J=14.4 Hz, -CH<sub>2</sub>)  
 4.88 (d, 1H, J=14.4 Hz, -OH)  
 7.98 (d, 2H, J=9.2 Hz, Ar-H)  
 8.29-8.33 (m, 1H, piridin-H)  
 8.34-8.36 (m, 3H, Ar-H, piridin-H)  
 8.99-9.01 (m, 1H, piridin-H)  
 11.31 (s, 1H, pirol-NH)

**MS(ESI):** 259.1 ( $M\text{-Br}$ )<sup>+</sup>**Mr (izračunana):** 339.14**HRMS:** 259.0837 (izračunana: 259.0831 brez Br)**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Br

## 4.2. SINTEZA 2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1*H*-IMIDAZOLA (2)

### Reakcija:



### Postopek:

V procesno vialo zatehtamo 676 mg (2 mmol) spojine **1** in temu dodamo 5 ml absolutnega etanola ter 815 µl (14 mmol) 55 % hidrazin hidrata. Vialo segrevamo 15 min v mikrovalovnem reaktorju na temperaturi 120°C, pri tlaku 15 barov in z močjo 50 W. Reakcijsko zmes iz viale prelijemo v bučko in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Za kolonsko kromatografijo vzorec raztopimo v mobilni fazi. Nato dodamo silikagel (1.5-krat več kot imamo surovega produkta), odparimo topilo in silikagel z vezanim surovim produktom nanesemo na omočen stolpec silikagela v koloni ter začnemo z elucijo. Iz zbranih frakcij s spojino **2** odparimo topilo in nato zaostanek sušimo v sušilniku pri temperaturi 50°C.

### Rezultati:

**Izgled:** Rdeči kristali**Izkoristek:** 63.16 % (0.256 g)**Rf:** 0.2 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>)**Tališče:** 207-210°C, lit. 208°C (51)**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3448, 3377, 1596, 1579, 1497, 1318, 1093, 852, 722, 617, 490

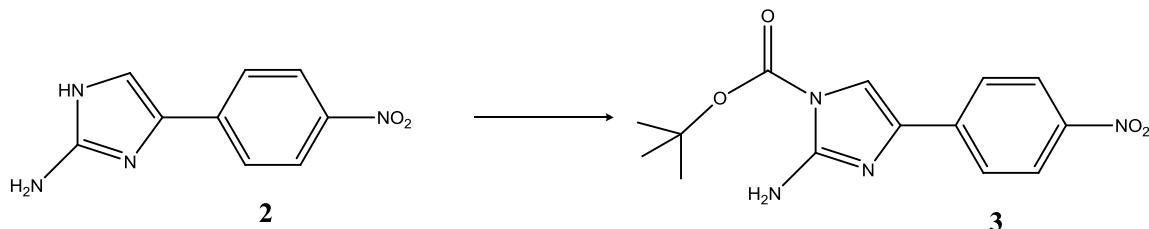
### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

$\delta$  [ppm] = 5.55 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 7.37 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.80 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H)  
 8.11-8.15 (m, 3H, Ar-H, imidazol-NH)

**MS(ESI):** 205.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>**Mr (izračunana):** 204.19**HRMS:** 205.0721 (izračunana: 205.0726)**Elementna sestava:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

### 4.3. SINTEZA TERC-BUTIL-2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1*H*-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (3)

#### Reakcija:



#### Postopek:

V 250 ml bučko zatehtamo 2 g (9.8 mmol) spojine **2** in jo suspendiramo v 20 ml vode ter dodamo 5 ml metanola. Ob mešanju na magnetnem mešalu dodamo 0.1 g (0.98 mmol) DMAP in 6.42 g (29.4 mmol) BOC-anhidrida ter segrevamo v oljni kopeli pri temperaturi 60°C. Ko se zmes začne peniti, dodamo še manjšo količino metanola, da speremo izhodno spojino iz vrata bučke in hladilnika. S TLC spremljamo potek reakcije. Ko po približno 5 h segrevanja zaznamo konec reakcije, reakcijsko zmes odfiltriramo z odsesavanjem in speremo z manjšo količino metanola. Oborino sušimo v sušilniku pri temperaturi 50°C.

#### Rezultati:

**Izgled:** Rumeni kristali

**Izkoristek:** 91.41 % (2.724 g)

**Rf:** 0.93 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>)

**Tališče:** 185-188 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3409, 3273, 3124, 2992, 1737, 1637, 1603, 1540, 1515, 1478, 1437, 1412, 1341, 1313, 1292, 1265, 1211, 1157, 1125, 1106, 856, 844, 783, 770, 750, 721, 670, 637, 596, 541, 516, 494, 459

#### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

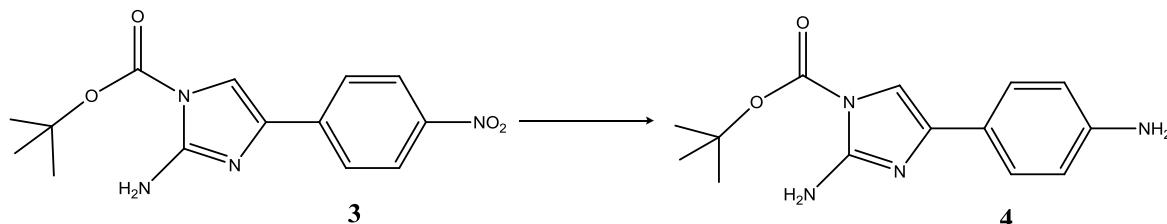
δ [ppm] = 1.60 (s, 9H, 3x CH<sub>3</sub>)

6.73 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 7.72 (s, 1H, imidazol-CH)  
 8.00 (d, 2H, J=8.8 Hz Ar-H)  
 8.21 (d, 2H, J=9.2 Hz Ar-H)

**MS(ESI):** 305.1 (M+H)<sup>+</sup>**Mr (izračunana):** 304.30**HRMS:** 305.1256 (izračunana: 305.1250)**Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

#### **4.4. SINTEZA TERC-BUTIL-2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (4)**

##### **Reakcija:**



##### **Postopek:**

V 50 ml dvogrlo bučko zatehtamo 0.5 g (1.64 mmol) spojine **3** in jo raztopimo v 30 ml THF. Raztopino prepihamo z argonom (cca. 10 min) in dodamo 10 masnih % katalizatorja Pd/C (0.05 g). Zopet prepihamo z argonom (cca. 5 min) in nato ob mešanju na magnetnem mešalu prepipujemo z vodikom. S TLC spremljamo potek reakcije. Po končani reakciji (3 h) katalizator odfiltriramo z odsesavanjem in odparimo topilo ter produkt posušimo pri 40°C.

##### **Rezultati:**

**Izgled:** Rumeno-beli kristali**Izkoristek:** 99.96 % (2.449 g)**Rf:** 0.87 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>)**Tališče:** 147-150 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3451, 3372, 3301, 3050, 2977, 1731, 1655, 1619, 1544, 1510, 1476, 1442, 1358, 1312, 1286, 1257, 1208, 1177, 1157, 1118, 1062, 937, 836, 769, 739, 693, 646, 596, 519, 472

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.56 (s, 9H, 3x CH<sub>3</sub>)  
 5.11 (s, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>)  
 6.49 – 6.53 (m, 4H, imidazol-NH<sub>2</sub>, Ar-H)  
 7.00 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.37 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H)

**MS(ESI):** 275.2 (M+H)<sup>+</sup>

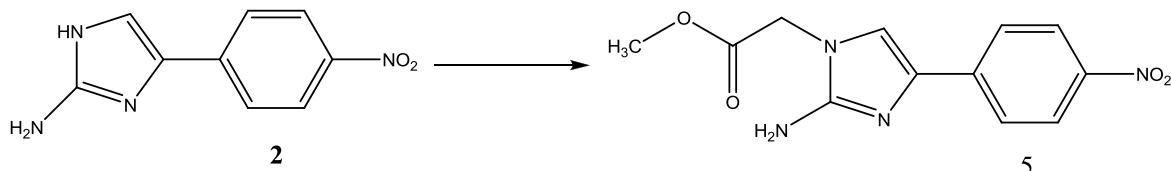
**Mr (izračunana):** 274.32

**HRMS:** 275.1502 (izračunana: 275.1508)

**Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.5. SINTEZA METIL 2-(2-AMINO-4-(4-NITROFENIL)-1H-IMIDAZOL-1-IL)ACETATA (5)

**Reakcija:**



**Postopek:**

100 mg (0.5 mmol) spojine **2** dodamo 7 ml acetonitrila in segrevamo do bistre raztopine. Dodamo 104 mg (0.75 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in mešamo na magnetnem mešalu cca. 5 min ter nato dodamo še 80 µl (0.84 mmol) metilbromoacetata. Zmes segrevamo v oljni kopeli pri temperaturi 60°C in s TLC spremljamo potek reakcije. Ko reakcija poteče, odparimo topilo in reakcijsko zmes raztopimo v 20-30 ml diklorometana ter speremo z 20 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>, 20 ml destilirane vode in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Sledi kolonska kromatografija s suhim nanosom vzorca.

**Rezultati:**

**Izgled:** Oranžni kristali

**Izkoristek:** 53 % (73 mg)

**Rf:** 0.48 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>), 0.31 (MF: diklorometan/metanol = 20:1 + NH<sub>3</sub>)

**Tališče:** 210-213°C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3430, 1750, 1637, 1596, 1508, 1317, 1220, 1108, 997, 942, 853, 737

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 3.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)  
 4.74 (s, 2H, CH<sub>2</sub>)  
 5.82 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 7.40 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.80 (d, 2H, J=9.2 Hz, Ar-H)  
 8.16 (d, 2H, J=9.2 Hz, Ar-H)

**MS(ESI):** 277.1 (M+H)<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 276.25

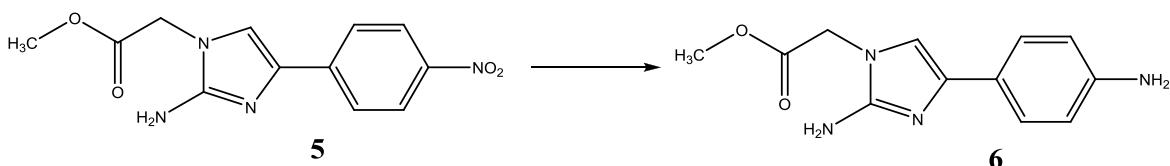
**HRMS:** 277.0934 (izračunana: 277.0937)

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**HPLC:** 100 % (254 nm), t<sub>r</sub> = 16.978 min

#### 4.6. SINTEZA METIL 2-(2-AMINO-4-(4-AMINOFENIL)-1H-IMIDAZOL-1-IL)ACETATA (6)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V dvogrlo bučko zatehtamo 120 mg (0.43 mmol) spojine **5** in jo raztopimo v minimalni količini THF. 10 minut prepihujemo z argonom, dodamo 10 masnih % Pd/C (0.012 g) in zopet 10 min prepihujemo z argonom čemur sledi prepihovanje z vodikom. Po končani reakciji odfiltriramo katalizator in odparimo topilo.

**Rezultati:**

**Izgled:** Oranžno-rumeni kristali

**Izkoristek:** 98 % (104 mg)

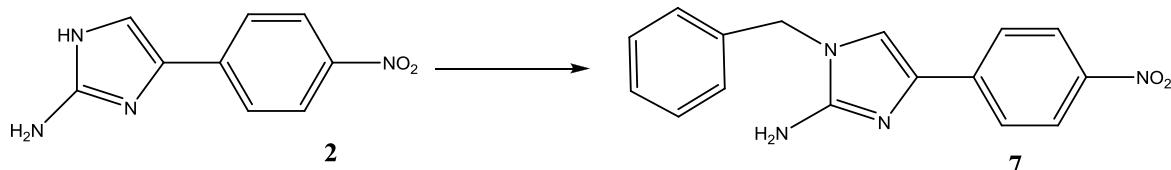
**Rf:** 0.3 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>)

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Op. S surovim produktom smo takoj šli v nadaljnje reakcije, zato o njem nimamo analitičnih podatkov.

#### 4.7. SINTEZA 1-BENZIL-4-(4-NITROFENIL)-1H-IMIDAZOL-2-AMINA (7)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V bučko zatehtamo 203 mg (1 mmol) spojine 2, ji dodamo 15 ml acetonitrila in segrevamo, da se popolnoma raztopi. Dodamo 207 mg (1.5 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ter mešamo še nadaljnjih 5 min, nakar dodamo 163 µl (1.36 mmol) benzil bromida in segrevamo v oljni kopeli pri temperaturi 60°C. S TLC spremljamo potek reakcije. Po končani reakciji reakcijsko zmes odfiltriramo z odsesavanjem in speremo z manjšo količino acetonitrila ter izvedemo kolonsko kromatografijo s suhim nanosom vzorca.

**Rezultati:**

**Izgled:** Oranžni kristali

**Izkoristek:** 86.7 % (255 mg)

**Rf:** 0.62 (MF: diklorometan/metanol = 10/1+NH<sub>3</sub>), 0.16 (MF: diklorometan/metanol = 20/1 + NH<sub>3</sub>)

**Tališče:** 210-215 °C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3411, 3110, 1648, 1595, 1572, 1546, 1501, 1447, 1326, 1204, 1189, 1107, 1071, 972, 944, 852, 732, 698, 492

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

δ [ppm] = 5.02 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>)

5.89 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)

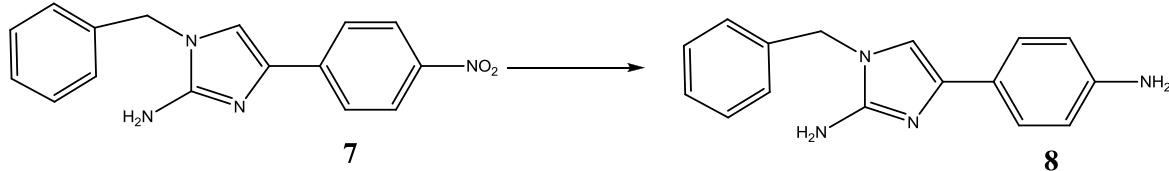
7.25-7.31 (m, 3H, Ar-H)

7.35-7.39 (m, 2H, Ar-H)  
 7.49 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.81 (d, 2H, J=9.2 Hz, Ar-H)  
 8.14 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)

**MS(ESI):** 295.1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>**Mr (izračunana):** 294.31**HRMS:** 295.1192 (izračunana: 295.1195)**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>**HPLC:** 100 % (254 nm), t<sub>r</sub> = 29.450 min

#### 4.8. SINTEZA 4-(4-AMINOFENIL)-1-BENZIL-1H-IMIDAZOL-2-AMINA (8)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V dvorgrlo bučko zatehtamo 118 mg (0.4 mmol) spojine 7, jo raztopimo v THF in prepihujemo z argonom 10 min. Nato dodamo 10 masnih % Pd/C (0.012 g) in zopet prepihujemo z argonom 10 min, čemur sledi prepihovanje z vodikom. S TLC spremljamo potek reakcije. Po končani reakciji odfiltriramo katalizator in odparimo topilo ter dobimo oranžno-rdeče kristale.

##### Rezultati:

**Izgled:** Oranžni-rdeči kristali**Izkoristek:** 97 % (103 mg)**Rf:** 0.4 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>)**Tališče:** 210-214 °C**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3430, 1624, 1508, 1492, 1364, 1180, 1074, 992, 835, 704, 520

##### <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 4.90 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>)

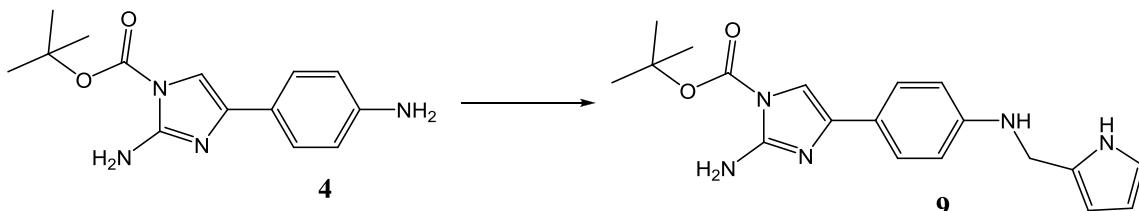
4.92 (s, 2H, Ar-NH<sub>2</sub>)

5.49 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 6.47 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)  
 6.75 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.21-7.28 (m, 5H, Ar-H)  
 7.32-7.36 (m, 2H, Ar-H)

**MS(ESI):** 265.1(M+H)<sup>+</sup>**Mr (izračunana):** 264.33**HRMS:** 265.1446 (izračunana: 265.1453)**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>

#### **4.9. SINTEZA TERC-BUTIL 4-((1H-PIROL-2-IL)METILAMINO)FENIL)-2-AMINO-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (9)**

##### **Reakcija:**



##### **Postopek:**

V bučko zatehtamo 357 mg (1.30 mmol) spojine **4** in jo raztopimo v 18 ml THF. Dodamo 124 mg (1.30 mmol) pirol-2-karboksaldeida, 75 µl (1.30 mmol) ocetne kisline in 386 mg (1.82 mmol) NaBH(OAc)<sub>3</sub>. Mešamo na magnetnem mešalu in s TLC spremljamo potek reakcije. Ker je po 3,5 h še vedno prisoten izhodni aldehyd, dodamo še 193 mg (0.91 mmol) NaBH(OAc)<sub>3</sub> in pustimo mešati čez noč. Po končani reakciji dodamo 18 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in ekstrahiramo z etrom ter nato izvedemo kolonsko kromatografijo s suhim nanosom vzorca. S pomočjo TLC-ja določimo frakcije iz katerih odparimo topilo in dobimo rumeno oranžne kristale.

##### **Rezultati:**

**Izgled:** Rumeno oranžni kristali

**Izkoristek:** 46.6 % (204 mg)

**Rf:** 0.62 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>) 0.53 (MF: etilacetat)

**Tališče:** 160-163°C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3396, 3282, 3126, 2974, 1740, 1639, 1616, 1593, 1512, 1458, 1394, 1373, 1359, 1320, 1296, 1270, 1212, 1180, 1160, 1125, 1094, 1074, 1025, 937, 885, 849, 834, 770, 737, 719, 696, 599, 558, 514

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.57 (s, 9H, 3x CH<sub>3</sub>)  
 4.14 (d, 2H, J=5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
 5.86-5.88 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
 5.92-5.97 (m, 2H, pirol-CH)  
 6.52 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 6.61-6.66 (m, 3H, Ar-H, pirol-CH)  
 7.03 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.43 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)  
 10.72 (s, 1H, pirol-NH)

**MS(ESI):** 354.2 (M+H)<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 353.42

**HRMS:** 354.1921 (izračunana: 354.1930)

**Elementna sestava:** C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

**HPLC:** 95.42 % (254 nm), t<sub>r</sub> = 14.879 min

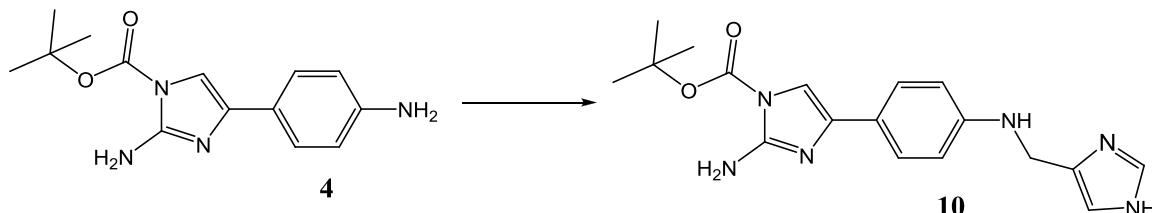
**Elementna analiza:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave **0.35 H<sub>2</sub>O.** \*

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti	$\Delta$ (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju H <sub>2</sub> O	$\Delta$ (%)
% C 64.57	% C 63.75	0,82	% C 63.44	0.31
% H 6.56	% H 6.48	0.08	% H 6.64	0.16
% N 19.82	% N 19.04	0.78	% N 19.47	0.43

\* Vsebnost vode je vidna že na NMR spektru

**4.10. SINTEZA TERC-BUTIL 4-((1H-IMIDAZOL-4-IL)METILAMINO)FENIL)-2-AMINO-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (10)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V bučki raztopimo 300 mg (1.09 mmol) spojine **4** v približno 10 ml THF. Temu dodamo 105 mg (1.09 mmol) imidazol-4-karboksaldehida, 62.29 µl (1.09 mmol) CH<sub>3</sub>COOH in 324 mg (1.526 mmol) NaBH(OAc)<sub>3</sub>. Pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji naredimo kolonsko kromatografijo s suhim nanosom vzorca in iz zbranih frakcij, v katerih s pomočjo TLC-ja določimo našo spojino, odparimo topilo pod znižanim tlakom. Zaostanek je oranžna kristalinična snov.

**Rezultati:**

**Izgled:** Oranžni kristali

**Izkoristek:** 22 % (85 mg)

**Rf:** 0.43(MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>), 0.31(MF: etilacetat)

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3380, 2978, 1735, 1615, 1516, 1356, 1292, 1257, 1158, 1118, 1011, 936, 828, 772, 738, 698, 659, 621

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

$\delta$  [ppm] = 1.57 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>)  
 4.14 (d, 2H, J=5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
 5.88-5.91 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
 6.52 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
 6.61 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ar-H)  
 6.93 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.03 (s, 1H, imidazol-CH)  
 7.43 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H)  
 7.57 (s, 1H, imidazol-CH)

11.90 (s, 1H, imidazol-NH)

**MS(ESI):** 355.2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 354.41

**HRMS:** 355.189 (izračunana: 355.1882)

**Elementna sestava:** C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>

**HPLC:** 97.31 % (254 nm), t<sub>r</sub> = 19.623 min

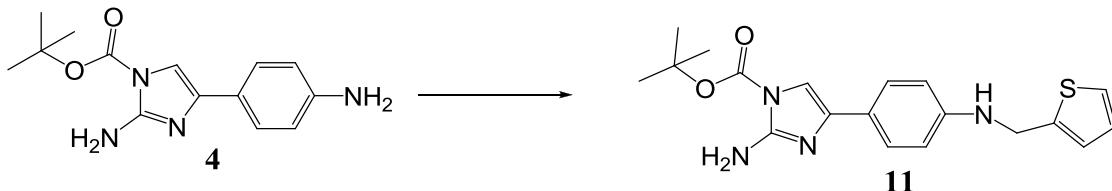
**Elementna analiza:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave **1.35 H<sub>2</sub>O.**\*

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti	Δ (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju H <sub>2</sub> O	Δ (%)
% C 61.00	% C 57.15	3.85	% C 57.08	0.07
% H 6.26	% H 6.42	0.16	% H 6.57	0.15
% N 23.71	% N 22.08	1.63	% N 22.19	0.11

\* Vsebnost vode je vidna že na NMR spektru

#### 4.11. SINTEZA TERC-BUTIL 2-AMINO-4-((TIOFEN-2-IL)METILAMINO)-1H-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (11)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V bučko zatehtamo 1.225 g (4.47 mmol) spojine **4** in jo raztopimo v 30 ml THF. Nato ob mešanju dodamo 409 µl (4.47 mmol) tiofen-2-karboksaldehida, 258 µl (4.47 mmol) CH<sub>3</sub>COOH in 1.327 g (6.528 mmol) NaBH(OAc)<sub>3</sub> ter pustimo mešati čez noč. Ker čez noč reakcija še ne poteče, dodamo še 286 µl (2.24 mmol) aldehyda in 663 mg (3.26 mmol)

NaBH(OAc)<sub>3</sub>. Po končani reakciji (čez noč) izvedemo kolonsko kromatografijo s suhim nanosom vzorca, v bučko zberemo frakcije, ki vsebujejo naš produkt (vidimo na TLC-ju), odparimo topilo ter dobimo produkt v obliki temno rumenih kristalov.

**Rezultati:**

**Izgled:** Temno rumeni kristali

**Izkoristek:** 13 % (218 mg)

**Rf:** 0.8 (MF: diklorometan/metanol = 10/1 + NH<sub>3</sub>); 0.61 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

**Tališče:** 168-172°C

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3416, 2970, 1737, 1638, 1617, 1509, 1475, 1372, 1361, 1320, 1287, 1256, 1211, 1181, 1160, 1123, 823, 769, 736, 704, 516, 459

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**

δ [ppm] = 1.56 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>)  
4.45 (d, 2H, J=6 Hz, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
6.31-6.34 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-)  
6.51 (s, 2H, imidazol-NH<sub>2</sub>)  
6.60 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)  
6.95-6.97 (m, 1H, tiofen-CH)  
7.03-7.05 (m, 2H, imidazol-CH, tiofen-CH)  
7.35-7.37 (m, 1H, tiofen-CH)  
7.42 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H)

**MS(ESI):** 371.2 (M+H)<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 370.47

**HRMS:** 371.1542 (izračunana: 371.1542)

**Elementna sestava:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

**Elementna analiza:** S pomočjo JASPER v2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculatorja smo izračunali, da je prišlo do vezave **0.6 H<sub>2</sub>O**.\*

Izračunane vrednosti	Ugotovljene vrednosti	$\Delta$ (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju H <sub>2</sub> O	$\Delta$ (%)
% C 61.60	% C 59.60	2.00	% C 59.85	0.25
% H 5.99	% H 5.76	0.23	% H 6.13	0.37
% N 15.12	% N 14.70	0.42	% N 14.69	0.01

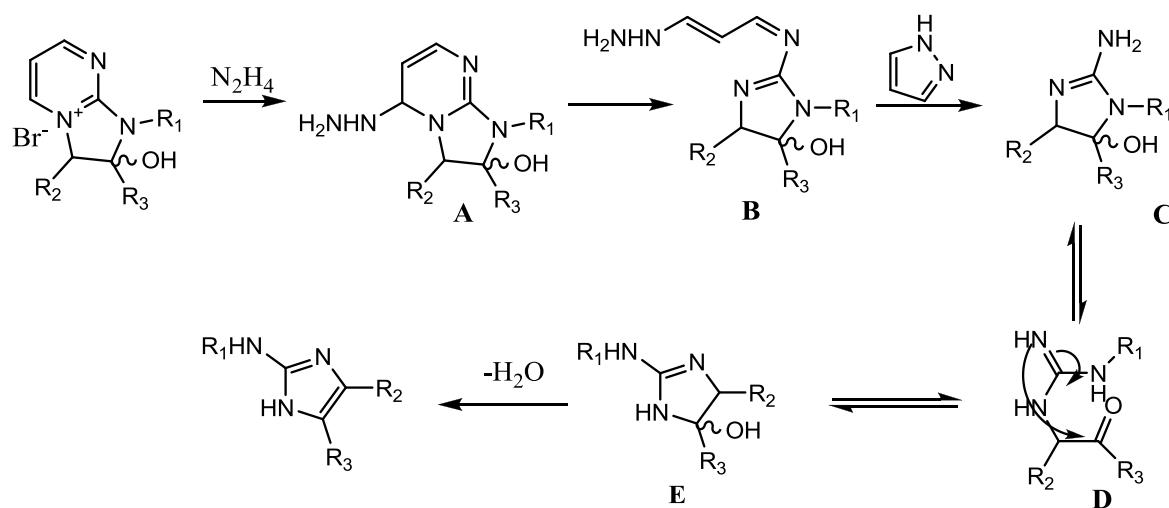
\* Vsebnost vode je vidna že na NMR spektru

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. CIKLOKONDENZACIJA IN SINTEZA 2-AMINOIMIDAZOLA

V prvi stopnji smo izvedli ciklokondenzacijo med 2-aminopirimidinom in 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanonom s pomočjo DMAP kot katalizatorja. Ugotovili so, da ciklokondenzacija izhodnih spojin vodi do stabilne soli (spojava **1**).

Nastalo sol smo nadalje uporabili za sintezo spojine **2** v mikrovalovnem reaktorju. Pretvorba 2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- $\alpha$ ]pirimidin-4-ijeve soli v 2-amino-1*H*-imidazol naj bi potekala po nenavadni preureeditvi tipa Dimroth *in situ* (slika 21).



Slika 21: Predlagan mehanizem pretvorbe 2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- $\alpha$ ]pirimidin-4-ijeve soli v 2-amino-1*H*-imidazol.

Najprej pride do cepitve 2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[1,2- $\alpha$ ]pirimidin-4-ijeve soli, ki poteka s hidrazin hidratom. V nadaljevanju nastane pirazol in 2-amino-5-hidroksi imidazolidin (**C**), ki je v ravnovesju z odprto obliko (**D**). Zopet sledi ciklizacija pri kateri nastane izomerni 2-amino-5(4)-hidroksiimidazolidin (**E**). Na koncu pride do dehidracije in rezultat le-te je 2-amino-1*H*-imidazol. Nekateri 2-amino-5(4)-hidroksiimidazolidini (**E**) pri sobni temperaturi spontano izgubijo vodo, nekateri pa potrebujejo za to visoko temperaturo in dodatno energijo, navadno z uporabo mikrovalov. Po prvi stopnji so vse reakcije izvedli pri 100°C, da ne bi prišlo do prekinitev le-teh. (50)

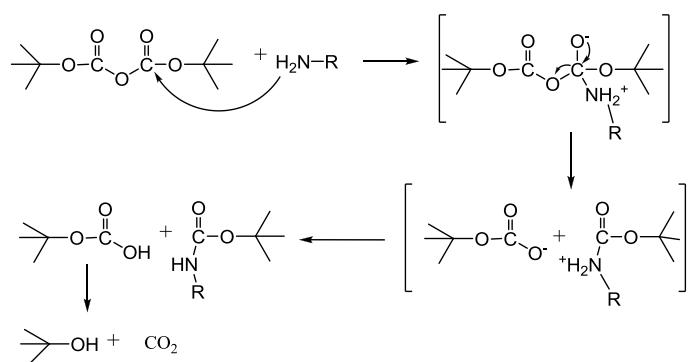
Ker so se reakcije s hidrazin hidratom v mikrovalovnem reaktorju izkazale za najhitrejše in najuspešnejše, smo jih izvedli tudi sami. Uporabili smo absolutni etanol, ker mora reakcija potekati v brezvodnih pogojih.

## 5.2. ZAŠČITA Z BOC-ANHIDRIDOM TER UVEDBA BENZILBROMIDA IN METILBROMOACETATA NA IMIDAZOLNI DUŠIK

V tretji stopnji sinteze intermediata **4** smo želeli na imidazolu spojine **2** uvesti BOC-anhidrid. S tem bi dobili spojino s fragmentom, ki se je izkazal kot pomemben pri apoptotični aktivnosti, saj ga je testirana spojina (**SPO-13**) vsebovala. Prav tako pa se BOC-anhidrid lahko uporablja za zaščito aminske skupine, da le-ta v nadalnjih reakcijah ne reagira. Amini so namreč odlični nukleofili in imajo bazične lastnosti, zato ob prisotnosti močnih elektrofilov in kislin radi reagirajo. (52)

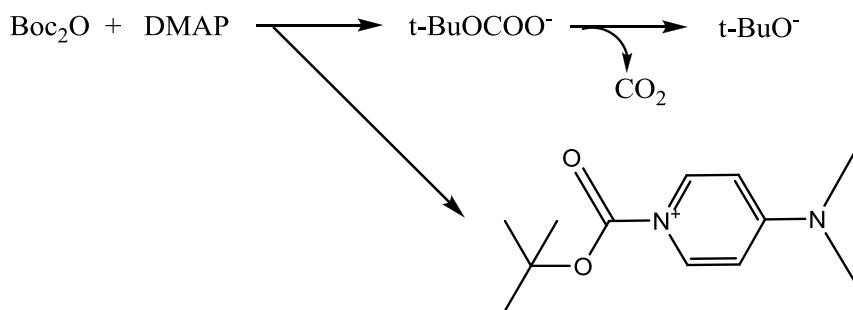
BOC-anhidrid ( $\text{BOC}_2\text{O}$ ) smo na aminsko skupino uvedli ob prisotnosti DMAP, ki je katalizator in prav tako nukleofil ter močna baza. Kot topilo smo uporabili metanol, ki pa smo ga morali večkrat dodati, da smo sprali reakcijsko zmes iz vratu bučke in hladilnika, ko se je le-ta začela peniti. Reakcija je potekla zelo hitro, kar se je videlo tudi v spremembni barvi reakcijske zmesi iz rdeče v intenzivno rumeno.

Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Aminska skupina (nukleofil) se adira na elektrofilni C-atom karbonilne skupine BOC-anhidrida in nastane tetraedrični intermedijat. Tetraedrični intermedijat v nadaljevanju reagira do *terc*-butilnega estra ogljikove kisline in *terc*-butilnega estra karbaminske kisline. *Terter*-butilni ester ogljikove kisline ni stabilen, zato razpade na *terc*-butanol in ogljikov dioksid. Karbaminska kislina ( $\text{R}-\text{NHCOOH}$ ) je zelo nestabilna in reagira do amina in ogljikovega dioksida, medtem ko so njeni estri in soli (karbamati in uretani) stabilni (slika 22). (53)



Slika 22: Mehanizem zaščite aminske skupine z BOC-anhidridom (54).

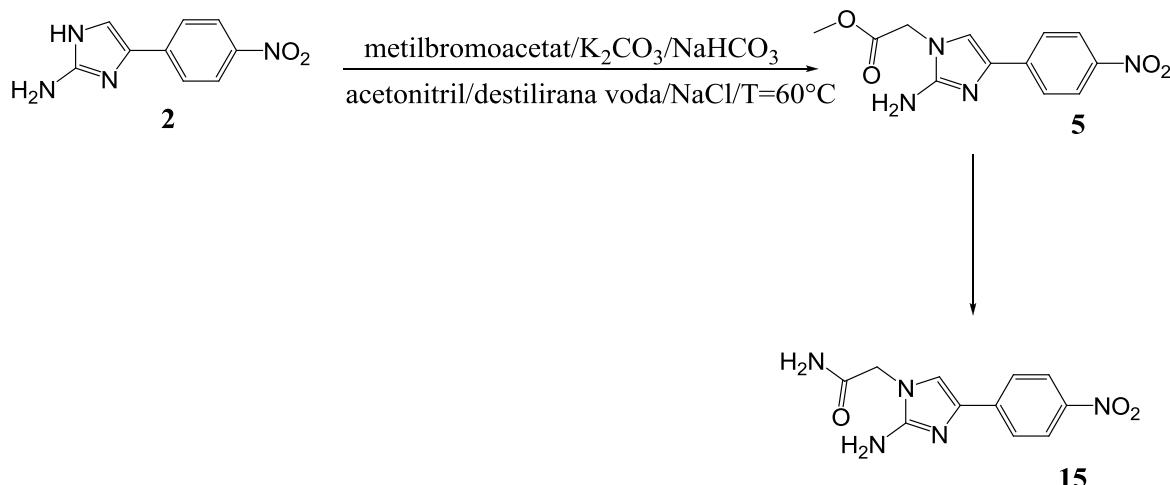
Med DMAP in BOC-anhidridom pride do reakcije, saj DMAP, kot nukleofil, reagira z BOC-anhidridom, ki je elektrofil, in pri tem nastane reaktivni acil-piridinijev intermediat in stranski produkt *terc*-butoksikarboksilatna skupina. Slednja se po odcepu oglikovega dioksida pretvori v *terc*-butilat, acilni del acil-piridinijevega intermediata pa lahko reagira z aminsko skupino. DMAP zaradi svojih katalizatorskih lastnosti tudi pospeši potek reakcije (slika 23).



Slika 23: Mehanizem reakcije med DMAP-om in BOC-anhidridom (55).

Na aminsko skupino spojine **2** smo poskušali uvesti tudi benzilno in metil acetatni fragment, kar bi lahko pripomoglo pri nadalnjem ugotavljanju povezave med strukturo in delovanjem derivatov klatrodina. To smo izvedli z benzil bromidom in metilbromoacetatom, in sicer smo reakciji izvedli v acetonitrilu, zaradi slabe topnosti izhodne spojine, pa je bilo potrebno še dodatno segrevanje. Kot bazo smo dodali kalijev karbonat, ki reagira z nastajajočim HBr, saj bi le-ta zaustavil reakcijo, ker bi protoniral izhodni sekundarni amin. Kljub temu, da je bilo potrebno dodatno čiščenje, sta reakciji potele z relativno visokim izkoristkom (benzil-86,7% in metil acetat-53%). Nadaljnje reakcije reduktivnega aminiranja in tvorbe amidne vezi s spojinami, ki so vsebovale benzilno in metil acetatno skupino niso bile uspešne, saj imata obe skupini elektron privlačen efekt in verjetno na ta način ovirata in zmanjšata nukleofilnost aromatske aminske skupine in s tem njeno reaktivnost.

Pri enem izmed poskusov sinteze spojine z metil acetatnim fragmentom na imidazolnem dušiku smo dobili spojino, katere struktura na podlagi NMR spektra ni ustrezala naši predvideni strukturi spojine. Nastal je amid (spojava **15**) za katerega sklepamo, da je nastal ob reagiranju amonijaka iz mobilne faze in spojine **2** (slika 24).



Slika 24: Neuspele reakcija vezave metilbromoacetata na imidazolni dušik.

### 5.3. REDUKCIJA NITRO SKUPINE

V četrtni stopnji smo izvedli reakcijo redukcije nitro skupine do aminske skupine s katalitskim hidrogeniranjem. Kot katalizator smo uporabili paladij na ogljiku (Pd/C), ki ima veliko specifično površino, na katero se lahko vodik dobro adsorbira. S povečanjem površine paladija pa se poveča tudi njegova reaktivnost. (56) Vodik s kisikom tvori eksplozivne snovi, zato je potrebno pred prepihovanjem z vodikom reakcijsko zmes prepihati z argonom, da izpodrinemo ves kisik. Prav tako je potrebno reakcijsko zmes prepihati z argonom po dodatku katalizatorja. Reakcija poteka v zaprti dvogrli bučki. Kot topilo smo uporabili THF, v katerem je bila izhodna spojina dobro topna in tudi reakcija je potekla z visokim izkoristkom. Na TLC-ju se je pojavila samo ena lisa, ki je bila nižja od lise izhodne spojine. Do tega je prišlo zaradi povečanja polarnosti, ki ga povzroči aminska skupina v nastali spojnici **4**.

V primeru redukcije nitro skupine spojine **7** je bila reakcija selektivna, saj se lahko s katalitskim hidrogeniranjem odstrani tudi benzilno skupino.

### 5.4. REDUKTIVNO AMINIRANJE

V nadalnjih stopnjah smo s spojino **4** in različnimi aldehidi poskušali izvesti reakcijo reduktivnega aminiranja.

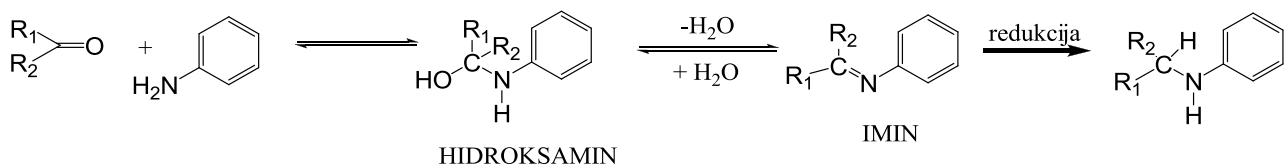
Reduktivno aminiranje je reakcija med aldehydom ali ketonom ter amonijakom, primarnim aminom ali sekundarnim aminom ob prisotnosti reducentov in pri kateri nastane primarni, sekundarni ali terciarni amin (slika 25). Ta vrsta reakcije je najbolj uporabna in pomembna

pri sintezi različnih aminov. Pri reakciji pride do nastanka intermediata hidroksamina, ki nato dehidrira do imina. Pod šibko kislimi ali nevtralnimi pogoji se imin protonira in nastane iminijev ion. Redukcija iminijevega iona omogoči nastanek alkiliranega amina. Reduktivno aminiranje je lahko direktna reakcija, pri kateri karbonilna spojina in amin reagirata ob prisotnosti reducenta brez predhodnega nastanka intermediata imina ali iminijeve soli. Lahko pa je tudi indirektna reakcija, pri kateri nastane intermedijat, ki se nato reducira do končne spojine.

Kot reducent je natrijev cianborhidrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) zelo uspešen zaradi svoje stabilnosti v zelo kislih pogojih, dobre topnosti v alkoholih (metanol) in njegove selektivnosti pri različnih vrednostih pH. Učinkovit je pri nižjih vrednostih pH (3-6), medtem ko se pri višjih vrednostih pH redukcija upočasni. Zaradi njegove toksičnosti so morali poiskati alternativo, saj bi se lahko zaostali cianid pojavil v produktih in odpadkih, predvsem pri večjih reakcijah. Kot alternativo so uporabili natrijev triacetoksiborhidrid ( $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ), ki je šibek in izredno selektiven reducent. Sterični in elektron akceptorski učinki treh acetoksi skupin stabilizirajo bor-vodikovo vez in zmanjšajo njegov reduktivni učinek. Na izbor reducenta so vplivali že znani rezultati reduktivnega aminiranja.

Natrijev triacetoksiborhidrid je zelo učinkovit pri reduktivnem aminiranju zelo nereaktivnih aminov. Za hitrejši potek reakcije je dobro dodati tudi enega ali več ekvivalentov ocetne kisline.

Ugotovili so, da so reakcije z aldehidi mnogo hitrejše od tistih s ketoni in dajejo višje izkoristke.

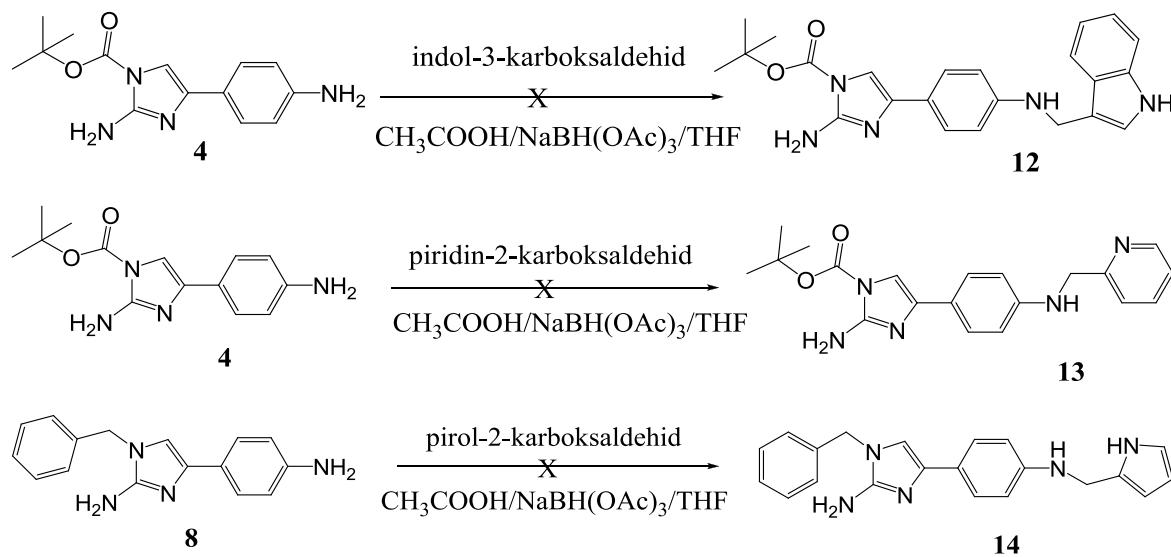


Slika 25: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja (57).

Zaradi uspešnih reakcij reduktivnega aminiranja z  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  kot reducentom smo ga za izvedbo reakcij uporabili tudi mi, saj pri uporabi  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  kot reducenta reakcije niso potekle, kar smo potrdili tudi s TLC-jem, na katerem so bile vidne lise izhodnih spojin v reakcijski zmesi. V primeru, da reakcija ni takoj potekla, smo dodali še nekaj reducenta in aldehyda ter pustili, dokler s TLC-jem nismo zaznali konca reakcije. Ker noben izmed surovih produktov ni bil čist, je bilo vsakega potrebno očistiti s kolonsko kromatografijo.

Naredili smo suhi nanos na kolono, kar pomeni, da smo reakcijsko zmes raztopili v minimalni količini topila in dodali 1,5x več silikagela glede na maso surovega produkta, ter nato odparili topilo in nanesli zaostanek na omočen silikagel na koloni. Kot topilo za amin **4** smo uporabili THF, saj je bila ta spojina **4** v njem dobro topna. Kljub slabim izkoristkom smo s spektroskopskimi metodami potrdili prisotnost spojin s pričakovano strukturo.

Reduktivno aminiranje smo poskusili izvesti tudi na spojini, ki vsebuje na imidazolnem obroču benzilni fragment (spojava **14**), a reakcija ni potekla, kar je vidno tudi na TLC-ju, saj je lisa izhodne spojine zelo intenzivna, medtem ko so lise na novo nastalih spojin zelo šibke, komaj opazne. To je le še dokaz več, da benzilna skupina ovira potek reakcij, saj s svojim elektron privlačnim učinkom zmanjšuje reaktivnost aminske skupine. Reakcija reduktivnega aminiranja tudi ni potekla med spojino **4** in piridin-2-karboksaldehidom (spojava **13**) ter spojino **4** in indol-3-karboksaldehidom (spojava **12**), kar smo potrdili tudi z NMR in MS (slika 26).



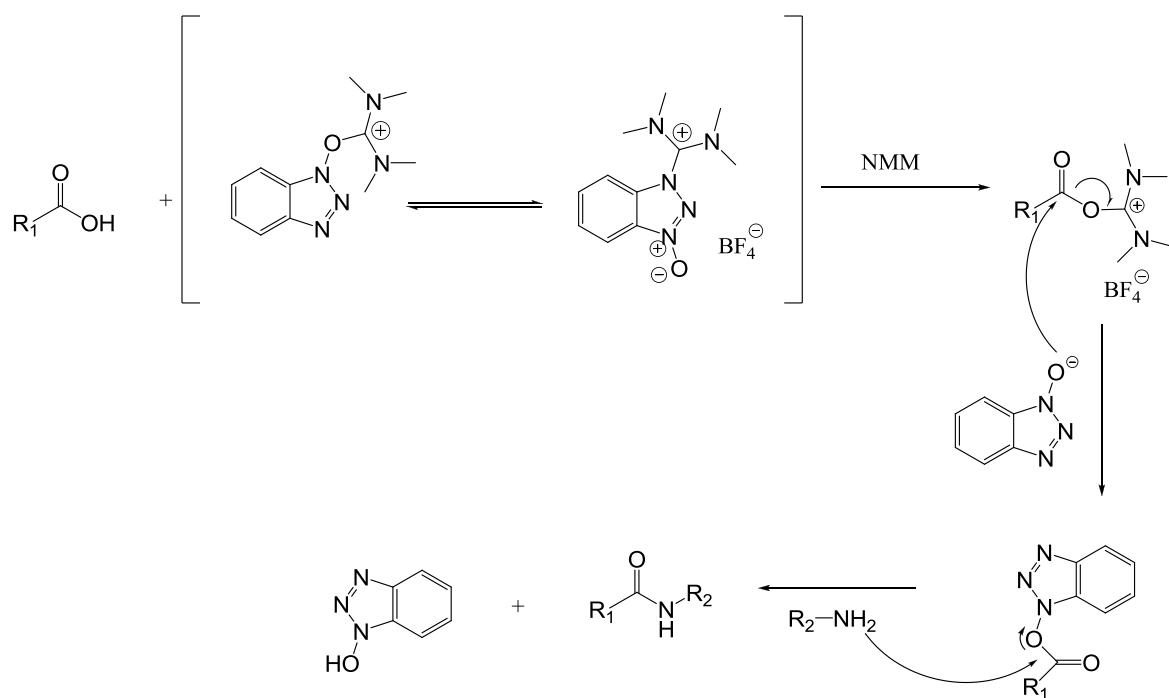
Slika 26: Neuspele reakcije reduktivnega aminiranja.

## 5.5. TVORBA AMIDNE VEZI

Poskusili smo tvoriti amidno vez med pirol-2 karboksilno kislino in aromatskim aminom intermediata **4**. Amidna vez nastane med aminsko skupino ene spojine in karboksilno skupino druge spojine in pri tem pride do odcepa vode. Reakcija poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije na karbonilnem C-atomu. Pride do izstopa hidroksilne skupine v obliki vode in vezave aminske skupine amina ter s tem tvorbe amidne vezi. Karboksilno

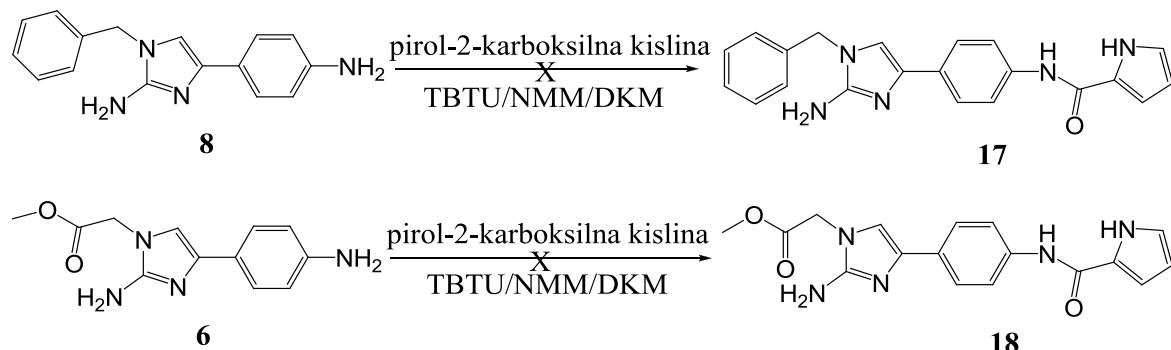
skupino je potrebno aktivirati, za kar se uporablajo *in situ* coupling reagenti (reagenti za aktivacijo karboksilne skupine), kot so DCC,  $\text{TiCl}_4$ , aktiviran fosfat. Velikokrat se za aktivacijo karboksilne kisline uporablja TBTU, ki se je izkazal kot učinkovit pri tvorbi amidne vezi, zato smo ga preizkusili tudi mi.

Pri reakciji med kislino in TBTU-jem se aktivira karboksilna skupina, ki reagira z izhodnim aminom ter tako omogoči nastanek amida. V reakcijsko zmes smo dodali še NMM, ki deluje kot baza in povzroči ionizacijo kisline (slika 27).



Slika 27: Mehanizem aktivacije karboksilne skupine s TBTU in tvorba amidne vezi (58).

Amidno vez smo poskusili sintetizirati s pirol-2-karboksilno kislino, kot amin pa smo uporabili spojino **6** in spojino **8**, a v nobenem primeru reakcija ni potekla (slika 28). Sklepamo lahko, da sta za to krivi benzilna in metil acetatna skupina, vezani na imidazolnem obroču, ki zaradi svojega elektron privlačnega učinka zmanjšujeta nukleofilnost in s tem tudi reaktivnost aminske skupine. Na reaktivnost spojin pa vpliva tudi položaj aminske skupine na benzenovem obroču, na katero imajo vpliv premiki elektronskih parov v benzenovem obroču. Spojine z aminsko skupino na meta mestu benzenovega obroča so bolj reaktivne kot spojine z aminsko skupino na para mestu.

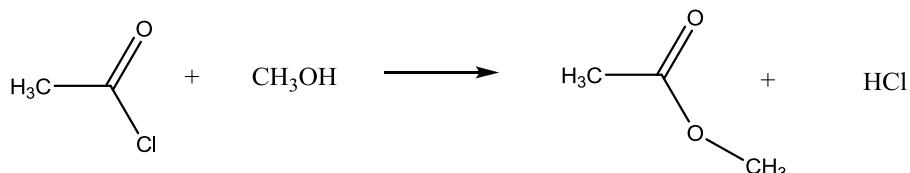


Slika 28: Neuspele reakcije tvorbe amidne vezi.

## **5.6. ODSTRANJEVANJE DI-TERC-BUTILKARBONATA (BOC ZAŠČITE)**

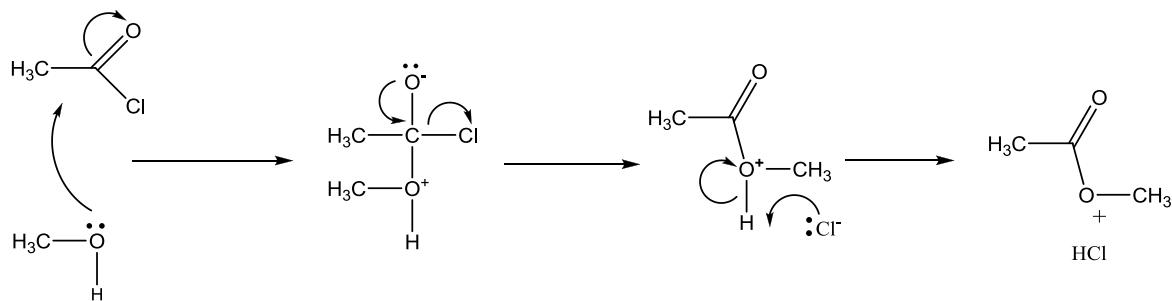
Odstranitev *terc*-butiloksikarbonilne skupine načeloma izvedemo z močno kislino (npr. trifluorooacetna kislina) v diklorometanu ali s plinastim HCl v metanolu. (59)

V našem primeru smo izvedli odstranitev *terc*-butiloksikarbonilne skupine s plinastim HCl v metanolu. Uporabili smo acetilklorid, ki je reagiral z metanolom, pri čemer je nastal *in situ* vodikov klorid in metil acetat (slika 29). Sama reakcija poteka v dveh stopnjah, zaradi eksoternosti pa jo je potrebno izvajati na ledeni kopeli.



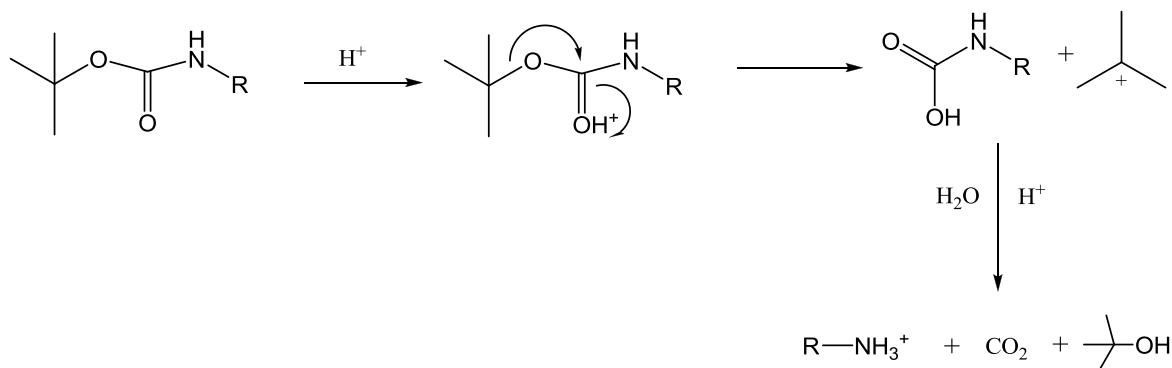
Slika 29: Reakcija med acetilkloridom in metanolom.

V prvi stopnji (stopnja adicije) pride do nukleofilnega napada na pozitivni atom ogljika z enim od prostih elektronskih parov na kisiku molekule metanola. V drugi stopnji (stopnja eliminacije) pa pride do dveh dogodkov. Najprej se tvori vez med ogljikom in kisikom in izpodrine iz molekule kloridni ion, čemur sledi odstranitev vodikovega iona in nastaneta metil acetat in vodikov klorid (slika 30).



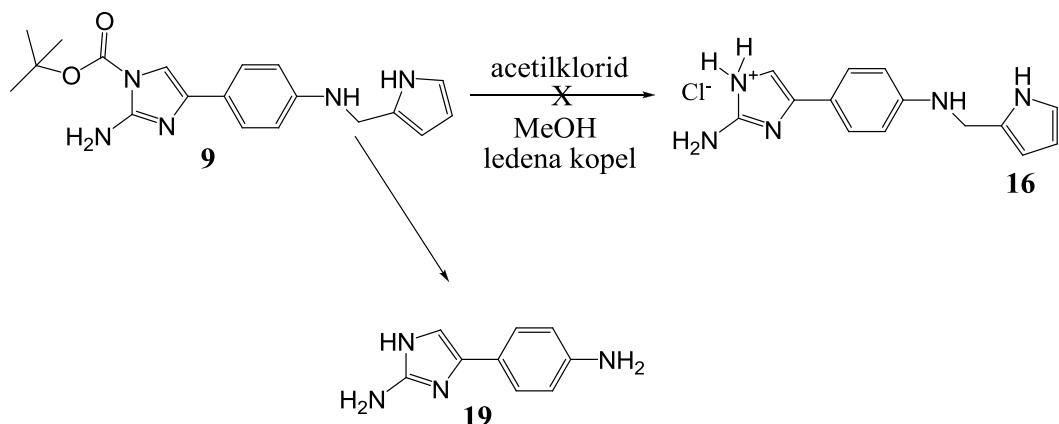
Slika 30: Mehanizem reakcije med acetilkloridom in metanolom (60).

Odstranitev BOC zaščite v kislem privede do nastanka *terc*-butanola in CO<sub>2</sub>. Karbokation, ki nastane, je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin (slika 31).



Slika 31: Mehanizem odstranitve BOC-zaščite v kislem (61).

Pri poskusu odstranitve zaščite iz imidazolnega dušika s pomočjo acidolize je prišlo do razpada spojine **9**. To smo potrdili tudi z NMR spektrom, na katerem smo videli signale, ki pripadajo spojini **19**. Očitno so kisli pogoji povzročili ne le odcepitev zaščitne skupine, temveč tudi pretvorbo sekundarnega amina do primarnega amina **19** in ostalih razpadnih produktov, ki jih nismo mogli identificirati (slika 32).



Slika 32: Neuspela reakcije odstranitve BOC-zaščite.

## 5.7. TESTIRANJE APOPTOTIČNE AKTIVNOSTI

Spojina **SPO-13**, iz katere smo izhajali pri načrtovanju sinteze naših spojin, je bila izpostavljena apoptotičnem testiranju in se je izkazala kot spojina z visoko apoptotični aktivnostjo, saj je 90 % celic bilo podvrženih apoptozi. Tudi naše spojine smo izpostavili testiranju na apoptozo, in sicer spojini **9** (SAP-5) in **10** (SAP-13). Izkazali sta se kot spojini s slabo apoptotično aktivnostjo, saj je bil odstotek apoptotičnih celic relativno nizek.

Preglednica IV: Spojini **9** (SAP-5) in **10** (SAP-13) ter njuna učinkovitost na apoptozo celic.

Oznaka spojine	Struktura spojine	Ime spojine	Koncentracija	% apoptotičnih celic
SAP-5		tert-butyl 4-(4-((1H-pirol-2-il)metilamino)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat	50 μM	34.0
SAP-13		tert-butyl 4-(4-((1H-imidazol-4-il)metilamino)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat	50 μM	38.8

Na podlagi rezultatov testiranj spojin na apoptotično aktivnost lahko vidimo, da spojine nastale z reduktivnim aminiranjem, izgubijo svojo apoptotično aktivnost v primerjavi s spojinami, ki vsebujejo amidno vez. Torej imajo spojine z amidno vezjo večjo apoptotično aktivnost kot sekundarni amini. Kljub relativno nizkemu odstotku apoptotičnih celic pa rezultati vseeno niso zanemarljivi, pri čemer lahko te zasluge pripisemo *terc*-butilosikarbonilni skupini vezani na imidazolni dušik, saj tudi ta pripomore k apoptotični aktivnosti (vsebuje jo **SPO-13**). Pri nadalnjih načrtovanjih sintez derivatov toksina klatrodina bi bilo torej potrebno razmišljati v smeri sinteze novih amidnih analogov **SPO-13**, ki bi pripomogli k nadalnjim raziskavam pri ugotavljanju povezave med strukturo in delovanjem, saj bi lahko še dodatno potrdili ugotovitev, da imajo spojine z amidno vezjo visoko apoptotično učinkovitost.

## 6. SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali naslednje derivate nevrotoksina klatrodina z reakcijo reduktivnega aminiranja: *terc*-butil 4-(4-((1H-pirol-2-il)metilamino)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat (**9**), *terc*-butil 4-(4-((1H-imidazol-4-il)metilamino)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat (**10**) in *terc*-butil 4-(4-((1H-indol-3-il)metillamino)fenil)-2-amino-1H-imidazol-1-karboksilat (**11**).

Sintezni postopek (hidrazinoliza pirimidinijeve soli) tvorbe 2-amino-4-(4-nitrofenil)-1*H*-imidazola (**2**), ki smo ga uporabili, se je izkazal za dobrega, saj je reakcija potekla zelo hitro (15min) in po končani reakciji je bilo potrebno produkt samo še očistiti s kolonsko kromatografijo.

Kot ustreznata zaščita imidazolnega dušika spojine **2** se je izkazal di-*terc*-butildikarbonat, ki smo ga uvedli z uporabo DMAP kot katalizatorja in ob segrevanju.

Na imidazolni dušik smo uvedli tudi benzilni in metil acetatni fragment ter izvedli redukcijo teh spojin, a nadaljnje reakcije s temi spojinami niso potekle zaradi vpliva benzilne in metil acetatne skupine na nukleofilnost aromatske aminske skupine.

Redukcijo nitro skupine smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem in s tem dobili amin, *terc*-butil-2-amino-4-(4-aminofenil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**4**), ki je služil kot izhodna spojina za reakcije reduktivnega aminiranja.

Reduciranje spojine, ki vsebuje na imidazolni aminski skupini benzilno skupino, s katalitskim hidrogeniranjem poteče selektivno, saj se reducira samo nitro skupina.

Pri reakcijah reduktivnega aminiranja smo uporabili različne aldehyde, ki so s primarnim aminom tvorili sekundarni amin. Kljub temu, da izkoristki niso bili visoki, so nam spektroskopske analize potrdile, da smo sintetizirali spojine z želenimi strukturami.

Pri reakcijah reduktivnega aminiranja smo uporabili dva reducenta, in sicer NaBH(OAc)<sub>3</sub> in NaBH<sub>3</sub>CN. Pri tem se je prvi pokazal za učinkovitejšega.

Spojini **9** in **10**, nastali z reakcijo reduktivnega aminiranja, sta se pri testiranju na apoptotično aktivnost izkazali kot spojini s nizko apoptotično aktivnostjo. Zaključimo lahko, da zamenjava amidne skupine z metilen aminske zmanjša apoptotično aktivnost.

## 7. LITERATURA

1. Fattorusso E, Tagliatela-Scafì O: Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008: 3-4, 11-12, 16, 271-291
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Alkaloid> (junij 2012)
3. Skubic V: Organofarmakologija s toksikologijo za študente veterinarske medicine, Veterinarska fakulteta, Ljubljana:Pleško, Ljubljana, 1990: 40-41
4. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Alkaloid> (junij 2012)
5. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kritosemenke> (julij 2012)
6. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Golosemenke> (julij 2012)
7. [http://www2.pef.uni-lj.si/kemija/execrp/03\\_morsko\\_dno\\_v\\_obreznem\\_pasu/index.html](http://www2.pef.uni-lj.si/kemija/execrp/03_morsko_dno_v_obreznem_pasu/index.html) (julij 2012)
8. <http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Veterina%20Strupene%20rastline.pdf> (junij 2012)
9. <http://www.docsimon.de/artikel/atropin-pos-1-oph-gtt-sol-1x10ml> (julij 2012)
10. [http://psychotropia.co/?attachment\\_id=3174](http://psychotropia.co/?attachment_id=3174) (julij 2012)
  
11. Aniszewski T: Alkaloids - Secrets of life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Radarweg 29, PO BOx 211, Amsterdam, The Netherlands, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, UK, 1st Ed, 2007: 1-13, 105, 112, 170.
  
12. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6203243.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6203243.htm) (julij 2012)
13. <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Mescaline> (julij 2012)
14. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C83670&Mask=400> (julij 2012)
15. <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Alkaloid> (julij 2012)
16. <http://en.wikipedia.org/wiki/Coniine> (julij 2012)
17. Sepčić K: Zdravila iz morja: prvaki so spužve, ki so prave "kemične tovarne". Delo (priloga Znanost) 2008; 77: 20
18. Sipkema D, Franssen MCR, Osinga R, Tramper J, Wijffels RH: Marine Sponges as Pharmacy. Marine Biotechnology 2005; 7: 142-162

19. Müller WEG, Schröder HC, Wiens M, Petrović-Ottstadt S, Batel R, Müller IM: Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II-the Benefits. eCAM 2004; 1(2): 133-144
20. Amigo M, Paya M, Braza-Boils A, De Rosa S, Terencio MC: Avarol inhibits TNF- $\alpha$  generation and NF- $\kappa$ B activation in human cells and animal models. Life sciences 2008; 82: 256-264
21. D'Ambrosio M, Guerriero A, Pietra F, Debitus C: Leucascandrolide A, a New Type of Macrolide: The first powerfully bioactive metabolite of calcareous sponges (*Leucascandra caveolata*, a new genus from the coral sea). Helvetica Chimica Acta 1996; 79: 51-60
22. Toma T, Yoichi KY, Fukuyama T: Total synthesis of (+)-Manzamine A. J Am Chem Soc 2010; 132(30): 10233-10235
23. Kuan KWK, Pepper PH, Bloch MW, George HJ: Total synthesis of (+)-Aureol. Org Lett 2012; 14(18): 4710-4713
24. <http://www.discoverlife.org/20/q?search=Agelas+clathrodes> (julij 2012)
25. <http://sorsaka.blogspot.com/2011/02/orange-elephant-ear-sponge.html> (julij 2012)
26. Blumenthal MK, Seibert LA: Voltage-Gated Sodium Channel Toxins, Poisons, Probes and Future Promise. Cell biochemistry and biophysics 2003; 38: 215-237
27. Catterall AW: From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. Neuron 2000; 26: 13-25
28. Catterall AW: Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. The Journal of Physiology 2012; 590: 2577-2589
29. Duclohier H: Structure-function studies on voltage-gated sodium channel. Biochimica et Biophysica Acta 2009; 1788: 2374-2379
30. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall AW: The crystal structure of voltage-gated sodium channel. Nature 2011; 475: 353-358
31. <http://bio.ijs.si/~krizaj/group/Predavanja%202012/Seminarji/Napetostno-odvisni%20kanalcki-porocilo.pdf> (julij 2012)
32. <http://www.clabs.de/natrium1.htm> (julij 2012)
33. Rivera Rentas LA, Rosa R, Rodriguez DA, Escalona De Motta G: Effect of alkaloid toxins from tropical marine sponges on membrane sodium currents. Toxicon 1995; 33: 491-497

34. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Saksitoksin> (julij 2012)
35. <http://www.chemistry.wustl.edu/~coursedev/Online%20tutorials/Limiting%20Reagents/synthesis.htm> (julij 2012)
36. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Saksitoksin> (julij 2012)
37. Jezernik K: Apoptoza, Apoptosis. Med razgl 1999; 38: 69-81
38. Zommermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 2011; 92 (1): 57-70
39. Pižem J, Cör A: Kaspaze. Med Razgl 2001; 40: 283-291
40. Vermeulen K, Van Backstaele DR, Berneman ZN: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Ann Hematol 2005; 84 (10): 627-639
41. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene 1998; 17: 3237-3245
42. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ 2003; 10(1): 76-100
43. [www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash) (julij 2012)
44. Vidic I, Šuput D, Milislav I: Modulatorji apoptoze kot nova zdravila. Farm Vestnik 2006; 57: 150-154
45. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm> (julij 2012)
46. MacFarlane M, Williams CA: Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep 2004; 5(7): 674-678
47. Okoren P: Sinteza 2-aminoimidazolskih derivatov nevrotoksina klatrodina. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011
48. Mou H, Zheng Y, Zhao P, Bao H, Fang W, Xu N: Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria and Fas/FasL-mediated pathways. Toxicology in vitro 2011; 25: 1027-1032
49. Allison CA, Cacabelos R, Lombardi RMV, Álvarez AX, Vigo C: Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2011; 25: 1341-1357
50. Ermolat'ev SD, Van der Eycken VE: A divergent Synthesis of Substituted 2 – Aminoimidazoles from 2-Aminopyrimidines. J Org Chem 2008; 73(17): 6691-6697
51. Nath JP: Indian Journal of Chemistry, Section B. Organic chemistry including medicinal chemistry 1980; V19B(6): 526-528

52. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/amine1.htm> (julij 2012)
53. Katedra za farmacevtsko kemijo: Uvedba zaščitnih skupin na aminske skupine aminokislin, Vaje iz farmacevtske kemije 3, 2010
54. [http://202.141.40.218/wiki/index.php/Synthesis\\_of\\_Peptides](http://202.141.40.218/wiki/index.php/Synthesis_of_Peptides) (september 2012)
55. Dalpozzo R, Bartoli G, Bosco M, Melchiorre P, Sambri L: Recent Development about the Use of Pyrocarbonates as Activator in Organic Synthesis: A Review. *Current Organic Synthesis* 2009; 6: 79-101
56. March J, Smith MB: March's advanced organic chemistry, reactions, mechanisms and structure, A Wiley Interscience Publivation, New York, 6th Ed, 2007: 947, 1054-1055, 1169-1179
57. Abdel-Magid FA, Carson GK, Harris DB, Maryanoff AC, Shah DR: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J Org Chem* 1996; 61(11): 3849-3862
58. Balalaie S, Mahdidoust M, Eshaghi-Najafabadi R: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Phenylhydrazation of Carboxylic Acids at Room Temperature. *Journal of the iranian chemical society* 2007; 4: 364-369
59. [http://en.wikipedia.org/wiki/Di-tert-butyl\\_dicarbonate](http://en.wikipedia.org/wiki/Di-tert-butyl_dicarbonate) (avgust 2012)
60. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/alcohol.html> (avgust 2012)
61. [http://202.141.40.218/wiki/index.php/Synthesis\\_of\\_Peptides](http://202.141.40.218/wiki/index.php/Synthesis_of_Peptides) (september 2012)