

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA MARIN

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA MARIN

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH DERIVATOV 8-HIDROKSI-5-NITROKINOLINA IN 4-NITROFENOLA KOT INHIBITORJEV
KATEPSINA B**

THE DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW DERIVATES OF 8-HYDROXY-5-NITROQUINOLINE AND 4-NITROPHENOL AS INHIBITORS OF CATHEPSIN B

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom asist. dr. Izidorja Sosiča. Meritve iz masne spektroskopije so opravili na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu za zaupanje pri dodelitvi teme diplomske naloge ter vseh navetov pri pisanju.

Članoma komisije prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan ter doc. dr. Mojci Lunder se zahvaljujem za pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre somentorju asist. dr. Izidorju Sosiču za potrpežljivost, pomoč, kritike in vzpodbudo pri raziskovalnem delu ter pri pisanju diplomske naloge.

Na koncu pa še posebna zahvala družini in prijateljem za vso podpodo in zaupanje. Hvala!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom asist. dr. Izidorja Sosiča.

Luka Marin

Kazalo

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD	1
1.1. PROTEAZE.....	1
1.2. CISTEINSKE PROTEAZE.....	2
1.3. KATEPSIN B	4
1.3.1. Zgradba katepsina B	4
1.3.2. Sinteza katepsina B	5
1.3.3. Mehanizem delovanja katepsina B	5
1.3.4. Vloga katepsina B v telesu.....	8
1.3.5. Vloga katepsina B pri raku	8
1.4. INHIBITORJI KATEPSINA B	10
1.4.1. Endogeni inhibitorji	10
1.4.2. Eksogeni inhibitorji.....	11
1.4.3. Nitroksolin (8-hidroksi-5-nitrokinolin).....	14
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE.....	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1. SPOJINE Z 8-HIDROKSI-5-NITROKINOLINSKIM SKELETOM.....	21
4.1.1. Uvedba nitro skupine na kinolinski obroč	21
4.1.2. Tvorba amidne vezi.....	22
4.1.3. 8-Kloro-N-(cianometil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid	29
4.2. SPOJINE Z 2-KARBOKSI-4-NITROFENOLNIM SKELETOM	31
4.2.1. Uvedba nitro skupine na fenilni obroč.....	31
4.2.2. Tvorba amidne vezi.....	32
4.3. SPOJINE S 4-NITROFENOLNIM SKELETOM.....	40
4.3.1. Priprava amina z Mannichovo reakcijo	40

5. REZULTATI IN RAZPRAVA	46
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	46
5.1.1. Uvedba nitro skupine na obroč	46
5.1.2. Tvorba amida	47
5.1.3. Mannichova reakcija	50
5.2. REZULTATI BIOKEMIJSKEGA VREDNOTENJA	51
6. SKLEP	60
7. LITERATURA	61

POVZETEK

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza, ki ima eksopeptidazno in endopeptidazno aktivnost. Medtem ko eksopeptidazno aktivnost povezujemo s fiziološkimi procesi deaktivacije proteinov, pa je endopeptidazna aktivnost odgovorna za bolj specifično razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa, kar vodi v tumorsko invazijo in metastaziranje. Zato je katepsin B postal zanimiva tarča za razvoj novih učinkovin, ki bi selektivno zavirale endopeptidazno aktivnost encima, medtem ko na eksopeptidazno aktivnost ne bi imele vpliva.

Eden izmed bolj zanimivih, selektivnih, nekovalentnih inhibitorjev katepsina B je protibakterijska učinkovina nitroksolin (8-hidroksi-5-nitrokinolin), ki inhibira njegovo endopeptidazno aktivnost v nizkem mikromolarnem območju.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali dvajset novih potencialnih inhibitorjev katepsina B; osem od teh je imelo 8-hidroksi-5-nitrokinolinski skelet, kateremu smo na mesto 7 pripeli karboksilno skupino in nato sintetizirali različne amidne derivate. Sintetizirali smo tudi pet derivatov s 4-nitrofenolnim obročem in tako preverili nujnost prisotnosti kinolinskega skeleta za doseganje encimske inhibicije. Nazadnje smo sintetizirali še sedem amidnih derivatov z 2-karboksi-4-nitrofenolnim skeletom in tako dodatno raziskali kemijski prostor potencialnih inhibitorjev katepsina B.

Pri analizi rezultatov biokemijskega vrednotenja smo ugotovili, da spojine z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim skeletom izkazujejo od 1.5 do 5.3 krat boljšo inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B v primerjavi z ostalima dvema skupinama spojin. Tako smo ugotovili, da je prisotnost enega substituiranega obroča premalo za tvorbo optimalnega števila interakcij z S2' podmestom encima. Nadaljnji pregled rezultatov je pokazal, da so spojine z amidno vezjo izkazovale boljšo inhibicijo tako endopeptidazne kot tudi eksopeptidazne aktivnosti. Vse spojine, ki so imele v svoji strukturi ciano skupino, so izkazovale najboljšo inhibicijo katepsina B, saj lahko ciano skupina tvori večje število interakcij z aktivnim mestom encima. Boljšo inhibicijo katepsina B so pokazale tudi spojine, ki so imele v svoji stranski skupini pripel obročni sistem – le ta se je lahko umestil v S1 podmesto in tako izboljšal inhibitorne lastnosti.

Kot najboljši spojini sta se izkazali spojini **6** in **7**, ki izkazujeta primerljivo inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B z nitroksolinom. Zanimivo je, da obe spojini kljub strukturni podobnosti z nitroksolinom mnogo bolj inhibirata eksopeptidazno aktivnost (8.8-krat močnejše) kot nitroksolin.

ABSTRACT

Cathepsin B is a lysosomal cysteine protease possessing exopeptidase and endopeptidase activities. The dipeptidyl carboxypeptidase activity is associated with physiological processes of protein deactivation, whereas the endopeptidase activity is responsible for more specific degradation of extracellular matrix proteins, leading to tumor invasion and metastasis. Therefore, cathepsin B has become an interesting target for the development of new compounds that would selectively inhibit the endopeptidase activity of the enzyme.

One of the most interesting, selective, non-covalent inhibitors of cathepsin B is 8-hydroxy-5-nitroquinoline (nitroxoline), an antibacterial agent that inhibits the endopeptidase activity of cathepsin B in the low micromolar range.

As a part of the thesis, we successfully synthesized twenty new potential inhibitors of cathepsin B; eight of which possessed an 8-hydroxy-5-nitroquinoline scaffold to which a carboxyl group was attached at position 7 and a variety of amide derivatives were subsequently synthesized. We also prepared five compounds with a 4-nitrophenol ring with the aim to determine the importance of the quinolone ring for potent inhibition of the enzyme. Finally, we synthesized seven amide derivatives with 2-carboxy-4-nitrophenol ring and thus further investigated the chemical space of potential inhibitors of cathepsin B.

Results of the biochemical evaluation showed that the compounds with the 8-hydroxy-5-nitroquinoline scaffold inhibited the endopeptidase activity of cathepsin B from 1.5 to 5.3 better when compared to the other two groups of compounds. Thus we can establish that the presence of only one substituted aromatic ring is not enough to form an optimum number of interactions within the S2' subsite of cathepsin B. Further examination of the results showed that the compounds with the amide bond showed greater inhibition of the endopeptidase and exopeptidase activities. All compounds possessing a cyano group in the structure were found to be more potent inhibitors of cathepsin B; most probably due to the ability of the cyano moiety to form favourable interactions with the active subsites of the enzyme. Improved inhibition of cathepsin B was also exhibited by the compounds that had an additional ring attached in the side

chain at position 7. We can postulate that these compounds are able to form more interactions with the S1 subsite and thus exhibit improved inhibitory properties.

The best inhibition was displayed by the compounds **6** and **7**, indicating a comparable endopeptidase inhibition of cathepsin B activity with the parent nitroxoline. Interestingly, despite having structural similarities with nitroxoline both compounds showed 8.8-fold better inhibition of the exopeptidase activity when compared with nitroxoline.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ocetna kislina
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	aspartat
CH₂Cl₂	diklorometan
Cys	cistein
d	doublet
dd	dublet dubleta
DMSO	dimetil sulfoksid
EtOH	etanol
EtOAc	etyl acetat
Gln	glutamin
Gly	glicin
His	histidin
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IC₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
Ile	izolevcin
J	sklopitevna konstanta
K_i	inhibitorna konstanta
m	multiplet
MeOH	metanol
NMR	nuklearna magnetna resonanca
Na₂CO₃	natrijev karbonat
Na₂SO₄	natrijev sulfat
s	singlet

t	triplet
TBTU	(O-benzotiazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TGF	transformirajoči rastni faktor
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TIMP-1,-2	tkivni inhibitor metaloproteinaz
TLC	tankoplastna kromatografija
VEGF	vaskularni endotelni rastni faktor
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

1.1. PROTEAZE

Proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Poznani so tudi pod imenom proteolitični encimi ali proteinaze. Celica z njimi regulira funkcijo in usodo proteinov ter tako skrbi za normalno homeostazo. Proteaze lahko razdelimo na dva načina, in sicer glede na mehanizem katalize ali pa delitev v klane.

Proteaze se glede na mehanizem katalize delijo v 6 razredov:

- serinske proteaze,
- treoninske proteaze,
- cisteinske proteaze,
- asparaginske proteaze
- metaloproteaze
- proteaze neznanega tipa [1].

Delitev proteaz v posamezne klane pa poteka preko njihove podobnosti v terciarni strukturi. Klani proteaz se glede na medsebojno homolognost razdelijo še v družine in poddružine [2, 3].

Proteaze izvršijo hidrolizo preko nukleofilnega napada na ogljik v amidni vezi, med seboj pa se razlikujejo tudi po mehanizmu delovanja. Medtem ko cisteinske, serinske in treoninske proteaze uporabljajo funkcionalne skupine ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$) v svojih stranskih verigah za nukleofilni napad, asparaginske in metaloproteaze to dosežejo preko spremembe kisikovega atoma vode v nukleofil [2]. Nastali nukleofili lahko cepijo protein znotraj verige (endopeptidaza) ali na koncu polipeptidne verige (eksopeptidaza). Eksopeptidaze lahko naprej razdelimo še na karboksipeptidaze (cepijo s C-terminalnega konca peptida) in aminopeptidaze (cepijo z N-terminalnega konca). Lahko jih razdelimo tudi po njihovi substratni specifičnosti: proteaze, ki specifično prepoznajo in cepijo eno

samo aminokislinsko zaporedje; ter nespecifične, promiskuitetne proteaze, ki nespecifično razgradijo peptid [4].

Proteaze predstavljajo približno 2% človeškega genoma in opravljajo pomembne naloge v naših organizmih. Poleg manj zapletenih procesov, kot je na primer nespecifična razgradnja proteinov v želodčnem soku, proteaze opravljajo tudi zelo selektivno razgradnjo specifičnih substratov, ki vplivajo na številne biološke procese. Danes poznamo njihovo vpletjenost v procesih strjevanja krvi, predstavitevi antigenov, apoptozi, aktivaciji citokinov, angiogenezi, resorpciji kostnega tkiva ter aktivaciji in migraciji imunskih celic. Zaradi tako širokega in specifičnega delovanja lahko ob nepravilnem delovanju proteaz pride do patoloških stanj kot so koagulopatije, rak, avtoimunih in nevrodegenerativnih bolezni; vpletene pa naj bi bile tudi v proces bakterijske in virusne okužbe [2, 5]. Zato proteaze ne predstavljajo le obetavne tarče za zdravljenje teh bolezni temveč tudi diagnostične in napovedne kazalce, s katerimi lahko spremljamo potek bolezni.

1.2. CISTEINSKE PROTEAZE

Cisteinske proteaze so peptidaze, pri katerih je vršilec nukleofilnega napada na ogljikov atom amidne vezi tiolna vez. Najdemo jih v skoraj vseh živih organizmih, tako v sesalcih, bakterijah, rastlinah, glivah kot virusih [6].

Glede na podobnost v aminokislinskem zaporedju jih delimo v 9 klanov in skupino neuvrščenih proteaz. Vsak klan je označen s črko, ki predstavi, po katerem mehanizmu poteče kataliza (A - asparaginska kislina, C - cistein, itd.). Najštevilčnejši je klan CA, v katerega spada družina papainov (C1). Ta se še nadalje deli na dve poddružini, papainu podobnih proteaz (C1A) ter proteaze podobne bleomicin-hidrolazi (C2A) [7].

V poddružino papainu podobnih proteaz (C1A) spadajo tudi katepsini. Do danes jih poznamo 11 (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X) [3]. Svoje substrate lahko razgrajujejo kot endopeptidaze, z izjemo katepsinov B, C, H in X, ki lahko zaradi posebnega strurnega elementa delujejo tudi kot eksopeptidaze. Kljub temu, da so cisteinski katepsini veliko časa veljali le za pretežno lizosomske proteaze, so nedavna odkritja pokazala, da lahko izkazujejo svoje delovanje tudi izven lizosomov. Našli so jih v jedru, citosolu, vezane na celično membrano ter tudi izven celice.

Katepsini so zgrajeni iz dveh domen, leve, v kateri prevladuje alfa vijačnica, in desne, v kateri prevladuje motiv beta sodčka. Obe domeni sta skupaj povezani z disulfidnimi vezmi v obliko črke V. Med domenama se razteza aktivno mesto. V levi domeni se nahaja Cys29, ki tvori tiolat-imidazolijev ionski par s His199, ki se nahaja v desni domeni. Skupaj tvorita katalitično diado cisteinskih proteaz [8]. V pomoč pri cepitvi peptidne vezi substrata jima je tudi Asn175, ki ustrezno orientira imidazolijev obroč His219 [9].

S pomočjo kristalne strukture katepsina z inhibitorji so ugotovili, da se substrat encima veže v režo z aktivnim mestom v iztegnjeni konformaciji [10]. Pri tem naj bi aminokislinski ostanki substrata tvorili interakcije s petimi podmesti na encimu: S1, S1', S2, S2' in S3 (nomenklatura po Schechterju in Bergerju). Ta podmesta poskrbijo za pravilno usmeritev in vezavo substrata na encim. Nadaljnje raziskave so razkrile, da so podmesta S1, S2 ter S1' bolj pomembne pri tvorbi vezi, saj tvorijo interakcije tako z amidno vezjo kot aminokislinskim ostanki in tako poskrbijo za substratno specifičnost katepsinov. Medtem pa podmesti S2' in S3 tvorita interakcije samo z aminokislinskimi ostanki [6].

Katepsini so v telesu udeleženi v številnih fizioloških procesih, kot so razgradnja proteinov, celična proliferacija, resorpcija kostnega tkiva, aktivacija prekurzorskih proteinov, uravnavanje rasti dlak, predstavitev antigenov in apoptoza celice. Njihovo nepravilno delovanje pa se odraža v številnih patoloških procesih, kot so revmatoidni artritis in osteoartritis, rak, nevrodegenerativne bolezni, ateroskleroza in bolezni, ki so posledice nezadostne razgradnje proteinov v lizosomih [3, 8, 11, 12]. Mutacija na nivoju gena, ki kodira katepsin, lahko vodi tudi v različne dedne bolezni, kot so piknodisostoza in sindroma Papillon-Lefevre ter Haim-Munk. [8]

Zaradi širokega spektra bolezni, pri katerih so katepsini dokazano vpleteni, se danes razvoj usmerja v iskanje novih inhibitorjev, s katerimi bi lahko vplivali na potek določenega bolezenskega procesa (npr. katepsin B pri raku, katepsin K pri osteoporozni in revmatoidnem artritisu, katepsin S pri astmi) [11, 13]. Obenem lahko prisotnost katepsinov izkoristimo tudi kot diagnostični/prognostični dejavnik za bolezni, pri katerih so udeleženi [15].

1.3. KATEPSIN B

1.3.1. Zgradba katepsina B

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza diskaste oblike in velikosti 50 Å. Po strukturi je podoben papainu. Njegova zrela oblika je sestavljena iz leve domene, ki jo sestavlja *N*-terminalni konec, ter iz desne domene, ki jo sestavlja *C*-terminalni konec polipeptidne verige. Leva domena je pretežno sestavljena iz treh alfa verig, medtem ko desno sestavlja šest beta plošč, ki tvorijo motiv beta sodčka. Med domenama se nahaja reža v obliki črke V, kjer je aktivno mesto encima [16, 17]. Cys29, ki je odgovoren za cepitev peptidne vezi, se nahaja na *N*-terminalnem delu alfa vijačnice. Ima nenavadno nizko pK vrednost (približno 4). To je posledica tvorbe tiolat-imidazolijevega ionskega para s His199. V tem procesu se tudi pK bazičnega imidazola spremeni na približno 8. Zato encim katepsin B najbolje deluje pri pH pogojih od 4 do 8 [18].

Za katepsin B je značilen tudi strukturni element, zaradi katerega se razlikuje od ostalih katepsinov. Nad aktivnim mestom katepsina B se razprostira zaporna zanka, ki je sestavljena iz 21 aminokislin (Ile105-Thr125) [19]. Njena funkcija je omejevanje dostopa substratov do aktivnega mesta. Ker pa je zanjo značilno, da je gibljiva in posledično lahko prisotna v različnih konformacijah, omogoča katepsinu B poleg endopeptidazne tudi eksopeptidazno aktivnost [2].

Zanka v zaprti konformaciji encima tvori dva solna mostička med His110-Asp22 ter Arg116-Asp224, s čimer prepreči vezavo endopeptidaznih substratov v aktivno mesto in lahko deluje le kot eksopeptidaza. Eksopeptidazno konformacijo encima dodatno stabilizira še His111, ki se nahaja na vrhu zanke in tvori elektrostatske interakcije s *C*-terminalno COOH skupino substrata [19, 20, 21].

V nekaterih primerih pa se lahko solni mostički, ki vežejo zanko na encim, prekinejo. V tem primeru se zaporna zanka odmakne od reže in katepsin B pridobi tudi endopeptidazno aktivnost.

Ali bo katepsin B izkazoval endopeptidazno ali eksopeptidazno aktivnost, je v veliki meri odvisno od pH okolja, v katerem se encim nahaja. V kislem mediju (npr. v lizosому) deluje kot eksopeptidaza in tako opravlja svojo fiziološko funkcijo, v nevtralnem mediju (npr. vezan na membrano) pa izkazuje endopeptidazno aktivnost, ki je povezana z

razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa in lahko vodi v tumorsko invazijo in metastaziranje [14, 22].

1.3.2. Sinteza katepsina B

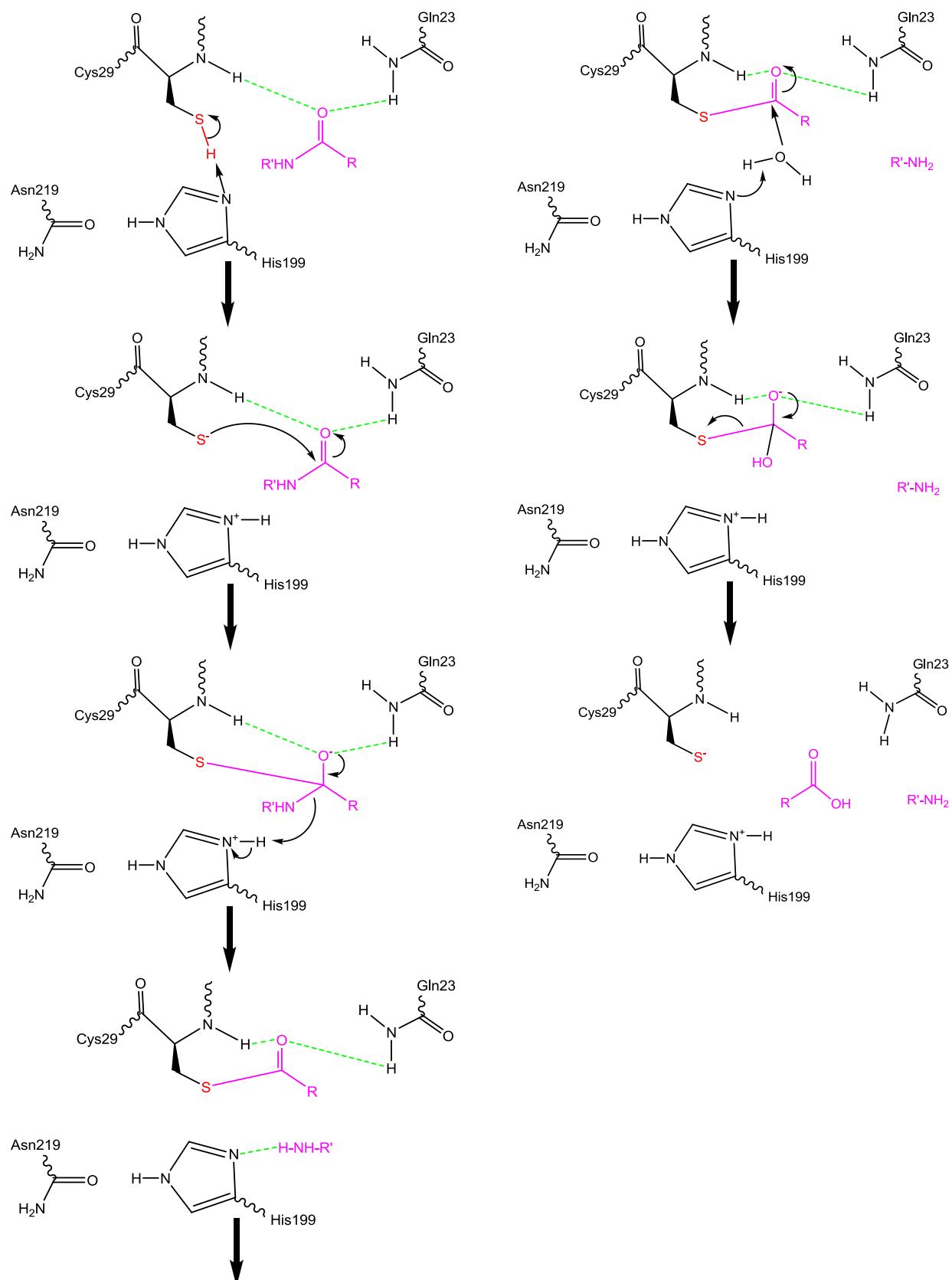
Katepsin B se prvotno sintetizira v neaktivni obliki kot 339 aminokislin dolgi preprokatepsin B na ribosomih zrnatega endoplazmatskega retikuluma [22]. Preprokatepsin B je sestavljen iz vodilnega peptida, inhibitornega propeptida, zrele oblike encima ter C-terminalnega propeptida. Ob sintezi sočasno poteče cepitev vodilnega peptida in preprokatepsin se pretvori v 314 aminokislin dolg prokatepsin. Ta vstopi v lumen zrnatega endoplazmatskega retikuluma in Golgijev aparat, kjer se izvrši *N*-glikozilacija dveh asparaginskih ostankov (Asn38 ter Asn111) in fosforilacija manoznega ostanka [22]. Po fosforilaciji se encim veže na manzo-6-fosfatne receptorje, kar omogoči njihovo razmeščanje v endosome, ki se po zorenju zlijejo z lisozomi [4, 24]. Med procesom zorenja se v veziklih zniža pH, kar povzroči disociacijo encima iz manoznih receptorjev in proteolitično odstranitev obeh terminalnih propetidov. S tem povzroči aktivacijo encima. Proteolitično aktivacijo katepsina B lahko poleg nizkega pH katalizirajo tudi druge cisteinske proteaze (catepsin C, D, G, in L, pepsin, papain, nevtrofilna elastaza, tPA, uPA) ter tudi katepsin B sam [15, 25].

Na tej stopnji je aktiviran katepsin B v obliki enoverižnega encima. Če pa pride še do nadaljnje cepitve dipeptida v internem peptidu, lahko nastane dvojerižna oblika encima, ki jo sestavlja lahka (5 kDa) in težka veriga (26 kDa). Med seboj sta povezani z disulfidno vezjo. [15].

1.3.3. Mehanizem delovanja katepsina B

Katalitična triada katepsina B je sestavljena iz treh aminokislinskih ostankov, in sicer Cys29, His199 in Asn219. Vršilec nukelofilnega napada na substratni ogljikov atom je tiolna skupina Cys29. Nastanek nukleofila sproži imidazol His199, ki deprotonira tiolno skupino Cys29. Da ta korak lahko poteče, poskrbi Asn219, ki je potreben za pravilno orientacijo imidazolnega obroča His199. S tem se tiolna skupina Cys29 aktivira in skupaj z imidazolom His199 tvorita tiolat-imidazolni ionski par, ki je aktiven pri pH vrednostih od 4 do 8 [25]. Pred napadom se med –NH skupinama Cys29 ter Gln23 tvori oksianionski žep, ki stabilizira substrat ter poveča reaktivnost nukleofila [15, 17].

Po nukleofilnem napadu se imidazolni kation prenese na $-\text{NH}$ skupino substrata, ki povzroči disociacijo *C*-terminalnega dela z encima. Imidazol His199 nato polarizira molekulo vode, ki povzroči hidrolizo tioestrske vezi aciliranega encima. To vodi v disociacijo *N*-terminalnega dela substrata z encima [15] (Slika 1).



Slika 1. Mehanizem delovanja katepsina B.

1.3.4. Vloga katepsina B v telesu

Katepsin B je encim, ki ga najdemo skoraj v vseh tkivih v telesu. Ker je njegova koncentracija najvišja v lizosomih, so sprva zmotno mislili, da je njegova edina funkcija lizosomska razgradnja celici lastnih in nelastrnih fagocitiranih proteinov [25]. Z nadaljnjiimi raziskavami so dokazali, da katepsin B sodeluje tudi pri drugih, bolj specifičnih fizioloških procesih, kot so apoptoza, celjenje ran, remodulacija kosti, sproščanju ščitničnih hormonov iz tiroglobulina, predstavitev antigenov, preoblikovanju matriksa in sodeluje pri aktivaciji pro-hormonov ter pro-encimov [2, 17, 25].

Ob tako široki paleti fizioloških procesov, pri katerih katepsin B sodeluje, ni presenečenje, da določene napake na nivojih transkripcije, posttranskripcijskih sprememb, translacije in posttranslacijskih sprememb vodijo v številne bolezenske procese. Danes je nepravilno delovanje katepsina B (ekspresija, aktivnost in lokalizacija) povezano s pojavom raka, Alzheimerjeve bolezni, artritisa in osteoporoze, z vnetnimi bolezni pljuč in z akutnim pankreatitisom [2, 17, 25].

1.3.5. Vloga katepsina B pri raku

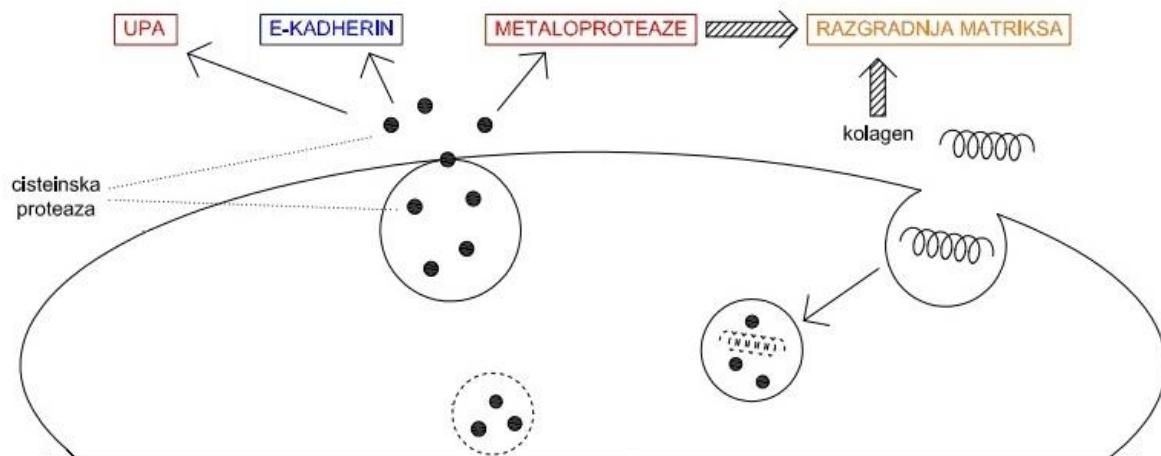
Prvi zmetki o tem, da so cisteinske proteaze povezane z napredovanjem raka, izvirajo iz leta 1930. Vendar tej ugotovitvi niso pripisovali velikega pomena vse do leta 1968, ko so odkrili povišano aktivnost katepsinov v človeških tumorskih vzrocih [26]. To je sprožilo še vedno trajajoče intenzivno raziskovanje, s katerim naj bi spoznali vse vloge katepsinov pri napredovanju te bolezni.

Do danes so povišano aktivnost in/ali ekspresijo katepsina B zaznali pri različnih oblikah raka (kolorektalnem, dojke, pljuč, jeter, možgan, melanoma) [26, 27]. Povečana aktivnost katepsina B lahko nakazuje na nepravilno delovanje endogenih inhibitorjev, katerih naloga je nadzor teh encimov. Omenjena spremenjena aktivnost encima pri rakavih obolenjih je razlog, da se danes katepsin B uporablja tudi kot prognostični in diagnostični kazalec pri bolnikih s to boleznjijo.

Katepsin B sodeluje pri večini procesov, ki pospešujejo napredovanje raka; udeležen je namreč pri nastanku in proliferaciji tumorskih celic, angiogenezi ter pri pospeševanju tumorskega metastaziranja v druge dele telesa. Na tumorsko invazijo in metastaziranje bistveno vpliva neposredno z razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa (fibronektin,

kolagen IV ter laminin) in posredno preko aktivacije proteaz, ki so del proteolitične kaskade (urokinazni aktivator plazminogena, pro-uPA), ter inaktivacije celično adhezivnih proteinov (E-kadherin). Za povečano ekspresijo in translokacijo katepsina B zunaj celice naj bi poskrbel kisel pH, ki ga ustvarja tumor v svoji okolici. Tako se povečano število kopij katepsina B začne zbirati na obrobju tumorskega tkiva, kjer se začne razgradnja zunajceličnega matriksa. Dejstvo pa je tudi, da je znotrajcelična oblika katepsina B, ki je prisotna v lizosomih ter endosomih, tudi sposobna razgrajevanja proteinov zunajceličnega matriksa [26] (Slika 2).

Katepsin B je vključen tudi v pospeševanje procesa angiogeneze, ki je osrednja stopnja pri rasti in metastaziranju tumorjev. Ko tumorju začne primanjkovati hranil in kisika, ta sproži rast novih krvnih žil iz že obstoječih žil in tako pride do potrebnih hranil. Proses neovaskularizacije nadzirajo rastni faktorji (VEGF in TGF-beta) ter metaloproteaze, katerih funkcija je preoblikovanje zunajceličnega matriksa. Katepsin B naj bi z razgradnjo TIMP-1 in TIMP-2, ki sta inhibitorja metaloproteaz, poskrbel za večjo aktivnost metaloproteaz in posledično pospešil proces angiogeneze [28]. Poleg tega pa z razgradnjo zunajceličnega matriksa povzroči sproščanje rastnih faktorjev VEGF in TGF- β , ki še dodatno pripomorejo k procesu angiogeneze [29, 30].



Slika 2. Prikaz vpliva cisteinskih proteaz/katepsina B na potek razvoja raka. Skica prikazuje tumorigene dejavnike razgradnje matriksa.

1.4. INHIBITORJI KATEPSINA B

Zaradi neposredne povezave med zvišano koncentracijo katepsina B in patološkimi procesi, predstavlja le-ta potrjeno tarčo v boju s temi boleznimi. Najbolj raziskana je vloga katepsina B pri rakavih obolenjih. Danes je znano, da lahko inhibitorji katepsina B znatno zmanjšajo invazivnost tumorskih celic, s čimer je dokazan potencial uporabe v kemoterapiji [31].

Glede na izvor delimo inhibitorje katepsina B na endogene in eksogene (sintezne) inhibitorje.

1.4.1. Endogeni inhibitorji

Za nadzor aktivnosti cisteinskih proteaz v organizmu so odgovorni endogeni inhibitorji. V telesu jih je veliko; najštevilčnejšo ter najbolj raziskano skupino inhibitorjev predstavlja cistatinska nadružina. Le-to glede na njihovo aminokislinsko zaporedje, prisotnost in položaj disulfidne vezi ter molekulske mase proteina razdelimo v tri družine: cistatini tipa I (stefini), cistatini tipa II, cistatini tipa III (kininogeni) [6]. Vsi so kompetitivni, reverzibilni, tesno prilegajoči se inhibitorji z delovanjem v mikro- do pikomolarnem območju koncentracije [31]. Za izvršitev inhibicije so pomembni trije strukturni elementi: *N*-terminalni fragment z aminokislinskim ostankom Gly11 ter dve zanki na posameznem koncu inhibitorja. Inhibitor se veže v aktivno mesto encima ter tako prepreči vezavo substrata [6].

Cistatini tipa I (stefini) so znotrajcelični enoverižni polipeptidi, ki so sestavljeni iz približno 100 aminokislinskih ostankov (11 kDa), niso glikozilirani ter ne vsebujejo disulfidnih vezi [32]. Glavna predstavnika te družine sta stefina A in B. Stefin B lahko najdemo po vsem telesu v skoraj vseh tipih celic, medtem ko stefin A le v določenih tkivih (koža, epitelij) [6].

Cistatini tipa II so ekstracelularni enoverižni polipeptidi, ki so sestavljeni iz od 120 do 122 aminokislinskih ostankov. Za razliko od stefinov imajo cistatini tipa II dve disulfidni vezi ter zmožnost glikozilacije in fosforilacije. Najpomembnejši predstavnik te družine je cistatin C, ki ga najdemo skoraj v vseh fizioloških tekočinah. Poleg tega pa poznamo tudi še cistatine D, E, F, S, SA in SN [6].

Cistatini tipa III (kininogeni) so prekurzorji različnih kininskih peptidov (bradikinin, kalikinin). Med vsemi cistatini so največji (68 - 120 kDa), sebujejo več disulfidnih vezi ter so prisotni v glikozilirani obliki [6]. Nedavno objavljeni rezultati so pokazali, da kininogeni nimajo močnega inhibitornega učinka na katepsin B, saj naj bi njegova strukturna zanka motila vezavo kinina na encim [33].

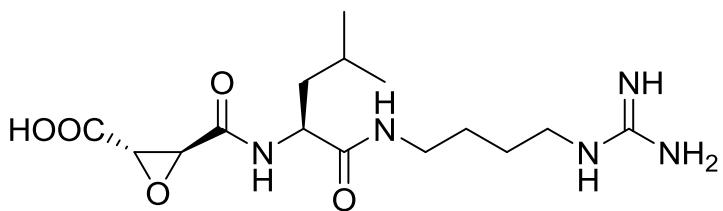
Čeprav lahko opisani endogeni inhibitorji zelo učinkovito inhibirajo aktivnost katepsina B, se jih zaradi neugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti ter hkratne interakcije tudi z ostalimi katepsini ne uporablja v terapiji. Se pa njihove kristalne strukture v kompleksu s katepsinom B uporablja za načrtovanje ter optimizacijo nizkomolekularnih sinteznih inhibitorjev [31].

1.4.2. Eksogeni inhibitorji

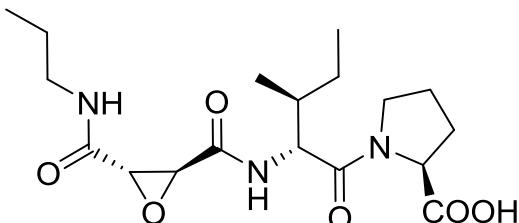
Nizkomolekularne sintezne inhibitorje katepsina B lahko razdelimo na kovalentne in nekovalentne inhibitorje, kovalentne pa še naprej na ireverzibilne in reverzibilne inhibitorje.

Značilnost ireverzibilnih inhibitorjev je prisotnost elektrofilnega fragmenta v njihovi peptido-mimetični strukturi, ki tvori ireverzibilno kovalentno vez z nukleofilno tiolno skupino v aktivnem mestu proteina. Vendar ravno ta velika reaktivnost predstavlja največje težave, saj lahko pride do reakcij tudi z drugimi netarčnimi proteini [2].

Najbolj raziskani ireverzibilni inhibitorji so epoksisukcinilni inhibitorji. Skupina se je razvila iz spojine vodnice E-64, v naravi prisotnega inhibitorja, ki so ga leta 1978 izolirali iz plesni *Aspergillus japonicus*. Zaradi preširokega spektra delovanja na različne katepsine in v želji po selektivnem inhibitorju katepsina B so raziskovalci sintetizirali različne derive E-64 [3]. Kot najboljši inhibitor katepsina B se je izkazala spojina CA-074, ki je imela več kot stokrat nižjo polovično inhibitorno koncentracijo kot E-64, medtem ko je inhibicija drugih katepsinov ostala na ravni inhibitorja E-64 [2]. Večjo selektivnost za katepsin B so dosegli z drugače pozicionirano karboksilno skupino, ki za razliko od E-64 tvori interakcijo z obema histidinskima ostankoma (His110 in His111) zaporne zanke katepsina B. Na žalost se zaradi slabega prehajanja biološke membrane (peptidna struktura, prisotnost naboja na molekuli) ter toksičnosti ni nikoli prenesel v klinično uporabo [3].



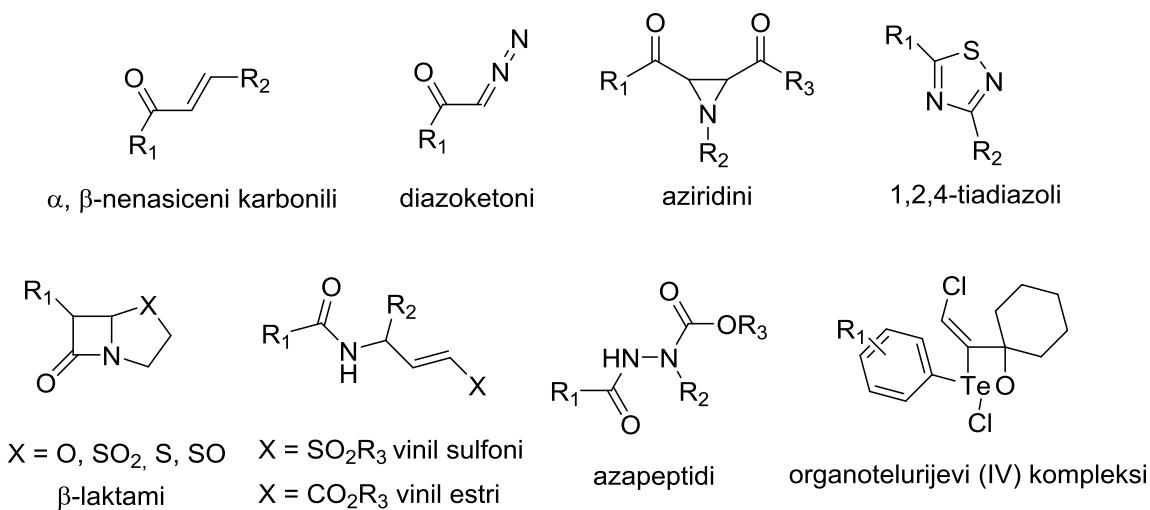
E-64



CA-074

Slika 3. Strukturi eposukcinilnih inhibitorjev E-64 ter CA-74.

Poleg epoksisukcinilnih poznamo tudi druge ireverzibilne inhibitorje. To so alfa, betanenasičeni karbonili oz. Michaelovi akceptorji, diazoketoni, aziridini, 1,2,4-tiadiazoli, beta-laktami, vinil sulfoni, vinil estri, azapeptidi, organotelurijevi kompleksi, derivati boronske kisline, aciloksi metil ketoni, hidroksamati ter halogenirani metil ketoni [2, 3, 31, 34]. Splošne strukture nekaterih so predstavljene na sliki 4.

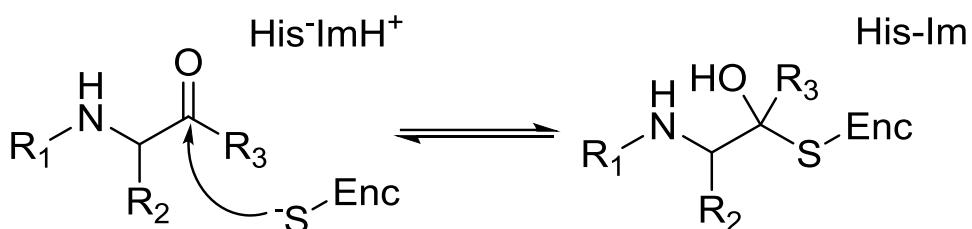


Slika 4. Splošne strukture nekaterih ireverzibilnih inhibitorjev.

Zaradi številnih toksičnih učinkov, ki jih izkazujejo ireverzibilni inhibitorji, se danes veliko truda usmerja v iskanje reverzibilnih in tesno prilegajočih inhibitorjev katepsina B. Prevladuje prepričanje, da naj bi idealen inhibitor zaviral samo endopeptidazno aktivnost, medtem ko vpliva na eksopeptidazno aktivnost ne bi imel, oziroma bi bil ta vpliv zelo majhen. Nekateri avtorji predlagajo, da bi to najlažje dosegli s spojinami, ki ne bi prehajale celičnih membran ter tako inhibirale le encime zunaj celic [26].

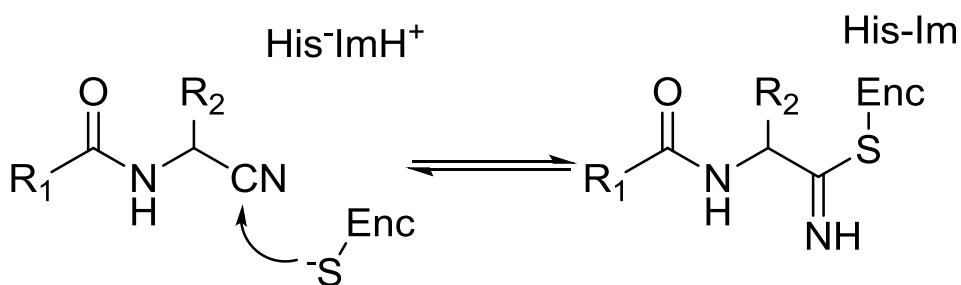
Največji problem predstavlja iskanje elektrofilnih skupin, s katerimi bi dosegli samo reverzibilno inaktivacijo encima. Zato večina reverzibilnih kovalentnih inhibitorjev vsebuje karbonilno ali nitrilno skupino [31].

Inhibitorji s karbonilno skupino delujejo preko tvorbe tetraedričnega intermediata s tiolno skupino (Cys29) encima. V to skupino prištevamo aldehidne, ketonske, diketonske, trifluorometilketonske derivate; alfa-ketoestre, alfa-ketoamide ter metilketonske amide [15, 31].



Slika 5. Splošni prikaz mehanizma inhibicije reverzibilnih inhibitorjev s karbonilno skupino.

Drugo skupino reverzibilnih kovalentnih inhibitorjev predstavljajo spojine, ki vsebujejo nitrilno skupino. Ti veljajo za bolj zanimive, saj izkazujejo večjo selektivnost za cisteinske proteaze kot karbonilni inhibitorji. Mehanizem inhibicije naj bi potekal po poti podobni Pinnerjevi reakciji; po nukleofilnem napadu tiolne skupine na nitrilno skupino se tvori reverzibilni trigonalni tioimidatni kompleks v aktivnem mestu. Nitrilne inhibitorje delimo v tri večje podskupine: cianamide, aromatske nitrile in derivate aminoacetonitrila [34].



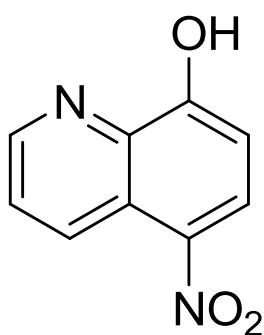
Slika 6. Splošni prikaz mehanizma inhibicije reverzibilnih inhibitorjev z nitrilno skupino.

Poleg teh dveh poznamo tudi druge reverzibilne inhibitorje katepsina B. Ti so različnih struktur: derivati ciklopropanona, amentoflavona, ftalata; paladijeve (II), oksorenijeve (V) ter zlato (III) komplekse [31, 35, 36, 37].

1.4.3. Nitroksolin (8-hidroksi-5-nitrokinolin)

V zadnjih letih se veliko pozornosti namenja spojni 8-hidroksi-5-nitrokinolin, poznanim pod trivialnim imenom nitroksolin. Nitroksolin je protibakterijska učinkovina, ki se uporablja za zdravljenje urogenitalnih bakterijskih okužb [21].

Poleg tega je bilo ugotovljeno, da je nitroksolin tudi reverzibilni mešani inhibitor katepsina B s $K_i = 154.4 \mu\text{M}$ ter $K_i' = 39.5 \mu\text{M}$ za endopeptidazno aktivnost ter s $K_i = 271.8 \mu\text{M}$ za eksopeptidazno aktivnost. Večja afiniteta do endopeptidazne aktivnosti encima je zaželena, saj je ravno ta odgovorna za pojav večine patoloških procesov.



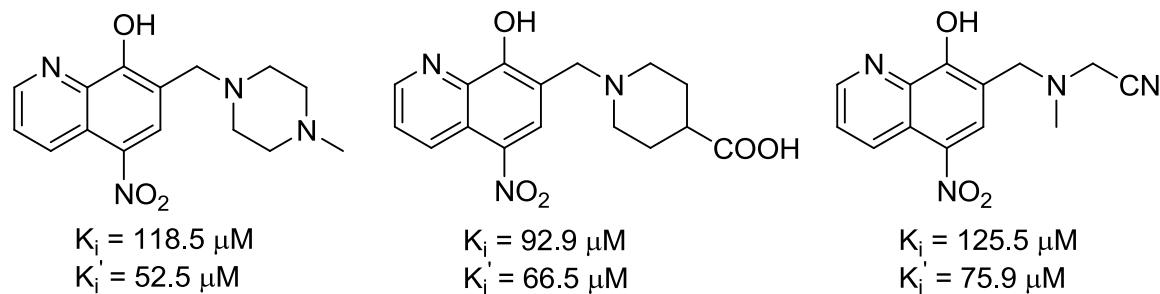
Slika 7. Strukturna formula nitroksolina.

S pomočjo kristalne strukture so raziskovalci ugotovili, da sta za inhibitorno delovanje nitroksolina nujno potrebni skupini $-\text{NO}_2$ na mestu 5 ter $-\text{OH}$ na mestu 8. Medtem ko se

kinolinski skelet veže v mesto S2', se $-NO_2$ skupina vrine med His110 ter His111 na zaporni zanki. Vsak od obeh kisikovih atomov tvori interakcijo s posameznim histidinom, kar povzroči močno afiniteto molekule do encima. Hidroksilna skupina ne tvori interakcij z encimom, vendar je očitno nujna, saj se ob njeni odstranitvi topnost molekule in posledično inhibicija zmanjšata [21].

Ker molekula nitroksolina ne izkazuje toksičnih stranskih učinkov in dobro prehaja celične membrane, ima odličen potencial za nadaljnje raziskovanje in iskanje še močnejšega inhibitorja katepsina B.

Tako se je zelo hitro začela sinteza derivatov, s katerimi so dodatno raziskali kemijski odnos med strukturo in delovanjem in poskušali izboljšati inhibicijo encima. Ugotovljeno je bilo, da so se najbolje obnesle modifikacije na mestu 7 kinolinskega obroča, modifikacije na vseh ostalih mestih pa so povzročile slabšo inhibicijo encima. S pomočjo kristalne strukture nitroksolina v aktivnem mestu encima so sklepali, da se dodatni strukturni elementi pripeti na mesto 7 najverjetneje vežejo v S1' podmesto katepsina B. Kot najbolj zanimive substitucije na mestu 7 so se izkazale modifikacije, pri katerih sta bili prisotni nitrilna skupina ali nasičeni/nenasičeni obroči [21].



Slika 8. Nekateri derivati nitroksolina z modifikacijo na mestu 7, ki so izkazovali dobro inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B. Vsi so mešani inhibitorji [povzeto po 21, 38].

2. NAMEN DELA

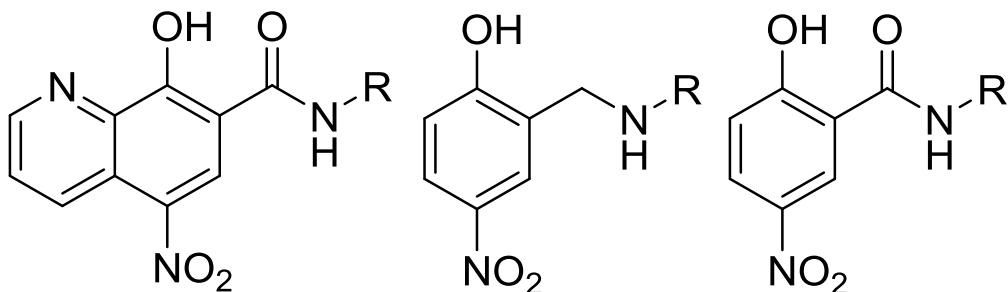
Nenadzorovana aktivnost katepsina B je povezana s številnimi patološkimi procesi v telesu, najpogosteje z rakom. Eden izmed bolj zanimivih selektivnih, nekovalentnih in reverzibilnih inhibitorjev katepsina B je protibakterijska učinkovina nitroksolin (8-hidroksi-5-nitrokinolin), ki inhibira njegovo endopeptidazno aktivnost v nizkem mikromolarnem območju [38, 39].

Namen dela bo sinteza novih potencialnih inhibitorjev katepsina B, ki bi izkazovale boljšo inhibitorno aktivnost kot nitroksolin. Izhajali bomo iz spojin z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim ali 4-nitrofenolnim skeletom.

Na 8-hidroksi-5-nitrokinolinski skelet bomo najprej uvedli karboksilno skupino na mesto 7, nato pa sintetizirali različne amidne derivate ter tako obširneje raziskali kemijski prostor potencialnih inhibitorjev katepsina B. Amid bomo pripravili z uporabo sklopitvenih reagentov ali preko tvorbe kislinskega klorida.

Nato bomo dodatno raziskali nujnost prisotnosti kinolinskega skeleta za doseganje dobre inhibicije. Zanimalo nas bo ali lahko ustrezno inhibicijo dosežemo že s spojinami, ki vsebujejo manjši fenolni obroč; pripenjali bomo različne amine na *ortho* mesto 4-nitrofenola z uporabo Mannichove reakcije.

Po sintezi 4-nitrofenolnih derivatov bomo preverili tudi, ali uvedba amidne vezi vpliva na konstantno inhibicije. Zato bomo najprej pripravili 2-karboksi-4-nitrofenol ter preko karboksilne skupine tvorili različneamide. Le-te bomo pripravili z uporabo sklopitvenih reagentov ali preko tvorbe kislinskega klorida.



Slika 9. Splošne strukture spojin, ki jih bomo sintetizirali.

Vsem sintetiziranim spojinam bomo določili *in vitro* inhibitorno aktivnost na katepsinu B s spektrofotometrično metodo. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo poskušali ugotoviti, kakšen vpliv imajo različni substituenti na inhibitorno aktivnost.

3. MATERIALI IN METODE

1. MATERIALI

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Merck, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluka, Alfa Aesar, TCI Chemicals, Carlo Erba.

2. METODE

Kromatografske metode

Za tankoplastno kromatografijo (TLC), s katero smo spremljali potek reakcij ter postopkov čiščenja s kolonsko kromatografijo, smo uporabili plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0.20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV svetilko (valovna dolžina = 254 nm ali 366 nm) in orositvene reagente bromkrezol zeleno (detekcija karboksilnih skupin) ter ninhidrin (detekcija aminov). Mobilne faze so bile različne in so navedene pri vsaki spojni posebej.

Pri kolonski kromatografiji smo uporabljali različno velike steklene kolone, odvisno od količine spojine. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck, z velikostjo por 0.063-0.200 mm.

Spektroskopske metode

Masni spektri spojin so bili posneti na spektrofotometru Autospec (VG-Analytical) z EI, ESI in HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

^1H ter ^{13}C spektre spojin smo posneli na spektrofotometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za Farmacijo. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih DMSO- d_6 in CF₃COOD, kot interni standard pa smo uporabili TMS. Pri procesiranju spektrov smo uporabljali računalniški program MestReC 4.8.6 proizvajalca Mesterlab Research S.L.

Elementna analiza

Elementno analizo spojin smo izvedli s Perkin-Elmer C, H, N analizatorjem, 240 C.

Določanje tališč

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

Nomenklatura spojin

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali program ChemDrawUltra, verzija 11.0, podjetja CambridgeSoft. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

Biokemijsko vrednotenje spojin na katepsinu B

Inhibitorno aktivnost smo določali preko inhibicije razgradnje dipeptida Z-Arg-Arg-AMC za endopeptidazno aktivnost ter inhibicije razgradnje Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys(Dnp)-OH (poznan tudi kot Abz-GIVRAK(Dnp)-OH) za eksopeptidazno aktivnost. Uporabili smo encim katepsin B, izoliran iz *E. coli* [39]. Testna raztopina katepsina B je bila pripravljena s 100 mM fosfatnim pufrom, pH 6, za endopeptidazno testiranje, ter s 60mM acetatnim pufrom, pH 5, za eksopeptidazno testiranje. V obe raztopini smo dodali še 0.1% PEG 8000, 5 mM DTT, 1.5 mM EDTA ter 0.01% Triton X-100. Pred testiranjem smo encim aktivirali s pet minutno inkubacijo pri 37 °C.

Pri testiranju endopeptidazne inhibitorne aktivnosti smo dodali 5 µL substrata Z-Arg-Arg-AMC (končna koncentracija 5 µM) in 5 µL testne spojine (koncentracija 50 µM) v pore mikrotitrsko ploščice. Potek reakcije smo povzročili z dodatkom 90 µL testne raztopine katepsina B (koncentracija 5 nM). Nastajanje fluorescirajočega razgradnega produkta substrata smo opazovali pri temperaturi 37 °C in valovni dolžini 460 nm (\pm 10 nm), medtem ko smo vzbujenost dosegli z obsevanjem pri 380 nm (\pm 20 nm).

Pri testiranju eksopeptidazne inhibitorne aktivnosti smo dodali 5 µL substrata Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys(Dnp)-OH (končna koncentracija 1 µM) in 5 µL testirane spojine (koncentracija 50 µM) v pore mikrotitrsko ploščice. Potek reakcije smo povzročili z dodatkom 90 µL testne raztopine katepsina B (koncentracija 0.5 nM). Nastajanje fluorescirajočega produkta substrata smo opazovali pri temperaturi 37 °C in valovni

dolžini 420 nm (± 10 nm), medtem ko smo vzbujenost dosegli z obsevanjem pri 320 nm (± 20 nm).

Vse teste smo izvedli dvakrat. Relativno inhibicijo encima smo izračunali po naslednji enačbi: Relativna inhibicija (%) = $100(1 - v_i/v_o)$, kjer v_i predstavlja hitrost nastanka razgradnih produktov v prisotnosti inhibitorja, medtem ko v_o predstavlja hitrost nastanka razgradnih produktov, če inhibitor ni prisoten.

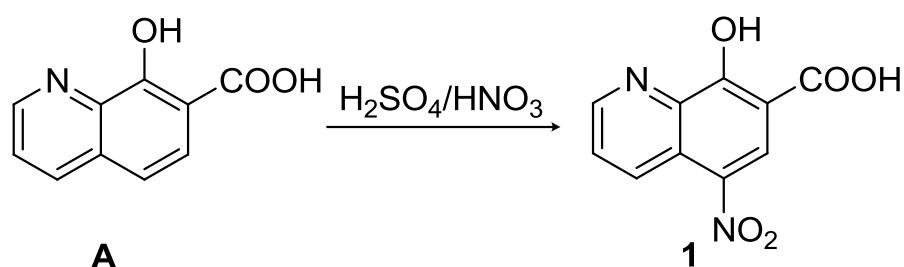
K_i vrednost smo določili z merjenjem hitrosti reakcij pri različnih koncentracijah substrata in inhibitorja. Na mikrotitrsko ploščo smo dodali 5 μL substrata v treh različnih koncentracijah (60, 180 in 360 μM Z-Arg-Arg-AMC za testiranje endopeptidazne aktivnosti ter 1, 3 in 6 μM Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys(Dnp)-OH za testiranje eksopeptidazne aktivnosti), 5 μL izbranega inhibitorja v sedmih različnih koncentracijah (0, 20, 40, 60, 80, 100 in 200 μM) ter 90 μL testne raztopine katepsina B (koncentracija 5 nM). Spremljanje reakcije je potekalo po zgoraj opisanem postopku. Rezultate smo obdelali s pomočjo programa SigmaPlot 12.

Testi so bili izvedeni na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SPOJINE Z 8-HIDROKSI-5-NITROKINOLINSKIM SKELETONOM

4.1.1. Uvedba nitro skupine na kinolinski obroč



Slika 10. Reakcijska shema tvorbe nitriranega produkta (A – izhodna spojina, 1 – produkt reakcije).

Sintezni postopek

V suho bučko smo pazljivo odmerili 96% žveplovo kislino (7.5 mL) in 7-karboksi-8-hidroskikinolin (5.0 mmol, 946 mg) (spojina A). Bučko smo z ledeno kopeljo ohladili na 0 °C ter počakali, da se je spojina A v celoti raztopila. Nato smo po kapljicah dodajali mešanico 96% žveplove kisline in 65% dušikove kisline (2 mL), ki smo jo predhodno zmešali v razmerju 1:1 in jo na ledeni kopeli ohladili do 0 °C. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 18 minut na ledeni kopeli. Po pretečenem času smo reakcijsko zmes zlili na 100 g zdrobljenega ledu. Izpadla je rumena oborina (produkt 1), ki smo jo odfiltrirali s presesevanjem in v sušilniku posušili do suhega.

8-Hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksilna kislina (1)

Opis: temno rumena trdna amorfna snov

m = 910 mg, izkoristek: 78 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 9 : 1 : 0.1$) = 0.29

Temperatura tališča: 273.0–275.0 °C

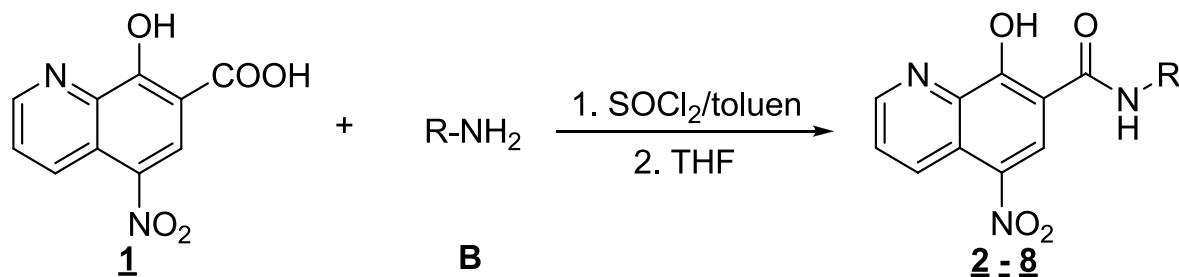
ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 233

HRMS (m/z = 233) za $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_5$: izračunan 233.0198 in izmerjen 233.0198

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 8.19 (dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 1H, Ar-H), 9.01 (dd, $J = 5.0, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H), 9.03 (s, 1H, Ar-H), 9.71 (dd, $J = 5.0, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

4.1.2. Tvorba amidne vezi

Uporaba tionil klorida



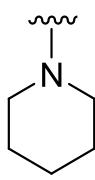
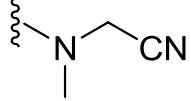
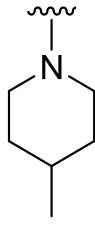
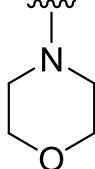
Slika 11. Reakcijska shema tvorbe kinolinskega amida z uporabo tionil klorida (**1** – produkt reakcije na sliki 10, **B** – izbrani amin, **2 – 8** – produkti reakcije, navedeni v tabeli I).

Splošni sintezni postopek

V suho bučko smo natehtali spojino **1** (2 mmol, 468 mg) in jo raztopili v toluenu (10 mL). Dodali smo tionil klorid (38.5 mmol), opremili bučko s povratnim hladilnikom ter pustili reakcijsko zmes mešati od 2 do 24 ur na oljni kopeli pri 80 °C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in nato reakcijsko zmes spirali s CH_2Cl_2 (3×30 mL). Preostanek smo raztopili v suhem THF (15 mL) ter bučko dali na ledeno kopel. Ko se je reakcijska zmes ohladila na 0 °C, smo pazljivo začeli dodajati izbrani amin (3 mmol) (**B**). Če je bil dodani

amin v obliki soli (HCl , H_2SO_4), smo reakcijski zmesi dodali tudi trietilamin (7.5 mmol). Po dodatku vseh spojin smo bučko odmknili iz ledene kopeli ter pustili mešati pri sobni temperaturi od 2 do 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo, suhemu preostanku dodali citronsko kislino (10 mL) ter ekstrahirali z CH_2CL_2 (3×50 mL). Organski fazi smo dodali Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Po potrebi smo produkt dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.

Tabela I. Reakcijski časi in strukturne formule posameznih produktov **2 – 8** iz slike 11.

Oznaka produkta	R	Čas reakcije (h)
2		2
3		20
4		24
5		3

6		2
7		22
8		20

((8-Hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)(piperidin-1-il)metanon (2)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 15 : 1$, nato še prekristalizacija iz EtOH.

Opis: temno rumeni kristali

m = 160 mg, izkoristek: 53 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$) = 0.77

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 302

HRMS (m/z = 302) za $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4$: izračunan 302.1141 in izmerjen 302.1135

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 1.20-1.68 (m, 6H, piperidin-H), 3.25-3.30 (m, 2H, piperidin-H), 3.54-3.75 (m, 2H, piperidin-H), 7.77-7.79 (dd, *J* = 8.5, 3.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.46 (s, 1H, Ar-H), 9.05 (dd, *J* = 3.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.43 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

Elementna analiza za C₁₅H₁₅N₃O₄:

Izračunana (%): C, 59.80; H, 5.02; N, 13.95

Ugotovljena (%): C, 59.54; H, 4.75; N, 13.90

N-(Cianometil)-8-hidroksi-N-metil-5-nitrokinolin-7-karboksamid (3)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1, nato še prekristalizacija iz EtOH.

Opis: rumeni kristali

m = 25 mg, izkoristek: 9 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 5 : 1) = 0.41

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 285

HRMS (m/z = 285) za C₁₃H₉N₄O₄: izračunan 285.0624 in izmerjen 285.0627

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.05 (s, 3H, CH₃), 4.63 (s, 2H, CH₂), 7.83 (dd, J = 8.5, 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.03 (dd, 4.0, 1.5 Hz 1H, Ar-H), 9.41 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

Elementna analiza za C₁₃H₁₀N₄O₄:

Izračunana (%): C, 54.55; H, 3.52; N, 19.57

Ugotovljena (%): C, 54.27; H, 3.16; N, 19.81

(8-Hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)(4-metilpiperidin-1-il)metanon (4)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1, nato še prekristalizacija iz EtOH.

Opis: sipki temno rumeni kristali

m = 17 mg, izkoristek: 5 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.41

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 316

HRMS (m/z = 316) za C₁₆H₁₈N₃O₄: izračunan 316.1297 in izmerjen 316.1293

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 0.85 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, CH₃), 0.97-1.13 (m, 2H, 2 x pipeidin-H), 1.38-1.48 (m, 1H, piperidin-H), 1.49-1.60 (m, 1H, piperidin-H), 1.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, piperidin-H), 2.69-2.80 (m, 1H, piperidin-H), 2.88-3.01 (m, 1H, piperidin-H), 3.54 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, piperidin-H), 4.51-4.65 (m, 1H, piperidin-H), 7.78 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.46 (s, 1H, Ar-H), 9.05 (dd, 3.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.43 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

Elementna analiza za C₁₆H₁₇N₃O₄:

Izračunana (%): C, 60.94; H, 5.43; N, 13.33

Ugotovljena (%): C, 61.14; H, 5.48; N, 13.02

(8-Hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)(morpholino)metanon (5)

Prekristalizacija iz EtOH.

Opis: temno rumeni kristali

m = 95 mg, izkoristek: 32 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.24

Temperatura tališča: 216.0–225.0 °C

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 302

HRMS (m/z = 302) za C₁₄H₁₂N₃O₅: izračunan 302.0777 in izmerjen 302.0772

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.25-3.34 (m, 2H, morfolin-H), 3.52-3.60 (m, 2H, morfolin-H), 3.63-3.73 (m, 4H, morfolin-H), 7.97 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.50 (s, 1H, Ar-H), 9.04 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.25 (dd, *J* = 9.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

^{13}C NMR (100 MHz, CF_3COOD) δ (ppm) = 48.01, 68.45, 120.26, 127.16, 129.00, 131.54, 131.94, 138.28, 147.42, 147.59, 155.14, 168.51.

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 41.92, 46.95, 65.94, 66.28, 118.19, 122.86, 125.76, 128.47, 133.58, 133.83, 136.74, 148.44, 157.11, 164.61.

Elementna analiza za $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$:

Izračunana (%): C, 55.45; H, 4.32; N, 13.86

Ugotovljena (%): C, 55.81; H, 3.98; N, 13.73

N-Benzil-N-(cianometil)-8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksamid (6)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$.

Opis: rumeni kristali

m = 8 mg, izkoristek: 2 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$) = 0.47

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 361

HRMS (m/z = 361) za $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$: izračunan 361.0937 in izmerjen 361.0932

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 4.44-4.83 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 7.13-7.51 (m, 5H, Ar-H), 7.78 (dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.53 (s, 1H, Ar-H), 9.10 (dd, $J = 4.0, 1.5$ Hz, 1H, Ar-H), 9.39 (dd, $J = 9.0, 1.5$ Hz, Ar-H); manjka signal za OH.

Elementna analiza za $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$:

Izračunana (%): C, 62, 98; H, 3.89; N, 15.46

Ugotovljena (%): C, 62.67; H, 4.08; N, 15.51

N-(Cianometil)-8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksamid (7)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 10 : 1 : 0.1$, nato čiščenje še z dodatno kolonsko kromatografijo $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$.

Opis: rumena trdna amorfna snov

m = 11 mg, izkoristek: 3 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$) = 0.41

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M-H]⁺ : m/z = 271

HRMS (m/z = 271) za $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_4$: izračunan 271.0467 in izmerjen 271.0461

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.85 (s, 1H, CH₂), 7.84 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 9.09 (s, 1H, Ar-H), 9.24 (dd, *J* = 4.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.36 (dd, *J* = 9.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

Elementna analiza za $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$:

Izračunana (%): C, 52.95; H, 2.96; N, 20.58

Ugotovljena (%): C, 53.15; H, 2.94; N, 20.67

N-(1-Cianociklopropil)-8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksamid (8)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 9 : 1 : 0.1$.

Opis: temno rumeni kristali

m = 23 mg, izkoristek: 13 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$) = 0.16

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 299

HRMS (m/z = 299) za $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$: izračunan 299.0780 in izmerjen 299.0788

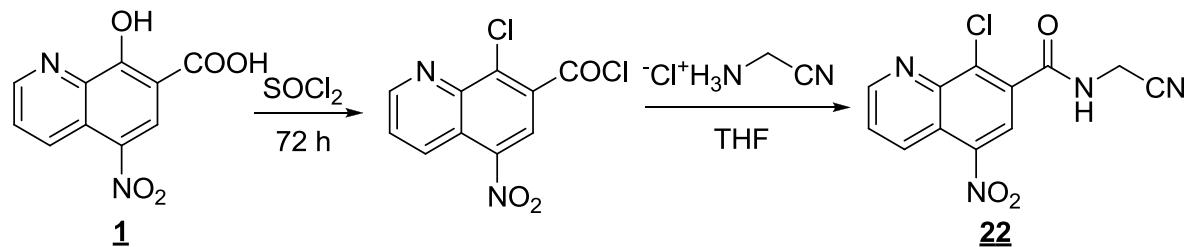
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.07 (m, 2H, CH₂), 1.46 (m, 2H, CH₂), 7.92 (dd, J = 9.0, 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.79 (dd, J = 4.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.33 (s, 1H, Ar-H), 9.47 (dd, J = 9.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 10.59 (s, 1H, OH).

Elementna analiza za C₁₄H₁₀N₄O₄:

Izračunana (%): C, 56.38; H, 3.38; N, 18.79

Ugotovljena (%): C, 56.71; H, 3.20; N 18.81

4.1.3. 8-Kloro-N-(cianometil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid



Slika 12. Reakcijska shema tvorbe 8-kloro-N-(cianometil)-5-nitrokinolin-7-karboksamida (**1** – produkt reakcije na sliki 10, **22** – produkt reakcije).

Sintezni postopek

V suho bučko smo natehtali spojino **1** (2 mmol, 468 mg) in jo raztopili v toluenu (10 mL). Dodali smo tionil klorid (38.5 mmol), opremili bučko s povratnim hladilnikom ter pustili reakcijsko zmes mešati 72 ur na oljni kopeli pri 80 °C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in nato reakcijsko zmes spirali s CH₂CL₂ (3 × 30 mL). Preostanek smo raztopili v suhem THF (15 mL) ter bučko dali na ledeno kopel. Ko se je reakcijska zmes ohladila na 0 °C, smo pazljivo začeli dodajati aminoacetonitrilijev hidrogensulfat (3 mmol) (**B-7**). Ker je bil dodani amin v obliki soli, smo reakcijski zmesi dodali tudi trietilamin (7.5 mmol). Po dodatku vseh spojin smo bučko odmaknili iz ledene kopeli ter pustili mešati pri sobni temperaturi 22 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo, suhemu preostanku dodali citronsko kislino (10 mL) ter ekstrahirali z CH₂CL₂ (3 × 50 mL). Organski fazi smo dodali Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

8-Kloro-N-(cianometil)-5-nitrokinolin-7-karboksamid (22)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 20 : 1 : 0.1$.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 10 mg, izkoristek: 2 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 20 : 1 : 0.1$) = 0.45

Temperatura tališča: >300 °C (razpad)

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 289

HRMS (m/z = 289) za $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$: izračunan 289.0128 in izmerjen 289.0124

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.81 (s, 1H, CH₂), 7.80 (dd, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 1H, Ar-H), 9.02 (s, 1H, Ar-H), 9.25 (dd, *J* = 4.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 9.40 (dd, *J* = 9.0, 1.5 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 27.53, 117.03, 121.42, 123.16, 125.66, 132.40, 134.71, 136.30, 143.18, 144.05, 152.22, 164.88.

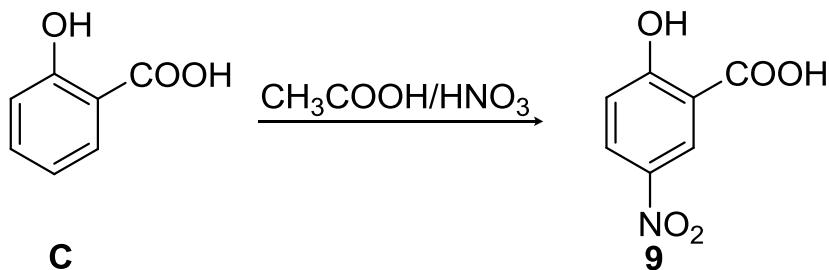
Elementna analiza za $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$:

Izračunana (%): C, 49.59; H, 2.43; N, 19.28

Izmerjena (%): C, 49.28; H, 2.43; N, 19.30

4.2. SPOJINE Z 2-KARBOKSI-4-NITROFENOLNIM SKELETONOM

4.2.1. Uvedba nitro skupine na fenilni obroč



Slika 13. Reakcijska shema tvorbe nitriranega produkta (C – izhodna spojina, **9** – produkt reakcije).

Sintezni postopek

V bučko smo natehtali salicilno kislino (18.1 mmol, 2.5 g) (spojava **C**) ter jo raztopili v brezvodni ocetni kislini (40 mL). Nato smo bučko opremili s povratnim hladilnikom in jo na oljni kopeli segreli do 50 °C. Po segrevanju smo reakcijski zmesi po kapljicah dodajali 68% dušikovo kislino (11 mL) in mešali z magnetnim mešalom 12 minut. Po pretečenem času smo celotno reakcijsko zmes zlili na 50 g zdrobljenega ledu. Izpadla je rumena oborina (produkt **9**), ki smo jo odfiltrirali s presesevanjem in v sušilniku posušili do suhega.

2-Hidroksi-5-nitrobenzojska kislina (**9**)

Opis: oranžna trdna amorfna snov

m = 1.94 g, izkoristek: 59 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 5 : 1 : 0.1) = 0.24

Temperatura tališča: 69.0–72.5 °C

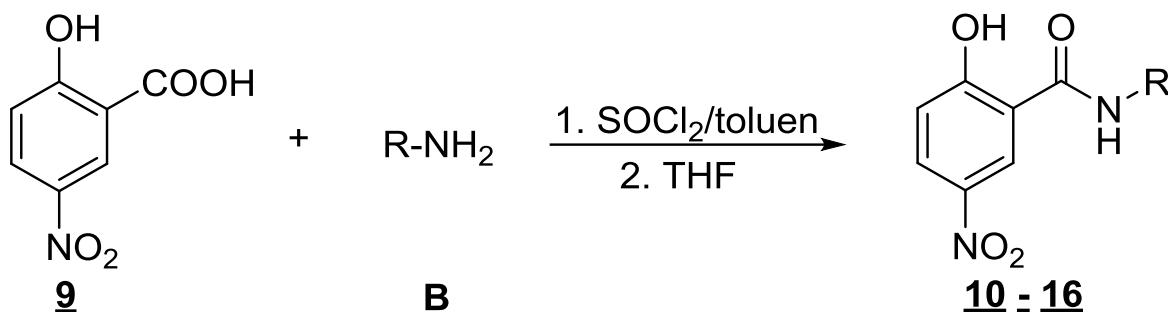
ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 182

HRMS (m/z = 182) za C₇H₄NO₅: izračunan 182.0089, izmerjen 182.0084.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 6.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.08 (dd, *J* = 9.0; 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.53 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

4.2.2. Tvorba amidne vezi

Uporaba tionil klorida

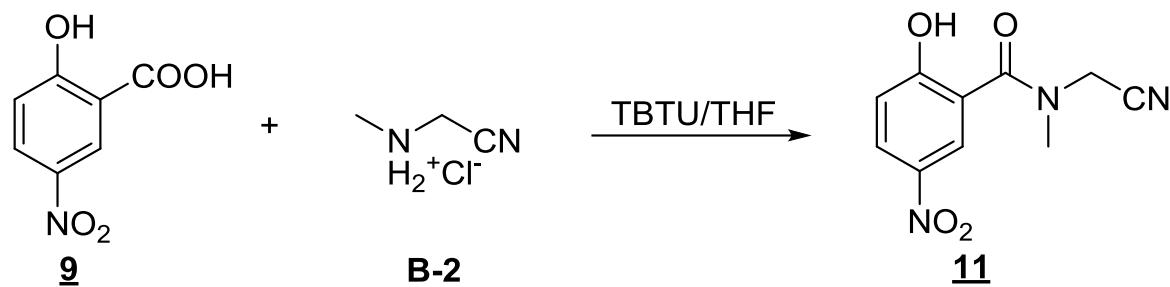


Slika 14. Reakcijska shema tvorbe fenolnega amida z uporabo tionil klorida (**9** – produkt reakcije na sliki 13, **B** – izbrani amin, **10 – 16** – produkti reakcije, navedeni v tabeli II).

Splošni sintezni postopek

V suho bučko smo natehtali spojino **9** (2.0 mmol, 366 mg) in jo raztopili v toluenu (10 mL). Dodali smo tionil klorid (38.5 mmol), opremili bučko s povratnim hladilnikom ter pustili reakcijsko zmes mešati 18 ur na oljni kopeli pri 80 °C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in nato reakcijsko zmes spirali s CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). Preostanek smo raztopili v suhem THF (15 mL) ter bučko dali na ledeno kopel. Ko se je reakcijska zmes ohladila na 0 °C smo pazljivo začeli dodajati izbrani amin (3 mmol) (**B**). Če je bil dodani amin v obliki soli (HCl, H₂SO₄) smo reakcijski zmesi dodali tudi trietilamin (7.5 mmol). Po dodatku vseh spojin smo bučko odmknili iz ledene kopeli ter pustili mešati pri sobni temperaturi od 2 do 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo, suhemu preostanku dodali HCl (10 mL, 0.01 M) ter ekstrahirali s CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). Organski fazi smo dodali Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Po potrebi smo produkt dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.

Uporaba sklopitvenega reagenta TBTU



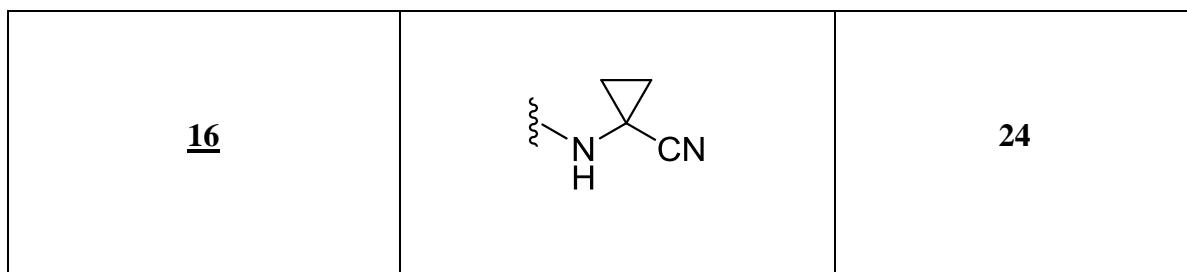
Slika 15. Reakcijska shema tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU (**9** – produkt reakcije na sliki 13, **B-2** – izbrani amin, **11** – produkt reakcije).

Sintezni postopek

V bučko smo natehtali spojino **9** (2 mmol, 366 mg) in jo raztopili v THF (10 mL). Bučko smo nato prepihalo z argonom in pod inertno atmosfero počasi dodali TBTU (5.9 mmol, 1.9 g), metilaminoacetonitrilijev klorid (2.2 mmol, 234 mg) (**B-2**) ter *N*-metilmorfolin (4 mmol), da smo spremenili amin iz soli v prosto obliko. Reakcijsko zmes pustimo mešati na sobni temperaturi 48 ur. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom, suhi preostanek raztopili v vodi in spirali s CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). Organski fazi smo dodali Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo dodatno očistili s kolonsko kromatografijo ter prekristalizacijo iz EtOH.

Tabela II. Reakcijski časi in strukturne formule posameznih produktov **10 – 16** iz slik 14 in 15.

Oznaka produkta	R	Čas reakcije (h)
10		2
11		24 (tionil klorid) 48 (TBTU)
12		16
13		1.5
14		24
15		4

**(2-Hidroksi-5-nitrofenil)(piperidin-1-il)metanon (10)**

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 50 : 1$, nato še prekristalizacija iz mešanice EtOAc : heksan = 1 : 1.

Opis: beli kristali

m = 10 mg, izkoristek: 2 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$) = 0.77

Temperatura tališča: 195.0–204.0 °C

ESI-MS [$\text{M}+\text{H}]^+$: m/z = 251

HRMS (m/z = 251) za $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$: izračunan 251.1032 in izmerjen 251.1036

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.42–1.60 (m, 6H, piperidin-H), 3.14 (m, 2H, piperidin-H), 3.58 (m, 2H, piperidin-H), 7.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, Ar-H), 8.14 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H, Ar-H), 11.45 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 23.89, 25.15, 25.81, 41.86, 47.21, 116.09, 124.10, 125.27, 126.09, 139.25, 159.71, 164.33.

N-(Cianometil)-2-hidroksi-N-metil-5-nitrobenzamid (11)

1. postopek: Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$.

2. postopek: Čiščenje s kolonsko kromatografijo, prvič EtOAc : heksan = 1 : 1, drugič EtOAc : heksan = 2 : 1.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 41 mg, izkoristek: 10 % (1. postopek)

m = 17 mg, izkoristek: 4 % (2. postopek)

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$) = 0.47

Temperatura tališča: 142.0–147.0 °C

ESI-MS [M-H]⁺ : m/z = 234

HRMS (m/z = 234) za $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4$: izračunan 234.0515 in izmerjen 234.0510

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆, 353 K) δ (ppm) = 2.98 (s, 3H, CH₃), 4.50 (s, 2H, CH₂N), 7.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.18 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.42 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-*d*₆, 353 K) δ (ppm) = 32.50, 34.88, 35.98, 116.38, 123.39, 124.60, 126.89, 139.43, 159.72, 166.94.

Elementna Analiza za $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$:

Izračunana (%): C, 51.07; H, 3.86; N, 17.87

Ugotovljena (%): C, 51.00; N, 3.78; N, 17.80

(2-Hidroksi-5-nitrofenil)(4-metilpiperidin-1-il)metanon (**12**)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$, nato še prekristalizacija iz acetona.

Opis: temno rumeni kristali

m = 25 mg, izkoristek: 5 %

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 15 : 1$) = 0.49

Temperatura tališča: 165.0–172.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 265

HRMS (m/z = 265) za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$: izračunan 265.1188 in izmerjen 265.1182

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.01-1.11 (m, 2H, piperidin-H), 1.51-1.68 (m, 2H, piperidin-H), 2.71-2.74 (m, 1H, piperidin-H), 2.97-3.00 (m, 1H, piperidin-H), 3.22-3.24 (m, 1H, piperidin-H), 4.45 (s, 1H, piperidin-H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.14 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.46 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 21.52, 30.30, 33.29, 33.99, 41.19, 46.51, 116.06, 124.08, 125.26, 126.08, 139.37, 159.57, 164.30.

(2-Hidroksi-5-nitrofenil)(morfolino)metanon (13)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 18 mg, izkoristek: 7 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1) = 0.25

Temperatura tališča: 189.0–197.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 253

HRMS (m/z = 253) za C₁₁H₁₃N₂O₅: izračunan 253.0824 in izmerjen 253.0828

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.17-3.20 (m, 2H, morfolin-H), 3.52-3.54 (m, 2H, morfolin-H), 3.60-3.65 (m, 4H, morfolin-H), 7.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.56 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 41.67, 46.71, 65.85, 66.14, 116.16, 124.33, 124.61, 126.38, 139.46, 159.49, 164.65.

N-Benzil-N-(cianometil)-2-hidroksi-5-nitrobenzamid (14)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 23 mg, izkoristek: 4 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.56

Temperatura tališča: 58.5–61.0 °C

ESI-MS [M-H]⁺ : m/z = 310

HRMS (m/z = 310) za C₁₆H₁₂N₃O₄: izračunan 310.0828 in izmerjen 310.0826

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 4.29–4.79 (m, 4H, CH₂), 7.07 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, Ar-H), 7.21–7.41 (m, 5H, Ar-H), 8.07–8.26 (m, 2H, Ar-H), 11.90 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 33.63, 52.70, 116.22, 116.52, 123.17, 124.60, 126.93, 127.48, 127.77, 128.54, 135.48, 139.09, 160.13, 167.29.

Elementna analiza za C₁₆H₁₂N₃O₄:

Izračunana (%): C, 61.73; H, 4.21; N, 13.50

Ugotovljena (%): C, 61.49; H, 4.20; N, 13.71

N-(Cianometil)-2-hidroksi-5-nitrobenzamid (15)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 7 : 1, nato še prekristalizacija iz dietil etra.

Opis: temno rumena trdna amorfna snov

m = 15 mg, izkoristek: 7 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.1) = 0.55

Temperatura tališča: 185.0–191.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 222

HRMS (m/z = 222) za C₉H₈N₃O₄: izračunan 222.0515 in izmerjen 222.0509

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 4.38 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.26 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.74 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 9.49 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, CONH), 12.91 (s, 1H, OH).

Elementna analiza za C₉H₇N₃O₄:

Izračunana (%): C, 48.88; H, 3.19; N, 19.00

Ugotovljena (%): C, 49.10; H, 3.27; N, 18.71

N-(1-Cianociklopropil)-2-hidroksi-5-nitrobenzamid (16)

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

Opis: rumeni kristali

m = 20 mg, izkoristek: 8 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.52

Temperatura tališča: 235.0–245.0 °C

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 246

HRMS (m/z = 246) za C₁₁H₈N₃O₄: izračunan 246.0515 in izmerjen 246.0513

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 1.35 (m, 2H, CH₂), 1.60 (m, 2H, CH₂), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.27 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.71 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 9.71 (s, 1H, CONH), 12.89 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 15.89, 20.16, 116.64, 118.75, 120.56, 125.84, 128.77, 138.07, 165.76, 167.47.

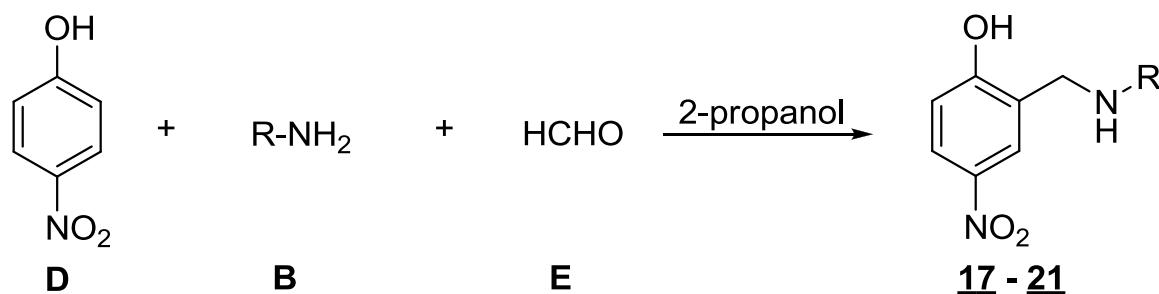
Elementna analiza za C₁₁H₉N₃O₄:

Izračunana (%): C, 53.44; H, 3.67; N, 17.00

Ugotovljena (%): C, 53.66; H, 3.35; N, 16.74

4.3. SPOJINE S 4-NITROFENOLNIM SKELETONOM

4.3.1. Priprava amina z Mannichovo reakcijo

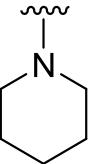
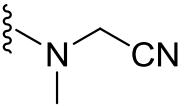
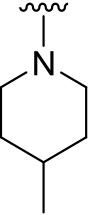
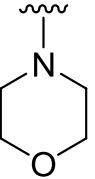


Slika 16. Reakcijska shema tvorbe amina z uporabo Mannichove reakcije (**D** – izhodna spojina, **B** – izbrani amin, **E** – paraformaldehid, **17 - 21** – produkti reakcije, navedeni v tabeli III).

Splošni sintezni postopek

4-Nitrofenol (3.0 mmol, 417 mg) (spojina **D**) ter izbran amin (4.0 mmol) (spojina **B**) smo natehtali v suho bučko in ju raztopili v 2-propanolu (15 mL). Ko se je vse raztopilo, smo začeli s počasnim dodajanjem paraformaldehida (3.0 mmol, 90 mg) (spojina **E**). Bučko smo opremili s povratnim hladilnikom ter pustili reakcijsko zmes mešati od 16 do 36 ur na oljni kopeli pri 85 °C. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Suhi preostanek smo suspendirali v nasičeni vodni raztopini Na₂CO₃ (15 mL) in ga spirali s CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Po potrebi smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo.

Tabela III. Reakcijski časi in strukturne formule posameznih produktov 17 – 21 iz slike 16.

Oznaka produkta	R	Čas reakcije (h)
<u>17</u>		20
<u>18</u>		36
<u>19</u>		16
<u>20</u>		16
<u>21</u>		24

4-Nitro-2-((piperidin-1-il)metil)fenol (17)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza EtOAc.

Opis: temno rumena trdna amorfna snov

m = 249 mg, izkoristek: 35 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.53

Temperatura tališča: 88.0–88.5 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 237

HRMS (m/z = 237) za C₁₂H₁₇N₂O₃: izračunan 237.1239 in izmerjen 237.1234

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 1.42-1.48 (m, 2H, piperidin-H), 1.54-1.61 (m, 4H, piperidin-H), 2.57-2.61 (m, 4H, piperidin-H), 3.81 (s, 2H, CH₂N), 6.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 22.96, 24.71, 52.68, 58.12, 116.29, 122.10, 125.12, 125.42, 137.08, 167.14.

2-((2-Hidroksi-5-nitrobenzil)(metil)amino)acetonitril (18)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1.

Opis: svetlo rumena trdna amorfna snov

m = 75 mg, izkoristek: 11 %

Rf (EtOAc : heksan = 1 : 1) = 0.66

Temperatura tališča: 99.5–107.0 °C

ESI-MS [M-H]⁻ : m/z = 220

HRMS (m/z = 220) za C₁₀H₁₀N₃O₃: izračunan 220.0722 in izmerjen 220.0718

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 2.29 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 2H, CH₂), 3.77 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.23 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 41.11, 44.60, 52.88, 115.42, 115.82, 124.66, 124.69, 125.57, 139.51, 162.03.

Elementna analiza za C₁₀H₁₁N₃O₃:

Izračunana (%): C, 54.30; H, 5.01; N, 19.00

Ugotovljena (%): C, 54.37; H, 5.11; N, 18.76

2-((4-Metilpiperidin-1-il)metil)-4-nitrofenol (19)

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

Opis: rumena trdna amorfna snov

m = 295 mg, izkoristek: 39 %

Rf (EtOAc : heksan = 1 : 1) = 0.3

Temperatura tališča: 77.0–79.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 250

HRMS (m/z = 250) za C₁₃H₁₉N₂O₃: izračunan 251.1396 in izmerjen 251.1389

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.12-1.25 (m, 2H, piperidin-H), 1.38-1.52 (m, 1H, piperidin-H), 1.62-1.70 (m, 2H, piperidin-H), 2.23-2.32 (m, 2H, piperidin-H), 2.89-2.97 (m, 2H, piperidin-H), 3.81 (s, 2H, CH₂N), 6.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 21.32, 29.44, 32.97, 52.16, 57.68, 116.20, 122.29, 125.04, 125.36, 137.25, 166.06.

Elementna analiza za C₁₃H₁₈N₂O₃:

Izračunana (%): C, 62.38; H, 7.25; N, 11.19

Ugotovljena (%): C, 62.15; H, 6.90; N, 11.30

2-(Morfolinometil)-4-nitrofenol (20)

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

Opis: svetlo rumena trdna amorfna snov

m = 68 mg, izkoristek: 14 %

Rf (CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) = 0.78

Temperatura tališča: 82.0–85.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 239

HRMS (m/z = 239) za C₁₁H₁₆N₂O₄: izračunan 239.1032 in izmerjen 239.1039

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 2.40-2.48 (m, 4H, morfolin-H), 3.60-3.63 (m, 4H, morfolin-H), 3.64 (s, 2H, CH₂N), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.04 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H); manjka signal za OH.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 52.69, 56.71, 66.00, 115.59, 123.81, 124.58, 125.36, 139.23, 163.10.

2-(Benzil(2-hidroksi-5-nitrobenzil)amino)acetonitril (21)

Čiščenje s kolonsko kromatografijo, mobilna faza EtOAc : heksan = 1 : 2.

Opis: svetlo rumeni kristali

m = 38 mg, izkoristek: 4 %

Rf (EtOAc : heksan = 1 : 1) = 0.56

Temperatura tališča: 117.0–120.0 °C

ESI-MS [M+H]⁺ : m/z = 298

HRMS (m/z = 298) za C₁₆H₁₆N₃O₃: izračunan 298.1192 in izmerjen 298.1187

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.64 (s, 2H, CH₂), 3.71 (s, 2H, CH₂), 3.74 (s, 2H, CH₂), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.30-7.39 (m, 5H, Ar-H), 8.07 (dd, *J* = 8.5, 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.21 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.30 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 41.45, 50.69, 57.34, 115.41, 115.70, 124.73, 125.39, 127.47, 127.55, 128.50, 128.59, 137.18, 139.55, 162.04.

Elementna analiza za $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$:

Izračunana (%): C, 64.64; H, 5.09; N, 14.13

Ugotovljena (%): C, 64.71; H, 4.98; N, 14.37

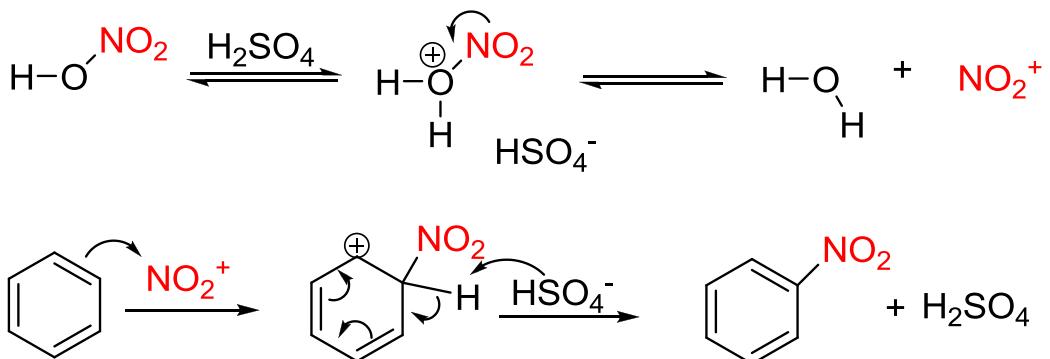
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1. Uvedba nitro skupine na obroč

Nitro skupino uvedemo na benzilni obroč preko elektrofilne aromatske substitucije. Reakcija navadno poteka z uporabo zmesi koncentrirane dušikove (HNO_3) in žveplove kislinske (H_2SO_4). Pri reakciji moramo biti pazljivi, saj je koncentrirana žveplova kislina ena najmočnejših organskih kislin in lahko povzroči hude kemične opeklne. Obenem moramo tudi paziti, da ne pride v kontakt z vodo, saj med njima poteče izjemno močna eksotermna reakcija [40].

Nitriranje poteka tako, da najprej močna žveplova kislina protonira hidroksilno skupino dušikove kislinske in tako nastane molekula vode, ki se odcepi od dušikove kislinske. Tako dobimo reaktivni elektrofilni nitronijev ion, ki ga napade nukleofil iz C=C vezi v benzenovem obroču. Hidogensulfatni anion napade proton, ki je po poteku nitriranja sedaj na benzenovem obroču odveč in tako dobimo regenerirano žveplovo kislino [41].



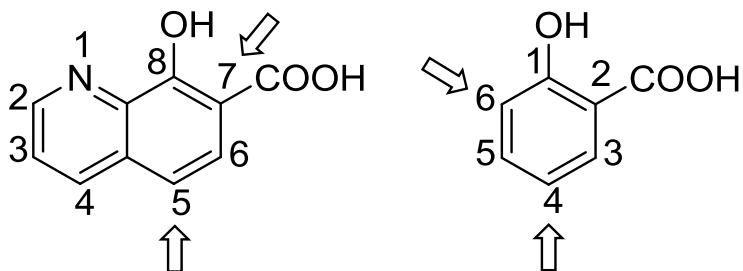
Slika 17. Mehanizem tvorbe elektrofilnega nitronijevega iona in njegove vezave na benzenov obroč.

Na kateri položaj na obroču se bo vezala nitro skupina, je odvisno od usmerjanja ostalih že pripetih funkcionalnih skupin na obroču. V obeh naših primerih, tako na kinolinu kot benzenovem obroču, smo imeli že prisotni hidroksilno ter karboksilno skupino.

Hidroksilna skupina usmerja na položaj *orto/para*, medtem ko karboksilna skupina usmerja na položaj *meta*.

Kinolin smo nitrirali po zgoraj opisanem postopku. Kinolin je sestavljen iz dveh obročev, benzenovega in piridinskega. Znano je, da je benzenov obroč bolj dovrzeten za elektrofilne aromatske substitucije, medtem ko na piridinu lažje potečejo nukleofilne substitucije [42]. To je razlog, da nitriranje kinolina (v kolikor je le-ta nesubstituiran) večinoma poteče na mestu 5 in 7. Ker imamo v našem primeru na mestu 8 pripeto hidroksilno skupino, na mestu 7 pa karboksilno skupino, je logično, da bomo v največji meri dobili 5-nitro produkt (78 %). Reakcijo smo optimizirali tako, da smo jo izvajali na ledu, s čimer smo zmanjšali reaktivnost nitronijevega iona ter tako preprečili nastanek 5,7-dinitriranega produkta, ki nastane po dekarboksilaciji in sledenjem nitriranjem na mestu 7.

Reakcijo nitriranja benzenovega obroča (drugi sklop spojin) smo izvedli nekoliko drugače. V literaturi [43] smo zasledili postopek, pri katerem se namesto žveplove kisline uporabi brezvodno ocetno kislino in segrevanje reakcijske zmesi na 50 °C. Že pripete funkcionalne skupine na benzenovem obroču usmerjajo nitronijev ion na mesti 4 in 6, vendar zaradi steričnih ovir v večji meri nastaja 4-nitro derivat (59 %).

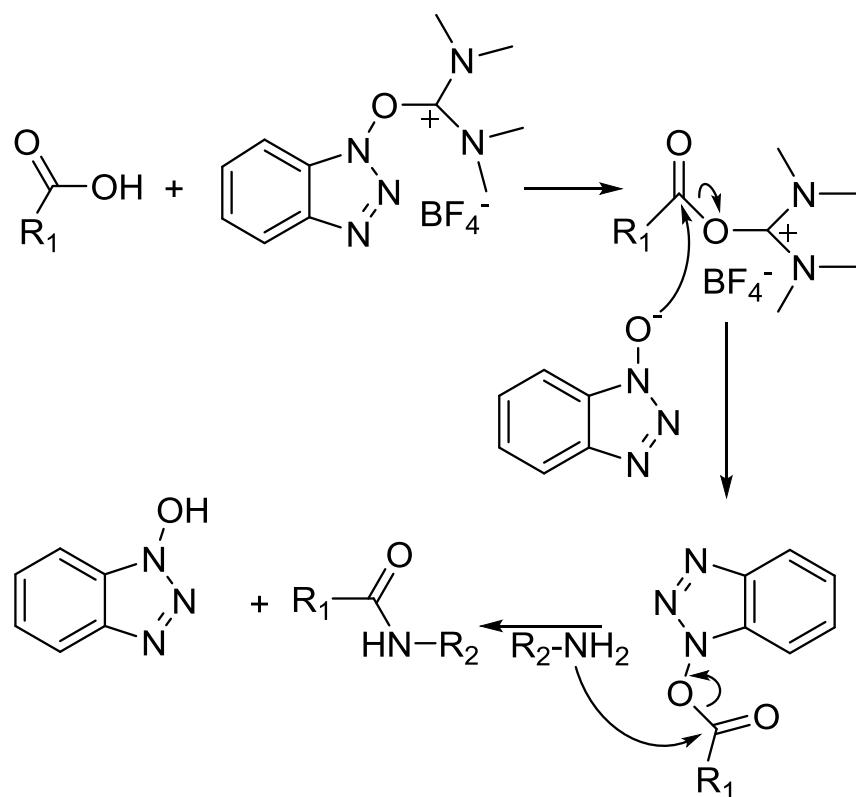


Slika 18. Mesta, kamor se lahko veže nitronijev ion na kinolinski in benzenov obroč.

5.1.2. Tvorba amida

Tvorbo amida smo poskusili izvesti po različnih postopkih. Prvi postopek je bil uporaba skloplitvenih reagentov za tvorbo amidne vezi. Slednje se uporablja za aktivacijo karboksilne kisline, kar posledično omogoči bolj učinkovit nukleofilni napad amina in tvorbo amidne vezi.

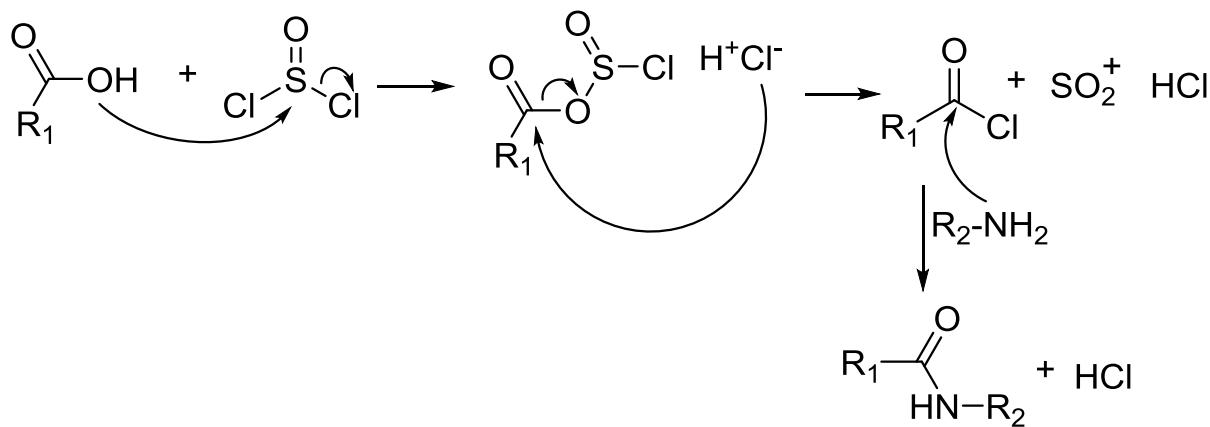
Poskusili smo z uporabo TBTU ((*O*-benzotiazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametil uronijev tetrafluoroborat), EDC (1-etyl-(3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) ter kombinacijo EDC in HOBr (*N*-hidroksibenzotriazol). Reakcije izbranih aminov s karboksilno skupino pripeto na kinolinski ali benzenov skelet, niso potekale po naših pričakovanjih. Reakcije so bile neuspešne v večini primerov, razen pri reakciji metilaminoacetonitrila s karboksilno kislino na kinolinskem skeletu, s katerim smo dobili **11**. Ker pa je tudi ta reakcija potekla s slabim izkoristkom (4 %), smo produkte poskusili sintetizirati z uporabo drugega postopka.



Slika 19. Shema sinteze amidne vezi z uporabo skloplitvenega reagenta TBTU [44].

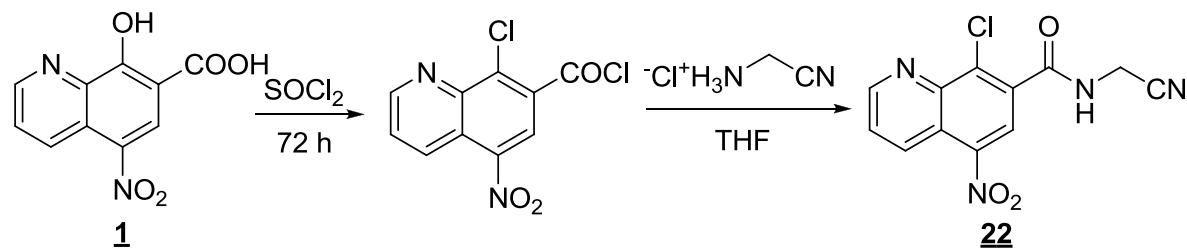
Amidno vez smo poskusili nato sintetizirati preko tvorbe kislinskega klorida. Karboksilno kislino smo v prvi stopnji s tionil kloridom pretvorili v bolj reaktivен kislinski klorid. Atom klora, ki se je vezal na karbonilni ogljikov atom, zmanjša elektronsko gostoto temu ogljikovemu atomu, s čimer je napad nukleofila nanj olajšan. Ob napadu nukleofila se klor odcepi in sprosti se HCl. Zato smo v reakcijsko zmes vedno dodali bazo (v našem primeru trietilamin), ki nevtralizira sproščeno HCl; na ta način se amin, ki predstavlja nukleofil, ne protonira in tako je omogočen učinkovit potek reakcije [45]. Po končani reakciji smo

reakcijsko zmes spirali s CH_2Cl_2 in se tako znebili prebitnega tionil klorida, ki bi lahko motil nadaljnji potek tvorbe amida.



Slika 20. Sinteza amidne vezi z uporabo tionil klorida.

Ob prvem poskusu sinteze spojine **7** smo pustili prvi del reakcije s tionil kloridom (tvorba kislinskega klorida) predolgo (72 ur). Posledično se je $-\text{OH}$ skupina na mestu 8 izhodne kinolinske spojine zamenjala s $-\text{Cl}$ skupino. To smo opazili šele ob čiščenju in karakterizaciji končne spojine, ko smo ob razvitju TLC kromatograma zaznali dve, približno enako intenzivno obarvani lisi. NMR ter MS sta naša predvidevanja potrdila. Ker nam je uspelo kloriran derivat izolirati v dovolj veliki količini, smo ga obravnavali in tudi biokemijsko ovrednotili kot samostojno spojino **22**.



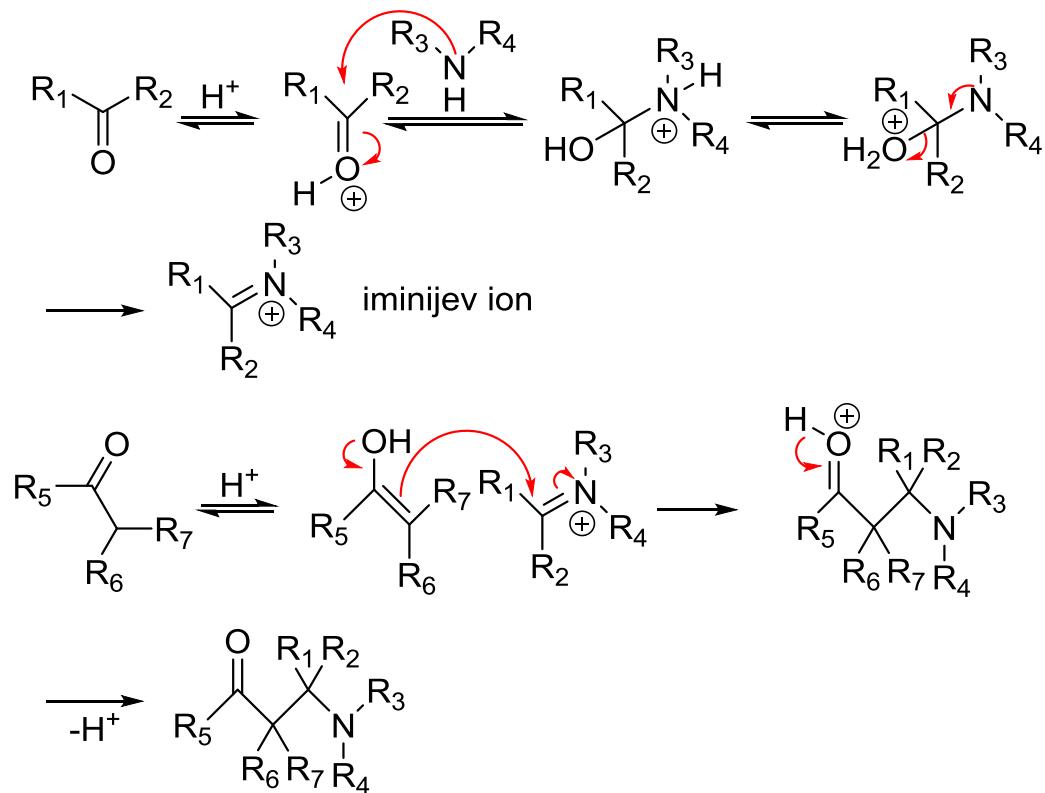
Slika 21. Reakcijska shema tvorbe spojine **22**.

Amidi, pridobljeni z uporabo kislinskega klorida, so nastali v različnih, v primerjavi s prejšnjim postopkom, zadovoljivih izkoristkih (4–53%). Količina nastalega produkta je bila v veliki meri odvisna od reaktivnosti uporabljenega amina. Pri vseh reakcijah so nastajali stranski produkti, zato smo vsako končno spojino očistili s pomočjo kolonske kromatografije.

5.1.3. Mannichova reakcija

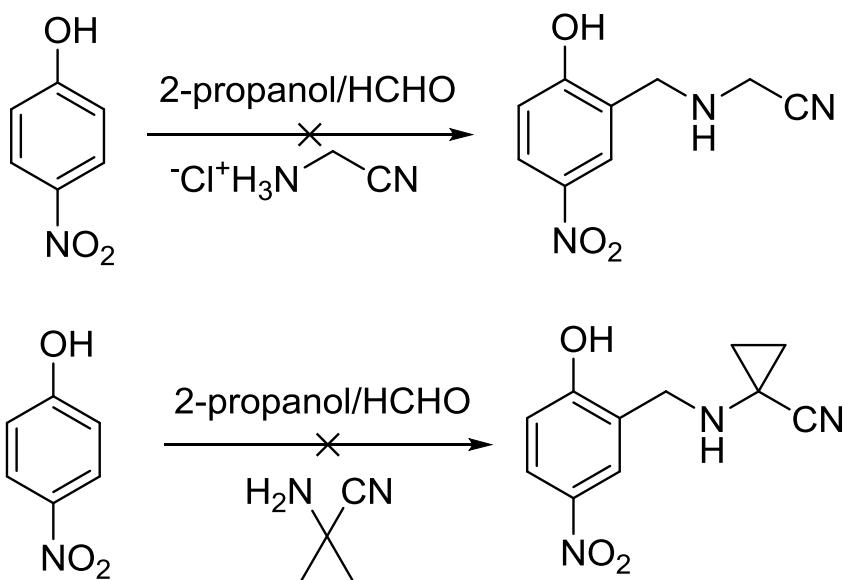
Pri tretjem sklopu spojin smo za pripenjanje izbranih aminov na benzenov obroč uporabili Mannichovo reakcijo. Mannichova reakcija je organska reakcija, pri kateri ob prisotnosti aldehida in izbranega amina poteče aminoalkiliranje na *alfa* ogljikovem atomu ob karbonilni skupini. Kot produkt dobimo β -amino karbonilno spojino, kateri pravimo tudi Mannichova baza.

Prva stopnja reakcije je tvorba iminijevega iona iz izbranega amina in formaldehida. Spojina s karbonilno skupino je v tautomeriji z enolno obliko, ki potem napade iminijev ion [46].



Slika 22. Mehanizem poteka Mannichove reakcije.

Reakcije naših izbranih aminov s 4-nitroaminofenolom ob prisotnosti paraformaldehida so potekale v izkoristkih od 4 do 39 %. Zanimivo je, da nam kljub večkratnemu poskušanju in menjavanju pogojev, dveh želenih derivatov ni uspelo sintetizirati. To sta derivata z aminoacetonitrilom ali 1-amino-1-ciklopropankarbonitrilom, vezanim na mesto *ortho* glede na hidroksilno skupino. Pri obeh neuspehlih reakcijah smo poskušali priti do želenega produkta s spremembo topila (namesto 2-propanola smo uporabili piridin), vendar pri tem nismo bili uspešni.



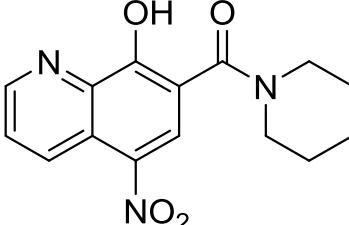
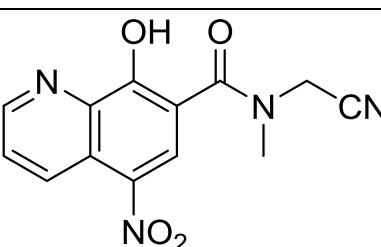
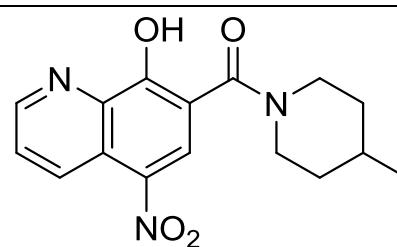
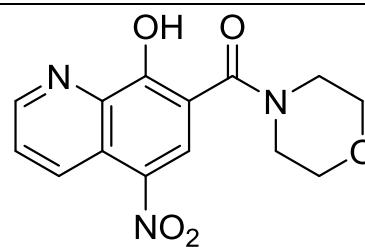
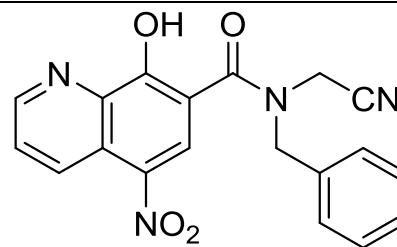
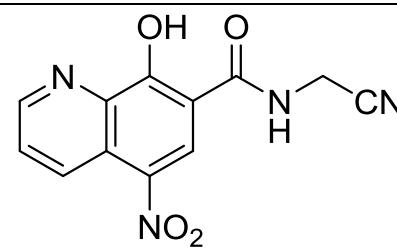
Slika 23. Reakcijski shemi dveh neuspehlih Mannichovih reakcij.

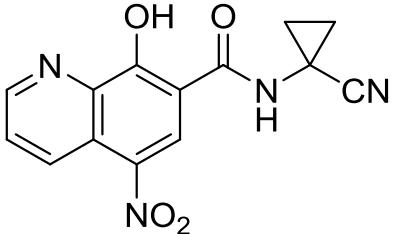
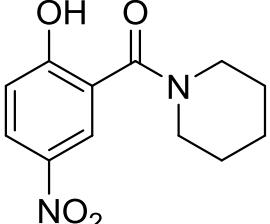
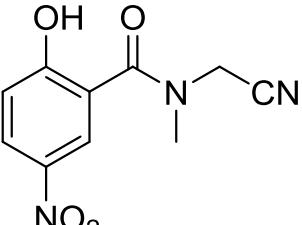
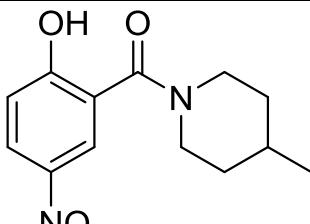
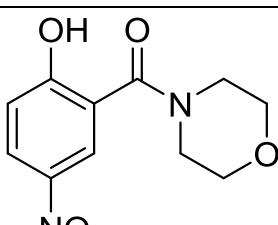
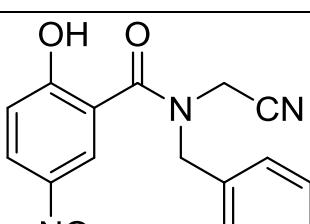
5.2. REZULTATI BIOKEMIJSKEGA VREDNOTENJA

Sintetizirane končne spojine smo biokemijsko ovrednotili na encimu katepsin B, izoliranem iz bakterije *E. coli*. Rezultati testiranja so zbrani v tabeli IV. Relativna inhibicija encima (R_i), ki je merilo učinkovitosti inhibitorja, je bila izračunana po naslednji enačbi:

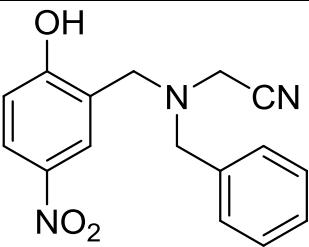
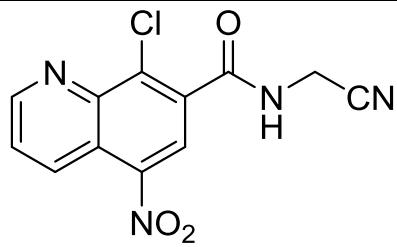
Relativna inhibicija (%) = $100(1 - v_i/v_o)$, kjer v_i predstavlja hitrost nastanka razgradnih produktov v prisotnosti inhibitorja, medtem ko v_o predstavlja hitrost nastanka razgradnih produktov, če inhibitor ni prisoten.

Tabela IV. Rezultati relativne inhibicije katepsina B.

Oznaka	Struktura	R_i endo catB [%]	R_i ekso catB [%]
2		4.29 ± 1.08	9.7 ± 8.17
3		17.49 ± 0.89	19.43 ± 2.43
4		17.17 ± 4.85	15.21 ± 3.72
5		24.61 ± 4.74	17.33 ± 3.25
6		18.48 ± 1.82	22.28 ± 1.89
7		8.06 ± 1.63	27.01 ± 1.13

8		11.36 ± 1.71	23.91 ± 1.30
10		14.67 ± 1.24	17.16 ± 3.79
11		12.81 ± 0.48	13.68 ± 0.49
12		3.24 ± 1.44	7.56 ± 0.87
13		17.58 ± 1.80	19.22 ± 1.97
14		9.76 ± 1.14	19.56 ± 1.97

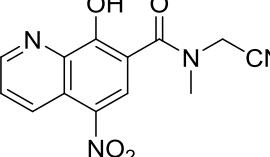
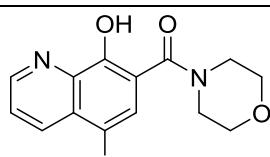
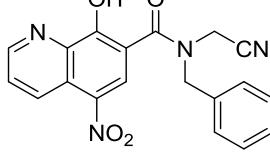
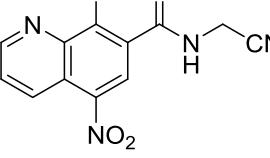
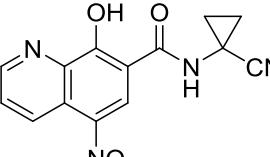
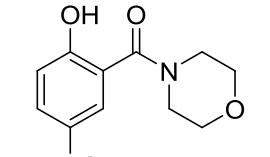
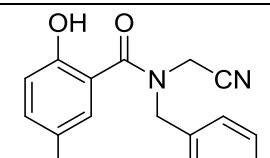
15		8.84 ± 1.16	24.55 ± 1.09
16		15.15 ± 0.31	30.05 ± 2.16
17		9.60 ± 1.25	4.79 ± 4.11
18		2.28 ± 1.18	7.60 ± 2.89
19		9.88 ± 0.07	6.10 ± 3.16
20		16.51 ± 0.01	17.08 ± 2.90

<u>21</u>		6.47 ± 2.42	11.46 ± 3.15
<u>22</u>		18.61 ± 1.50	28.69 ± 1.28

Na podlagi R_i vrednosti smo ovrednotili rezultate biokemijskega testiranja. Iz danih podatkov smo dobili informacijo o jakosti in odnosu med strukturo in delovanjem spojim. Večja kot je R_i vrednost, bolj sintetizirani inhibitor zavira delovanje encima.

Najboljšim spojinam ter spojinam, ki bi morale glede na znane literaturne podatke izkazovati najboljšo inhibicijo, smo eksperimentalno določili K_i – inhibitorno konstanto. K_i nam pove jakost inhibitorja. Iz njene vrednosti dobimo informacijo, kakšno koncentracijo inhibitorja moramo uporabiti, da bomo dosegli polovico maksimalne inhibicije.

Tabela V. Rezultati določanja inhibitornih konstant spojinam na encimu katepsin B.

	Struktura	Endopeptidazna aktivnost (Z-RR-AMC)			Eksopeptidazna aktivnost (Abz-GIVRAK(Dnp)-OH)		
		K _i (μM)	K _{i'} (μM)	Mehanizem inhibicije	K _i (μM)	K _{i'} (μM)	Mehanizem inhibicije
3		184.6 ± 1.6		Nekompetitivna inhibicija	120.6 ± 14.4		Nekompetitivna inhibicija
5		136.7 ± 17.3		Nekompetitivna inhibicija	121.7 ± 14.4		Nekompetitivna inhibicija
6		181.7 ± 30.7	64.4 ± 12.7	Mešana inhibicija	185.2 ± 4.7	32.2 ± 7.3	Mešana inhibicija
7			67.3 ± 9.7	Akompetitivna inhibicija	127.7 ± 20.8	30.1 ± 10.1	Mešana inhibicija
8			123.9 ± 13.7	Akompetitivna inhibicija	184.6 ± 5.2		Nekompetitivna inhibicija
13		236.7 ± 11.7		Nekompetitivna inhibicija	176.0 ± 5.2		Nekompetitivna inhibicija
14		341.9 ± 4.7		Nekompetitivna inhibicija	96.6 ± 10.5		Nekompetitivna inhibicija

<u>15</u>		271.3 ± 16.6	Nekompetitivna inhibicija	167.5 ± 4.8	Nekompetitivna inhibicija
<u>16</u>		246.8 ± 7.3	Nekompetitivna inhibicija	127.7 ± 3.4	Kompetitivna inhibicija
<u>20</u>		212.0 ± 12.1	Nekompetitivna inhibicija	97.4 ± 0.5	Nekompetitivna inhibicija
<u>22</u>		90.6 ± 1.1	Nekompetitivna inhibicija	90.5 ± 1.2	Nekompetitivna inhibicija

Med testiranjem izbora naših spojin so se kot najboljše izkazale spojine s kinolinskim skeletom, predvsem spojine 3, 5, 6, 7 ter 22. Izmed teh velja izpostaviti spojino 6.

8-hidroksi-5-nitrokinolinski derivati

Pri spojinah s kinolinskim skeletom, katerim smo določili K_i vrednosti ter mehanizem inhibicije, je samo spojina 6 po mehanizmu izkazovala enak tip inhibicije endopeptidazne aktivnosti kot nitroksolin, to je mešan tip inhibicije. Ravno tako kot nitroksolin je tudi spojina 6 izkazovala večjo afiniteto do kompleksa encim-substrat (ES kompleks), saj je izkazovala boljšo vrednost ($K_i' = 64.4 \pm 12.7 \mu\text{M}$). Za razliko od nitroksolina pa izkazuje spojina 6 tudi mešan tip inhibicije eksopeptidazne aktivnosti in to z večjo afiniteto kot do endopeptidazne ($K_i' = 32.2 \pm 7.3 \mu\text{M}$).

Spojine 3, 5 ter 22 so izkazovale nekompetitivni mehanizem inhibicije tako endo- kot eksopeptidazni aktivnosti. Na podlagi rezultatov je vidno, da so tudi te tri spojine izkazovale večjo inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Izmed teh treh se je kot

najboljši endopeptidazni inhibitor izkazala spojina **22**, kateri smo določili K_i vrednost = $90.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (nekompetitivni tip inhibicije).

Spojini **7** in **8** sta se izkazala kot akompetitivna inhibitorja endopeptidazne aktivnosti encima (spojina **7**, $K_i' = 67.3 \pm 9.7 \mu\text{M}$; spojina **8**, $K_i' = 123.9 \pm 13.7 \mu\text{M}$); medtem ko je spojina **7** eksopeptidazno aktivnost zavirala kot mešan inhibitor, je spojina **8** izkazovala nekompetitivno inhibicijo. Spojina **7** je izkazovala večjo afiniteto do eksopetidazne aktivnosti ($K_i' = 30.1 \pm 10.1 \mu\text{M}$).

4-nitrofenolni derivati

Pri spojinah s 4-nitrofenolnim obročem, katerim smo izmerili K_i vrednosti, so vse štiri spojine (**13**, **14**, **15**, **16**) izkazovale nekompetitivno inhibicijo endopeptidazne aktivnosti. Enako velja tudi za eksopeptidazno aktivnost, z izjemo spojine **16**, kateri je bil določen kompetitivni tip inhibicije. V primerjavi z nitroksolinom so vse spojine izkazovale višje K_i vrednosti za inhibicijo endopeptidazne aktivnosti, vendar boljšo inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti.

2-karboksi-4-nitrofenolni derivati

K_i vrednost smo določili samo eni spojni z 2-karboksi-4-nitrofenolnim skeletom, in sicer spojini **20**. Le-ta je izkazovala nekompetitivno inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B, ki je bila v primerjavi z nitroksolinom šibkeje izražena. Je pa spojina izkazovala boljšo inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti encima ($K_i = 97.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$), in sicer kot nekompetitivni inhibitor.

Razlaga odnosa med strukturo in delovanjem

Iz podatkov, zbranih v Tabeli V, lahko sklepamo na različne strukturne zahteve, ki so potrebne za doseganje čim boljše inhibicije endopeptidazne aktivnosti katepsina B.

Prva stvar, na katero se lahko osredotočimo, je osnovni skelet, na katerega smo pripenjali aminske derivate. Spojine z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim skeletom so izkazovale boljšo inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti katepsina B v primerjavi z nitroksolinom. Sklepamo lahko, da je samo en benzenov obroč premajhen za tvorbo optimalnega števila vezi z S2' podmestom encima. Če primerjamo spojine, ki imajo iste aminske derivate pripete na

kinolinski ali beznenov obroč, lahko opazimo, da spojine s kinolinskim obročem izkazujejo od 1.5 do 5.3 krat boljšo inhibicijo endopeptidazne aktivnosti encima.

Nadalje se lahko osredotočimo na ugotavljanje, ali je amidna vez med benzenovim obročem in pripetim aminskim derivatom pomembna za tvorbo boljših interakcij med inhibitorjem in encimom, ali je bolj primeren metilenski mostiček med obema strukturnima fragmentoma. Pri primerjavi inhibitornih konstant spojin **13** in **20** vidimo, da je spojina **13** izkazovala boljšo inhibicijo encima (tako endo- kot eksopeptidazne aktivnosti) in je tako za dosego boljše inhibicije amidna vez bolj primerna kot metilenski mostiček.

Primerjava struktur pripetih aminskih derivatov nam razkrije še tretjo strukturno zahtevo za boljše inhibitorno delovanje. Iz Tabele V je razvidno, da so najboljše rezultate dale spojine, ki imajo v svoji strukturi ciano skupino (**6**, **7**, **8**). To je pričakovano, saj lahko ciano skupina tvori večje število interakcij z aktivnim mestom encima. Dobre rezultate sta izkazovali tudi spojina **5**, ki ima na mestu sedem pripet morfolinski obroč, ter spojina **6**, ki ima poleg ciano skupine pripet tudi benzilni obroč. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je prisotnost obročne strukture na tem mestu pomemben dejavnik, saj se le-ta lahko umesti v S1 vezavno podmesto in tako izboljša inhibitorne lastnosti.

Večina naših sintetiziranih spojin je izkazala inhibitorno aktivnost endopeptidazne aktivnosti, ki se po vrednosti inhibicije lahko primerja z nitroksolinom. Najbolje sta se odrezali spojini **6** in **7**. Zanimivo je, da obe spojini izkazujeta bolj izrazito inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti kot nitroksolin (približno 8.8 -krat večja).

V kolikor bi želeli uporabnost vseh sintetiziranih spojin dodatno ovrednotiti, bi se morali poslužiti še bolj sofisticiranih funkcijskih testov tako na tumorskih linijah kakor tudi na 2-D in 3-D modelih tumorske invazije.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali in kemijsko okarakterizirali dvajset novih spojin kot potencialnih inhibitorjev encima katepsin B. Glede na osnovni strukturni skelet lahko razdelimo spojine v tri sklope: spojine z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim skeletom, spojine s 4-nitrofenolnim obročem ter spojine z 2-karboksi-4-nitrofenolnim skeletom. Končnim spojinam smo z encimskim testom določili relativno inhibicijo encima (R_i) na encimu katepsin B, izoliranem iz *E. coli*. Najboljšim spojinam smo nato določili še inhibitorne konstante.

Spojine smo sintetizirali v več sinteznih stopnjah. Sklopu spojin z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim obročem smo najprej uvedli karboksilno skupino na mesto 7. Nato smo na spojinah iz tega sklopa ter na spojinah z 2-karboksi-4-nitrofenolnim skeletom, tvorili amidno vez z izbranim aminom. Najprej smo poskusili reakcijo izvesti s sklopitvenimi reagenti, vendar reakcije večinoma niso potekle oziroma so potekle z zelo slabim izkoristkom. Zato smo tvorbo amidne vezi izvedli preko predhodne tvorbe kislinskega klorida. Spojinam s 4-nitrofenolnim skeletom smo s pomočjo Mannichove reakcije pripeli izbrane amine na mesto 2.

Ugotovili smo, da spojine z 8-hidroksi-5-nitrokinolinskim skeletom izkazujejo boljšo inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B, kar nakazuje, da je kinolinski skelet nujno potreben za doseganje boljše inhibicije encima (v primerjavi s spojinami, ki so imele v strukturi le en obroč). Nadalje smo ugotovili, da so spojine, ki so v svoji strukturi imele ciano skupino, izkazovale boljšo inhibicijo encima, saj le-ta tvori interakcije z aktivnim mestom encima. Primerjava med sklopoma spojin z 2-karboksi-4-nitrofenolnim skeletom ter 4-nitrofenolnim skeletom je pokazala, da s prisotnostjo amidne vezi v strukturi dosežemo boljšo inhibicijo encima in je tako za dosego boljše inhibicije bolj primerna kot metilenski mostiček.

Kot najboljši spojini sta se izkazali spojini **6** in **7**, ki imata v svoji strukturi vse tri od zgoraj naštetih zahtev za dosego ustrezne inhibicije. Obe izkazujeta nitroksolinu primerljivo inhibicijo endopeptidazne aktivnosti (spojava **6**, $K_i' = 64.4 \pm 12.7 \mu\text{M}$; spojava **7**, $K_i' = 67.3 \pm 9.7 \mu\text{M}$), a izkazujeta mnogo večjo afiniteto do inhibicije eksopeptidazne aktivnosti, kot jo ima nitroksolin (spojava **6**, $K_i' = 32.2 \pm 7.3 \mu\text{M}$; spojava **7**, $K_i' = 30.1 \pm 10.1 \mu\text{M}$).

7. LITERATURA

1. Rawlings N. D, Barrett A. J, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 227-33
2. Mehrtens J. M: The design, synthesis and biological assay of cysteine protease specific inhibitors. Doktorska disertacija, Christchurch: University of Canterbury; 2007
3. Vicik R, Busemann M, Bauman K, Schirmeister T: Inhibitors of cysteine proteases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006; 6(4): 331-53
4. Grudkowska M, Zagdanska B: Multifunctional role of plant cysteine proteases. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51(3): 609-24
5. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006; 5(9): 785-99
6. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczk W, Wieczerek E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Mariusz J, Grubb A: Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol.* 2001; 48(1): 1-20
7. <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/clansum?clan=CA> (maj 2013)
8. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO Journal* 2001; 20: 4629-33
9. Vernet T, Tessier D. T, Chatellier J, Plouffe C, Sing Lee T, Thomas D. Y, Storer A. C, Menard R: Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(28): 16645-52
10. Turk D, Gunčar G, Podobnik M, Turk B: Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* 1998; 397(2): 137-47
11. Chapman H. A, Riese R. J, Shi G. P: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 63-88
12. Mohamed, M. M, Sloane B. F: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 764-75
13. Wolters P. J, Chapman H. A: Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir. Res.* 2000; 1(3): 170-77

14. Koblinski J. E, Ahram M, Sloane B. F: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta* 2000; 291: 206-14
15. Mirković B: Regulacija endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2011
16. Musil D, Zučić D, Turk D, Engh R. A, Mayr I, Huber R, Popović T, Turk V, Towatari T, Katunuma N: The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO Journal* 1991; 10: 2321-30
17. <http://www.pharmainfo.net/reviews/cathepsin-b-novel-cysteine-proteases-papain-family> (maj 2013)
18. Lloyd J.B, Mason R. W: Subcellular biochemistry - Volume 27: Biology of the lysosome. New York: Plenum Press; 1996
19. Sosič I: Strukturno podprto načrtovanje in sinteza encimskih inhibitorjev s potencialnim protibakterijskim in protitumornim delovanjem. Doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2012
20. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CTSBID40202ch8p23.html> (maj 2013)
21. Mirkovic B, Renko M, Turk S, Sosic I, Jevnikar Z, Obermajer N, Turk D, Gobec S, Kos J: Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *Chem. Med. Chem.* 2011; 6(8): 1351-6
22. Barrett A. J, Rawlings N. D, Woessner J. F: Handbook of proteolytic enzymes. London: Elsevier Academic press; 2013
23. Katunuma N: Posttranslational precessing and modification of cathepsins and cystatins. *J. Signal Transduct.* 2010; 375345. doi: 10.1155/2010/375345. Epub 2010 Dec 16
24. Mach L, Stüwe K, Hagen A, Ballaun C, Glössl J: Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme. *Biochem. J.* 1992; 282 (Pt 2): 577-82
25. Mort J. S, Buttle D. J: Cathepsin B. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29 (5): 715-20
26. Vasiljeva O, Turk B: Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 764-75

27. Elie B. T, Gocheva V, Shree T, Dalrymple S. A, Holsinger L. J, Joyce J. A: Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model. *Biochimie.* 2010; 92(11):1618-24
28. Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A: Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Left.* 1999; 455 (3): 286-90
29. Im E, Venkatakrishnan A, Kazlauskas A: Cathepsin B regulates the intrinsic angiogenic threshold of endothelial cells, *Mol. Biol. Cell.* 2005; 16 (8): 3488-500
30. Ribarič S: Temeljni patološki fiziologiji. Ljubljana: UL MF Inštitut za patološko fiziologijo; 2009
31. Frlan R, Gobec S: Inhibitors of cathepsin B. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13: 2309-27
32. Pavlova A, Krupa J. C, Mort J. S, Abrahamson M, Björk I: Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110. *FEBS Lett.* 2000; 487 (2): 156-60
33. Naudin C, Lecaille F, Chowdhury S, Krupa J. C, Purisima E, Mort J. S, Lalmanach G: The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J. Mol. Biol.* 2010; 400(5):1022-35
34. Frizler M, Strinberg M, Sisay M. T, Gutschow M: Development of nitrile based peptidic inhibitors of cysteine cathepsins. *Curr. Top. Med. Chem.* 2010; 10: 294-322
35. Pan X, Tan N, Zeng G, Zhang G, Zhang Y, Jia R: Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B. *Bio. Med. Chem.* 2005; 13 (20): 5819-25
36. Baird I. R, Mosi R, Olsen M, Cameron B. R, Fricker S. P, Škerlj R. T: '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. *Inor. Chim. Acta* 2006; 359 (9): 2736-50
37. Zhu Y, Cameron B. R, Mosi R, Anastassov V, Cox J, Qin L, Santucci Z, Metz M, Škerlj R. T, Fricker S. P: Inhibition of the cathepsin cysteine proteases B and K by square-planar cycloaurated gold(III) compounds and investigation of their anti-cancer activity. *J. Inorg. Biochem.* 2011; 754-62.

38. Sosič I, Mirković B, Arenz K, Stefane B, Kos J, Gobec S: Development of new cathepsin B inhibitors: combining bioisosteric replacements and structure-based design to explore the structure-activity relationships of nitroxoline derivatives. *J. Med. Chem.* 2013 Jan 24;56(2):521-33
39. Kuhelj R, Dolinar M, Pungerčar J, Turk V: The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in Escherichia coli in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 1995, 229, 533-553
40. <http://chemistry.about.com/od/chemistrystudentfaqs/f/sulfuricwater.htm> (maj 2013)
41. <http://www.mhhe.com/physscience/chemistry/carey/student/olc/ch12nitration.html> (maj 2013)
42. <http://www.chtf.stuba.sk/~szolcsanyi/education/files/Chemia%20heterocyklickych%20zlucenin/Prednaska%201/Odporucane%20studijne-%20materialy/%28Izo%29chinol%EDn-vlastnosti%20a%20reaktivita.pdf> (maj 2013)
43. Andreozzi R, Canterino M, Caprio V, Di Somma I, Sanchirico R: Salicylic acid nitration by means of nitric acid/acetic acid system: chemical and kinetic characterization. *Org. Process Res. Dev.* 2006, 10 (6); 1199-204
44. Valeur E, Bradley M: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* 2009, Feb;38(2):606-31
45. Chang T. C, Huang M. L, Hsu W. L, Hwang J. M, Hsu L. Y: Synthesis and biological evaluation of ebselen and its acyclic derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 2003 Dec;51(12):1413-6
46. Cummings T. F, Shelton J. R: Mannich reaction mechanisms. *J. Org. Chem.* 1960, 25(3), 419-23