

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**SLAVKA MAJCEN**

**SINTEZA AMINOPIRIMIDINTIAZOLOV S POTENCIALNIM  
DELOVANJEM NA NAPETOSTNO ODDISNE IONSKE KANALČKE**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**SLAVKA MAJCEN**

**SINTEZA AMINOPIRIMIDINTIAZOLOV S POTENCIJALNIM  
DELOVANJEM NA NAPETOSTNO ODDVISNE IONSKE KANALČKE**

**SYNTHESIS OF AMINOPYRIMIDINETHIAZOLES WITH POTENTIAL  
ACTIVITY ON VOLTAGE-GATED ION CHANNELS**

**MAGISTRSKA NALOGA**

Ljubljana, 2015

Slavka Majcen:

Sinteza aminopirimidintiazolov s potencialnim delovanjem na napetostno odvisne ionske kanalčke

---

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### **Zahvala**

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., in asistentu dr. Roku Frlanu, mag. farm., za vse nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi magistrskega dela. Še posebej bi se rada zahvalila Marku Jukiču, mag. farm., tako za dosegljivost, prijaznost in odlično usmerjanje tekom opravljanja eksperimentalnega dela v laboratoriju kot tudi za potrežljivost, dobre misli in strokovne nasvete pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi magistrske naloge.

Prav tako bi se rada zahvalila Tjaši, Iztoku, staršem in vsem ostalim, ki so mi tekom študija vedno stali ob strani, me podpirali in verjeli vame.

Posebna zahvala gre tudi sošolkam in sošolcem, s katerimi sem preživelatako zabavne kot tudi naporne in stresne trenutke študijskega življenja.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Slavka Majcen

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član magistrske komisije: asist. dr. Rok Frlan, mag. farm.

Članica magistrske komisije: asist. dr. Martina Gobec, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>IX</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. <b>NAPETOSTNO ODVISNI NATRIJEVI KANALČKI (<math>Na_v</math>)</b>	<b>2</b>
1.1.1. Poimenovanje napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov	4
1.1.2. Napetostno odvisni natrijevi kanalčki kot terapevtske tarče za zdravilne učinkovine	5
1.1.2.1. Epilepsija	5
1.1.2.2. Bolečina	6
1.1.2.3. Srčna aritmija	7
1.2. <b>NAPETOSTNO ODVISNI KALIJEVI KANALČKI (<math>K_v</math>)</b>	<b>7</b>
1.2.1. Poimenovanje napetostno odvisnih kalijevih kanalčkov	8
1.2.2. Napetostno odvisni kalijevi kanalčki kot terapevtske tarče za zdravilne učinkovine	9
1.2.2.1. Avtoimunska bolezen	10
1.2.2.2. Sladkorna bolezen	10
1.2.2.3. Rak	10
1.3. <b>NARAVNI VIRI UČINKOVIN, KI DELUJEJO NA NAPETOSTNO ODVISNE KANALČKE</b>	<b>11</b>
1.3.1. Spojine naravnega izvora z delovanjem na napetostno odvisne natrijeve kanalčke	13
1.3.2. Spojine naravnega izvora z delovanjem na napetostno odvisne kalcijeve/kalijeve kanalčke	15
<b>2. NAČRT DELA</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>20</b>
3.1. <b>MATERIALI</b>	<b>20</b>
3.2. <b>METODE</b>	<b>20</b>
3.2.1. Kromatografske metode	20
3.2.2. Spektroskopske metode	21
3.2.3. Tališče	21
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL</b>	<b>22</b>
4.1. <b>REAKCIJSKE SHEME</b>	<b>22</b>

<b>4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ</b>	<b>23</b>
4.2.1. Sinteza pot <i>terc</i> -butil 2-((di- <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-formil-1 <i>H</i> -imidazol-1-karboksilata ( <u>7</u> )	23
4.2.1.1. Sinteza <i>N</i> -Boc-gvanidina ( <u>2</u> )	23
4.2.1.2. Sinteza 3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-ona ( <u>4</u> )	24
4.2.1.3. Sinteza <i>terc</i> -butil 2-amino-5-(dimetoksimetil)-1 <i>H</i> -imidazol-1-karboksilata ( <u>5</u> )	25
4.2.1.4. Sinteza <i>terc</i> -butil 2-((di- <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-(dimetoksimetil)-1 <i>H</i> -imidazol-1-karboksilata ( <u>6</u> )	26
4.2.1.5. Sinteza <i>terc</i> -butil 2-((di- <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-formil-1 <i>H</i> -imidazol-1-karboksilata ( <u>7</u> )	27
4.2.2. Sinteza pot <i>N</i> -(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida ( <u>19</u> )	28
4.2.2.1. Sinteza 1-dimetilamino-4,4-dimetokspent-1-en-3-ona ( <u>10</u> )	28
4.2.2.2. Sinteza 4-(1,1-dimetoksietyl)pirimidin-2-amina ( <u>12</u> )	29
4.2.2.3. Sinteza 4-acetyl-2-aminopirimidina ( <u>13</u> )	30
4.2.2.4. Sinteza 2-amino-4-bromoacetylpirimidina ( <u>14</u> )	31
4.2.2.5. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(2-aminopirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamata ( <u>16</u> )	32
4.2.2.6. Sinteza <i>terc</i> -butil 4-(2-(4-nitrobenzamido)pirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamata ( <u>18</u> )	33
4.2.2.7. Sinteza <i>N</i> -(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida ( <u>19</u> )	34
<b>5. RAZPRAVA</b>	<b>36</b>
5.1. Sinteza pot <i>terc</i> -butil 2-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-5-formil-1 <i>H</i> -imidazol-1-karboksilata ( <u>7</u> )	37
5.1.1. Uvedba Boc zaščitne skupine na gvanidin	37
5.1.2. Bromiranje karbonilne spojine na $\alpha$ -keto mestu	38
5.1.3. Sinteza spojine z imidazolnim obročem	39
5.1.4. Uvedba Boc zaščitne skupine s pomočjo pomožnega nukleofila	40
5.1.5. Odščita acetala z molekularnim jodom, raztopljenim v acetonus	41
5.2. Sinteza pot <i>N</i> -(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida ( <u>19</u> )	42
5.2.1. Tvorba $\alpha,\beta$ -nenasičenega ketona	42
5.2.2. Sinteza spojine s pirimidinskim obročem	44
5.2.3. Kislinsko katalizirana hidroliza ketala	45
5.2.4. Bromiranje 4-acetyl-2-aminopirimidina	46
5.2.5. Sinteza spojine s tiazolnim obročem	48
5.2.6. Tvorba amida na amino skupini	49
5.2.7. Odstranitev Boc zaščitne skupine z amino skupine	51
5.3. Razprava k rezultatom biološkega testiranja	52

6. <b><i>SKLEP</i></b>	<hr/> 55
------------------------	----------

7. <b><i>VIRI IN LITERATURA</i></b>	<hr/> 56
-------------------------------------	----------

## KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Shematski prikaz strukture napetostno odvisnega natrijevega kanalčka</i>	2
<i>Slika 2: Odprta in zaprta oblika inaktivacije</i>	4
<i>Slika 3: Fenitoin, karbamazepin in lamotrigin</i>	6
<i>Slika 4: Shematski prikaz strukture napetostno odvisnega kalijevega kanalčka</i>	8
<i>Slika 5: Astemizol in imipramin</i>	11
<i>Slika 6: Spužva Agelas clathrodes</i>	12
<i>Slika 7: Klatrodin, dibromoskeptrin in oroidin</i>	13
<i>Slika 8: Vezavna mesta za nevrotoksin</i>	14
<i>Slika 9: Uvedene spremembe na spojini vodnici</i>	17
<i>Slika 10: Osnovna reakcijska shema</i>	19
<i>Slika 11: Učinkovine, poslane na testiranje</i>	36
<i>Slika 12: Mehanizem zaščite aminske skupine z (Boc)<sub>2</sub>O</i>	37
<i>Slika 13: S kislino in bazo katalizirano bromiranje</i>	38
<i>Slika 14: Mehanizem tvorbe imidazola</i>	39
<i>Slika 15: Mehanizem katalitičnega delovanja DMAP</i>	41
<i>Slika 16: Mehanizem odščite acetalov in ketalov z jodom in acetonom</i>	42
<i>Slika 17: Mehanizem sinteze α,β-nenasičenega ketona</i>	43
<i>Slika 18: Aparatura za kratkopotno vakuumsko destilacijo</i>	44
<i>Slika 19: Mehanizem kislinsko katalizirane hidrolize ketala</i>	46
<i>Slika 20: Kislinsko katalizirano bromiranje</i>	47
<i>Slika 21: Mehanizem tvorbe spojine 16</i>	49
<i>Slika 22: Mehanizem katalitičnega delovanja piridina</i>	50
<i>Slika 23: Mehanizem tvorbe amida na amino skupini spojine 16</i>	50
<i>Slika 24: Možni stranski produkti</i>	50
<i>Slika 25: Mehanizem acidolize</i>	51

## KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Poimenovanje natrijevih kanalčkov, genski simbol, občutljivost na tetrodotoksin in razporeditev v tkivih</i>	5
<i>Preglednica II: Poimenovanje kalijevih kanalčkov, razporeditev v tkivih in patološka stanja (30, 24)</i>	9
<i>Preglednica III: Reakcijski pogoji in izkoristki, ki smo jih dobili pri optimizaciji bromiranja 4-acetyl-2-aminopirimidina</i>	47
<i>Preglednica IV: Rezultati testiranja na Nav1,3 kanalčkih</i>	53

## POVZETEK

Napetostno odvisni ionski kanalčki so transmembranski proteini, ki so odgovorni za prevajanje električnih signalov skozi celice in celične sisteme. Delimo jih glede na selektivno prepustnost ionov, in sicer na napetostno odvisne natrijeve kanalčke ( $\text{Na}_v$ ), napetostno odvisne kalijeve kanalčke ( $\text{K}_v$ ) in napetostno odvisne kalcijeve kanalčke ( $\text{Ca}_v$ ). Za prenos signalov so najpomembnejši napetostno odvisni natrijevi in kalijevi kanalčki, ki se nahajajo v različnih tkivih in jih delijo v več družin. Ti so vpleteni v različne fiziološke vloge in so posledično udeleženi v mnogih patoloških stanjih, kot so srčna aritmija, sladkorna bolezen, bolečina, epilepsija in druge. Učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje naštetih patoloških stanj, izkazujejo šibko selektivnost do določene izoblike kanalčka, kar se posledično izkazuje v številnih stranskih učinkih in ozkem terapevtskem oknu. Za povečanje selektivnosti je ključen razvoj primernejših učinkovin, kjer so nam lahko v pomoč učinkovine naravnega izvora.

V okviru magistrskega dela smo uporabili strukturi oroidina in klatrodina, ki sta naravna sekundarna metabolita izolirana iz morske spužve rodu *Agelas*. Ti dve spojini sta služili kot kandidata za spojino vodnico pri načrtovanju in sintezi spojin s selektivnim delovanjem na posameznih ionskih kanalčkih in izoblikah kanalčkov. Zaradi medsebojne podobnosti različnih družin kanalčkov bi bili selektivni modulatorji napetostno odvisnih kanalčkov ključnega pomena pri zdravljenju različnih patoloških stanj. Izvedli in optimizirali smo sintezi aminoimidazonega in aminopirimidintiazolnega fragmenta, katera smo poskušali povezati, vendar pa reakcija ni potekala po pričakovanih. Aminopirimidintiazolni fragment smo zato substituirali s 4-nitrobenzoil kloridom. Za identifikacijo spojin smo uporabili različne metode: NMR (nuklearna magnetna resonanca), MS (masna spektroskopija), IR (infrardeča spektroskopija) in določanje temperature tališča. Spojine smo poslali tudi na ustrezno biološko testiranje z uporabo avtomatizirane elektrofiziološke metode vpete krpice membrane. Rezultati testiranja so pokazali, da je ena izmed sintetiziranih spojin zmerno močan inhibitor kanalčkov  $\text{Na}v1,3$  s selektivnim delovanjem na odprto inaktivirano obliko kanalčka. Poleg tega pa so nam podali tudi informacijo o posameznih fragmentih, ki so ključni za delovanje spojin. Za aktivnost je ključen že omenjeni aminopirimidintiazolni fragment, ki ima na vsaki strani molekule vezan dodatni lipofilni fragment (*terc*-butil karbamat in 4-nitrobenzamid).

## ABSTRACT

Voltage-gated ion channels are transmembrane proteins responsible for the conduction and propagation of electrical signals throughout cells and cell systems. They are divided according to the selective permeability of ions, namely voltage-gated sodium channels ( $\text{Na}_v$ ), voltage-gated potassium channels ( $\text{K}_v$ ), and voltage-gated calcium channels ( $\text{Ca}_v$ ). Key channels for signal transmission are voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  channels, which are located in different tissues and divided into several classes. They are implicated in a variety of physiological roles and are therefore involved in many pathological conditions, such as cardiac arrhythmia, diabetes, pain, epilepsy, and other. Current active substances, used for the treatment of the above mentioned pathological conditions, exhibit a low selectivity to a specific isoform of the channel, which results in a number of side-effects and a narrow therapeutic window. In order to increase the selectivity the development of novel active pharmaceutical ingredients is of key importance and substances of natural origin can be a great asset.

In the context of this master thesis, we opted to use the structure of oroidin and clathrodin, which are natural secondary metabolites, isolated from sea sponge of the genus *Agelas*. These two compounds were used as candidates for lead compound in planning and development of novel compounds with potential selective action on specific ion channels and channel isoforms. Due to the similarity of various channel classes, selective modulators of voltage-gated channels would be of key importance in the treatment of various pathological conditions. We have implemented and optimized the syntheses of aminoimidazole and aminopyrimidinethiazole fragment, which we tried to connect, but the reaction did not progress as expected. Therefore, aminopyrimidinethiazole fragment was substituted with 4-nitrobenzoyl chloride. We have used various methods for the identification of compounds: NMR (nuclear magnetic resonance), MS (mass spectroscopy), IR (infrared spectroscopy), and the determination of melting point. The compounds were also sent to the appropriate biological testing with automated patch-clamp electrophysiology. The test results have shown that one of the synthesized compounds is moderately potent inhibitor of  $\text{Na}_v1.3$  channels with selective action on open inactivated form of the channel. In addition, they also provided information about individual fragments, which are of key importance for compounds activity. The key for activity is above-mentioned aminopyrimidinethiazole, having attached additional lipophilic fragment on each side of the molecule (*tert*-Butyl carbamate, and 4-nitrobenzamide).

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>ATP</b>	adenozintrifosfat
<b>Boc</b>	<i>t</i> -butiloksikarbonilna skupina
<b>Cav</b>	napetostno odvisni kalcijev kanalček
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	devteriran kloroform
<b>CIP</b>	prirojena neobčutljivost na bolečino
<b>CŽS</b>	centralni živčni sistem
<b>d</b>	dublet (NMR)
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>DMF-DMA</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamid dimetilacetal
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	devteriran dimetilsulfoksid
<b>ESI</b>	elektrorazpršilna ionizacija (MS)
<b>EtOAc</b>	etilacetat
<b>HRMS</b>	masna spektroskopija visoke ločljivosti
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša hitrost encimske reakcije na polovico
<b>IFM</b>	hidrofobna triada izolevcil-fenilalanil-metionin
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b>J</b>	sklopitvena konstanta
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>K<sub>v</sub></b>	napetostno odvisni kalijev kanalček
<b>M</b>	molarnost (mol/l)
<b>MeOH</b>	metanol
<b>Mr</b>	relativna molekulska masa
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>Nav</b>	napetostno odvisni natrijev kanalček
<b>nm</b>	nanometer
<b>NMR</b>	nuklearna magnetna resonanca
<b>P1</b>	zaprta oblika Nav1,3 kanalčka
<b>P3</b>	odprtta oblika Nav1,3 kanalčka
<b>Rf</b>	retencijski faktor

<b>s</b>	singlet (NMR)
<b>SB</b>	sladkorna bolezen
<b>STX</b>	saksitoksin
<b>TEA</b>	trietilamin
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija
<b>Tt</b>	temperatura tališča
<b>TTX</b>	tetrodotoksin
<b>UV</b>	ultravijolično
<b><math>\bar{v}</math></b>	valovno število [ $\text{cm}^{-1}$ ]
<b><math>\delta</math></b>	kemijski premik
<b><math>\eta</math></b>	izkoristek
<b><math>\lambda</math></b>	valovna dolžina

## 1. UVOD

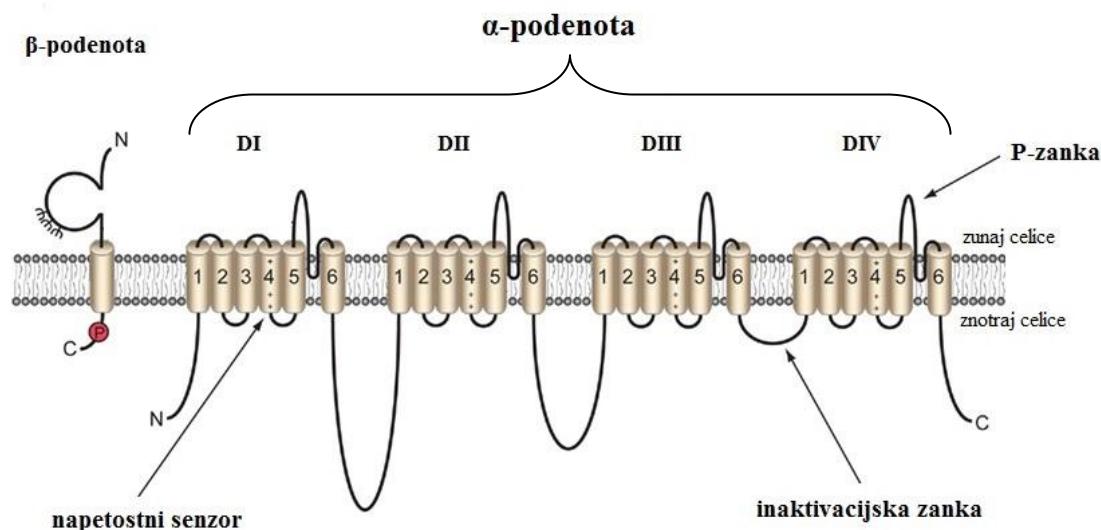
Celični transmembranski proteini, ki povzročijo spremembo v prevodnosti membrane za ione, tvorijo ionske kanalčke, le-ti pa se delijo na od ligandov odvisne in napetostno odvisne kanalčke. Slednji delujejo tako, da zaznajo spremenjeno napetost na membrani, kar sproži konformacijsko spremembo in s tem odprtje ali zaprtje kanalčka (1). Tako so odgovorni za prevajanje vala depolarizacije vzdolž celične membrane. Napetostno odvisne ionske kanalčke delimo glede na ionsko selektivnost, in sicer na napetostno odvisne natrijeve, kalijeve in kalcijeve kanalčke. Napetostno odvisni natrijevi kanalčki ( $Na_v$ ) sodelujejo pri tvorbi akcijskih potencialov, saj se z odprtjem teh kanalčkov sproži depolarizacija celične membrane v živčnih, mišičnih in endokrinih celicah (2). Napetostno odvisni kalijevi kanalčki ( $K_v$ ) so v sklopu proženja akcijskih potencialov odgovorni za repolarizacijo celične membrane v živčnih in mišičnih celicah. Vloga napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov pa je mnogovrstna. Odgovorni so za depolarizacijo akcijskega potenciala v srčni mišici, poleg tega pa lahko  $Ca^{2+}$  ioni delujejo tudi kot sekundarni prenašalci informacij in tako uravnavajo nekatere biokemijske procese znotraj celice (npr. eksocitoza) (1).

Neposreden prehod skozi lipofilno membrano je ionom onemogočen in zato prehajajo skozi ionske kanalčke ali s pomočjo ionskih črpalk (3, 4). Gibanje ionov skozi ionske kanalčke povzroči napetostne spremembe na celični membrani in posledično spremembo membranskega potenciala. Mirovni membranski potencial ima običajno vrednost  $-70\text{ mV}$ , kar pomeni, da je notranja stran celične membrane negativno nabita glede na zunanjou stran (4). Vzdrževanje koncentracijskega gradiента med obema stranema celične membrane omogoča od ATP odvisna natrij-kalijeva črpalka, ki izmenično z aktivnim transportom prenosa  $Na^+$  in  $K^+$  ione. Ko celica prejme signal, se prepustnost membrane za ione spremeni, posledično pa se spremeni tudi membranski potencial (5). Z odprtjem  $Na_v$  kanalčkov in vdorom  $Na^+$  ionov v celico se mirovni membranski potencial začne pomikati proti pozitivni vrednosti, kar vodi v depolarizacijo celične membrane (4). Ko se membrana depolarizira v tolikšni meri, da membranski potencial doseže prag vzdražnosti ( $-50\text{ mV}$ ), se sproži akcijski potencial z običajno vrednostjo  $+35\text{ mV}$  (4). Tako se sproži potovanje živčnega impulza po nevronih (6). Po hitri depolarizaciji se začno natrijevi kanalčki zapirati, hkrati pa se odpirajo kalijeve kanalčki. Le-ti povzročijo prehod  $K^+$  ionov iz celice

in padanje membranskega potenciala proti negativni vrednosti. Odprtji kalijevi kanalčki zato povzročijo repolarizacijo celične membrane in ponovno vzpostavitev mirovnega membranskega potenciala (5). Del membrane, v kateri je potekal akcijski potencial, je prehodno neodziven na nove dražljaje. To obdobje se imenuje neodzivna ali refraktarna doba. V tem času celična membrana ni sposobna proženja novega akcijskega potenciala. To je posledica neaktivnosti natrijevih kanalčkov, saj le ti nekaj časa niso sposobni ponovnega odprtja (7).

### 1.1. NAPETOSTNO ODVISNI NATRIJEVI KANALČKI (Nav)

Napetostno odvisne natrijeve kanalčke tvorijo transmembranski proteini, ki sodelujejo pri tvorbi akcijskega potenciala in so odgovorni za depolarizacijo in prevajanje električnih signalov skozi celične sisteme in tkiva (živčevje, mišičje in srce) (8, 9). Sesalski natrijevi kanalčki so sestavljeni iz  $\alpha$  podenote, ki predstavlja jedro kanalčka (3) in je ključna za normalno prehajanje  $\text{Na}^+$  ionov skozi membrane, ter iz pomožne  $\beta$  podenote, ki uravnava lastnosti in funkcijo kanalčka (9, 10).  $\alpha$  podenota sestoji iz štirih notranjih homolognih domen (I–IV), ki skupaj tvorijo poro za prehajanje ionov. Zgradba te pore določa selektivnost in prepustnost za natrijeve ione (8). Vsaka domena je sestavljena iz šestih  $\alpha$  spiralnih transmembranskih segmentov (S1–S6), ki imajo *N*- in *C*-terminalni konec znotraj celice (10). Povezava med transmembranskima segmentoma S5 in S6 se imenuje P-zanka in je odgovorna za zaporo pore, skozi katero prehajajo ioni (**Slika 1**) (4).

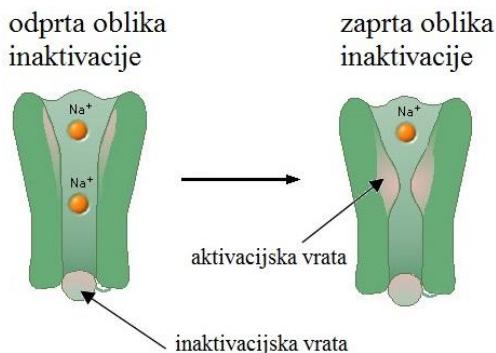


Slika 1: Shematski prikaz strukture napetostno odvisnega natrijevega kanalčka (11)

Pomožna  $\beta$  podenota je odgovorna za uravnavanje funkcije natrijevega kanalčka in je torej pomembna za normalno kinetiko kanalčkov in napetostno odvisno aktivacijo (8, 10). Sestavljena je iz enega transmembranskega segmenta, ki ima N-terminalni konec zunaj celice in C-terminalni konec znotraj celice (**Slika 1**) (1). V sesalskih celicah je prisotnih 5 različnih podenot  $\beta$  ( $\beta 1-\beta 5$ ). Vse podenote niso prisotne v vseh natrijevih kanalčkih, saj ima  $\alpha$  podenota lahko vezano eno ali več podenot  $\beta$  (12).

Aktivacija napetostno odvisnih kanalčkov je posledica spremembe napetosti na membrani, saj postane membranski potencial bolj pozitiven (10). Za aktivacijo kanalčka je odgovoren četrti transmembranski segment S4, ki je pogosto opisan kot napetostni senzor. Le-ta odgovarja na spremembo napetosti na membrani z odpiranjem oz. zapiranjem pore, kjer se nahajajo tako imenovana aktivacijska vrata (**Slika 2**) (8). Po napetostni aktivaciji pride do prostorske preuređitve kanalčka in posledično do odprtja pore, kar omogoči natrijevim ionom, da vdrejo v celico (8, 12).

Po aktivaciji kanalčka sledi inaktivacija (13). Hitra inaktivacija je posredovana s citoplazemsko zanko med domenama III in IV, ki tvori inaktivacijska vrata. To zanko sestavlja hidrofobna triada, sestavljena iz izolevcina, fenilalanina in metionina (IFM) in se imenuje inaktivacijska zanka (8, 10). Inaktiviran kanalček ima dve obliki: odprto in zaprto. Odprta oblika inaktivacije nastopi takoj zatem, ko se inaktivacijska vrata zapro (**Slika 2 levo**). V tem času so transmembranski segmenti S4 še vedno pomaknjeni proti zunanji strani celične membrane, da so aktivacijska vrata še vedno odprta, vendar pa prehod ionov v citoplazmo ni več mogoč. Po hitri inaktivaciji sledi neodzivna ali refraktarna doba, ko se napetostni senzorji postopoma vračajo v svojo prvotno pozicijo (se hiperpolarizirajo). Leto povzroči zaprtje aktivacijskih vrat. Ta oblika inaktivacije je zaprta, saj so tako aktivacijska kot tudi inaktivacijska vrata zaprta (**Slika 2 desno**) (14, 15).



Slika 2: Odprta in zaprta oblika inaktivacije (16)

### 1.1.1. Poimenovanje napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov

Za opredelitev poddružine in podvrst natrijevih kanalčkov najpogosteje uporabljajo sistem, ki temelji na podobnosti aminokislinskega zaporedja med kanalčki (17). Devet izooblik sesalskih natrijevih kanalčkov kaže več kot 75 % podobnost v aminokislinskem zaporedju (18). Zaradi tega vseh devet izooblik uvrščamo v isto družino Nav1 (9).

Nav1,1, Nav1,2, Nav1,3 in Nav1,7 kanalčki so si po sorodnosti najbližji, saj se geni zanje nahajajo na istem kromosomu. Izraženi so predvsem v nevronih in so zelo občutljivi na tetrodotoksin (17). Ta je eden izmed bolje poznanih toksinov, ki se selektivno in z visoko afiniteto veže na Nav (1). Po sorodnosti so si blizu tudi kanalčki Nav1,5, Nav1,8 in Nav1,9, ki se izražajo predvsem v srčni mišici in dorzalnih ganglijih. Le-ti so na tetrodotoksin odporni zaradi spremembe aminokislinskega zaporedja na enem samem mestu v domeni I. Nav1,4 in Nav1,6 kanalčki pa se od prej omenjenih dveh skupin malce bolj razlikujejo. Nav1,4 kanalčki so izraženi predvsem v skeletni muskulaturi, Nav1,6 kanalčke pa najdemo predvsem v CŽS (17).

Poleg te družine kanalčkov obstajajo še atipični kanalčki, ki imajo v 50 % enako aminokislinsko zaporedje kot Nav1. Označeni so z  $\text{Na}_X$  in imajo drugačno aminokislinsko zaporedje za aktivacijski senzor, inaktivacijska vrata in poro (17). Njihova vloga je predvidoma uravnavanje natrijevih ionov, saj naj bi v telesu zaznavali nivo koncentracije natrijevih ionov in glede na to uravnalili vnos natrija (12).

**Preglednica I: Poimenovanje natrijevih kanalčkov, genski simbol, občutljivost na tetrodotoksin in razporeditev v tkivih (17, 18)**

TIP KANALČKA	GEN	OBČUTLJIVOST KANALČKA NA TETRODOTOKSIN	MESTO IZRAŽANJA
Na <sub>v</sub> 1,1	SCN1A	občutljiv	CŽS, PŽS
Na <sub>v</sub> 1,2	SCN2A	občutljiv	CŽS
Na <sub>v</sub> 1,3	SCN3A	občutljiv	CŽS
Na <sub>v</sub> 1,4	SCN4A	občutljiv	skeletalna muskulatura
Na <sub>v</sub> 1,5	SCN5A	neobčutljiv	skeletalna muskulatura, srčna mišica
Na <sub>v</sub> 1,6	SCN8A	občutljiv	CŽS, PŽS
Na <sub>v</sub> 1,7	SCN9A	občutljiv	PŽS, Schwannove celice
Na <sub>v</sub> 1,8	SCN10A	neobčutljiv	dorzalni gangliji
Na <sub>v</sub> 1,9	SCN11A	neobčutljiv	PŽS
Na <sub>x</sub>	SCN6A, SCN7A		srce, uterus, skeletalna muskulatura, dorzalni gangliji

### 1.1.2. Napetostno odvisni natrijevi kanalčki kot terapevtske tarče za zdravilne učinkovine

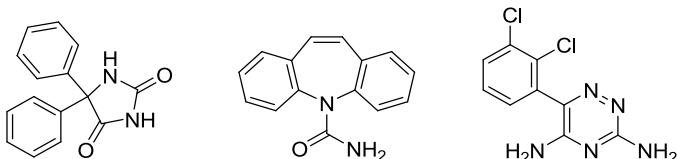
Na<sub>v</sub> kanalčki imajo zelo raznoliko zgradbo in zato predstavljajo tarčo za številne učinkovine, ki z vezavo na receptorsko mesto močno spremenijo funkcijo kanalčka. Registrirane majhne molekule, ki modulirajo delovanje Na<sub>v</sub> kanalčkov (lidokain, lamotrigin, karbamazepin, meksiletin ...), so zelo šibko selektivne, saj so si različne izooblike Na<sub>v</sub> kanalčkov po strukturi zelo podobne. Posledica neselektivnosti učinkovin prisotnih v klinični rabi so stranski učinki in ozko terapevtsko okno. Zaradi tega smer razvoja vodi v razvoj popolnoma selektivnih učinkovin na posamezni izoobliki (19, 20).

#### 1.1.2.1. Epilepsija

Več kot 200 mutacij, identificiranih na genu SCN1A, ki kodira Na<sub>v</sub>1,1 kanalček, je vzrok za nastanek epilepsije. Mutacije povzročijo bodisi izgubo ali pridobitev neke funkcije na kanalčku. Izguba funkcije Na<sub>v</sub>1,1 kanalčka izzove hudo mioklonično epilepsijo v otroštvu. Tudi mutacija na genu SCN1B, ki je odgovoren za  $\beta 1$  podenoto, vodi v nastanek epilepsije. Sprememba v zunajcelični domeni podenote  $\beta$  povzroči omejeno povezavo z  $\alpha$  podenoto in zniža izražanje kanalčka v membrani. Manjše število mutacij je zabeleženih na genu

SCN2A, ki kodira Nav1,2 kanalček. Klinični simptomi epilepsije so manj izraziti, epileptični napadi pa se pojavljajo samo v otroštvu (20).

Antiepileptiki, kot so fenitoin, karbamazepin in lamotrigin, inhibirajo Nav kanalčke in tako zavirajo nenehno ponavljanje se proženje akcijskih potencialov v možganskih nevronih. Ker se vežejo na natrijeve kanalčke v neaktivnem stanju, to stanje tudi podaljšajo (19).



Slika 3: Fenitoin, karbamazepin in lamotrigin

#### 1.1.2.2. Bolečina

Za nastanek bolečine so med drugimi odgovorni tudi Nav1,3 kanalčki, saj poškodba aksona, okužba z virusom varicella zoster ali vnetje povzročijo drastično spremembo izražanja teh kanalčkov v dorzalnih ganglijih (21). Poškodovani nevroni posledično posredujejo bolečinske signale (22).

Prirojena neobčutljivost na bolečino (CIP) je redka avtosomno recesivna bolezen, pri kateri oseba ne zaznava bolečine, zaznavanje ostalih dražljajev pa je nemoteno. To bolezen povzroča mutacija na genu SCN9A, ki povzroči izgubo celotne funkcije Nav1,7 kanalčka. Druga mutacija na tem genu pa, ravno nasprotno, senzibilizira kanal in povzroči eritemalgijo, kjer so pacienti bolj občutljivi na bolečino. Je izjemno redka bolezen, vendar povzroča zelo hude bolečine. Zanjo je značilen pekoč občutek v toplih, pordelih in oteklih nogah (20).

Prvi uporabljeni lokalni anestetik je bil kokain, ki se je zaradi številnih stranskih učinkov izkazal za neugodnega, vendar pa je služil kot spojina vodnica za nadaljnji razvoj lokalnih anestetikov (23). Lokalni anestetiki se vežejo na zaprto inaktivirano obliko Na<sub>v</sub> kanalčkov in to stanje podaljšajo. S tem zavirajo prevajanje električnih signalov po živčnih vlaknih in posledično onemogočajo prenos informacije o bolečini v centralni živčni sistem. Predstavniki lokalnih anestetikov so npr. lidokain, benzokain in bupivakain (4).

#### 1.1.2.3. Srčna aritmija

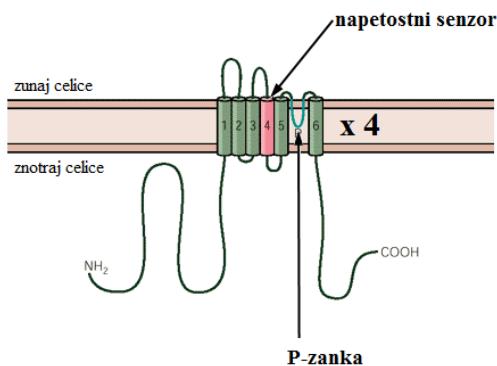
Na nastanek aritmije lahko vplivajo mutacije na Nav ali Kv kanalčkih. V srčni mišici je od Nav kanalčkov najbolj zastopan Nav1,5 kanalček, ki je odgovoren za nastanek akcijskega potenciala. Do sedaj je na genu, ki kodira ta kanalček, opisanih že več kot 160 mutacij, ki povzročajo številne srčne nepravilnosti (20).

Med zelo raznoliko družino Kv kanalčkov je za srce pomemben Kv7,1 kanalček. Mutacije, ki povzročajo izgubo funkcije tega kanalčka, povzročijo podaljšanje QT intervala in motnje srčnega ritma. Mutacije, ki pa povzročijo, da Kv7,1 kanalček pridobi novo funkcijo, vodijo v skrajšanje akcijskega potenciala in QT intervala ter atrijsko fibrilacijo (24).

Učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje aritmije, se delijo v štiri razrede glede na njihov mehanizem delovanja. Za nas je pomemben razred I, kamor sodijo inhibitorji Nav kanalčkov, in razred III, kjer najdemo zaviralce Kv kanalčkov. Antiaritmiki razreda I se vežejo na  $\alpha$  podenoto Nav kanalčkov in tako zmanjšajo hitrost depolarizacije v srčni celici. S tem skrajšajo trajanje akcijskega potenciala in posledično zmanjšajo aktivnost Nav kanalčkov. Predstavniki so lidokain, meksiletin in tokainid (19). Zaviralci kalijevih kanalčkov pa delujejo tako, da podaljšajo trajanje akcijskega potenciala v miokardnem vlaknu. Poleg tega pa podaljšajo tudi neodzivno ali refraktarno dobo. Danes so iz te skupine v uporabi predvsem amiodaron in sotalol (24).

## 1.2. NAPETOSTNO ODVISNI KALIJEVI KANALČKI (K<sub>V</sub>)

Napetostno odvisni kalijevi kanalčki povzročajo repolarizirajo akcijskega potenciala v živčnih in mišičnih celicah (25). Odgovorni so za ponovno vzpostavitev mirovnega membranskega potenciala, kontrolo praga vzdražnosti in frekvenco akcijskih potencialov (26). Sestavljeni so iz  $\alpha$  podenote in pomožne  $\beta$  podenote (27).  $\alpha$  podenota je sestavljena iz štirih enakih ali podobnih transmembranskih podenot, ki obdajajo centralno poro, skozi katero prehajajo ioni. Vsaka podenota je sestavljena iz šestih transmembranskih segmentov (S1–S6), ki imajo N- in C-terminalne konce znotraj celice. Povezava med transmembranskima segmentoma S5 in S6 se imenuje P-zanka in je pomembna za zaporo pore, skozi katero prehajajo ioni (**Slika 4**) (26).



Slika 4: Shematski prikaz strukture napetostno odvisnega kalijevega kanalčka (28)

$\beta$  podenota je odgovorna za premik napetostno odvisne aktivacije v smer hiperpolarizacije in hitro inaktivacijo  $K_V$  kanalčka.  $K_V$  kanalčki imajo lahko prisotne tri različne podenote  $\beta$  ( $\beta 1-\beta 3$ ) (27).

Aktivacija  $K_V$  kanalčkov je povezana s spremembo napetosti na membrani. Ko postane membranski potencial pozitiven, se  $K_V$  kanalčki počasi aktivirajo (26). Spremembo napetosti na membrani zazna napetostni senzor ali četrti transmembranski segment S4, ki ima na svoji površini vezane štiri argininske ostanke podobno kot S4 pri  $Na_V$  kanalčku. Ti ostanki omogočajo premik segmenta S4 skozi membrano proti zunajcelični strani membrane med repolarizacijsko fazo akcijskega potenciala. Tako se  $K_V$  kanalčki aktivirajo in omogočajo prehod  $K^+$  ionov iz celice (29).

Tako kot pri vseh ostalih kanalčkih, sta tudi tu procesa aktivacije in inaktivacije povezana. Zaradi inaktivacije kanalčka je ta nesposoben takojšnje aktivacije, kar vpliva na to, da je tudi celična membrana nekaj časa nezmožna proženja novega akcijskega potenciala. Da se npr. odstrani inaktivacija  $Na_V$  kanalčkov, se mora celična membrana repolarizirati ali celo hiperpolarizirati, kar omogočajo  $K_V$  kanalčki, ki se inaktivirajo počasi (1).

### 1.2.1. Poimenovanje napetostno odvisnih kalijevih kanalčkov

$K_V$  kanalčki so največja in najbolj raznolika skupina ionskih kanalčkov (30). Človeški kromosom nosi zapis za 40 različnih  $K_V$  kanalčkov, ki se delijo v dvanaest družin ( $K_V1-K_V12$ ), vsaka od njih pa se naprej deli še na poddružine (Preglednica II). Družino  $K_V1$  sestavlja osem članov, ki so izraženi predvsem v CŽS, najdemo pa jih tudi na periferiji (srce, žilni in imunski sistem) (24). Družino  $K_V2$  sestavlja le dva člana, ki se izražata v CŽS, kjer se izražajo tudi vsi člani družine  $K_V3$  in  $K_V4$ . Edini predstavnik

družine Kv5 se izraža tako v CŽS kot tudi v nekaterih organih (srce, jetra, ledvici) in žlezah (trebušna slinavka) (30, 24). Družino Kv7 sestavlja pet članov. Kv7,1 kanalčki se nahajajo predvsem na periferiji, Kv7,2–Kv7,5 kanalčki pa v živčnem sistemu (24). Kv8,1 kanalček se izraža predvsem v ČZS, Kv8,2 kanalček pa v nekaterih organih (pljuča, jetra, ledvici) in žlezah (trebušna slinavka). Vsi člani družine Kv9–Kv12 se izražajo predvsem v CŽS (30).

**Preglednica II: Poimenovanje kalijevih kanalčkov, razporeditev v tkivih in patološka stanja (30, 24)**

KANALČEK	TKIVO	PATOLOŠKA STANJA
Kv1,1–Kv1,8	CŽS	
Kv2,1–Kv2,2	CŽS	
Kv3,1–Kv3,4	CŽS	
Kv4,1–Kv4,3	CŽS	
Kv5,1	možgani, srce, jetra, ledvici, trebušna slinavka	ataksija, paraliza epilepsija
Kv6,1–Kv6,4	CŽS, nekateri organi in žleze	
Kv7,1	srce, skeletna muskulatura, jetra, ledvični epitelij, pljuča	atrijska fibrilacija, sindrom podaljšane QT dobe benigna družinska neonatalna konvulzija naglušnost
Kv7,2, Kv7,3, Kv7,5	CŽS	
Kv7,4	placenta in gladka muskulatura	
Kv8,1	možgani in ledvici	
Kv8,2	pljuča, jetra, ledvici, trebušna slinavka, priželjc, prostata	
Kv9,1–Kv9,3	CŽS in nekateri organi	
Kv10,1–Kv10,2	CŽS	rak
Kv11,1–Kv11,2	CŽS, nekateri organi in žleze	sinkopa, fibrilacija
Kv11,3	CŽS	
Kv12,1–Kv12,3	CŽS in nekateri organi	

### 1.2.2. Napetostno odvisni kalijevi kanalčki kot terapevtske tarče za zdravilne učinkovine

K<sub>V</sub> kanalčki prav zaradi svoje pogostosti ponujajo zelo veliko možnosti za razvoj učinkovin, npr. za zdravljenje raka, avtoimunskih bolezni ter presnovnih, nevroloških in kardiovaskularnih bolezni (24). Vendar pa je razvoj teh učinkovin težaven, saj so si K<sub>V</sub> kanalčki struktorno zelo podobni, poleg tega pa se lahko nahajajo tako v perifernem kot tudi v centralnem živčnem sistemu, kjer povzročajo številne neželene stranske učinke (31).

#### 1.2.2.1. Avtoimunska bolezen

Pri imunskem odgovoru pride po povečanega izražanja Kv1,3 kanalčkov, ki v limfocitih T uravnavajo membranski potencial in signaliziranje s pomočjo kalcija. Povečana količina kalcijevih ionov v celicah T povzroči povečano T celično proliferacijo in izločanje citokinov, predvsem interlevkinov 2, ki spodbujajo rast in delitev limfocitov T (32). Zaviralci Kv1,3 kanalčkov povzročijo depolarizacijo celice T in s tem zmanjšajo znotrajcelično koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov ter tako zavrejo delitev limfocitov T (24). Selektivni zaviralci Kv1,3 kanalčkov bi se tako lahko uporabljali pri zavrnitvi presadkov in zdravljenju avtoimunskih bolezni (31). Vendar pa bi le-ti povzročali tudi številne stranske učinke, saj se Kv1,3 kanalčki nahajajo tudi v CŽS, jetrih, skeletni muskulaturi, makrofagih, testisih in osteokalstih. Na tem področju je tako potrebnih še kar nekaj raziskav, ki bodo rešile vprašanje dolgotrajne uporabe teh učinkovin ter njihovo učinkovitost in hkrati varnost (32).

#### 1.2.2.2. Sladkorna bolezen

Pri človeku se v  $\beta$  celicah trebušne slinavke nahajajo predvsem Kv2,1 kanalčki, ki predstavljajo potencialno tarčo za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Z inhibicijo Kv2,1 kanalčkov se akcijski potencial podaljša, poleg tega pa so dlje časa odprti tudi kalcijevi kanalčki, kar pomeni, da se izločanje inzulina poveča. Ti kanalčki so prisotni tudi v placenti, pljučih, ledvicah, jetrih, skeletni muskulaturi, prostati, testisih in debelem črevesju. Torej bi učinkovina, ki bi inhibirala Kv2,1 kanalček v  $\beta$  celicah trebušne slinavke, povzročila številne stranske učinke v ostalih tkivih (24, 33).

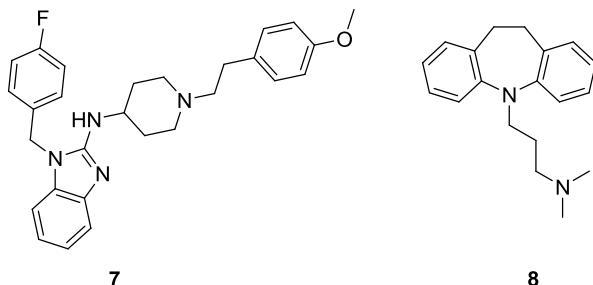
Danes se za zdravljenje sladkorne bolezni uporablja inzulin in peroralni antidiabetiki (bigvanidi, sulfonamidni antidiabetiki in zaviralci glukozidaze  $\alpha$ ). Med omenjenimi učinkovinami so sulfonamidni antidiabetiki edini, ki delujejo na kalijeve kanalčke. Le-ti namreč zavirajo od ATP odvisne kalijeve kanalčke in posledično stimulirajo izločanje inzulina iz  $\beta$  celic pankreasa. Predstavniki so glibenklamid, glipizid in glikvidon (34).

#### 1.2.2.3. Rak

Do danes še ni znana nobena mutacija na ionskem kanalčku, ki bi neposredno povzročila nastanek raka. Zato sklepajo, da so ionski kanalčki vpleteni v različne stopnje

napredovanja raka. Za zgodnjo stopnjo razvoja raka je značilno povečano izražanje Kv kanalčkov, kar je verjetno povezano s celičnim razmnoževanjem. V nadalnjih stopnjah se izražanje kanalčkov spreminja glede na različne fiziološke potrebe rakavih celic (35). V tumorskih in rakavih celicah tako najdemo povečano izražanje Kv1,3, Kv10,1 in Kv11,1 kanalčkov, ki so vpleteni v celično rast in razmnoževanje (36). Le-to je pogojeno z domnevo, da naj bi kalijevi kanalčki posredno regulirali pretok Ca<sup>2+</sup> ionov v celico, ti pa so pomembni za kontrolo celične rasti in razmnoževanja tako normalnih kot rakavih celic (35).

Astemizol in imipramin inhibirata Kv10,1 kanalčke, katerih izražanje se močno poveča predvsem pri karcinomu debelega črevesja, želodca in dojke. Posledica njunega delovanja je zmanjšana tumorska celična proliferacija. Ker pa oba inhibirata tudi Kv11,1 kanalčke, ki so prisotni tudi v srčnih miocitih, povzročata podaljšanje QT intervala. Astemizol je bil zaradi tega umaknjen s tržišča (24).



Slika 5: Astemizol in imipramin

### 1.3. NARAVNI VIRI UČINKOVIN, KI DELUJEJO NA NAPETOSTNO ODVISNE KANALČKE

Naravne substance, pridobljene iz živali, rastlin in mikrobov, se za zdravljenje bolezni uporabljajo že zelo dolgo (37). Nekatere zgodovinsko pomembnejše učinkovine, prisotne v klinični uporabi, morfin, vinkristin, paklitaksel in eritromicin, so pridobljene oz. načrtovane na podlagi spojin naravnega izvora. Zanimivo je, da podatki o razvoju novejših zdravilnih učinkovin nakazujejo na visoko prisotnost naravnih virov. Po pregledu strokovne literature je bilo pokazano, da je skoraj 50 % novejših učinkovin načrtovanih z uporabo naravnih virov, kot so mikroorganizmi, glice, rastline in živali (38). Zaradi zapletenosti naravnih učinkovin in njihovega težavnega pridobivanja je uporaba naravnih

spojin v farmacevtski industriji upadla v prid sinteznim knjižnicam. Vendar pa se v zadnjem času situacija počasi obrača in naravne spojine ponovno pridobivajo na veljni. Zanimive so predvsem zaradi ugodnih farmakokinetičnih lastnosti, saj nastopajo v že obstoječih biosistemih z obrambno ali katero drugo fiziološko vlogo (37).

Tudi morski ekosistem predstavlja med uporabljenimi naravnimi viri bogat vir naravnih učinkovin, vendar pa so te slabo raziskane in uporabljene. V zadnjih petdesetih letih je bilo morsko okolje vir za več kot dvajset tisoč naravnih produktov, kar kaže na to, da počasi pridobiva na pomenu pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin (39).

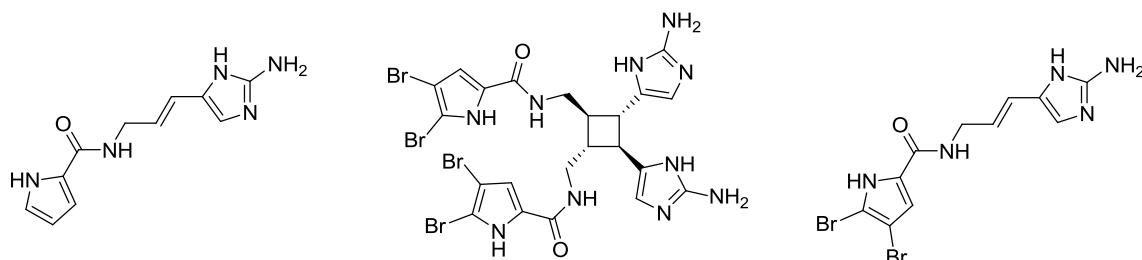
Naravne učinkovine, ki delujejo na Nav kanalčke, so našli v strupih pajkov, škorpijonov, kač, stožčastih morskih polžev in ožigalkarjev. Organizmi so namreč razvili številne spojine, ki jim pomagajo pri obrambnem mehanizmu proti naravnim sovražnikom. Takšne spojine, ki pogosto spadajo med sekundarne metabolite, predstavljajo bogat vir za razvoj novih učinkovin, saj imajo visoko selektivnost za vezavo na določeno vezavno mesto (40). Številne spojine morskih naravnih virov, ki delujejo na Nav kanalčke, spadajo med proteine, najdemo pa tudi majhne organske molekule (12). Izmed vseh morskih virov so za nas najbolj zanimive spužve iz rodu *Agelas*, ki so bogat vir bromiranih in nebromiranih spojin. Le-te izkazujejo antihistaminsko, antiholinergično, antimikrobično in protivirusno aktivnost (4, 40). Spužve iz rodu *Agelas* so nevretenčarji iz družine *Agelasidae*, ki živijo več kot 10 metrov pod morsko gladino na skalnih grebenih tropskega in subtropskega morja predvsem v Karibskem morju in Indijskem oceanu. Te spužve tvorijo zapleten simbiotski sistem s številnimi prisotnimi morskimi mikroorganizmi (41).



Slika 6: Spužva *Agelas clathrodes* (42)

Iz spužev rodu *Agelas* so do sedaj izolirali številne učinkovine, kot so npr. klatrodin, himenidin, oroidin, skeptrin, dibromoskeptrin, mauritamin in stevensin (4). Po strukturi so

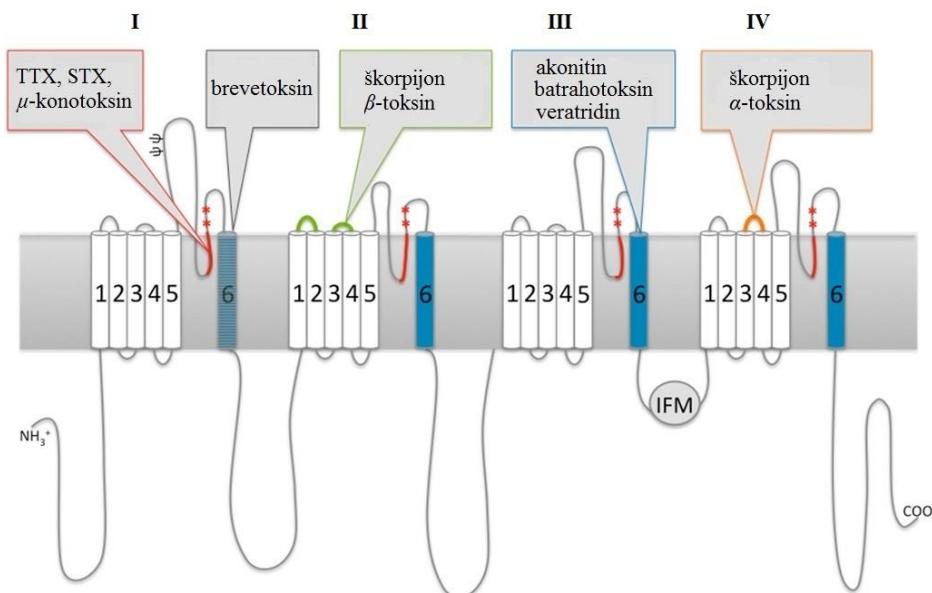
te učinkovine alkaloidi in delujejo predvsem na napetostno odvisne natrijeve in kalcijeve kanalčke (klatrodin, dibromoskeptrin in oroidin) (40).



**Slika 7: Klatrodin, dibromoskeptrin in oroidin**

### 1.3.1. Spojine naravnega izvora z delovanjem na napetostno odvisne natrijeve kanalčke

Toksini, ki jih proizvajajo živali, lahko na  $\text{Na}_V$  kanalčke delujejo na različne načine in se vežejo na različna vezavna mesta (12). Tetrodotoksin (TTX) je majhna organska molekula in alkaloid, ki ga proizvaja riba napihovalka. Veže se na P-zanko  $\text{Na}_V$  kanalčkov in tako blokira poro, ki je pomembna za prehod ionov (1). Občutljivost nanj je v nevronskih vlaknih in skeletni muskulaturi zelo visoka, saj že nanomolarne koncentracije povzročijo blokado  $\text{Na}_V$  kanalčkov in posledično smrt (8). Poro blokirata tudi peptida saksitoksin in  $\mu$ -konotoksin, ki se vežeta na isto vezavno mesto kot TTX (**Slika 8**) (21). Z blokado pore se prevodnost za  $\text{Na}^+$  ione zmanjša (1). S tem se onemogoči tvorba akcijskega potenciala in prenos impulza po mišičnih in živčnih vlakneh (23). Batrahotosin in brevetoksin sta peptidna toksina, topna v lipidih in delujeta kot alosterična modulatorja. Vežeta se na mesto, ki je ločeno od pore in napetostnega senzorja, ter stabilizirata določeno funkcionalno stanje kanalčka. Tako lahko spremenita potek aktivacije, inaktivacije in celo ionsko selektivnost. Polipeptidni toksini, ki jih proizvajajo škorpijoni, in  $\delta$ -konotoksin se vežejo na S3–S4 zanko na zunajcelični strani segmenta S4. S tem ovirajo transmembranski premik segmenta S4, ki je ključen za proces aktivacije (1). Te toksine so uporabili kot farmakološko orodje za preiskovanje funkcije posameznih izoblik  $\text{Na}_V$  kanalčkov (19).



Slika 8: Vezavna mesta za nevrotoksine (43)

Kot primer so raziskave Nav kanalčkov v žabjih jajčnih celicah pokazale, da  $\alpha$ -toksin, ki ga proizvaja škorpijon *Odontobuthus doriae*, oslabi hitro inaktivacijo Nav kanalčkov in posreduje trajni dotok  $\text{Na}^+$  ionov v celico. To lahko povzroči trajno celično depolarizacijo. Za ta toksin so najbolj občutljivi Nav1,7 kanalčki, ki se nahajajo na periferiji. Drugi primer je toksin pajkovca tarantele *Thrix-opelma pruriens*, ki je visoko selektivni zaviralec Nav1,7 kanalčkov. Deluje tako, da zmanjša prevodnost kanalčka in pomakne akcijski potencial proti bolj pozitivnim vrednostim. S tem inhibira aktivacijo Nav kanalčka (12). Zanimiva je tudi strupnina morskih stožčastih polžev (*Conus magus*), ki je bogat vir spojin z delovanjem na živčni sistem. Spojine so po strukturi peptidi in se s skupnim imenom imenujejo konotoksinji. Konotoksin, ki vplivata na Nav kanalčke, sta  $\delta$  in  $\mu$  konotoksin (44).  $\mu$ -konotoksinji se vežejo na isto vezavno mesto kot TTX (Slika 8). Vsi blokirajo Nav kanalčke, ki so prisotni v mišicah, in povzročijo njihovo paralizo.  $\mu$ -konotoksin GIIIA selektivno blokira Nav1,4 kanalčke, ki so prisotni v skeletnih mišicah (45).  $\mu$ -konotoksin PIIIA pa blokira Nav1,2 kanalčke, ki se nahajajo v CŽS, vendar nima vpliva na Nav1,7 kanalčke, ki so bolj pogosti na periferiji (44).  $\delta$ -konotoksinji zavirajo hitro inaktivacijo Nav kanalčkov, kar vodi v povečano celično vzburenje celotnega organizma (45). V nasprotju s prej opisanimi peptidi pa so zanimive tudi majhne organske molekule, in sicer sekundarni metaboliti iz spužev rodu *Agelas*. Gre za majhne spojine, kot sta klatrodin in dibromoskeptrin, ki prav tako delujeta na Nav kanalčke.

Omenjeni spojini znižata največjo amplitudo toka natrija preko membrane za 30–40 % in posledično zavirata delovanje Nav kanalčkov (4, 40).

### **1.3.2. Spojine naravnega izvora z delovanjem na napetostno odvisne kalcijeve/kalijeve kanalčke**

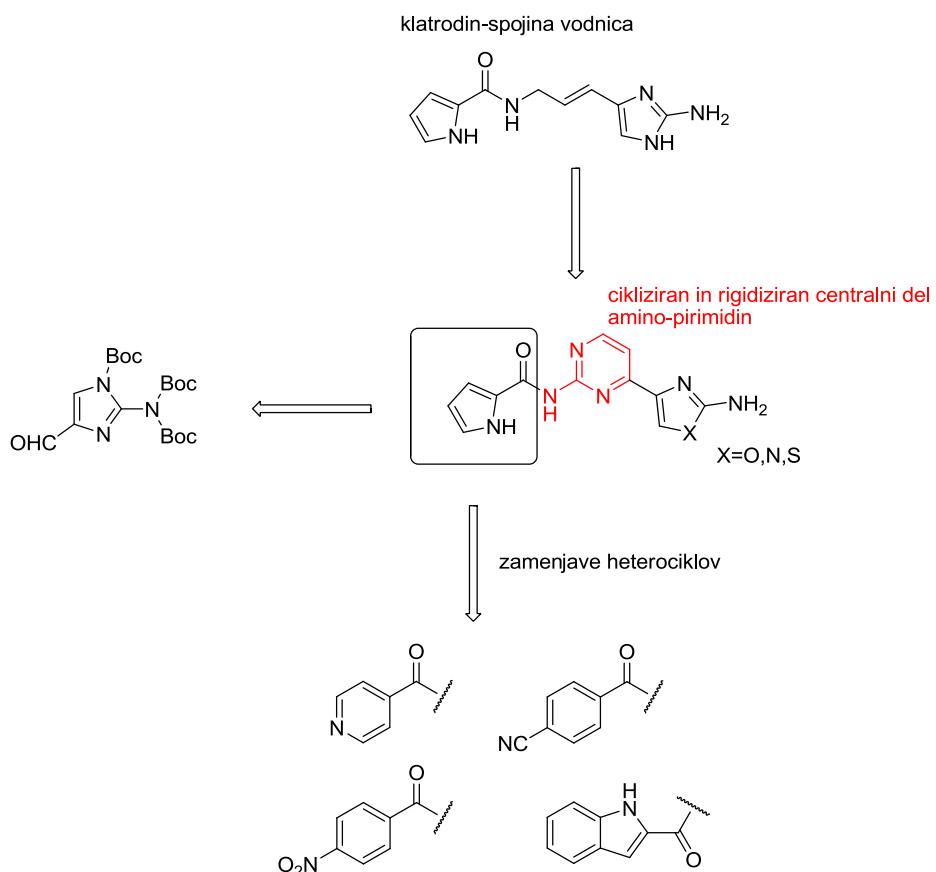
Prva klinično uporabljena učinkovina, izolirana iz morskega ekosistema, je peptid zikonotid, ki se uporablja za zdravljenje hude kronične bolečine. Je sintetični analog  $\omega$ -konotoksina, ki so ga odkrili v strupnini morskega stožčastega polža *Conus magus*. Deluje tako, da se veže na napetostno odvisne kalcijeve kanalčke, ki so prisotni samo v živčnih celicah. Z zaviranjem teh kanalčkov se prepreči sproščanje nevrotransmiterjev v živčnih končičih in posledično prenos bolečinskih signalov po hrbtenjači (46).

V naravi najdemo zelo veliko živalskih toksinov, ki lahko na različne načine delujejo na Kv kanalčke. Najbolj raziskan Kv1,1 zaviralec je 37 aminokislin dolg karibdotoksin, izoliran iz škorpijona *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. V nanomolarni koncentraciji blokira tudi Kv1,2 in Kv1,3 kanalčke. Deluje tako, da se veže na notranjo stran pore in zapre pot pomembno za prehod ionov. Študije so pokazale, da karibdotoksin zavira T celično proliferacijo in produkcijo interlevkina 2, kar je posledica blokade Kv1,3 kanalčkov. Prav tako sta zanimiva peptida noksiustoksin in margatoksin, ki sta prav tako izolirana iz dveh različnih vrst škorpijonov. Noksiustoksin zavre Kv1,1 in Kv1,2 kanalčke v nanomolarnih koncentracijah, margatoksin pa selektivno blokira Kv1,1, Kv1,2 in Kv1,3 kanalčke v pikomolarnih koncentracijah. Selektivni zaviralec Kv kanalčkov je tudi 59 aminokislin dolg peptid dendrotoksin, izoliran iz strupnine kače *Dendroaspis angusticeps*. Ker selektivno blokira Kv1,1, Kv1,2 in Kv1,6 kanalčke, stimulira sproščanje nevrotransmiterjev. Toksini, ki jih vsebujejo ožigalkarji in so pomembni za Kv kanalčke, imajo 35–37 dolgo aminokislinsko zaporedje. Njihova struktura je zelo zapletena zaradi prisotnosti disulfidnih vezi. Toksin ShK, izoliran iz *Stichodactyla helianthus*, inhibira Kv1,1, Kv1,3 in Kv1,4 kanalčke in povzroča bolečinske dražljaje. V nasprotju z velikim številom peptidnih toksinov, ki delujejo na Kv kanalčke, pa v naravi najdemo zelo malo majhnih organskih molekul, ki delujejo na omenjene kanalčke (31).

## 2. NAČRT DELA

Načrtovanje in sinteza selektivnih modulatorjev Nav kanalčkov je izjemno pomembno za izboljšanje farmakoterapije prej opisanih patoloških stanj. Zaenkrat so spojine morskega izvora dokaj slabo raziskan vir farmakološko aktivnih spojin, zato bomo pri načrtovanju in sintezi novih spojin s potencialnim selektivnim delovanjem na posameznih ionskih kanalčkih kot izhodiščni spojini uporabili strukturi oroidina in klatrodina. Strukturi sta naravna sekundarna metabolita spužve rodu *Agelas* in spadata med halogenirane alkaloide z zaviralnim delovanjem na napetostno odvisne natrijeve in kalcijeve kanalčke. V svoji strukturi imata aminoimidazolni obroč, ki je preko 2-aminopropenskega distančnika povezan s pirolnim ali dibromopirolnim obročem na drugi strani molekule. Cilj naloge bo tako načrtovanje in sinteza analogov oroidina in klatrodina ter njihovo biološko testiranje. Najprej se bomo lotili načrtovanja sintezne poti in nato še same sinteze potrebnih fragmentov. Nadaljevali bomo s poskusom dokončne konstrukcije potencialnih modulatorjev Nav kanalčkov in pridobljene spojine poslali na biološka testiranja. Razvili in sintetizirali bomo modulatorje z rigidnim 2-aminopirimidinskim distančnikom in jih analitsko ovrednotili. Pri načrtovanju potencialnih modulatorjev bomo posnemali strukturi klatrodina/oroidina, in sicer:

- imidazolni obroč klatrodina/oroidina bomo bioizosterno nadomestili z oksazolnim ali tiazolnim obročem,
- osrednji 2-aminopropenski distančnik v nativni strukturi klatrodina/oroidina bomo zamenjali z rigidnim 2-aminopirimidinskim fragmentom,
- pirolni obroč, prisoten v strukturi klatrodina/oroidina, bomo poskušali posnemati z različnimi aromatskimi in heteroaromatskimi fragmenti,
- poskušali bomo tudi pripraviti spojino, kjer bomo uporabili izvorni aminoimidazolni fragment na eni strani in posnemali pirolkarboksilni fragment oroidina z aminooksazolom ali aminotiazolom na drugi strani (**Slika 9**).



Slika 9: Uvedene spremembe na spojini vodnici

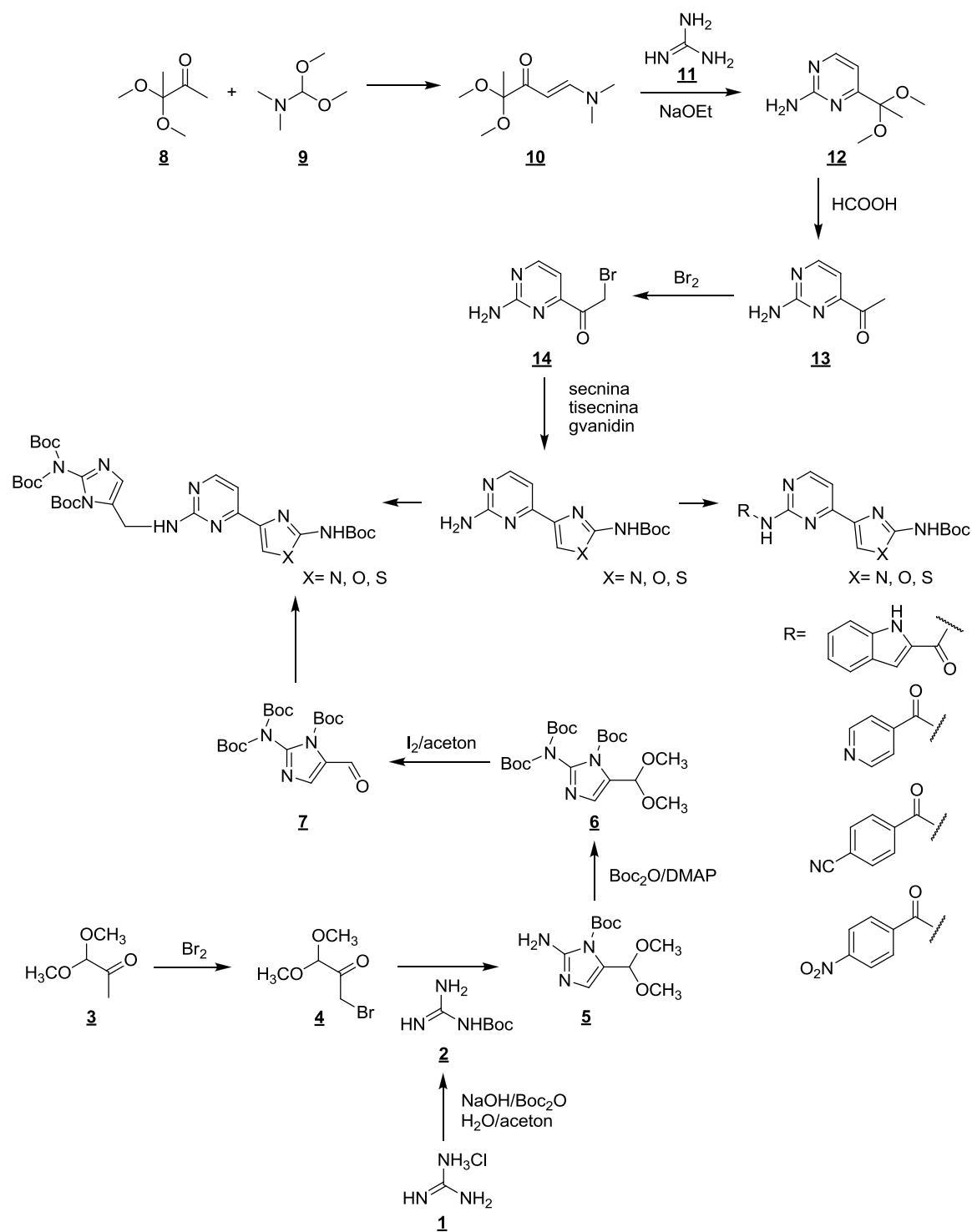
Najprej bomo poizkusili sintetizirati aromatski aldehyd *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**7**), ki ga bomo kasneje z reduktivnim aminiranjem pripeli na ključni aminopirimidinski fragment. Sinteza aromatskega aldehyda je sestavljenja iz petih stopenj. V prvi stopnji bomo amino skupino gvanidina zaščitili z (Boc)<sub>2</sub>O. Nato bo sledilo bromiranje 1,1-dimetoksiopropan-2-ona in tvorba  $\alpha$ -bromoketona 3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-ona (**4**), ki ga bomo uporabili v nadaljnji reakciji z Boc-gvanidinom. Nastal bo aminoimidazolni derivat *terc*-butil 2-amino-5-(dimetoksimetil)-1*H*-imidazol-1-karboksilat (**5**). Amino skupino tega derivata bomo zaščitili z (Boc)<sub>2</sub>O s pomočjo pomožnega nukleofila DMAP. Na koncu bo sledila odščita acetala in tvorba končnega produkta *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**7**).

Tvorba ključnega aminopirimidinskega fragmenta je prav tako sestavljenja iz petih stopenj. Najprej bomo sintetizirali 1-dimethylamino-4,4-dimetoksipent-1-en-3-on (**10**) iz

3,3-dimetoksibutan-2-ona in 1,1-dimetoksi-*N,N*-dimetilmelanamina. Ta skupaj z gvanidinom tvori aminopirimidinski derivat, ki ima vezano 1,1-dimetoksietylno skupino. To skupino bomo pretvorili do ketona z mravljično kislino. Nastal bo 4-acetyl-2-aminopirimidin (**13**), ki ga bomo bromirali in dodali sečnino, tiosečnino ali gvanidin z eno zaščiteno aminske skupino. Tako bodo nastali različni derivati aminopirimidina, ki bodo imeli vezan oksazolni, tiazolni ali imidazolni obroč. Na koncu bomo sintetizirane aminopirimidine poskusili derivatizirati z različnimi heterocikli do končnih spojin.

Ob uporabi izvornega aminoimidazolnega fragmenta za derivatizacijo aminopirimidinskega intermediata bo končno dejanje sinteze odstranitev Boc zaščite z amino skupine, pri čemer bomo pozorni na zaščitene in odščitene spojine, ki bodo biološko vrednotene.

Posamezne ključne stopnje sinteze bomo poskušali optimizirati in preizkusiti različne pogoje z namenom sinteze končnih spojin z najkrajšim časom, najboljšim izkoristkom in enostavnim procesom čiščenja in izolacije produkta. Strukturo produktov posameznih sinteznih stopenj bomo potrdili z NMR (nuklearno magnetno resonanco), MS (masno spektrometrijo), IR (infrardečo spektroskopijo) in določanjem temperature tališča.



Slika 10: Osnovna reakcijska shema

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

- **reagenti in topila**

Za sintezno delo v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Merck, Acros Organics, Sigma-Aldrich in Fluka.

- **aparature**

Standardna laboratorijska oprema: laboratorijska tehnica, rotavapor, UV lučka, magnetni mešalnik, električni grelnik, kalota, sušilnik za lase, hladilnik, avtomatske pipete, grelna pištola, aparatura za vakuumsko destilacijo.

- **programska oprema**

Sintetizirane spojine smo določali iz  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  spektrov s pomočjo programa MestReC proizvajalca Mestrelab Research. Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Kromatografske metode

- **tankoplastna kromatografija (TLC)**

S TLC smo spremljali potek reakcij in izolacijo želenega produkta. Uporabljali smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm. Pri tem smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene pri vsakem sinteznem postopku posebej. Spojine smo na kromatografskih ploščah detektirali z UV svetilko valovnih dolžin  $\lambda=254$  in  $\lambda=366$  nm ter orositvenim reagentom za amine – ninhidrinom.

- **kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za ločevanje in čiščenje produktov. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm.

### 3.2.2. Spektroskopske metode

- **nuklearna magnetna resonanca (NMR)**

NMR spektre smo posneli na spektrometu Bruker Avance III 400 z magnetom Bruker Ultrashield™ 400 PLUS na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v DMSO-d<sub>6</sub> ali CDCl<sub>3</sub>.

- **masna spektrometrija (MS)**

MS spektre so nam posneli na masnem spektrometu Q-TOF Premier z ESI metodo ionizacije na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **infrardeča spektroskopija (IR)**

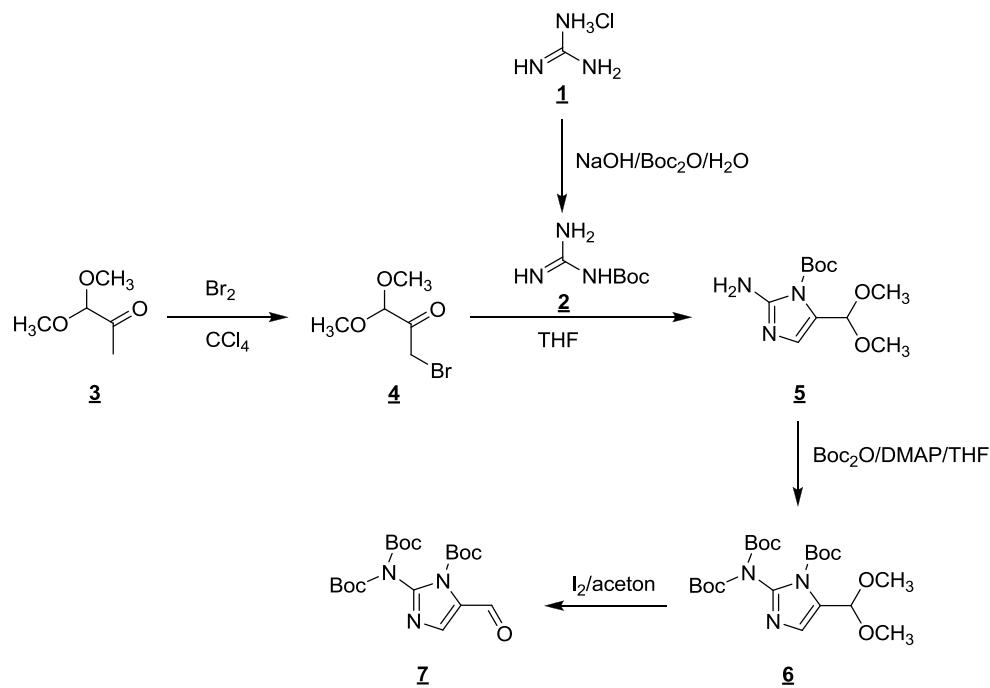
IR spektre smo posneli na spektrometu FTIR Nexus proizvajalca NICOLET na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

### 3.2.3. Tališče

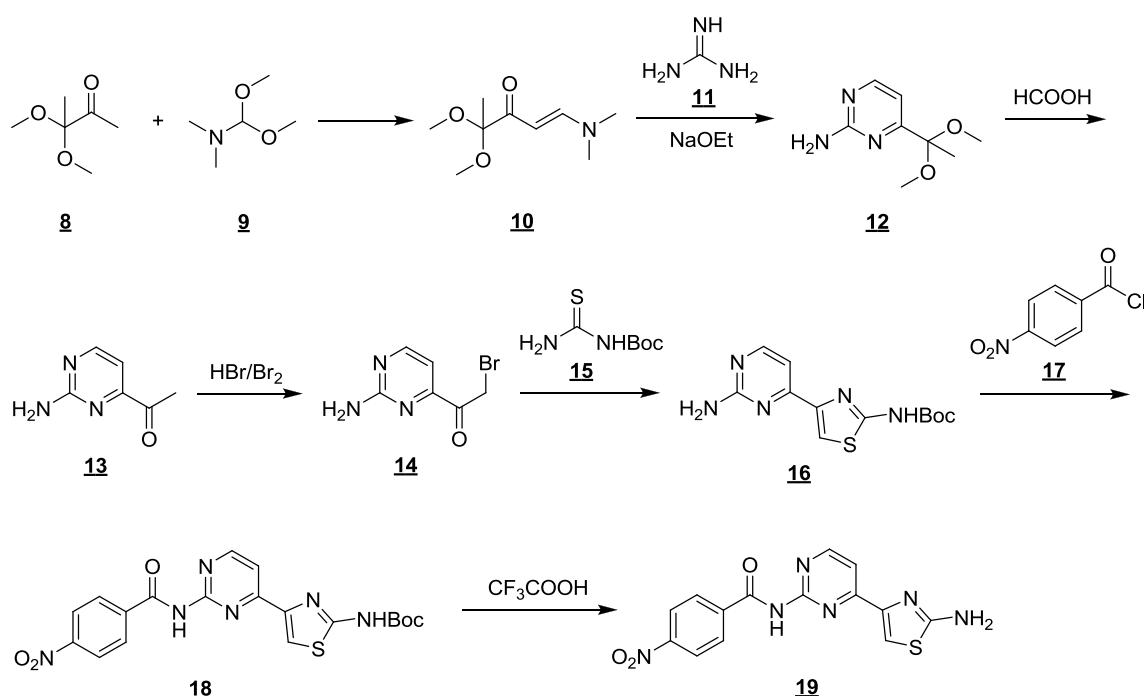
Temperaturo tališča smo spojinam določili s talilnim mikroskopom Leica z ogrevalno mizico. Temperature tališč niso korigirane.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. REAKCIJSKE SHEME



**Reakcijska shema 1:** Sinteza *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**7**)



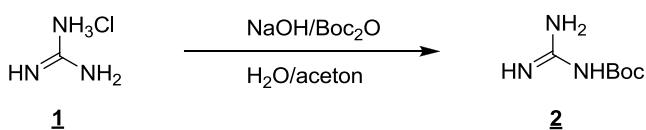
**Reakcijska shema 2:** Sinteza *N*-(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida (**19**)

## 4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

### 4.2.1. Sintezna pot *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**7**)

#### 4.2.1.1. Sinteza *N*-Boc-gvanidina (**2**)

##### Reakcija



##### Postopek

Raztopino (Boc)<sub>2</sub>O (1,14 g, 5,23 mmol) v acetonu (5 ml) smo pri -10 °C med mešanjem počasi dokapavali v raztopino natrijevega hidroksida (1,8 g, 44,3 mmol) in gvanidinovega klorida (2,5 g, 26,3 mmol) v zmesi vode (5 ml) in acetona (5 ml) ter pustili, da se reakcijska zmes med mešanjem čez noč počasi segreje do sobne temperature. Po poteku reakcije smo aceton odparili na rotavaporju, preostanek pa prenesli v lij ločnik in sprali z

diklorometanom ( $5 \times 10$  ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (10 ml). Organsko fazo smo sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odfiltrirali sušilno sredstvo in diklorometan odparili z rotavaporjem. Preostanek smo prelili z dietiletrom in pustili stati čez noč. Dobili smo 524 mg (3 mmol) belih kristalov. V vodni fazi je tudi nastala oborina, ki smo jo odfiltrirali, prelili z dietiletrom in pustili čez noč. NMR analiza je pokazala, da gre za isto spojino, kot smo jo dobili iz matičnice. Dobili smo še 300 mg (2 mmol) belih kristalov. Produkte smo združili in dobili 824 mg (5 mmol) produkta.

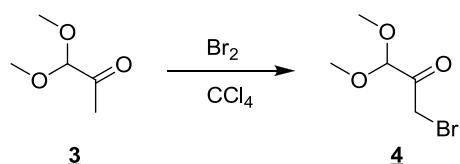
## Rezultati

Spojina je bila že sintetizirana (lit. 47).

<b>Izgled:</b>	beli kristali
<b>Mr:</b>	159,19
<b>η:</b>	99 %
<b>Rf:</b>	0,10 (diklorometan/MeOH=7/1)
<b>Tt:</b>	133–135 °C
<b>IR (ATR):</b>	$\bar{\nu} [\text{cm}^{-1}]$ : 3310, 2975, 2160, 1640, 1579, 1532, 1448, 1389, 1364, 1306, 1249, 1157, 1062, 971, 950, 875, 805

### 4.2.1.2. Sinteza 3-bromo-1,1-dimetoksipropan-2-on (4)

#### Reakcija



#### Postopek

2 l bučo smo pokrili z gumijastim zamaškom, jo prepahali z argonom in dodali tetraklorometan (800 ml). Z injekcijsko brizgo smo vanjo prenesli 1,1-dimetoksipropan-2-on (200 ml, 1,7 mol) in postavili na led za približno 10 min. Skozi gumijasti zamašek smo nato dodali še brom (87,2 ml, 1,7 mol) in pustili mešati v argonovi atmosferi pri sobni temperaturi čez noč. Po končani reakciji smo v reakcijsko zmes dodali natrijev

hidrogenkarbonat in pustili stati 20 min. Vsebino bučke smo prenesli v lij ločnik in sprali z vodo (2 x 100 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 x 100 ml). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in skoncentrirali produkt. Dobili smo 202 g (1 mol) svetlo rumenega olja, ki smo ga očistili z vakuumsko destilacijo.

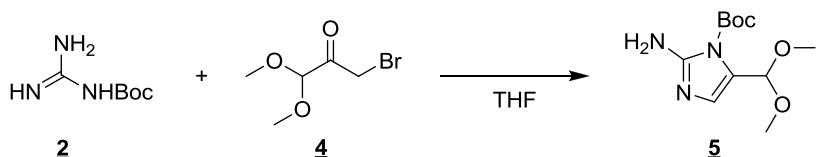
## Rezultati

Spojina je bila že sintetizirana (lit. 48).

Izgled:	svetlo rumeno olje
Mr:	197,03
η:	60 %
Rf:	0,33 (heksan/EtOAc=3/1)

### 4.2.1.3. Sinteza *terc*-butil 2-amino-5-(dimetoksimetil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata (5)

#### Reakcija



#### Postopek

Raztopino Boc-gvanidina (5 g, 32 mmol) v tetrahidrofuranu (THF, 50 ml) smo prepihali z argonom in jo ohladili na ledu. Z injekcijsko brizgo smo vanjo skozi gumijasti zamašek počasi kapljali spojino **4** (2g, 11 mmol), ki smo jo predhodno raztopili v THF (50 ml) in pustili mešati v argonovi atmosferi pri sobni temperaturi dva dni. Postopek izolacije smo poskušali optimizirati na dva načina, in sicer: najprej smo polovico reakcijske zmesi razredčili z etilacetatom (100 ml) in jo dvakrat sprali z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata. Po drugem spiranju se nam je izborila nečistoča, ki smo jo odfiltrirali. Preostanek smo sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in z rotavaporjem odparili topilo. Pri drugem postopku pa smo THF neposredno odparili z rotavaporjem. Oba preostanka smo prelili z dietiletrom in počakali, da je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da gre za isti spojini in zato smo obe oborini združili ter izvedli ločevanje s kolonsko kromatografijo. Tudi matičnici

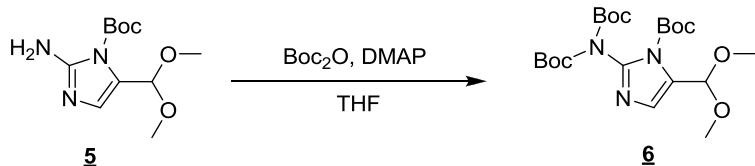
obeh polovic smo združili in topilo odparili z rotavaporjem. Tudi tu smo izvedli kolonsko kromatografijo. Frakcije s čistim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 340 mg (1 mmol) oranžno-rjave oborine. Za ponovno sintezo večjih količin produkta pa smo uporabili enostavnnejši postopek izolacije s spiranjem z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata, čemur je sledila kolonska kromatografija.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	oranžno-rjava oborina
<b>Mr:</b>	257,29
<b>η:</b>	12 %
<b>Rf:</b>	0,12 (EtOAc + 1 % TEA (trietilamin))
<b>Tt:</b>	136–138 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,58 (s, 9H, Boc), 3,35 (s, 6H, 2 × CH <sub>3</sub> O), 5,27 (s, 1H, CH), 6,07 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6,83 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> )
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b>	δ [ppm]: 28,08; 52,76; 85,18; 99,41; 109,43; 135,59; 149,47; 150,74
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3240, 3180, 3110, 2980, 2950, 2886, 2828, 1735, 1631, 1452, 1385, 1336, 1274, 1249, 1153, 1112, 1054, 978, 907, 843, 765, 711
<b>MS:</b>	258,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	258,1460 (izračunana 258,1454)

### 4.2.1.4. Sinteza *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-(dimetoksimetil)-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**6**)

#### Reakcija



#### Postopek

Spojino **5** (26 g, 102 mmol) smo raztopili v THF (400 ml) in dodali 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,2 g). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in ohladili na ledu ter skozi gumijasti zamašek po kapljicah dodajali raztopino (Boc)<sub>2</sub>O (54 g, 245 mmol) v THF

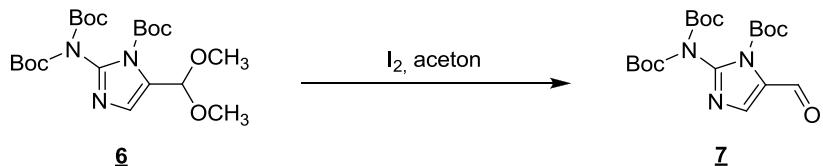
(100 ml) in raztopino pustili mešati čez noč. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom in spojino čistili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze heksan/EtOAc=1/1 + 1 % TEA. Frakcije s čistim produktom smo združili in odparili topilo na rotavaporju. Dobili smo 36 g (79 mmol) svetlo rumenih kristalov.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	svetlo rumeni kristali
<b>Mr:</b>	457,52
<b>η:</b>	77,5 %
<b>Rf:</b>	0,3 (heksan/EtOAc=1/1 + 1 % TEA)
<b>Tt:</b>	112–116 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,34 (s, 18H, 2 × Boc), 1,53 (s, 9H, Boc), 3,20 (s, 6H, CH <sub>3</sub> O), 5,36 (s, 1H, CH), 7,42 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> )
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 27,24; 27,38; 51,69; 83,24; 86,29; 97,85; 116,77; 136,43; 137,54; 145,88; 148,74
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3166, 3138, 2977, 2942, 2834, 1745, 1724, 1538, 1456, 1361, 1318, 1249, 1211, 1146, 1109, 1058, 1022, 985, 908, 872, 842, 816, 768
<b>MS:</b>	458,2 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	258,2502 (izračunana 258,2502)

### 4.2.1.5. Sinteza *terc*-butil 2-((di-*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilata (**7**)

#### Reakcija



#### Postopek

V raztopino spojine **6** (10,5 g, 22,9 mmol) v acetonu (10 ml) smo postopoma po kapljicah dodajali jod (1 g, 4 mmol), ki smo ga predhodno raztopili v acetonu (10 ml). Po 4 urah smo reakcijski zmesi dodali 5% raztopino natrijevega tiosulfata. Vse smo prenesli v lij ličnik in vodno fazo sprali z etilacetatom (3 x 20 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno

raztopino NaCl in jih sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ko smo odfiltrirali sušilno sredstvo, smo etilacetat uparili na rotavaporju in nato surovi produkt čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo heksan/EtOAc=1/1. Frakcije s čistim produkтом smo združili in topilo odparili na rotavaporju in dobili 4,3g (10,5 mmol) oranžnih kristalov.

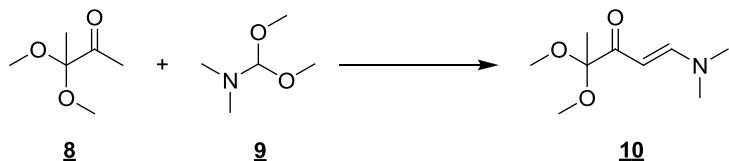
## Rezultati

<b>Izgled:</b>	oranžni kristali
<b>Mr:</b>	411,45
<b>η:</b>	46 %
<b>Rf:</b>	0,41 (heksan/EtOAc=2/1)
<b>Tt:</b>	98–100 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,37 (s, 18H, 2 × Boc), 1,56 (s, 9H, Boc), 8,52 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> ), 9,77 (s, 1H, CHO)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 27,36; 31,30; 83,93; 87,76; 127,75; 137,66; 139,12; 145,39; 148,62; 184,85
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3142, 2980, 2935, 1751, 1726, 1688, 1545, 1457, 1399, 1349, 1313, 1277, 1248, 1209, 1146, 1112, 1017, 991, 873, 845, 768, 734
<b>MS:</b>	412,2 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	412,2076 (izračunana 412,2084)

### 4.2.2. Sintezna pot *N*-(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida (**19**)

#### 4.2.2.1. Sinteza 1-dimetilamino-4,4-dimetoksipent-1-en-3-ona (**10**)

##### Reakcija



## Postopek

3,3-dimetoksibutan-2-on (6 g, 45 mmol) in 1,1-dimetoksi-*N,N*-dimetilmetanamina (6 ml, 45 mmol) smo segrevali pri 110 °C v argonovi atmosferi. Po 26 urah je nastala oranžna tekočina. Med reakcijo je nastal metanol, ki smo ga na koncu odparili na rotavaporju. Za čiščenje produkta smo uporabili vakuumsko destilacijo, pri čemer je končna spojina začela

destilirati pri 170 °C in je destilirala do temperature 186 °C. Dobili smo 7 g (38 mmol) rumene oljne tekočine, ki smo jo shranili v hladilniku, kjer so nastali rumeni kristali.

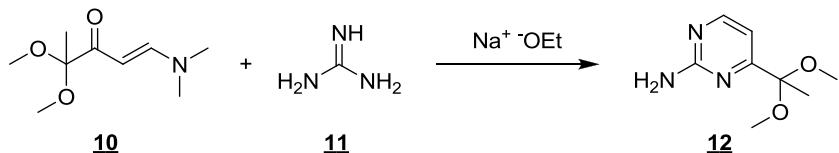
## Rezultati

Spojina je bila že sintetizirana (lit. 49).

<b>Izgled:</b>	rumeni kristali
<b>Mr:</b>	187,24
<b>η:</b>	83 %
<b>Rf:</b>	0,62 (DKM/MeOH=7/1)
<b>Tt:</b>	57–59 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,22 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2,78 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,08 (s, 9H, CH <sub>3</sub> , 2 × OCH <sub>3</sub> ), 5,39 (d, 1H, J = 12,63, CH), 7,56 (d, 1H, J = 12,64, CH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 20,77; 36,96; 44,41; 90,25; 101,78; 154,01; 191,91
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 2945, 2833, 1648, 1544, 1486, 1443, 1412, 1355, 1279, 1257, 1216, 1181, 1135, 1113, 1075, 1041, 1007, 923, 881, 860, 786, 664

### 4.2.2.2. Sinteza 4-(1,1-dimetoksietil)pirimidin-2-amina (12)

#### Reakcija



#### Postopek

V prežarjeno bučko, ki smo jo prepigli z argonom, smo nalili absolutni etanol (225 ml) in jo opremili z vodnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko. V etanol smo počasi in previdno dodali natrij (1,8 mg, 77 mmol), ki smo ga predhodno narezali na majhne koščke in ga natehtali v čašo s toluenom. Ker se nam je reakcijska zmes začela segrevati, smo jo ohlajali na ledeni kopeli, dokler se natrij ni ves raztopil. Ko smo nato dodali gvanidin (7,4 g, 77 mmol), je nastala motna bela raztopina. Po 10 minutah smo dodali še spojino **10** (14,6 g, 77 mmol) in vsebino segrevali pri temperaturi refluksa 23 ur. Reakcijsko zmes smo nato ohladili na ledu, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali z absolutnim etanolom (2 x 7 ml). Dobili smo 7,8 g (42,6 mmol)

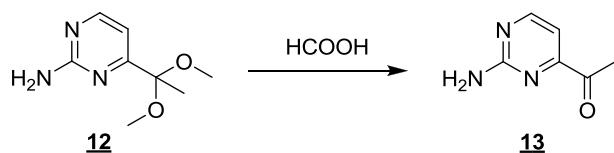
belo-rumenih igličastih kristalov. Matičnico smo na rotavaporju uparili do suhega in preostanek prelili z vročim etilacetatom. Tvorila se je oborina, ki smo jo takoj odfiltrirali, saj je šlo za nečistoče. Matičnico smo najprej ohladili na sobno temperaturo in še dodatno na ledu do 0 °C. Ponovno so izpadli kristali, ki smo jih odfiltrirali in sprali z etilacetatom. Dobili smo 5,6 g (30,6 mmol) belo-rumenih igličastih kristalov. NMR analiza obeh spojin je pokazala, da gre za enak produkt. Tako smo skupno dobili 13,4 g (73,2 mmol) belo-rumenih igličastih kristalov.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	belo-rumeni igličasti kristali
<b>Mr:</b>	183,10
<b>η:</b>	95 %
<b>Rf:</b>	0,36 (EtOAc)
<b>Tt:</b>	154–156 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,44 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3,07 (s, 6H, 2 × OCH <sub>3</sub> ), 6,68 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6,72 (d, 1H, J = 5,02, CH <sub>Ar</sub> ), 8,24 (d, 1H, J = 5,02, CH <sub>Ar</sub> )
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 22,81; 48,63; 100,61; 107,09; 158,75; 163,74; 168,83
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3312, 3189, 2942, 2841, 1636, 1564, 1480, 1434, 1366, 1347, 1293, 1215, 1197, 1169, 1142, 1106, 1036, 999, 880, 853, 817, 722, 650
<b>MS:</b>	184,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	184,1085 (izračunana 184,1086)

### 4.2.2.3. Sinteza 4-acetyl-2-aminopirimidina (13)

#### Reakcija



#### Postopek

Spojino 12 (1 g, 5 mmol) smo prelili z vodo (3 ml) in dodali mravljično kislino (30 ml, 800 mol) ter segrevali 1 uro pri 40 °C. Po končani reakciji smo mravljično kislino uparili pod znižanim tlakom in preostanek prelili z absolutnim etanolom (5 ml), ki smo ga

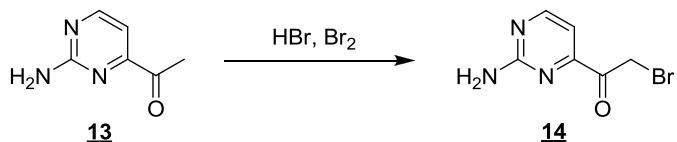
predhodno ohladili na 0 °C. Tvorila se je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali z absolutnim etanolom. Dobili smo 750 mg (5 mmol) belih kristalov.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	beli kristali
<b>Mr:</b>	137,17
<b>η:</b>	99 %
<b>Rf:</b>	0,64 (EtOAc + 1% TEA)
<b>Tt:</b>	147–149 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 2,52 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 6,93 (d, 1H, J = 4,86, CH <sub>Ar</sub> ), 6,97 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 8,47 (d, 1H, J = 4,86, CH <sub>Ar</sub> )
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 25,43; 106,14; 159,78; 160,46; 163,88; 200,00
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3460, 3336, 3165, 1706, 1633, 1558, 1469, 1351, 1288, 1264, 1201, 1172, 1119, 1021, 1001, 979
<b>MS:</b>	138,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	138,0668 (izračunana 138,0667)

### 4.2.2.4. Sinteza 2-amino-4-bromoacetilpirimidina (**14**)

#### Reakcija



#### Postopek

Najprej smo pripravili sol spojine **13** s HBr. To smo izvedli tako, da smo spojino **13** (500 mg, 3,6 mmol) raztopili v vročem etilacetatu (5 ml) in dodali HBr (500 µl, 4,3 mmol) ter počakali, da je izpadla oborina. Po filtraciji le-te smo dobili 753 mg (3,5 mmol) soli spojine **13** s HBr, ki smo jo prelili z ocetno kislino (3 ml) in ponovno dodali HBr (400 µl, 3,6 mmol). Bučko smo pokrili z gumijastim zamaškom in nanj namestili balon z argonom. Po 30 min mešanja smo reakcijski zmesi dodali brom (200 µl), ki smo ga predhodno dispergirali v ocetni kislini (200 µl). Reakcijsko zmes smo 1 uro segrevali pri 60 °C, jo ohladili na sobno temperaturo in prelili z etilacetatom (3 ml). Tvorila se je oborina, ki smo

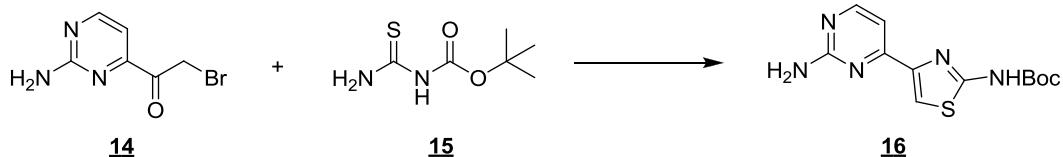
jo odfiltrirali in dobili 900 mg (3 mmol) hidrobromidne soli spojine **14**. Sol smo nevtralizirali z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata in dobili 625 mg (3 mmol) spojine **14**.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	oranžni kristali
<b>Mr:</b>	216,04
<b>η:</b>	80 %
<b>Rf:</b>	0,72 (EtOAc + 1% TEA)
<b>Tt:</b>	> 340 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	$\delta$ [ppm]: 4,89 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,00 (d, 1H, J = 4,85, CH <sub>Ar</sub> ), 7,06 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 8,51 (d, 1H, J = 4,85, CH <sub>Ar</sub> )
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	$\delta$ [ppm]: 27,85; 123,47; 129,63; 147,11; 159,34; 203,56
<b>IR (ATR):</b>	$\bar{v}$ [cm <sup>-1</sup> ]: 3202, 3140, 3074, 2695, 2360, 2339, 1730, 1653, 1621, 1595, 1524, 1459, 1371, 1288, 1221, 1127, 1000, 983, 929, 893, 823, 769, 702
<b>MS:</b>	216,0 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	215,9772 (izračunana 215,9772)

### 4.2.2.5. Sinteza *terc*-butil 4-(2-aminopirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamata (**16**)

#### Reakcija



#### Postopek

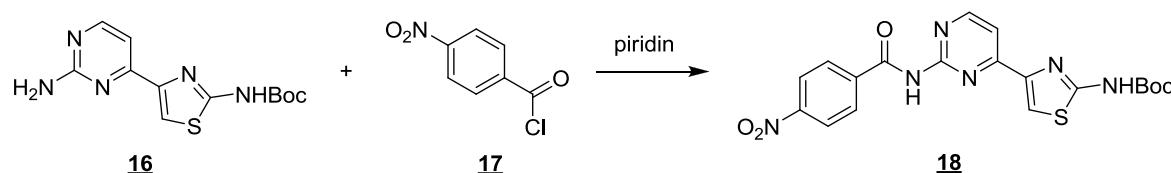
Spojino **14** (166 mg, 0,8 mmol) smo raztopili v absolutnem etanolu (10 ml), bučko pokrili z gumijastim zamaškom in nanj namestili balon z argonom. Dodali smo Boc-tiosečnino (122,3 mg, 0,8 mmol) in reakcijsko zmes mešali na oljni kopeli pri temperaturi refluksa 1,5 ure. Po končani reakciji smo etanol odparili na rotavaporju, preostanek pa prelili z etilacetatom. Izpadli so kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Dobili smo 225 mg (0,8 mmol) rjavih kristalov.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	rjavi kristali
<b>Mr:</b>	293,34
<b>η:</b>	100 %
<b>Rf:</b>	0,40 (DKM/MeOH=5/1)
<b>Tt:</b>	171–173 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,49 (s, 9H, Boc), 6,61(s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7,03 (d, 1H, J = 4,70, CH <sub>Ar</sub> ), 7,78 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> ), 8,31 (d, 1H, J = 4,79, CH <sub>Ar</sub> ), 11,67 (s, 1H, CONH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 27,82; 81,76; 106,13; 120,74; 145,70; 149,30; 153,01; 155,70; 160,79; 164,40
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3863, 2552, 2160, 2031, 1712, 1666, 1603, 1546, 1494, 1458, 1368, 1343, 1241, 1152, 1071, 965, 871, 833, 797, 754, 681
<b>MS:</b>	294,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	294,1019 (izračunana 294,1025)

### 4.2.2.6. Sinteza terc-butil 4-(2-(4-nitrobenzamido)pirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamata (**18**)

#### Reakcija



#### Postopek

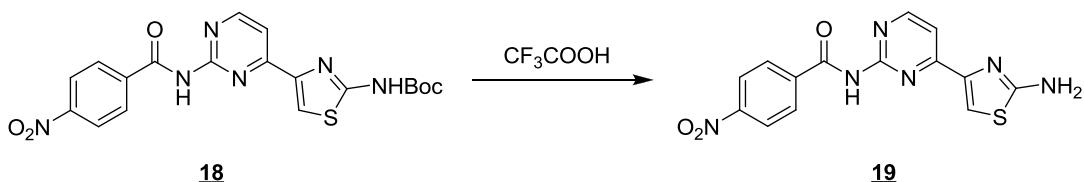
Na bučko z raztopino spojine **16** (100 mg, 0,3 mmol) v piridinu (4 ml) smo namestili gumijasti zamašek in skozenj balon z argonom. Postopoma smo dodajali spojino **17** (63 mg, 0,3 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 1 uro. Piridin smo uparili pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v diklorometanu (5 ml). Vse smo prelili v ljiljan in sprali 1 M HCl (1 x 5 ml in 1 x 10 ml). Diklorometan smo uparili na rotavaporju in dobili 87 mg oranžno-rdečih kristalov. Spojino smo čistili s kolonsko kromatografijo in kot mobilno fazo uporabili EtoAc/heksan=1/1 + 1% TEA. Frakcije s čisto spojino smo združili in odparili topilo na rotavaporju, kjer smo dobili 28 mg (0,06 mmol) belih kristalov.

## Rezultati

<b>Izgled:</b>	beli kristali
<b>Mr:</b>	442,45
<b>η:</b>	19 %
<b>Rf:</b>	0,07 (EtoAc/heksan=1/1 + 1% TEA)
<b>Tt:</b>	182–184 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 1,50 (s, 9H, Boc), 7,62 (d, 1H, J = 5,18, CH <sub>Ar</sub> ), 7,89 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> ), 8,16 (d, 2H, J = 8,86, 2 × CH <sub>Ar</sub> ), 8,34 (d, 2H, J = 8,67, 2 × CH <sub>Ar</sub> ), 8,80 (d, 1H, J = 5,12, CH <sub>Ar</sub> ), 11,41 (s, 1H, CONH), 11,78 (s, 1H, CONH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 27,89; 81,54; 115,80; 123,51; 129,68; 140,30; 147,16; 150,84; 159,38; 160,00; 162,60; 180,32
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3271, 2924, 2534, 2160, 2025, 1703, 1605, 1527, 1491, 1414, 1347, 1258, 1218, 1159, 1108, 1062, 1016, 997, 840, 823, 754, 704, 651
<b>MS:</b>	443,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	443,1133 (izračunana 443,1138)

### 4.2.2.7. Sinteza N-(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida (**19**)

#### Reakcija



#### Postopek

Na bučko z raztopino spojine **18** (27 mg, 0,06 mmol) v diklorometanu (500 µl) smo namestili gumijasti zamašek in z injekcijsko brizgo dodali trifluorocetno kislino (500 µl, 7 mmol). Raztopino smo v argonovi atmosferi mešali 3 ure pri sobni temperaturi. Diklorometan in trifluorocetno kislino smo uparili na rotavaporju in preostanek prelili s trietylaminom (1 ml), ki smo ga nato uparili na rotavaporju. Postopek s trietylaminom smo ponovili še enkrat. Preostanek smo raztopili v diklorometanu (10 ml) in sprali z vodo (1 x 5 ml) in NaCl (1 x 5 ml). Organsko fazo smo nučali skozi past z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparili na rotavaporju. Dobili smo 12 mg (0,04 mmol) svetlo rumenih kristalov.

**Rezultati**

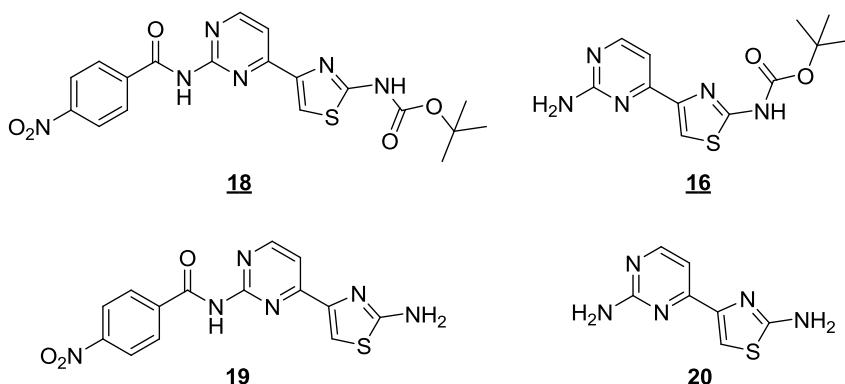
<b>Izgled:</b>	Svetlo rumeni kristali
<b>Mr:</b>	342,33
<b>η:</b>	57 %
<b>Rf:</b>	0,06 (DKM/MeOH=10/1)
<b>Tt:</b>	222–224 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b>	
<b>(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 7,27 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7,38 (s, 1H, CH <sub>Ar</sub> ), 7,52 (d, 1H, J = 5,11 CH <sub>Ar</sub> ), 8,15 (d, 2H, J = 9,01, 2 × CH <sub>Ar</sub> ), 8,34 (d, 2H, J = 1,53, 2 × CH <sub>Ar</sub> ), 8,74 (d, 1H, J = 5,13, CH <sub>Ar</sub> ), 11,33 (s, 1H, CONH)
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	
<b>(100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b>	δ [ppm]: 82,78; 84,40; 96,36; 105,86; 123,55; 124,75; 141,85; 143,54; 144,95; 166,22; 171,67; 188,39
<b>IR (ATR):</b>	ν [cm <sup>-1</sup> ]: 3852, 3837, 3734, 3709, 3674, 3647, 3627, 3565, 3324, 2916, 2320, 2193, 2158, 2070, 2045, 2012, 1981, 1963, 1949, 1697, 1589, 1524, 1488, 1435, 1348, 1262, 1110, 1059, 1014, 851, 717, 673, 640
<b>MS:</b>	343,1 (MH) <sup>+</sup>
<b>HRMS:</b>	343,0617 (izračunana 343,0613)

## 5. RAZPRAVA

Naš načrt je bil konvergentna sinteza z uporabo sintetiziranih fragmentov ter derivatizacija 4-(2-aminopirimidin-4-il)tiazol-2-ama (**20**), vendar pa zaradi neustreznega poteka reakcij in časovne omejitve vseh zastavljenih ciljev nismo uresničili.

Izvedli in optimizirali smo dve sintezi fragmentov, ki bodo uporabljeni za nadaljnje raziskave, in sicer aminoimidazolnega in aminopirimidinskega fragmenta. Sinteza aminoimidazolnega fragmenta se je izkazala za zelo zahtevno, vendar pa smo uspeli razviti pogoje, ob katerih smo uspešno sintetizirali načrtovani trojno Boc zaščiteni aminoimidazolni sinton **7**. Prav tako je bila zahtevna tudi sinteza aminopirimidinskega sintona **16**, ki predstavlja heteroaromatsko rigidno strukturo z možnostjo substitucije na obeh straneh. Sintetizirani heteroaromatski skelet je prav tako primeren za nadaljnji razvoj modulatorjev ionskih kanalčkov.

Poleg uspešno izvedene sinteze dveh ključnih fragmentov smo sintetizirali tudi dve končni načrtovani spojini, in sicer z Boc zaščiteno spojino **18** ter odščiteno spojino **19**, ki smo ju poslali na testiranje na natrijevih in kalijevih kanalčkih. Na testiranja pa smo poleg omenjenih spojin poslali tudi spojini **16** in **20**.



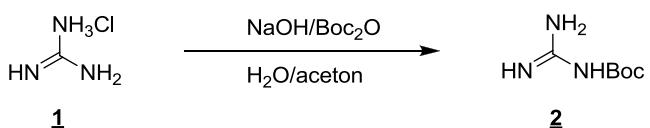
Slika 11: Učinkovine, poslane na testiranje

Vloga celotnega dela leži v dveh izvedenih in optimiziranih sintezah fragmentov, ki bodo nedvomno pripomogle k razvoju morebitnih analogov klatrodina/oroidina kot potencialnih inhibitorjev napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov.

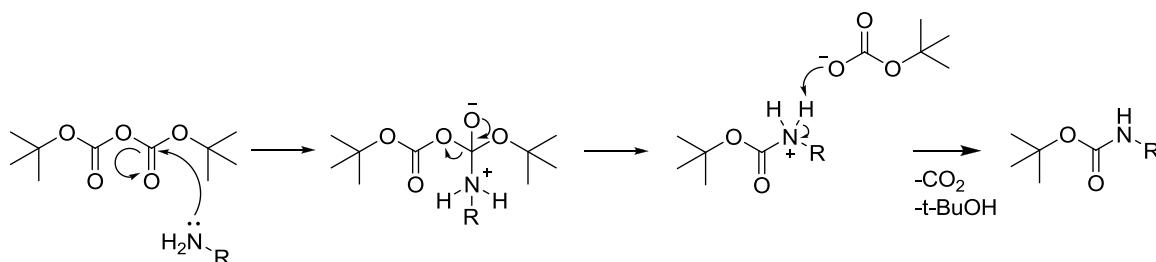
### 5.1. Sintezna pot *terc*-butil 2-((*terc*-butoksikarbonil)amino)-5-formil-1*H*-imidazol-1-karboksilata (7)

### **5.1.1. Uvedba Boc zaštitne skupine na gvanidin**

## Reakcija:



Z uporabo NaOH smo gvanidinijev klorid pretvorili do prostih oblik in s tem povečali njegovo reaktivnost. Ker je gvanidin dobro topen v vodi,  $(Boc)_2O$  pa v organskih topilih, smo kot primerno topilo za oba reagenta uporabili zmes vode in acetona. Reakcijsko zmes smo ohladili na približno  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  in vanjo počasi po kapljicah dodajali  $(Boc)_2O$ , ki smo ga predhodno raztopili v acetonu. Z ohladitvijo reakcijske zmesi smo omejili obseg hidrolize Boc-anhidrida in nastajanja di-Boc-gvanidina. Reakcija je potekala čez noč po mehanizmu nukleofilne substitucije preko tetraedričnega mehanizma. Primarna aminska skupina gvanidina je s svojim prostim elektronskim parom dober nukleofil, ki neposredno napade C atom karbonilne skupine Boc-anhidrida. Med njima pride do tvorbe vezi, pri čemer izstopita *terc*-butilni alkohol in  $\text{CO}_2$  (**Slika 12**).

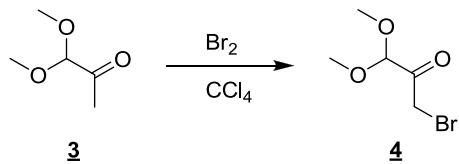


**Slika 12:** Mehanizem zaštite aminskih skupina z  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (50)

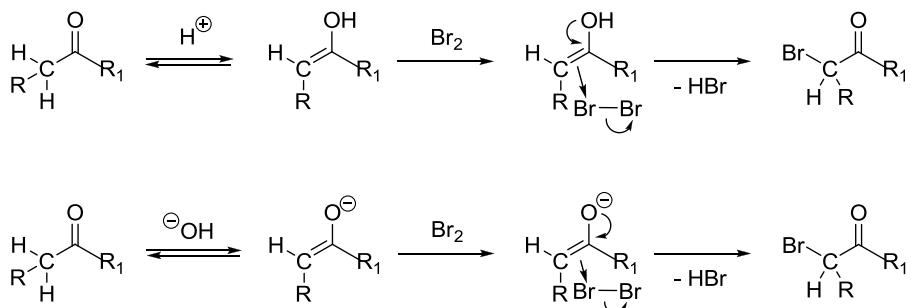
Predvidevali smo, da je med reakcijo nastal tudi gvanidin, ki ima zaščiteni dve amino skupini. Preostanek smo zato prelili z dietiletrom in se znebili tega stranskega produkta. Naš želeni produkt v dietiletru ni topen in se je zato izboril.

### 5.1.2. Bromiranje karbonilne spojine na $\alpha$ -keto mestu

**Reakcija:**



Bromiranje je potekalo na  $\alpha$ -ogljikovem atomu poleg karbonilne skupine, ki ima prisoten vsaj en vodikov atom. Mehanizem reakcije je elektrofilna adicija na alkene, saj ta poteče na enolni tautomerni oblici metilketona. Ravnotežje med ketonsko in enolno tautomerno obliko je sicer pomaknjeno v smer keto-oblike, saj je enolna oblika manj stabilna in posledično nastaja le v sledovih. Ker pa je slednja oblika bolj reaktivna, reagira prej in poruši ravnotežje med obema tautomernima oblikama. Da se le-to ponovno vzpostavi, se mora del ketonske oblike pretvoriti v enolno, ki ponovno reagira. Hitrost bromiranja je tako odvisna od prehoda ketonske v enolno tautomerno obliko (enolizacija). Keto-enol tautomerija je lahko bazično ali kislinsko pogojena (**Slika 13**). V prisotnosti kisline se atom karbonilnega kisika protonira. Prisotnost baze pa povzroči deprotoniranje rahlo kislega  $\alpha$ -vodikovega atoma ob karbonilni skupini. Tako se tvorita enol in enolatni ion, ki lahko reagirata z elektrofilom, da nastane  $\alpha$ -substituirana karbonilna spojina. V reakcijski zmesi je tako nastala enolna oblika spojine **3**, ki je reagirala z bromom do nastanka končne spojine **4**. Zaradi eksotermnosti smo reakcijsko zmes ohladili in s tem omogočili kontroliran potek reakcije in zmanjšan potek morebitnih stranskih reakcij.

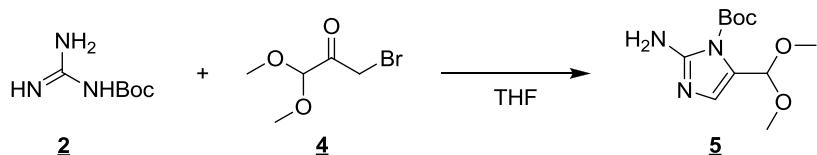


**Slika 13: S kislini in bazo katalizirano bromiranje (51)**

Po končani reakciji smo z natrijevim hidrogenkarbonatom nevtralizirali med reakcijo nastajajočo HBr.

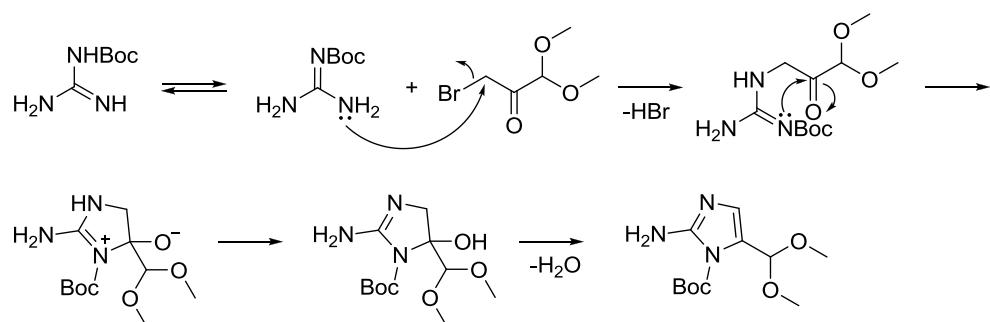
### 5.1.3. Sinteza spojine z imidazolnim obročem

**Reakcija:**



Kot primerno topilo za oba reaktanta smo uporabili THF. Reakcijo smo imeli ves čas v argonovi atmosferi, saj pri reakciji nastaja voda, zato bi dodatna voda iz okolja upočasnila ciklizacijo. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledu in s tem usmerili reakcijo do selektivnega nastanka imidazola, saj s tem predvidoma zmanjšamo obseg nastanka stranskih reakcij.

Reakcija je potekala po mehanizmu ciklokondenzacije Boc-gvanidina z  $\alpha$ -bromoketonom. Najprej je potekla nukleofilna substitucija na C atomu  $\alpha$ -bromoketona. Prosta primarna amino skupina v Boc-gvanidinu je reagirala kot nukleofil in napadla primarni C atom  $\alpha$ -bromoketona. Ta je dober elektrofil zaradi vezanega broma in dimetilacetalne skupine, ki imata negativni induktivni efekt. Pri reakciji izstopajo bromidni ioni, ki veljajo za dobro izstopajočo skupino. V naslednji stopnji pa je potekla nukleofilna adicija Boc zaščitene amino skupine na karbonilno skupino spojine 4, čemur je sledila eliminacija vode (Slika 14).



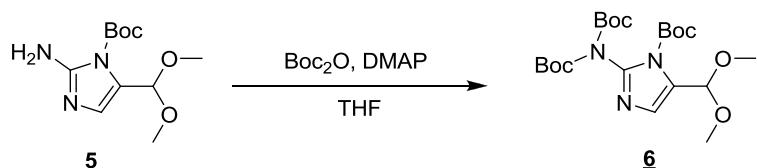
Slika 14: Mehanizem tvorbe imidazola

Po poteku reakcije smo poskušali optimizirati postopek izolacije z uporabo različnih metod. Najprej smo reakcijsko zmes spirali z nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata. Organski fazi smo po spiranju dodali sušilno sredstvo in produkt skoncentrirali do suhega preostanka. Ostanek smo prelili z dietiletrom in odfiltrirali

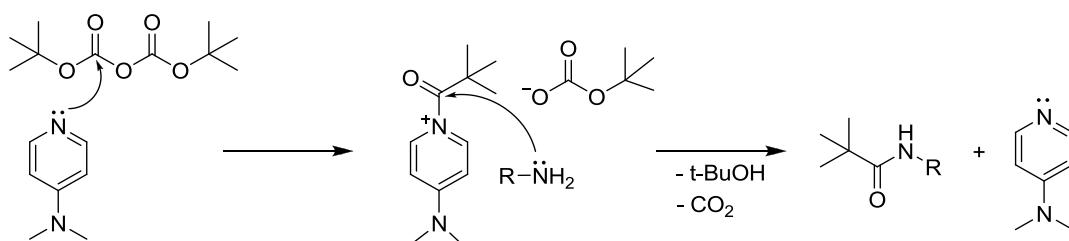
oborino. Ustreznost postopka izolacije smo preverili s tankoplastno kromatografijo. Opazili smo, da se ta postopek ni izkazal za najboljšega, saj končna spojina vsebuje še kar nekaj primesi. Pri drugem postopku pa smo THF neposredno odparili z rotavaporjem. Tudi tu smo preostanek prelili z dietiletrom in počakali, da je izpadla oborina. S tankoplastno kromatografijo smo preverili ustreznost postopka, vendar smo na koncu ugotovili, da tudi ta ne daje želenih rezultatov. Oba produkta smo tako združili in naredili kolonsko kromatografijo. Za nadaljnjo sintezo smo zaradi lažje izvedbe izbrali metodo spiranja z nasičeno raztopino natrijeva hidrogenkarbonata, čemur je sledila kolonska kromatografija.

#### 5.1.4. Uvedba Boc zaščitne skupine s pomočjo pomožnega nukleofila

**Reakcija:**



DMAP deluje kot nukleofilni katalizator pri sintezi estrov in amidov. Je piridinski derivat z visoko nukleofilnostjo, saj ima v aromatskem obroču prisoten dušikov atom s prostim elektronским parom. Je visoko toksičen in se lahko absorbira skozi kožo (52), zato smo morali pri izvajanju reakcije vseskozi uporabljati rokavice. Katalitično delovanje DMAP je torej povezano s prostim elektronskim parom, ki se nahaja na aromatskem dušikovem atomu. Le-ta reagira kot nukleofil, ki napade C atom karbonilne skupine Boc-anhidrida. Pri tem nastane *N*-acil-4-dimetilaminopiridinijeva sol, ki je močno reaktivna. Protion je v našem primeru *terc*-butil karbonatni ion, ki razpade na *terc*-butilni alkohol in CO<sub>2</sub>. Ogljikov atom, na katerem je vezan DMAP, je močan elektrofil, ki ga napade nezaščitena aminska skupina spojine **5**. Med njima se tvori vez in pride do izstopa DMAP, ki ponovno reagira z Boc-anhidridom.

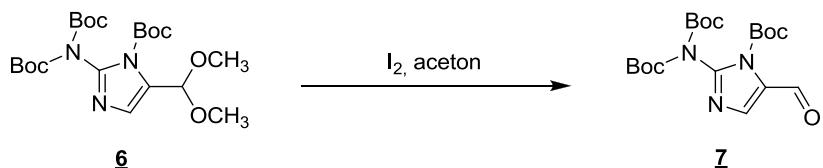


Slika 15: Mehanizem katalitičnega delovanja DMAP (52)

Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom in spojino čistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico heksana in etilacetata, ki smo ji dodali 1 % TEA. Da bi uspeli zbrati ustrezne frakcije, ki bi vsebovale našo čisto spojino, smo uporabili mobilno fazo etilacetat:heksan. Naša spojina je namreč v tej mobilni fazi izkazovala retencijski faktor 0,3. Za spiranje celotne spojine smo tekom izvedbe čiščenja gradientno povečali polarnost mobilne faze z dodatkom etilacetata. To je pripomoglo k hitrejšemu in popolnejšemu spiranju pričakovane spojine iz kolone. Frakcije s čistim produktom smo združili in topilo odparili na rotavaporju.

### 5.1.5. Odščita acetala z molekularnim jodom, raztopljenim v acetonu

**Reakcija:**

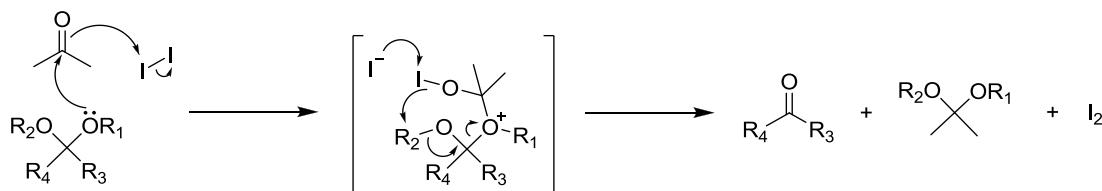


Spojino **6** smo raztopili v acetonu, ki predstavlja tako topilo kot substrat. Po kapljicah smo reakcijski zmesi dodajali jod, ki smo ga predhodno raztopili v acetonu. S tem smo usmerjali reakcijo do nastanka želenega produkta.

Z molekularnim jodom katalizirana odščita acetalov in ketalov ne poteka po mehanizmu hidrolize, pač pa po mehanizmu izmenjave substrata. Predvidevajo, da pride pri reakciji do izmenjave določenih skupin med acetonom in izhodno spojino, kot je prikazano na **Sliki 16** (53). Zaradi različnih elektronegativnosti kisikovega in ogljikovega atoma je karbonilna skupina acetona polarizirana. Ker je kisikov atom bolj elektronegativ, si poveča elektronsko gostoto tako, da pritegne skupni elektronski par iz središčne lege,

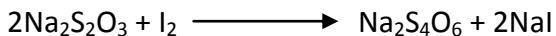
elektronska gostota na ogljikovem atomu pa se posledično zmanjša. Ta pojav je ključen za večjo reaktivnost karbonilne skupine.

Kisikov atom v acetalu ali ketalu je nukleofil, ki neposredno napade C atom acetona, ki je zaradi polarizacije dober elektrofil. Kisikov atom v acetonu pa je zaradi polarizacije nukleofil, ki napade molekularni jod. V nadaljevanju sledi eliminacija molekularnega joda in ketala, ki se tvori na molekuli acetona. Končni produkt reakcije pa je aldehid.



Slika 16: Mehanizem odščite acetalov in ketalov z jodom in acetonom (53)

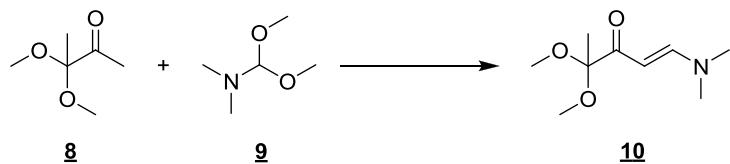
Reakcijo smo po štirih urah prekinili z dodatkom 5% raztopine natrijevega tiosulfata. Le-ta deluje kot reducent, ki jodove atome reducira v brezbarvne jodidne ione.



## 5.2. Sintezna pot *N*-(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamida (**19**)

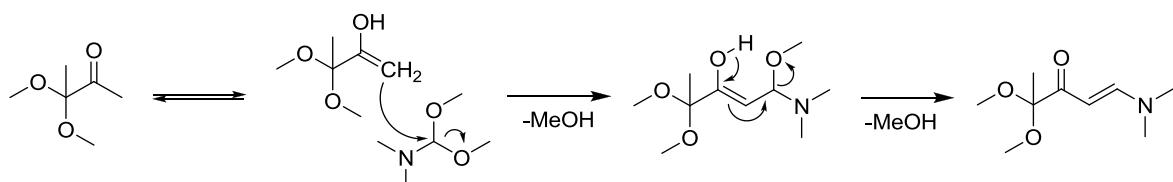
### 5.2.1. Tvorba $\alpha,\beta$ -nenasičenega ketona

**Reakcija:**



Spojina **8** se nahaja v tautomerem ravnotežju med ketonsko in enolno obliko. V reakcijo pa vstopa samo enolna oblika. Aktivirana metilenska skupina v enolu reagira kot nukleofil in napade C atom spojine **9**, ki se imenuje DMFDMA (*N,N*-dimetylformamid dimetilacetal). DMFDMA je formamidni acetal, ki se uporablja bodisi za alkiliranje kislin, fenolov, aromatskih in heteroaromatskih spojin bodisi za formiliranje aktiviranih metilenskih skupin (sinteza enaminov), aminov, amidov in heterociklov (54, 55).

C atom spojine **9**, ki ga napade aktivirana metilenska skupina, je dober elektrofil, saj ima vezani dve metoksi skupini z negativnim induktivnim efektom. Pri tem pride do eliminacije ene molekule metanola, v nadaljevanju pa sledi premestitev protona in eliminacija druge molekule metanola. Končni produkt je torej  $\alpha,\beta$ -nenasičen keton.



Slika 17: Mehanizem sinteze  $\alpha,\beta$ -nenasičenega ketona

Oba reagenta, ki vstopata v reakcijo, sta tekočini. Reakcijo smo imeli ves čas v argonovi atmosferi, saj lahko etri ob prisotnosti kisika iz zraka tvorijo nestabilne hidroperokside in perokside. Reakcijsko zmes smo segrevali na 110 °C in s tem pospešili potek reakcije. Po 26 urah smo opazili tekočo reakcijsko zmes oranžne barve. Kot stranski produkt je nastal metanol, ki smo ga odparili na rotavaporju. Za čiščenje produkta smo uporabili vakuumsko destilacijo s kratko potjo, saj destilat preide le kratko razdaljo med bučko z vzorcem in bučko, v katero destilira.

Destilacija pod znižanim tlakom ali vakuumska destilacija je metoda, pri kateri znižamo vrednost tekočine z znižanjem tlaka, pri katerem tekočino destiliramo. Uporablja se za čiščenje spojin z visokim vrednotnim in spojin, ki termično niso obstojne pri atmosferskem tlaku. Uporabili smo aparaturo za kratkopotno destilacijo proizvajalca BÜCHI (Slika 18), ki se uporablja za čiščenje spojin z nehlapnimi nečistočami. Vzorec, ki ga želimo destilirati, prenesemo v bučko in jo povežemo z drugo hlajeno zbirno bučko, v kateri bo vzorec kondenziral. Le-to pa povežemo s stekleno cevjo, ki jo priključimo na vakuum. Nato bučko z vzorcem vstavimo v posebno grelno cev, zbirno bučko pa potopimo v ledeno kopel, da destilat lažje kondenzira. Da omogočimo homogen prenos energije in snovi v sistemu, bučke med celotnim postopkom destilacije rotirajo (56).

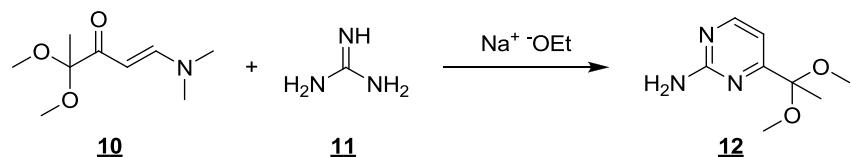


Slika 18: Aparatura za kratkopotno vakuumsko destilacijo (vir: S. Majcen)

Pri 130 °C je začela destilirati prozorna tekočina, za katero se je izkazalo, da je izhodna spojina **8**. Končna spojina je začela destilirati pri 170 °C in je destilirala do temperature 186 °C. Dobili smo rumeno oljno tekočino (vidno na **Sliki 18**). Ko smo končno spojino postavili v hladilnik, so nastali rumeni kristali.

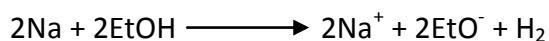
### 5.2.2. Sinteza spojine s pirimidinskim obročem

#### Reakcija:



Reakcija poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo pripravili natrijev etoksid, ki je zelo močna baza in odcepi gvanidinski proton ter s tem poveča nukleofilnost gvanidinskih NH skupin.

Tvorba natrijevega etokside je redoks reakcija: (52)



Ker natrij z vodo reagira zelo burno, smo morali med potekom reakcije zagotoviti popolnoma brezvodne pogoje, in sicer tako, da smo bučko pred uporabo prežarili z žarilno pištolo in jo dobro prepigli z argonom. Poleg tega smo na povratni hladilnik dali

klorkalcijevo cevko, ki poleg uravnavanja tlaka tudi zagotovi brezvodne pogoje. V tako bučko smo nalili brezvodni etanol. Če bi etanol vseboval vodo, bi nastajal natrijev hidroksid, ki ni dovolj močna baza, da bi odcepila proton v molekuli gvanidina, kar bi vodilo v upočasnitev reakcije.

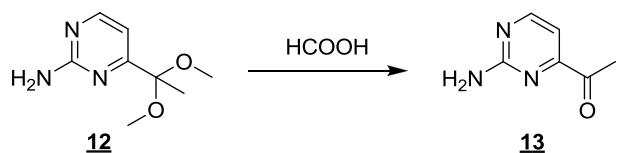
Nato smo se lotili priprave natrija. Tega smo previdno narezali na čim manjše koščke, ki smo jih počasi dodajali v reakcijsko zmes. Tak protokol je zelo pomemben, saj je reakcija nastajanja etoksida zelo burna, ker se sprošča vodik. Da smo med pripravo natrijevega etoksida preprečili stik natrija z vodo, smo natrij vseskozi shranjevali v toluenu. Zaradi eksoternosti reakcije smo reakcijsko zmes ohlajali na ledeni kopeli in tako preprečili nenadzorovan potek reakcije.

Tekom reakcije je nastajala vse bolj rumena in gosta raztopina. Tvorila se je spojina s pirimidinskim obročem po mehanizmu nukleofilne substitucije. Kot stranska produkta sta nastala voda in dimetilamin.

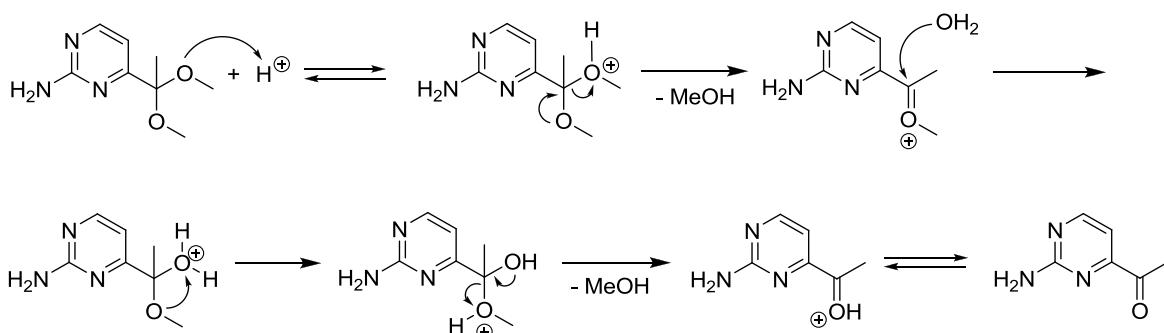
Reakcijsko zmes smo ohladili na ledu, pri čemer se je spojina začela izobarjati, saj se je topnost spojine v hladnem etanolu zmanjšala.

### 5.2.3. Kislinsko katalizirana hidroliza ketala

**Reakcija:**



Hidroliza poteka v kislem mediju ob dodatku vode. Ob prisotnosti mravljične kisline se metoksi skupina spojine **12** protonira. Ker je metanol dobro izstopajoča skupina, le-ta izstopi in nastane kationski intermedijat, ki je dober elektrofil. Tega napade voda, ki predstavlja nukleofil, kar vodi do nastanka protoniranega hemiketala. Sledi prenestitev protona in izstop še ene molekule metanola. Pri tem pride do nastanka protonirane karbonilne skupine, ki se deprotonira do ustreznegra ketona (**Slika 19**).



Slika 19: Mehanizem kislinsko katalizirane hidrolize ketala (57)

Reakcijsko zmes smo segrevali 1 uro pri 40 °C in s tem izboljšali topnost spojine **12** ter pospešili potek reakcije. Če bi med potekom reakcije prišlo do protoniranja proste amino skupine, to ne bi vplivalo na nadaljnji potek reakcij. Po končani reakciji smo mravljično kislino odparili pod znižanim tlakom in preostanek prelili z absolutnim etanolom, ki smo ga predhodno ohladili na 0 °C. Tvorila se je oborina, ki smo jo odfiltrirali. Tudi pri izolaciji nam protonirana oblika spojine **13** ni delala težav, saj se je ravno tako izoborila v etanolu. Za izvedbo reakcije smo uporabili tudi alternativni postopek, pri katerem smo spojino **12** raztopili samo v mravljični kislini in mešali na sobni temperaturi 2,5 ure. Mravljično kislino smo nato odparili in produkt prekristalizirali iz absolutnega etanola, vendar pa se ta postopek ni izkazal za najboljšega, saj se je izkoristek gibal okrog 45 %. Poleg tega postopka smo acetal poskušali odščititi tudi z molekularnim jodom, raztopljenem v acetonu, vendar reakcija ni potekala.

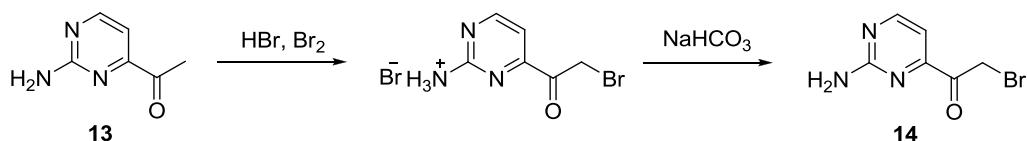
#### 5.2.4. Bromiranje 4-acetyl-2-aminopirimidina

Spojino **14** smo poizkušali pripraviti na več različnih načinov in tako optimizirati reakcijo bromiranja. Reakcijski pogoji, ki smo jih uporabili, so predstavljeni v **Preglednici III**. Za najugodnejšo sintezno pot se je izkazal postopek, pri katerem smo uporabili 8,8 M raztopino HBr in Br<sub>2</sub>. Postopek je zajemal pripravo soli s HBr spojine **13** v EtOAc. To smo nato suspendirali v ocetni kislini, dodali HBr in Br<sub>2</sub>, ter segrevali na 60 °C, dokler reakcija ni potekla.

**Preglednica III: Reakcijski pogoji in izkoristki, ki smo jih dobili pri optimizaciji bromiranja 4-acetyl-2-aminopirimidina**

Številka eksperimenta	Reagenti	Topilo	Izkoristek
1.	CuBr <sub>2</sub> in 8,8 M HBr	ocetna kislina	reakcija ni potekla
2.	CuBr <sub>2</sub>	EtOAc	9,5 %
3.	8,8 M HBr in Br <sub>2</sub>	ocetna kislina	24 %
4.	<i>N</i> -bromosukcinimid in p-toluensulfonska kislina	MeOH	54 %
5.	8,8 M HBr in Br <sub>2</sub>	EtOAc in acetna kislina	80 %

**Reakcija:**



V prvi stopnji smo naredili sol z bromovodikovo kislino 4-acetyl-2-aminopirimidina. Morebitna protonirana oblika spojine **13** iz prejšnje stopnje nas pri poteku reakcije ne moti, saj moramo amino skupino zaščititi na neklasični način, da ne bi vstopala v reakcijo z bromom. To naredimo *in situ* s protoniranjem z močno kislino (HBr).

4-acetyl-2-aminopyridin smo raztopili v vročem etilacetatu in dodali HBr. Na ta način smo protonirali amino skupino spojine **13**, ki je posledično izpadla v etilacetatu. Oborino smo odnučali in jo zaradi velike higroskopnosti takoj uporabili naprej. Sol smo suspendirali v acetni kislini in dodali HBr. Tako smo zagotovili kisel medij za kislinsko katalizirano enolizacijo.

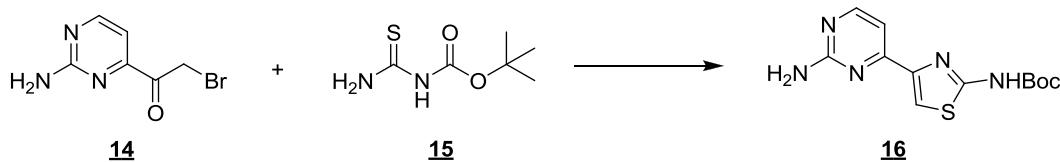


Slika 20: Kislinsko katalizirano bromiranje (51)

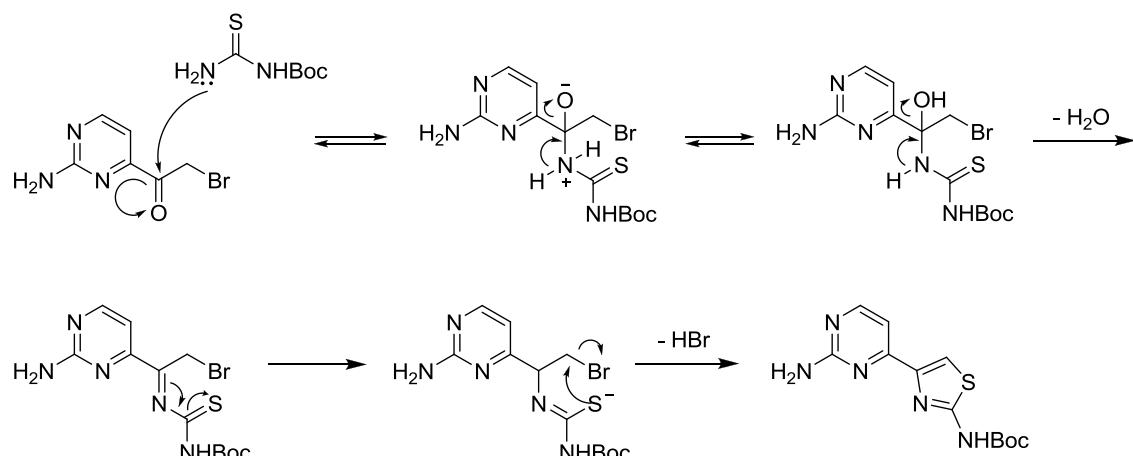
Po 30 minutah mešanja smo dodali raztopino broma v ocetni kislini in nastala je bistra rdeča raztopina. Reakcijsko zmes smo segrevali na 60 °C in že po 10 minutah je izpadla rumeno-bela kristalinična oborina. Ob tem se je razbarvala, kar je nakazovalo na to, da se je elementarni brom porabil. V reakcijsko zmes smo namreč dali samo en ekvivalent broma, ki pa se je v celoti porabil in zato povzročil spremembo barve. Potekla je elektrofilna substitucija broma na  $\alpha$ -ogljikov atom glede na karbonilno skupino. Reaktivna skupina je v našem primeru enol in začetna reakcija je podobna klasični elektrofilni adiciji pri alkenih. Rakcija se ne konča z adicijo, ampak s ponovnim nastankom karbonilne skupine. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in jo prelili z etilacetatom, kjer je nastala sol izpadla. Prosto obliko spojine **14** smo pripravili z mešanjem v nasičeni raztopini natrijevega hidrogenkarbonata.

### 5.2.5. Sinteza spojine s tiazolnim obročem

#### Reakcija:



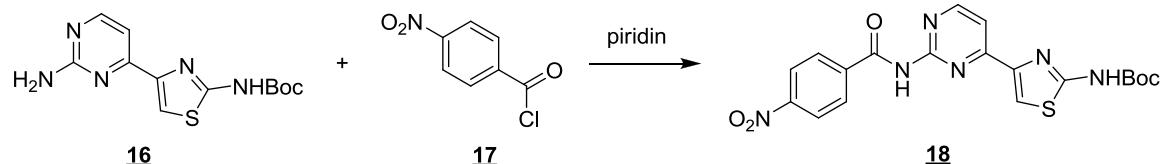
Med potekom reakcije najprej nastane imin. Njegova tvorba je nukleofilna adicija proste amino skupine Boc-tiosečnine na karbonilno skupino spojine **14**, čemur sledi eliminacija vode. V nadaljevanju sledi premestitev protona in posledično tvorba  $\text{RS}^-$  iona, ki je ravno tako dober nukleofil. Ta neposredno napade primarni C atom  $\alpha$ -bromoketona, ki je dober elektrofil zaradi karbonilne skupine in vezanega broma z močno negativnim induktivnim efektom. Pri tem izstopijo bromidni ioni, ki veljajo za dobro izstopajočo skupino. Drugi N atom Boc-tiosečnine ne more reagirati s primarnim C atomom  $\alpha$ -bromoketona, saj ima vezano Boc zaščitno skupino. Zaradi tvorbe karbamata na tem N atomu je le-ta zaradi zmanjšane elektronske gostote manj reaktivna. Reakcija tako prednostno poteka na žveplovem atomu.

Slika 21: Mehanizem tvorbe spojine 16

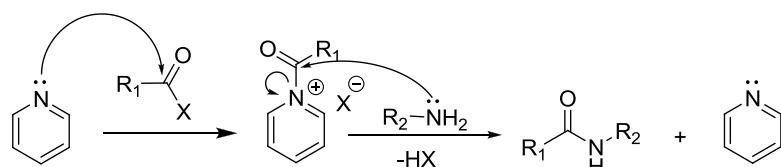
Najprej smo poskusili produkt čistiti s kolonsko kromatografijo in kasneje s prekristalizacijo iz etilacetata. Po primerjavi izkoristkov smo se odločili za bistveno enostavnnejše čiščenje s prekristalizacijo iz etilacetata.

### 5.2.6. Tvorba amida na amino skupini

**Reakcija:**

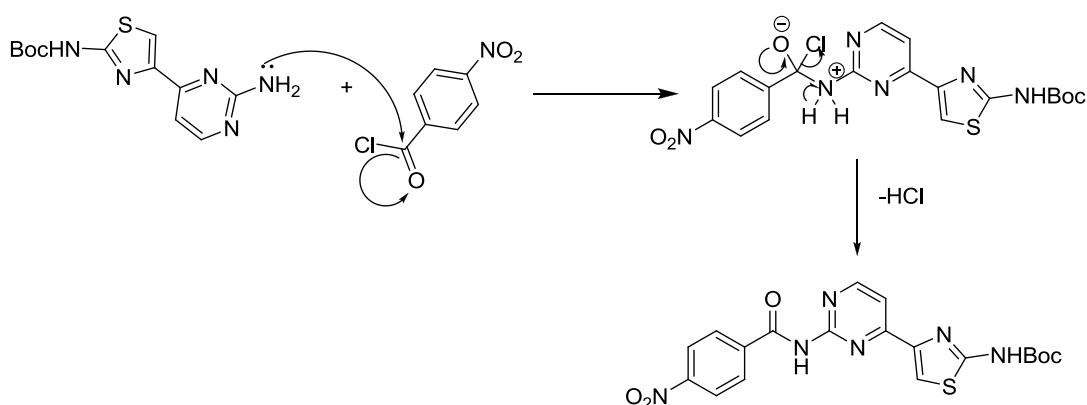


Oba reagenta smo raztopili v piridinu, ki ima vlogo topila, hkrati pa nevtralizira med reakcijo nastajajočo HCl. Poleg tega ima piridin zaradi prostega elektronskega para na dušikovem atomu, podobno kot DMAP, vlogo nukleofilnega katalizatorja reakcije. Le-ta reagira s karbonilno skupino prisotnega reaktanta, kar vodi do nastanka N-acetylpiridinijeve soli. Karbonilna skupina te soli je močan elektrofil, ki ga napade amino skupina drugega reaktanta. Med njima pride do tvorbe vezi in do izstopa piridina, ki lahko ponovno reagira (Slika 22).

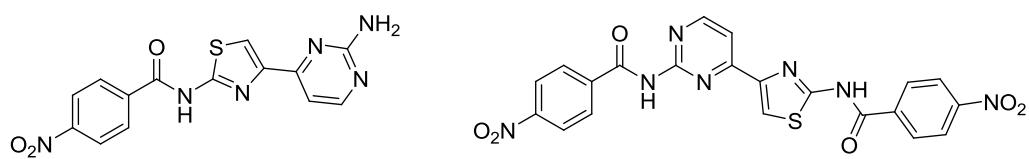


Slika 22: Mehanizem katalitičnega delovanja piridina

Spojino **17** smo dodajali počasi in s tem usmerjali reakcijo do tvorbe amida na prosti amino skupini spojine **16**. Nastala je rjava raztopina. Potek reakcije smo spremeljali s tankoplastno kromatografijo in po eni uri mešanja pri sobni temperaturi ugotovili, da se je spojina **17** že porabila. Potekla je nukleofilna substitucija amino skupine spojine **16** na karbonilno skupino spojine **17**.

Slika 23: Mehanizem tvorbe amida na amino skupini spojine **16**

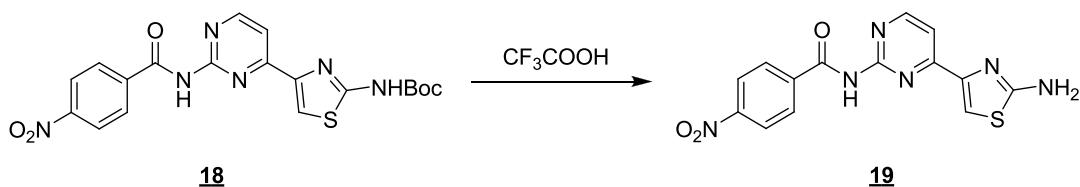
Vzrok za nizek izkoristek je lahko nastanek stranskih produktov. Če reakcije nismo izvajali dovolj previdno, je lahko ob prisotnosti vode prišlo do hidrolize zaščitne skupine. Tako je lahko prosta amino skupina na tiazolu reagirala s kislinskim kloridom do nastanka spojine **21**. Poleg tega pa je lahko nastajala tudi spojina, ki je imela tako na amino skupini tiazola kot tudi na amino skupini pirimidina vezano 4-nitrobenzoilno skupino (spojava **22**).

**21****22**

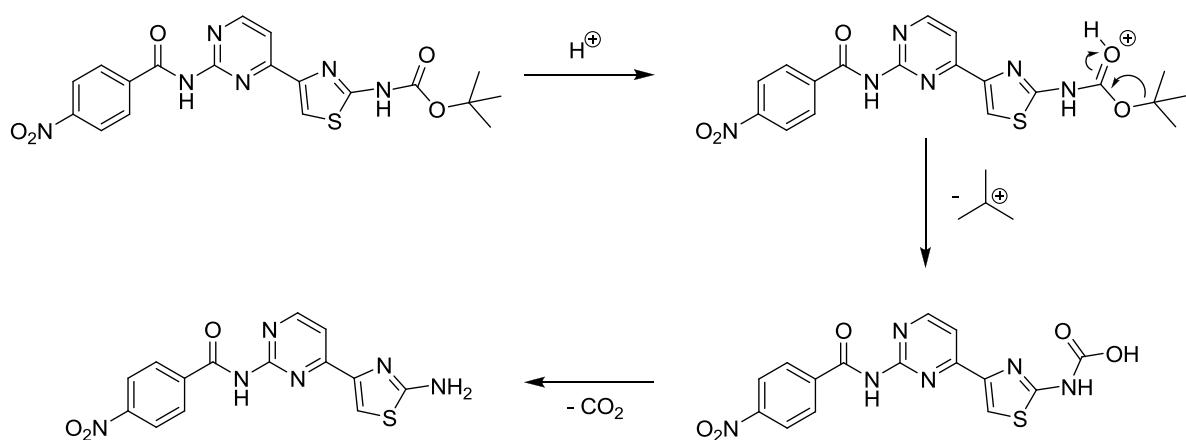
Slika 24: Možni stranski produkti

### 5.2.7. Odstranitev Boc zaščitne skupine z amino skupine

**Reakcija:**



Reakcija je potekala tri ure v brezvodnem diklorometanu pri sobni temperaturi in v argonovi atmosferi. Odstranitev Boc zaščitne skupine je potekala po mehanizmu acidolize. Proton trifluorocetne kisline napade kisik na karbonilni skupini Boc zaščitne skupine, nato sledi odcep *tert*-butilnega kationa. Nastali derivat karbamske kisline je nestabilen in zato razpade na sol aminskega derivata in ogljikov dioksid, ki izhaja iz zmesi (**Slika 25**).



**Slika 25: Mehanizem acidolize (58)**

Po končani reakciji smo triklorocetno kislino uparili na rotavaporju in preostanek prelili s trietilaminom. S tem smo pripravili prosto obliko aminskega derivata in nevtralizirali trifluorocetno kislino, ki je nismo uspeli odpariti. Preostanek smo raztopili v diklorometanu in organsko fazo spirali z vodo. S tem smo se rešili soli trifluorocetne kisline, ki so topne v vodi. Organsko fazo smo sprali še z nasičeno raztopino NaCl in jo odfiltrirali s presesavanjem skozi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> past. Tako smo odstranili vso vodo in topilo odparili na rotavaporju.

### 5.3. Razprava k rezultatom biološkega testiranja

Spojine so bile biološko testirane na zaprti (P1) in odprt inaktivirani (P3) obliki Nav1,3 kanalčka z uporabo avtomatizirane elektrofiziološke metode vpete krpice membrane (ang. "patch-clamp").

Pri tej metodi lahko določen kanalček v membrani izoliramo tako, da se s tanko in na poseben način oblikovano stekleno pipeto nežno dotaknemo dela membrane, kjer se kanalček nahaja. Tesen stik med membrano in robom pipete dosežemo s tvorbo majhnega podtlaka skozi pipeto. To loči raztopino v pipeti od zunajcelične raztopine. Preko pipete lahko z različnimi kemijskimi sredstvi vzdražimo celično membrano in spremljamo njene odzive na različne dražljaje (6).

Za klinično uporabo so najugodnejši zaviralci inaktivirane oblike Nav1,3 kanalčkov, ki so odgovorni za prevajanje dražljaja bolečine. Njihovo izražanje se med potekom bolečine drastično spremeni. Za zelo močne zaviralce te oblike kanalčkov veljajo spojine, pri katerih je  $IC_{50}$  pod 3  $\mu M$ , spojine, ki izkazujejo  $IC_{50}$  med 3 in 10  $\mu M$ , veljajo za zmerno močne zaviralce, medtem ko so spojine znotraj intervala 10–30  $\mu M$  razmeroma šibki zaviralci inaktivnega stanja Nav1,3 kanalčkov. Kot neaktivne veljajo tiste spojine, pri katerih je  $IC_{50}$  nad 30  $\mu M$ . Poleg tega je pomembna tudi selektivnost spojin, h kateri pripomorejo predvsem dejstva, da se spojine vežejo le na eno izobliko kanalčka (Nav1,3) ter na točno določeno stanje kanalčka, ki je v našem primeru odprto inaktivirano.

**Preglednica IV: Rezultati testiranja na Nav1,3 kanalčkih**

Oznaka	Struktura	Zaprta oblika Nav1,3 kanalčka (P1)	Odprta oblika Nav1,3 kanalčka (P3)	Razmerje med oblikama kanalčka (P1/P3 razmerje)
		IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	
TTX		0,00425	0,00146	2,9
<u>18</u>		24,60	3,99	6,2
<u>20</u>		30	22,09	1,4
<u>16</u>		30	30	1
<u>19</u>		30	30	1

Tetrodotoksin se pri metodi vpete krpice membrane uporablja kot kontrola pri biološkem testiranju.

Na Nav1,3 kanalčkih so bile testirane štiri spojine, ki so predstavljene v **Preglednici IV**. Iz preglednice lahko razberemo, da testirane spojine izkazujejo različno stopnjo inhibicije Nav1,3 kanalčkov. Spojina 18 je zmerno močan zaviralec odprtega inaktiviranega stanja Nav1,3 kanalčkov, saj je njen IC<sub>50</sub> 3,99 µM. Opazimo lahko tudi, da je razmerje med vezavo na zaprto in odprto inaktivirano obliko kanalčka za to spojino 6,2. Spojina 20 velja za razmeroma šibko zaviralko inaktivirane oblike Nav1,3 kanalčkov. Njen IC<sub>50</sub> znaša za odprto inaktivirano obliko 22,09, razmerje med vezavo na zaprto in odprto inaktivirano obliko pa 1,4. Po strukturi se spojini 18 in 20 razlikujeta v tem, da ima spojina 20 prosto

tako amino skupino na pirimidinu kot na tiazolu. Iz tega lahko sklepamo, da je 2-aminopirimidintiazolni fragment primeren kot osnovni fragment pri načrtovanju novih potencialnih zaviralcev. Za praktično neaktivni spojini veljata spojini **16** in **19**, ki imata IC<sub>50</sub> 30 μM. Pri spojinah tudi ne moremo oceniti selektivnosti. Spojina **16** se od spojine **18** loči le v tem, da ima amino skupino na aminopirimidintiazolnem obroču prosto. Razlika med spojinama **19** in **18** pa se kaže v prosti amino skupini tiazola. Iz tega lahko sklepamo, da mora biti za aktivnost tako na amino skupini tiazola kot tudi amino skupini pirimidina prisoten nek lipofilni fragment, ki omogoča dodatne lipofilne interakcije z vezavnim mestom.

Vse omenjene spojine so bile testirane tudi na Nav1,5 kanalčkih, na katerih pa niso izkazovale aktivnosti. To pomeni, da so testirane spojine selektivne za Nav1,3 kanalčke in ne bodo izkazovale neželenih stranskih učinkov v srčni mišici, kjer se nahajajo Nav1,5 kanalčki.

Med spojinami, ki smo jih sintetizirali, je bila torej najbolj aktivna spojina **18**. Njeno strukturo lahko primerjamo z znanimi zaviralci Nav1,3 kanalčka, ki so navedeni v patentni literaturi (59). Opazimo lahko nekatere podobnosti z našimi spojinami, npr. ustrezno substituiran aminotiazolni obroč. Poleg tega imajo omenjene spojine, podobno kot sintetizirana spojina **18**, na osrednji aminofenilni fragment vezan aromatski lipofilni del, medtem ko je pri spojini **18** le-ta nadomeščen z aminopirimidinskim fragmentom.

Če torej povzamemo, smo sintetizirali spojino, ki je primerna za nadaljnji razvoj modulatorjev ionskih kanalčkov. Spojina izkazuje selektivnost na obeh testiranih izooblikah (Nav1,3 in Nav1,5) ter samih oblikah kanalčka (zaprta, odprta). V primerjavi naše spojine z inhibitorji v literaturi smo še dodatno potrdili strukturne zahteve za delovanje na izbrani tarči ter sintetizirali spojino, ki jo lahko nadalje ustrezno derivatiziramo. V naslednjih stopnjah sinteze bi lahko nitro skupino spojine **18** reducirali do amino skupine in jo uporabili za nadaljnjo derivatizacijo. Poleg tega bi lahko z različnimi lipofilnimi fragmenti substituirali tudi amino skupino tiazola in tako izkoristili dodatne interakcije z vezavnim mestom.

## 6. SKLEP

Na podlagi izvornih spojin smo v okviru magistrske naloge načrtovali in sintetizirali analoge 2-aminopirimidintiazola s potencialnim delovanjem na Nav kanalčke. Končni rezultat celotnega dela sta tako dve končni spojini *terc*-butil 4-(2-(4-nitrobenzamido)pirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamat (**18**) in *N*-(4-(2-aminotiazol-4-il)pirimidin-2-il)-4-nitrobenzamid (**19**), ki bosta nedvomno pripomogli k nadaljnemu razvoju potencialnih selektivnih inhibitorjev napetostno odvisnih kanalčkov.

Izvedli in optimizirali smo dve sintezi fragmentov. Sinteza aminoimidazolnega fragmenta se je izkazala za zelo zahtevno, vendar smo uspeli razviti pogoje, pri katerih smo pripravili aminoimidazolni fragment z zaščitenimi vsemi tremi amino skupinami. Le-tega smo nato poskušali z reduktivnim aminiranjem vezati na ključni 2-aminopirimidintiazolni fragment, vendar pa reakcija ni potekala po pričakovanjih. Tudi sinteza ključnega 2-aminopirimidintiazolnega fragmenta se je izkazala za zahtevno, vendar smo z ustreznou optimizacijo sintetizirali končne spojine z vezano 4-nitrobenzamidno skupino na pirimidinskem obroču. 2-aminopirimidintiazolni skelet smo poskušali derivatizirati tudi z drugimi različnimi aromatskimi in heteroaromatskimi derivati, vendar smo bili pri tem neuspešni. Pridobljene spojine smo ustreznou ovrednotili in nekatere med njimi poslali na biološka testiranja.

Biološka testiranja so bila izvedena z metodo vpete krpice membrane na Nav1,3 in Nav1,5 kanalčkih. Rezultati so pokazali, da je spojina *terc*-butil 4-(2-(4-nitrobenzamido)pirimidin-4-il)tiazol-2-ilkarbamat (**18**) zmerno močan inhibitor Nav1,3 kanalčkov, ki so odgovorni za prevajanje dražljaja bolečine. Spojina se na to izobliko Nav1,3 kanalčka veže selektivno v primerjavi s srčno obliko Nav1,5 kanalčkov. To pomeni, da bi imele potencialne učinkovine manjši spekter stranskih učinkov. Še dodatno pa k selektivnosti pripomore tudi dejstvo, da se omenjena spojina veže na točno določeno odprto inaktivirano obliko Nav1,3 kanalčka.

Rezultati biološkega testiranja so nam podali tudi informacije o posameznih fragmentih molekule, ki so ključni za delovanje spojin. Za aktivnost je ključen predvsem osrednji 2-aminopirimidintiazolni fragment. Poleg tega smo tudi ugotovili, da samo en lipofilni fragment, vezan na osnovni fragment, še ne da želene aktivnosti. Izboljšanje le-te opazimo šele pri vezanih dveh lipofilnih fragmentih.

## 7. VIRI IN LITERATURA

1. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology, 5<sup>th</sup> ed., Mosby, St. Louis, Missouri, 2004; 1–77.
2. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T: Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 2007; 124–141.
3. Dudev T, Lim C: Factors Governing the Na<sup>+</sup> vs K<sup>+</sup> Selectivity in Sodium Ion Channels. *Journal of the American Chemical Society* 2010; 2321–2332.
4. Hodnik Ž: Alkaloidi iz spužev rodu *Agelas* kot inhibitorji napetostno odvisnih ionskih kanalov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana 2010; 1–21.
5. Campbell NA, Reece JB: Biologija 2: zgradba in delovanje organizmov, učbenik za gimnazije in srednje strokovne šole. 1. natis. Celovec: Mohorjeva založba 2012; 142–155.
6. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana 2005: 208–237.
7. Bresjanec M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije. 3. popravljena in dopolnjena izdaja, Patofiziologija; 1–7.
8. Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF: Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of Physiology* 1998; 647–657.
9. Ogata N, Ohishi Y: Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels. *The Japanese Journal of Pharmacology* 2002; 265–377.
10. Catterall WA: From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 2000; 13–25.
11. <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fphar.2011.00053/full> (**Slika 1**, obiskano 14. 5. 2014).
12. Jukič M, Kikelj D, Anderluh M: Isoform Selective Voltage-Gated Sodium Channel Modulators and the Therapy of Pain. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 1–24.
13. Goldin AL: Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology* 2003; 284–290.
14. Groome JR, Lehmann-Horn F, Holzherr BD: Open- and closed-state fast inactivation in sodium channels, Differential effects of a site-3 anemone toxin. *Landes Bioscience* 2011; 65–78.
15. Armstrong CM: Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 17991–17996.

16. <http://dundeemedstudentnotes.wordpress.com/2012/04/06/action-potentials/> (**Slika 2**, obiskano 23. 9. 2014)
17. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA: Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 2000; 365–368.
18. Wood JN, Baker M: Voltage-gated sodium channels. *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 17–21.
19. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA: Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today* 2000; 506–520.
20. England S, de Groot MJ: Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *British Journal of Pharmacology* 2009; 1413–1425.
21. Kraft DS, Bannon AW: Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Pharmacology* 2008; 50–56.
22. Lai J, Hunter JC, Porreca F: The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Neurobiology* 2003; 291–297.
23. Baker MD, Wood JN: Involvement of  $\text{Na}^+$  channels in pain pathways. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001; 27–31.
24. Wulff H, Castle NA, Pardo LA: Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature* 2009; 982–1001.
25. Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R: Atomic structure of voltage-gated  $\text{K}^+$  channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 2007; 376–383.
26. Yellen G: The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 35–42.
27. Pongs O, Leicher T, Berger M, Roepke J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF: Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated  $\text{K}^+$  Channel  $\beta$  Subunits. *Annals New York Academy of Sciences*; 344–355.
28. [http://www.ib.cnea.gov.ar/~redneu/2013/BOOKS/Principles%20of%20Neural%20Science%20-%20Kandel/gateway.ut.ovid.com/gw2/ovidweb.cgi?sid=jhkoalgmeho00dbookimagebookdb\\_7c\\_2fc~12.htm](http://www.ib.cnea.gov.ar/~redneu/2013/BOOKS/Principles%20of%20Neural%20Science%20-%20Kandel/gateway.ut.ovid.com/gw2/ovidweb.cgi?sid=jhkoalgmeho00dbookimagebookdb_7c_2fc~12.htm) (**Slika 4**, obiskano 29. 9. 2014).
29. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R: The principle of gating charge movement in a voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel. *Nature* 2003; 42–48.

30. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Ruby B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X: International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* 2005; 473–508.
31. Kaczorowski GJ, Garcia ML: Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999; 448–458.
32. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pannington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, Andrews BS, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehrzanadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus H, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy G: Kv1,3 channels and a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 17414–17419.
33. MacDonald PE, Wheeler MB: Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 2003; 1046–1062.
34. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011; 85–95, 113–131, 249–255.
35. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pilozzi S, Becchetti A: Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy. *Current Medicinal Chemistry* 2009; 66–93.
36. Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W: Role of Voltage-gated Potassium Channels in Cancer. *The Journal of Membrane Biology* 2005; 115–124.
37. Koehn FE, Carter GT: The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature* 2005; 206–220.
38. Kingston DGI: Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of Natural Products* 2011; 496–511.
39. Gerwick WH, Fenner AM: Drug Discovery from Marine Microbes. *Microb Ecol* 2013; 800–806.
40. Hodnik Ž, Tomašić T, Peterlin Mašić L, Chan F, Kirby RW, Madge DJ, Kikelj D: Novel state-dependent voltage-gated sodium channel modulators, based on marine

- alkaloïdes from *Agelas* sponges. European Journal of Medicinal Chemistry 2013; 154–164.
41. Cafieri F, Fattorusso E, Mangoni A, Taglialatela-Scafati O: Clathramides, unique bromopyrrole alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas clathrodes*. Tetrahedron 1996; 13713–13720.
  42. [http://www.natuurlijkmooi.net/caribische\\_zee/sponzen/agelas\\_clathrodes.htm](http://www.natuurlijkmooi.net/caribische_zee/sponzen/agelas_clathrodes.htm) (**Slika 6**, obiskano 1. 10. 2014).
  43. <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fphar.2011.00071/fullb> (**Slika 8**, obiskano 6. 8. 2014).
  44. Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD: Voltage-Gated Sodium Channels and Pain Pathways. Wiley InterScience 2004; 55–71.
  45. Terlau H, Olivera BM: *Conus* Venom: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. Physiological Reviews 2004; 41–68.
  46. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP: Drug development from marine natural products. Nature 2009; 69–85.
  47. Schmuck C, Bickert V, Merschky M, Geiger L, Rupprecht D, Dudaczek J, Wick P, Rehm T, Machon U: A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of *N*-Protected 5-(Guanidinocarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxylic Acids. European Journal of Organic Chemistry 2008; 324–329.
  48. Ando N, Terashima S: A novel synthesis of the 2-amino-1*H*-imidazol-4-carbaldehyde derivatives and its application to the efficient synthesis of 2-aminoimidazole alkaloids, oroidin, hymenidin, dispacamide, monobromodispacamide, and ageladine A. Tetrahedron 2010; 6224–6237.
  49. Lipinski CA, Craig RH; Wright RB: 2-Amino- and 2-guanidino-4-thiazolylpyrimidines. From Journal of Heterocyclic Chemistry 1985; 22 (6), 1723–1726.
  50. Sollner Dolenc M, Pečar S: Vaje iz farmacevtske kemije III, 2. dopolnjena izdaja – ponatis, Ljubljana – Fakulteta za farmacijo 2007; 8–9.
  51. Tišler M: Organska kemija, 2. izdaja, 1. natis, Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 2013; 213–257.
  52. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2010; 4–9, 101–102.

53. Sun J, Dong Y, Cao L, Wang X, Wang S, Hu Y: Highly Efficient Chemoselective Deprotection of O,O-Acetals and O,O-Ketals Catalyzed by Molecular Iodine in Acetone. *Journal of Organic Chemistry* 2004; 8932–8934.
54. Allin SM, Barton WRS, Bowman WR, Bridge E, Elsegood MRJ, McInally T, McKee V: Bu<sub>3</sub>SnH-mediated radical cyclisation onto azoles. *Tetrahedron* 2008; 7745–7758.
55. Masayoshi A, Tsuyoshi N, Yukiko S, Yumiko M, Takahiro Y, Kazuhiko T, Takaichi S, Hiromi D, Takashi K, Wataru T, Ryotaku I, Hiroshi Y, Keiko O, Reina K, Futoshi N, Yumi K, Noriko M, Shintaro N, Tetsufumi K, Eiko N, Hatsumi N, Takahide N: Synthesis and SAR of 1,3-thiazolyl thiophene and pyridine derivatives as potent, orally active and S1P3-sparing S1P1 agonists. *From Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012; 3083–3088.
56. Požgan F, Štefane B: Uvod v laboratorijsko organsko kemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2009; 71–74.
57. Cordes EH, Bull HG: Mechanism and catalysis for hydrolysis of acetals, ketals, and ortho esters. *Chemical Reviews* 1974; 581–603.
58. Lundt BF, Johansen NL, Vølund A, Markussen J: Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1978; 258–268.
59. Gonzalez III JE, Termin AP, Martinborough E, Zimmerman N: Compositions useful as inhibitors of voltage-gated sodium channels. United States Patent, Patent number US 2006/0025415 A1 (spojina 68), date of patent Feb 2, 2006.