

Sinteza tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline radi ispitivanja bioloških učinaka

Tukara, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:666989>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
"Medicinska kemija"

Tea Tukara

*Sinteza tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline
radi ispitivanja bioloških učinaka*

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
"Medicinska kemija"

Tea Tukara

*Sinteza tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline radi ispitivanja
bioloških učinaka*

Diplomski rad

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine

Rijeka, 2022.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate university study
"Medicinal chemistry"

Tea Tukara

*Synthesis of thiazole-amide derivatives of theophylline-7-acetic acid to
evaluate their biological effects*

Graduate thesis

Mentor: Assoc. prof. Karlo Wittine

Rijeka, 2022.

Diplomski rad obranjen je dana 26. rujna 2022. godine pod povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti (predsjednica povjerenstva)
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj (član)
3. Izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine (član)

Rad sadrži 62 stranice, 5 tablica, 13 slika, 15 dodataka te 35 literaturnih navoda.

Sažetak

U sklopu ovog rada reakcijom amidacije pripremljeni su derivati teofilin-7-octene kiseline: a) tiazolni derivati **1-2**, b) benzo[d]tiazolni derivati **3-6** i c) 4-feniltiazolni derivati **7-15**. Strukture spojeva potvrđene su spektroskopijom ^1H NMR kao i spektrometrijom masa. In silico PASS analizom predviđeni su farmakološki učinci i biološke mete. Većina spojeva prema predviđanju bi trebala posjedovati djelovanje na transkripcijski faktor STAT, cAMP fosfodiesterazu ili posjedovati nootropno djelovanje.

Ključne riječi: teofilin, amidacija, PASS

Summary

As part of this work, theophylline-7-acetic acid derivatives were prepared by the amidation reaction : a) thiazole derivatives **1-2**, b) benzo[d]thiazole derivatives **3-6**, c) 4-phenylthiazole derivatives **7-15**. The structures of the prepared compounds were elucidated by ^1H NMR spectroscopy and mass spectrometry. Pharmacological effects and potential biological targets of novel compounds have been predicted by in silico analysis (PASS). Most compounds are predicted to have activity on transcription factor STAT, cAMP phosphodiesterase, or possess nootropic activity.

Keywords: theophylline, amidation, PASS

Sadržaj

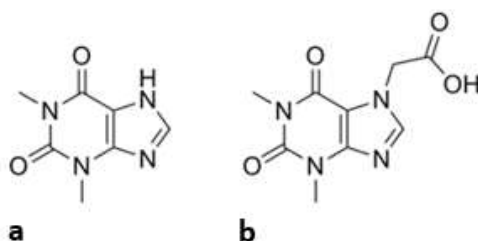
1.	Uvod.....	1
1.1.	Teofilin.....	1
1.1.1.	Bioški mehanizmi djelovanja teofilina.....	2
1.2.	Teofilin-7-octena kiselina.....	4
1.2.1.	Protutumorska svojstva teofilin-7-octene kiseline.....	5
1.2.2.	Antituberkulozna svojstva teofilin-7-octene kiseline.....	5
1.3.	Tiazoli.....	6
1.4.	Amidna veza.....	7
1.4.1.	Konvencionalne metode amidacije.....	8
1.4.2.	Katalitičke metode amidacije.....	12
1.5.	Određivanje biološke aktivnosti i mete spojeva.....	13
1.5.1.	PASS- Predviđanje Aktivnosti.....	13
1.6.	Transkripcijski faktor STAT.....	15
2.	Svrha rada.....	17
3.	Materijali i metode.....	18
3.1.	Opće napomene.....	18
3.1.1.	Kemikalije i reagensi.....	18
3.1.2.	Napredovanje reakcija.....	18
3.1.3.	Pročišćavanje dobivenih spojeva.....	18
3.1.4.	NMR.....	19
3.2.	Pregled sintetiziranih spojeva.....	19
3.2.1.	Sinteza spojeva.....	21
4.	Rezultati i rasprava.....	29
4.1.	Sinteza tiazolamidnih derivata.....	29
4.2.	Mehanizam HATU/DIPEA amidacije.....	30
4.3.	Rezultati in silico PASS analize.....	31
5.	Zaključak.....	35
6.	Literatura.....	36
7.	Dodaci.....	39

1. Uvod

1.1. Teofilin

Biljke su izvor različitih klasa spojeva povoljnih bioloških svojstava. Ksantini su jedan od poznatih primjera čiji su predstavnici teofilin, teobromin i kofein. Široko se primjenjuju u farmaceutskoj industriji kao antimikrobni i protuupalni lijekovi, antioksidansi te spojevi protutumorskog djelovanja. Pronalazimo ih u pićima i hrani koje svakodnevno konzumiramo poput kave, čaja i čokolade. Njihov predstavnik, teofilin, sigurnog biološkog profila i lako dostupan iz prirodnih izvora može se lako sintetski modificirati te time posjeduje veliki potencijal za razvoj novih spojeva kojima je moguće ispitati biološka svojstva.

Teofilin (1,3-dimetil-7*H*-purin-2,6-dion) je dimetilksantin izveden iz ksantin purinske baze i sastoji se od dvije metilne skupine smještene na položajima 1 i 3 (Slika 1.a). Purinske baze su molekule koje sudjeluju u ključnim životnim procesima te se biblioteke spojeva na bazi purina često testiraju na široku paletu bioloških meta. Brojni lijekovi koji u svojoj strukturi sadrže purinsku bazu trenutno se primjenjuju za liječenje različitih vrsta karcinoma, sistemske mastocitoze, infekcija uzrokovanih virusima te protiv odbacivanja organa. Biološki značaj purina, općenito, čini ih atraktivnim kemijskim entitetom za daljnje kemijske modifikacije i ispitivanje bioloških učinaka (1,2).



Slika 1. Prikaz strukture teofilina (a) i teofilin-7-oicne kiseline (b).

Ksantinski alkaloidi privlače također veliku pozornost zbog svoje široke terapijske upotrebe u liječenju respiratornih poremećaja poput kronične opstruktivne bolesti pluća i astme (3). Pokazuju nadalje učinke na središnji živčani sustav (SŽS), kardiovaskularne funkcije i bronhijalne mišiće. Postoje

nadalje uvjerljivi dokazi da pojedini metilksantini, kada se primjenjuju zajedno s lijekovima protiv raka, pojačavaju njihovo citotoksično djelovanje (2). Tako je primjerice utvrđeno da upotreba teofilina u kombinaciji s gemcitabinom ili cisplatinom, može inducirati apoptozu u različitim tumorskim stanicama (4).

Teofilin se koristi već više od 80 godina za liječenje bolesti dišnih putova. Prvotno se koristio kao bronhodilatator, no uporaba mu je reducirana zbog čestih nuspojava koje je izazivao korištenjem u visokim dozama, pri čemu je zamjenjen β 2-agonistima. Danas se najčešće primjenjuje kao dodatna terapija kod bolesnika s astmom čije stanje nije dobro kontrolirano korištenjem inhalacijskih kortikosteroida i u bolesnika s KOBP koja nije dobro kontrolirana bronhodilatatorima. Kao i kod astme, stanje bolesnika s teškim KOBP-om pogoršava se kada se teofilin povuče iz njihovog režima liječenja (5,6).

1.1.1. Biološki mehanizmi djelovanja teofilina

Unatoč tome što je teofilin već dugi niz godina u kliničkoj uporabi, njegov mehanizam i mjesto djelovanja na molekularnoj razini i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Predloženo je nekoliko molekularnih mehanizama djelovanja koji ovise o koncentraciji teofilina.

Tablica 1. Predloženi mehanizmi djelovanja teofilina. Po uzoru na (6).

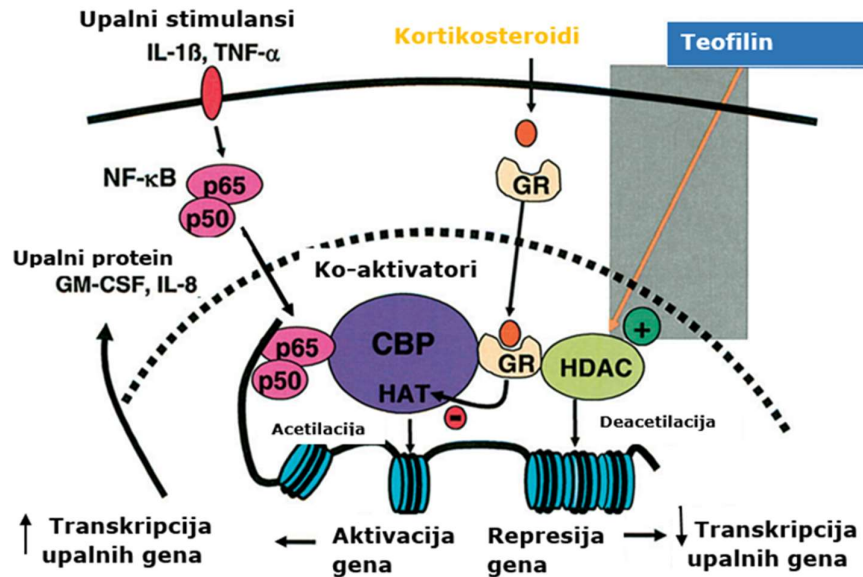
Neselektivna inhibicija fosfodiesteraze
Antagonizam adenzinskih receptora (A_1 , A_{1A} , A_{2B} , $P2Y_{15}$)
Povećano oslobađanje interleukina-10
Stimulacija oslobađanja epinefrina
Inhibicija medijatora (prostaglandini, TNF- α)
Inhibicija intracelularnog oslobađanja kalcija
Inhibicija NF- κ B (smanjenje nuklearne translokacije)
Inhibicija fosfoinozimid 3-kinaze
Povećana apoptoza
Povećana aktivnost histon deacetilaze (povećana učinkovitost kortikosteroida).

Mehanizmi koji se javljaju samo pri višim koncentracijama od klinički učinkovitih, često višim od 20 mg/L (klinički učinkovite koncentracije su u rasponu 5-10 mg/L):

- Inhibicija fosfodiesteraze (PDE)- teofilin je slabi neselektivni inhibitor izoenzima PDE, koji razgrađuju cikličke nukleotide u stanici povećavajući koncentraciju cAMP i cGMP
- Antagonizam adenozijskih receptora- snažan je inhibitor adenozijskih receptora, ovaj mehanizam je vjerojatno odgovoran za ozbiljnije nuspojave teofilina poput napadaja i srčanih aritmija
- Inhibicija nuklearnog faktora κB (NF- κB)- teofilin sprječava translokaciju proupalnog transkripcijskog faktora NF- κB smanjujući ekspresiju upalnih gena u astmi i KOBP-u
- Poticaj lučenja interleukina-10 koji posjeduje široki spektar protuupalnih učinaka
- Učinak na kinaze- inhibira fosfoinozimid 3-kinaze, s najvećim afinitetom za podtip fosfoinozimid 3-kinaze (p110) koji je uključen u odgovore na oksidativni stres
- Učinci na apoptozu- potiče apoptozu eozinofila smanjenjem antiapoptotičkog proteina Bcl-2, također inhibira enzim poli(ADP-riboza)polimerazu-1 (PARP-1), koji se aktivira oksidativnim stresom i dovodi do smanjenja razine NAD što rezultira energetsom krizom koja vodi staničnoj smrti (5-7).

Mehanizam u terapijskim dozama:

- Aktivacija histon deacetilaze (HDAC)- teofilin u niskim terapijskim dozama aktivira HDAC potiskujući ekspresiju upalnih gena, naročito ako je njihova aktivnost smanjena uslijed oksidativnog stresa. HDAC deacetiliraju histone koji su acetilirani od strane histon acetilaza (HAT) što rezultira supresijom upalnih gena i proteina poput faktora stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) i interleukina 8 (IL-8) (Slika 2.). Kortikosteroidi imaju jednako djelovanje kao teofilin, no različiti mehanizam, što predviđa njihov sinergijski učinak u suzbijanju upale (5,6).



Slika 2. Mehanizam djelovanja teofilina na HDAC. Po uzoru na (6).

1.2. Teofilin-7-octena kiselina

Jedan od derivata teofilina, teofilin-7-octena kiselina (7-TAA) ili acefilin (Slika 1.b), sintetiziran je u pokušaju da se zaobiđu nuspojave teofilina kao bronhodilatatora. Njezina je karakteristika povoljniji sigurnosni profil u usporedbi s teofilinom, ali loša apsorpcija. Strategija za poboljšanje apsorpcije i smanjenje toksičnosti i nuspojave je manipuliranje fizikalno-kemijskim svojstvima spoja kemijskom modifikacijom. Stoga je potrebna sinteza derivata s povećanom bioraspoloživostu (2,8).

Derivati teofilin-7-octene kiseline također pripadaju klasi bronhodilatatora te pokazuju važne biološke aktivnosti. Osim bronhodilatacije i opuštanja glatkih mišića, pokazano je da posjeduju antikancerogena, antituberkulozna te antiastmatična svojstva (3). Primjerice, acefilin piperazin, sol teofilin-7-octene kiseline, korišten je kao antiastmatik, srčani stimulans i diuretik (9). Nadalje, derivati teofilin-7-octene kiseline i metilnog estera pokazali su aktivnost protiv stanica mijeloične leukemije, *Mycobacterium tuberculosis* i raznih staničnih linija raka (10), dok su derivati koji sadrže aminokiselinske dijelove obećavajući spojevi za razvoj antimikobakterijskih sredstava (11).

1.2.1. Protutumorska svojstva teofilin-7-octene kiseline

Ye i suradnici pokazali su da derivati 7-TAA i 1,2,3-triazola mogu biti potencijalni kandidati za lijekove protiv karcinoma pluća nemalih stanica (NSCLC). Procijenili su antiproliferativnu aktivnost sintetiziranih derivata na devet vrsta stanica raka: H460 (pluća), A549 (pluća), A2780 (jajnici), LOVO (debelo crijevo), MB-231 (dojka), MCF-7 (dojka), OVCAR3 (jajnici), SW480 (debelo crijevo) i PC-9 (pluća). Neki od spojeva su pokazali značajno antitumorsko djelovanje u usporedbi s 7-TAA, a spoj koji sadrži trifluorometil je bio učinkovit protiv svih 9 staničnih linija raka. Dvije stanične linije NSCLC, H460 i A549 pokazale su posebnu osjetljivost na spoj koji sadrži trifluorometil grupu s IC_{50} od $5,929 \pm 0,97 \mu\text{M}$ odnosno $6,76 \pm 0,25 \mu\text{M}$. Taj spoj može značajno inducirati staničnu apoptozu povećanjem omjera apoptotskog proteina Bax/Bcl-2 regulacijom ekspresije fosforiliranog Akt proteina, i ima malu toksičnost za normalne stanice hepatocita LO2 u terapijskim koncentracijama (4). Shahzadi i suradnici su također ispitali antiproliferativnu aktivnost derivata 7-TAA i 1,2,3-triazola. Protutumorsko djelovanje svih derivata ispitano je protiv staničnih linija MCF-7 i A549 te je otkriveno da većina spojeva pokazuje antiproliferativno djelovanje. Među tim spojevima, onaj s najmanjom IC_{50} vrijednošću, $1,25 \pm 1,60 \mu\text{M}$, prepoznat je kao najjače sredstvo protiv obje stanične linije raka. Važno je napomenuti da su gotovo sve molekule pokazale nisku citotoksičnost protiv ljudskih eritrocita u testu hemolize (10). Nadalje, Voynikov i suradnici pokazali su da derivati 7-TAA s aminokiselinama imaju antiproliferativno djelovanje na stanice akutne (HL-60) i kronične (K-562) mijeloične leukemije. Antiproliferativni učinci otkriveni su pri relativno visokim koncentracijama, između 330,4 i 1051,9 μM , a ispitani spojevi nisu bili toksični za embrionalne stanice ljudskih bubrega (8).

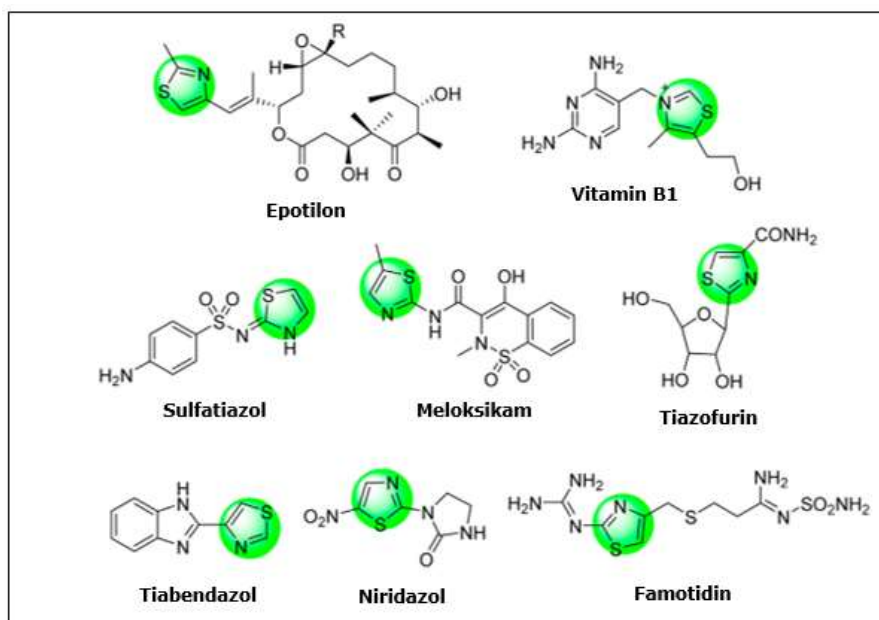
1.2.2. Antituberkulozna svojstva teofilin-7-octene kiseline

Voynikov i suradnici su sintetizirali amide 7-TAA i aminokiselina radi ispitivanja antimikobakterijskog djelovanja protiv *M. tuberculosis* H37Rv. Spojevi su pokazali izvrsnu aktivnost, čak 10-25 puta veću od etambutola, klasičnog lijeka protiv tuberkuloze (11). U drugoj studiji, utvrđeno je da su metilni esteri derivata 7-TAA aktivniji od aminokiselinskih.

1.3. Tiazoli

U posljednje vrijeme, heterociklička kemija jedna je od najvažnijih disciplina u organskoj sintezi i farmaceutskoj kemiji. Veliki broj heterocikličkih spojeva djeluje kao aktivni farmaceutski sastojak u lijekovima raznih bioloških svojstava.

Jedna od važnih skupina takvih heterocikala jesu tiazoli. Tiazoli su peteročlani heterocikli koji u svom prstenu sadrže dušik i sumpor. Zbog njihove sintetske raznolikosti i terapijskog značaja, već su dugo predmet istraživanja i često su korišteni u dizajnu lijekova (12,13). Tiazolni prsten je strukturni fragment nekih prirodnih spojeva poput tiamina (vitamin B1), tiamin pirofosfata (TPP, koenzim u Krebsovom ciklusu), epotilona (protutumorski lijek), bacitracina i penicilina (antibiotik). Nadalje, nalazi se i u sintetičkim komercijalnim lijekovima poput sulfatiazola (sulfa-lijek), niridazola (šistosomicid), tiabendazola (antifungalni lijek), tiazofurina (protutumorski lijek), famotidina (lijek protiv čira na želucu) i meloksikama (nesteroidni protuupalni lijek) (14).



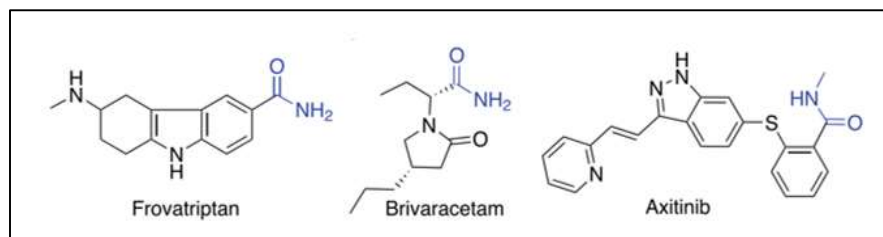
Slika 3. Prikaz nekih komercijalnih sintetskih lijekova na bazi tiazola. Po uzoru na (14).

Derivate tiazola karakterizira široki spektar bioloških svojstava, poput antikonvulzivnog, antimikrobnog, antituberkulostatskog, bakteriostatskog, antivirusnog, antimalarijskog, antikancerogenog i antihipertenzijskog djelovanja. Koriste se kod upala, shizofrenije, HIV infekcija, kao hipnotici i

odnedavno za liječenje boli, kao antagonisti fibrinogenog receptora sa antitrombotskom aktivnošću, kao novi inhibitori bakterijske DNA giraze te u razvoju lijekova protiv alergija (13).

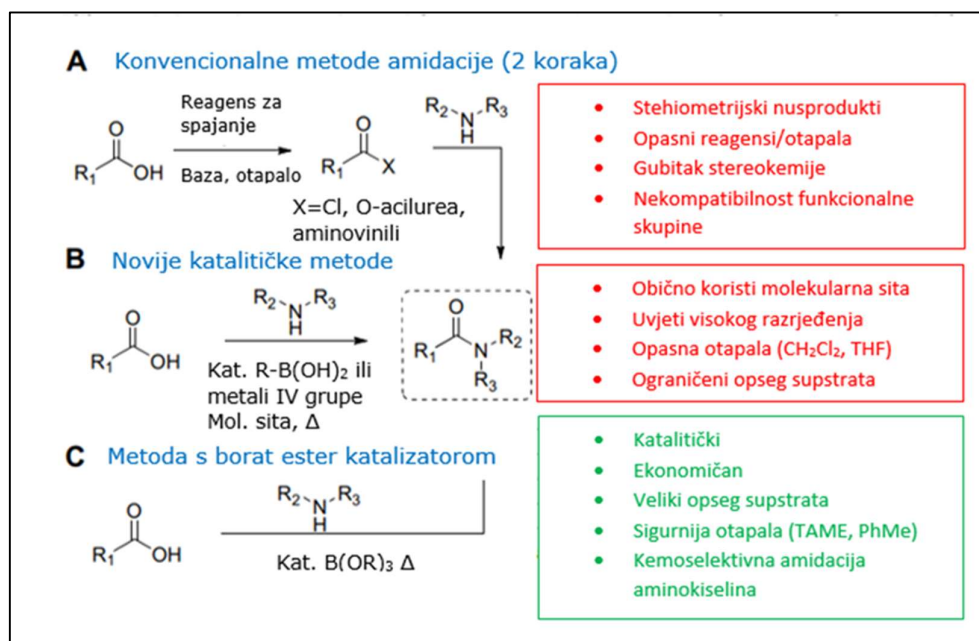
1.4. Amidna veza

Amidna veza je strukturni motiv koji je široko rasprostranjen u prirodnim i industrijskim proizvodima poput proteina, pesticida, polimernih materijala i lijekova (15). U biologiji je ova vrsta veze poznata kao peptidna veza koja povezuje građevne blokove aminokiselina zajedno dajući proteine. Amidne veze nisu ograničene samo na biološke sustave i prisutne su u ogromnom nizu molekula u tekstilnoj industriji u sklopu poliamida te posebice u farmaceutskoj industriji, uključujući glavne lijekove na tržištu (16). Neki od niza korištenih lijekova koji sadrže amidnu vezu su; atorvastatin (blokira proizvodnju kolesterola), lizinopril (inhibitor angiotenzin konvertirajućeg enzima), valsartan (blokada receptora angiotenzina II), i diltiazem (blokator kalcijevih kanala koji se koristi u liječenju angine i hipertenzije), frovatriptan (lijek protiv migrene), brivaracetam (antiepileptik), axitinib (protutumorski lijek).



Slika 4. Prikaz nekih od lijekova koji sadrže amidni strukturni motiv. Preuzeto sa (15).

Kreiranje amidne veze je temeljno važna i najčešće izvođena reakcija u organskoj sintezi, a najčešće je posredovana jednim od mnoštva takozvanih reagensa za spajanje (16). Reakcija se obično izvodi kondenzacijom aktivirane karboksilne kiseline s aminom i razvijen je znatan broj visoko učinkovitih protokola formiranja amida, posebice u sintezi peptida (Slika 4.).



Slika 5. Metode amidacije. Po uzoru na (17).

Unatoč velikom broju protokola, relativno je čest slučaj da se amidi odnosno amidna veza teško dobiva utvrđenim protokolima, posebice ako se radi o sterički ometenim supstratima ili aminima s nedostatkom elektrona. Stoga se učinkovite sintetske metode amida još uvijek smatraju izazovom u organskoj kemiji i farmaceutskoj industriji te je potrebno razviti inovativne metode .

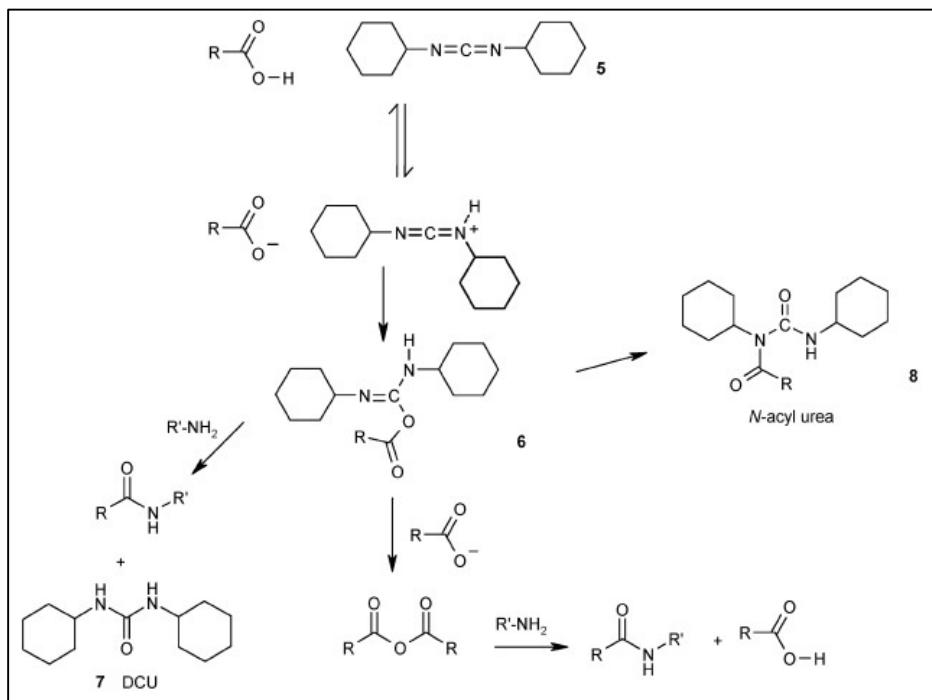
1.4.1. Konvencionalne metode amidacije

Jedna od najčešće korištenih nekatalitičkih metoda za aktivaciju karboksilne kiseline je korištenje reagensa za spajanje pomoću kojih nastaju aktivniji karbonilni spojevi, uključujući anhidride, karbonske anhidride, estere i slično. Prije aktivacije kiseline, potrebno ju je deprotonirati, što se postiže korištenjem DIPEA-e (diizopropiletilamin). Nastali karboksilat zatim reagira s reagensom za spajanje dajući reaktivni međuprodukt koji se često može izolirati ili odmah upotrijebiti u reakciji s aminom uz stvaranje amidne veze. Za dobivanje aktivirane karboksilne kiseline obično se koristi veliki izbor reagensa kao što su kiseli halid (klorid, fluorid), azidi, anhidridi ili karbodiimidi (18,19).

a) Karbodiimidi

Karbodiimidi su jedan od prvih reagensa korištenih za aktivaciju kiseline. Najčešće korišteni za aktivaciju su DCC (dicikloheksilkarbodiimid) i DIC (diizopropilkarbodiimid). Što se tiče mehanizma, najprije karboksilna kiselina reagira sa DCC-om kako bi nastala O-acilureja kao međuprodukt (Slika 6.). Nakon toga, izravnim spajanjem s aminom nastaje željeni amid, uz nastanak nusprodukta dicikloheksilureje (DCU) koja se može ukloniti filtracijom (16,19).

O-acilureja je jedan od najaktivnijih intermedijera za spajanje amida koji mogu spontano racemizirati, što se mora uzeti u obzir prilikom sinteze. Zato se najčešće aktivacija karboksilne kiseline vrši u prisutnosti aditiva hidroksibenzotriazola, poput HOBt (1-hidroksi-benzotriazol) i HOAt (1-hidroksi-7-aza-benzotriazol) koji brzo reagiraju s aktiviranim esterom (20).

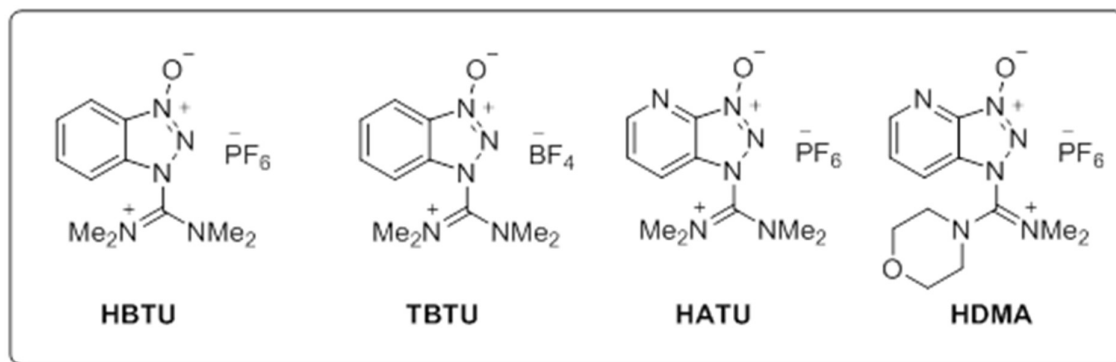


Slika 6. Prikaz mehanizma reakcije pomoću DCC-a. Preuzeto sa (19).

b) Iminijeve soli

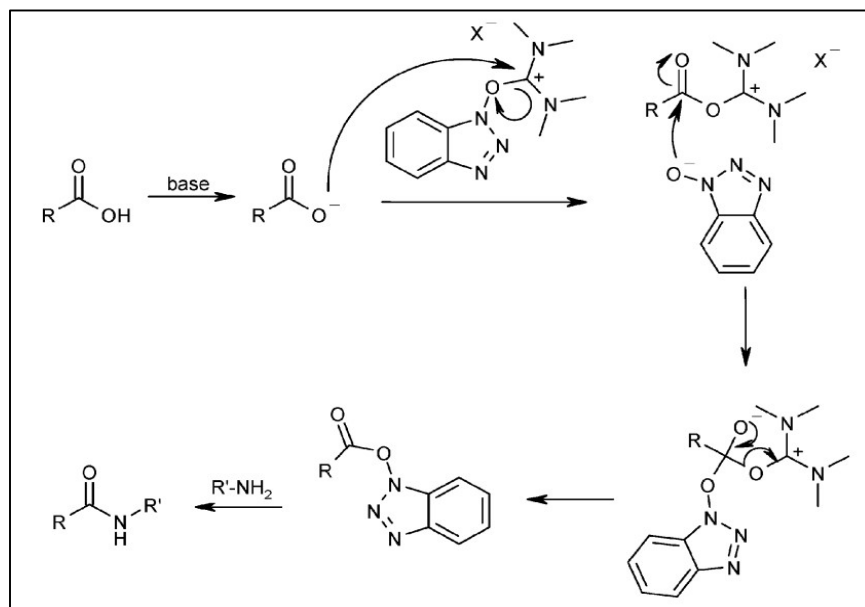
Mnogi reagensi za spajanje temelje se na sustavu HOBt/HOAt i uronij/iminijevim solima. Predstavnici ove skupine reagensa za spajanje su HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronij heksafluorofosfat), TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronij tetrafluoroborat),

HATU (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinij 3-oksidi heksafluorofosfat), HDMA (1-((dimetilamino)-(morfolino)metilen)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridinij heksafluorofosfat 3-oksidi). Strukture ovih reagensa prikazane su na Slici 7. Strukturu čini imonijev kostur i izlazna skupina (21).



Slika 7. Prikaz struktura iminijevih soli. Preuzeto sa (19).

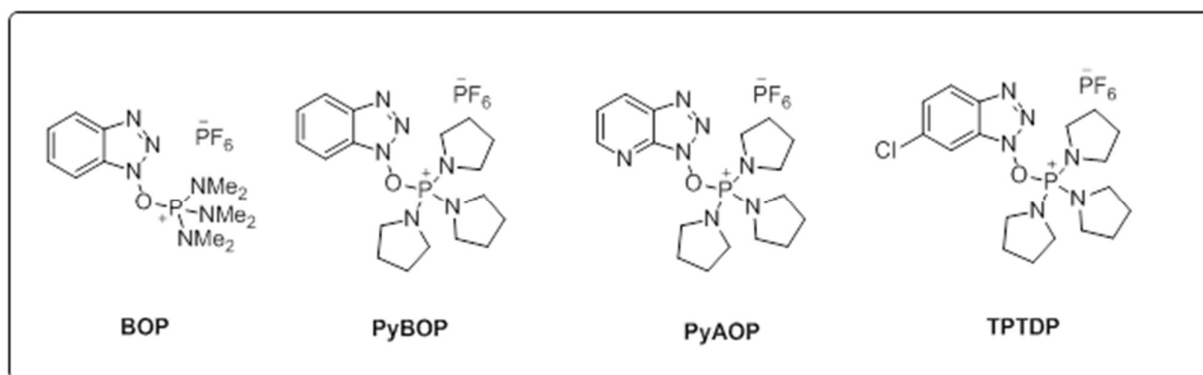
Iminijevе soli su vrlo učinkoviti reagensi za spajanje peptida s brzim vremenom reakcije i minimalnom racemizacijom, a uz dodatak aditiva poput HOBt i HOAt moguće ju je u potpunosti eliminirati. Ovi reagensi koriste se u ekvimolarnom odnosu s karboksilnom kiselinom kako bi se spriječila reakcija viška reagensa sa slobodnim aminom peptida što bi spriječilo spajanje (19). Iminijevе soli reagiraju s karboksilnim kiselinama u prisutnosti baze (obično DIPEA) stvarajući OAt/OBt aktivne estere, koji zatim reagiraju s aminima. Redoslijed dodavanja i vrijeme tijekom reakcije su presudni, budući da je česti slučaj sporedne reakcije amina i reagensa za spajanje uz nastanak međuprodukta gvanidinja (16,20). Spajanje koje uključuje iminijevе soli izvodi se s viškom baze, što može pospješiti racemizaciju (21).



Slika 8. Prikaz mehanizma reakcije s iminijevim solima. Preuzeto sa (16).

c) Fosfonijeve soli

Prva korištena fosfonijeva sol bila je BOP (((1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)oksi)tris(dimetilamino)fosfonij heksafluorofosfat (V)) čija je upotreba ograničena zbog karcinogenosti i respiratorne toksičnosti HMPA koja nastaje u reakcijama spajanja. Ostali reagensi su: PyBOP (((1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)oksi)tri(pirolidin-1-il)fosfonij heksafluorofosfat (V)), PyAOP (((3H-[1,2,3]triazol[4,5-b]piridin-3-il)oksi)tri(pirolidin-1-il)fosfonij heksafluorofosfat (V)) i TPTDP (S-(1-okso-2-piridil)tio-1,3-dimetilpropilenuronij tetrafluoroborat) (Slika 9.).

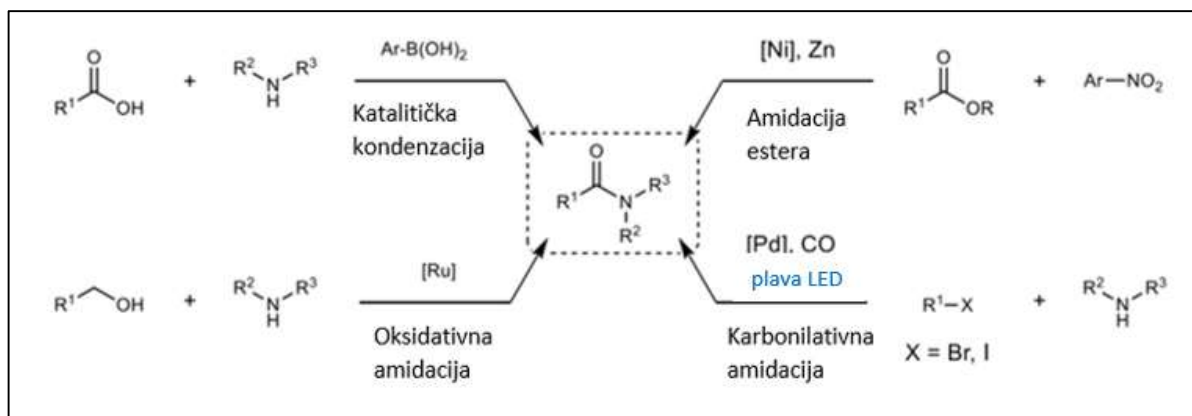


Slika 9. Prikaz struktura fosfonijevih soli. Preuzeto sa (19).

Fosfonijeve soli reagiraju s karboksilatom zahtijevajući obično 2 ekvivalenta baze. Prednost za upotrebu fosfonijevih soli u odnosu na iminijeve reagense je da fosfonij ne reagira sa slobodnom amino skupinom aminske komponente. To omogućuje spajanje u ekvimolarnom odnosu između kiseline i amina, što je vrlo korisno u reakcijama poput intramolekularne ciklizacije linearnih peptida ili reakcijama gdje se ne preporučuje suvišak amina (19).

1.4.2. Katalitičke metode amidacije

U posljednjih 20-ak godina vidljiv je nagli porast u razvoju metoda katalitičke amidacije zbog smanjenja otpada tijekom odvijanja reakcije. Takav razvoj metoda posljedica je usvajanja zelene kemije u akademskom i industrijskom sektoru. Pretpostavlja se da katalitička reakcija sama po sebi mora biti učinkovitija od one posredovane stehiometrijskim reagensom, čemu ide u prilog to da 9-to načelo zelene kemije promiče upotrebu katalizatora umjesto reagensa. Najuspješniji katalizatori do danas uključuju soli metala skupine (IV) i sustave na bazi bora. Svih ovih elemenata (B, Ti, Zr) ima relativno u izobilju i jeftini su, a njihovi se spojevi općenito smatraju netoksičnima tako da ne postoje opća ograničenja njihove prisutnosti kao nečistoća u tragovima u farmaceutskim proizvodima (18,22).



Slika 10. Katalitičke metode amidacije. Po uzoru na (23).

1.5. Određivanje biološke aktivnosti i mete spojeva

Bioaktivne molekule, poput lijekova i metabolita, vežu se za makromolekularne mete te na taj način moduliraju njihovu aktivnost rezultirajući fenotipskim učincima. Poznato je i da jedna molekula može imati nekoliko meta za koje će se vezati. Nedavna studija je pokazala da poznati lijekovi imaju u prosjeku šest molekularnih meta (24). Prema tome, određivanje meta tih malih molekula nužno je za otkrivanje molekularnih mehanizama temeljenih na njihovoj bioaktivnosti te predviđanju potencijalnih nuspojava ili unakrsne reaktivnosti.

1.5.1. PASS- Predviđanje Aktivnosti

Spektar biološke aktivnosti (BAS) intrinzično je svojstvo spoja koje predstavlja različite farmakološke učinke, fiziološke i biokemijske mehanizme djelovanja i specifičnu toksičnost (mutagenost, kancerogenost, teratogenost i embriotoksičnost) (25). Dobro je poznato da svaka tvar ima širok spektar bioloških aktivnosti, što možemo vidjeti u primjeru prenamjene već korištenih lijekova za neku svrhu. Potraga za novim farmakološki aktivnim spojevima uključuje više kriterija jer osim posjedovanja željene biološke aktivnosti, taj spoj mora imati minimum nuspojava i toksičnih svojstava. Razvoj novih lijekova vrlo je zahtjevan proces i povezan je s velikom vjerojatnošću dobivanja negativnih rezultata u smislu farmakološke učinkovitosti. Stoga je postojanje alata koji unaprijed mogu predvidjeti farmakološka svojstva od velikog značaja.

Predviđanje Spektra Aktivnosti Tvari (PASS) je snažan potencijalni alat za određivanje biološke aktivnosti organskih spojeva na temelju njihovih strukturnih formula. Postoji kao računalni program i kao besplatno dostupan web izvor PASS Online (26,27). Predviđanje se temelji na analizi odnosa strukture i aktivnosti a program sadrži informacije o strukturi i biološkoj aktivnosti više od 300 000 organskih spojeva uključujući lijekove, kandidate za lijekove u različitim fazama kliničkog i pretkliničkog ispitivanja te farmaceutske agense (27).

Trenutna verzija PASS-a sposobna je predvidjeti više od 3750 bioloških učinaka, biokemijskih načina djelovanja, specifične toksičnosti i metaboličkih uvjeta na temelju 2D struktura ili kanonskog pojednostavljenog sustava pisanja struktura molekula – SMILES (engl. simplified molecular-input line-entry system) sa srednjom točnošću od gotovo 95% (28). 2D strukturne formule spojeva odabrane su kao osnova za opis kemijskih struktura jer su to jedine informacije dostupne u ranim fazama istraživanja. Stoga se korištenjem strukturne formule kao ulaznog

podatka mogu dobiti procjene profila biološke aktivnosti čak i za virtualne molekule, prije njihove kemijske sinteze i biološkog ispitivanja (29).

Algoritam za konstruiranje modela odnosa struktura-aktivnost na temelju spojeva iz skupa za treniranje i predviđanje aktivnosti za nove spojeve temelji se na Bayesovim procjenama (27). Kao rezultat ispitivanja, korisnik PASS-a dobiva izlaznu informaciju kao popis predviđenih aktivnosti s procijenjenom vjerojatnošću "aktivan" P_a ili "neaktivan" P_i , koje variraju od nula do jedan. Popis je poredan silaznim redoslijedom P_a-P_i ; stoga se vjerojatnije aktivnosti pojavljuju na vrhu popisa. Samo se aktivnosti s $P_a > P_i$ smatraju mogućima za određeni spoj (28).

Primjeri praktične primjene predviđanja spektra biološke aktivnosti pomoću programa PASS (27):

- Pregled biblioteke sintetiziranih spojeva; određivanje mete za sintetizirane spojeve
- Određivanje prioriteta u *in vitro* biološkim ispitivanjima- PASS rezultati odgovaraju *in vitro* biološkim ispitivanjima
- Određivanje prioriteta u *in vivo* biološkim ispitivanjima
- Evaluacija višeciljanog djelovanja predviđanjem *in vitro* profiliranja
- Procjena spektra biološke aktivnosti prirodnih spojeva

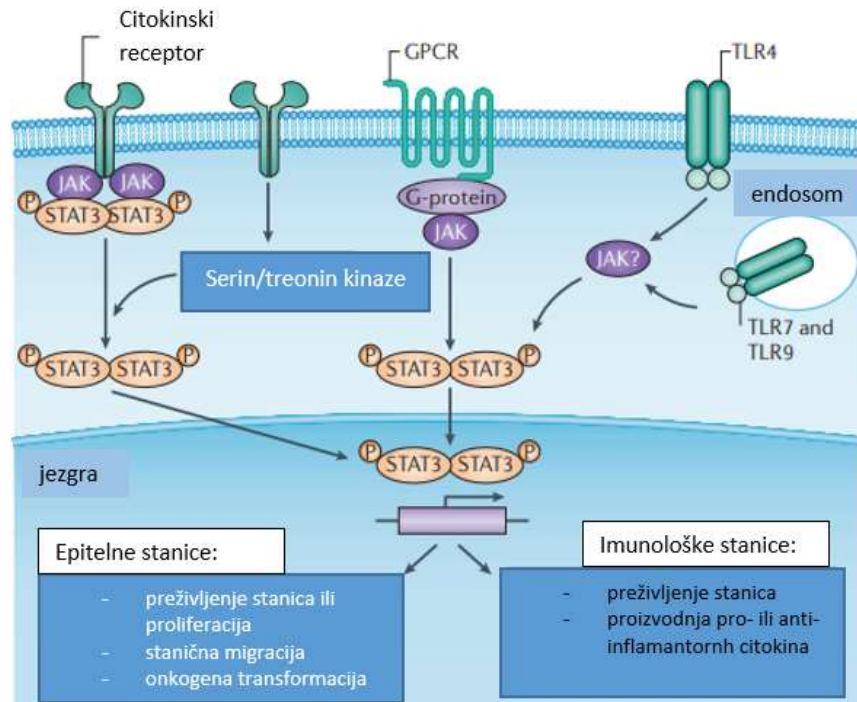
Tablica 2. Prikaz prednosti korištenja PASS-a u istraživanju i razvoju (29).

Primjena u ranim fazama istraživanja	Potrebna samo strukturna formula spoja, predviđanje u ranoj fazi farmaceutskog istraživanja.
Točnost predviđanja	Prosječna točnost predviđanja je 95%.
PASS parametri predstavljaju biološki prostor	Za razliku od mnogih drugih deskriptora koji odražavaju strukturna svojstva molekula.
Predviđanja su prilično brza	Izračun spektra biološke aktivnosti za 10 000 spojeva na običnom računalu traje oko 5 minuta.
Korišteni su standardni formati strukture	SDF ili MOL formati.
Potreban je samo običan PC	

Iako PASS omogućuje predviđanje široke lepeze bioloških aktivnosti u nominalnom vremenu, postoje i ograničenja ovog alata. Predviđene vrijednosti P_a i P_i nisu konačne u smislu biološke aktivnosti molekule jer se predviđanja temelje na 2D strukturi molekule i ne uzimaju u obzir energetske razine molekula. Stoga bi PASS predviđanja trebalo koristiti kao dopunski izvor informacija, no ipak mogu pomoći istraživačima da usmjere istraživanje (28).

1.6. Transkripcijski faktor STAT

STAT (engl. signal transducers and activators of transcription) su obitelj transkripcijskih faktora koji reguliraju rast i diferencijaciju stanica. Oni nisu ključni samo za prijenos signala iz brojnih receptorskih i nereceptorskih tirozin kinaza koje su često aktivirane u stanicama raka, već djeluju i kao faktori transkripcije koji reguliraju ekspresiju širokog spektra gena (30). Također sudjeluju u regulaciji upale ovisne o citokinima i imunitetu te određuju hoće li imunološki odgovori u mikrookruženju tumora pospješiti ili inhibirati rak (31). Članovi obitelji STAT, poput STAT3 i STAT5 uključeni su u napredovanje raka, dok STAT1 ima suprotnu ulogu potiskujući rast tumora (32). Catlett-Falcone i suradnici su još 1999. godine pokazali da je konstitutivno aktivirani STAT3 ključan za karcinogenezu raka glave i vrata te stanica multiplog mijeloma (33).



Slika 11. Mehanizam STAT-om posredovane transkripcije. Po uzoru na (30).

STAT se nalaze u citoplazmi u neaktivnom stanju. STAT3, STAT5a i STAT5b mogu se aktivirati brojnim citokinima i faktorima rasta, uključujući interleukin (IL)-6, EGF, faktor rasta sličan inzulinu, faktor rasta hepatocita, faktor stimulacije kolonija-1, faktor rasta trombocita, hormonima (hormon rasta, inzulin) i nizvodno od nekih receptora povezanih s G-proteinom. Nakon dimerizacije receptora izazvane ligandom, aktivirani Jak sekvencijalno fosforilira receptor i STAT. Ovo inducira otpuštanje i

dimerizaciju fosforiliranog STAT-a, omogućujući njegovu translokaciju u jezgru i naknadno vezanje na DNA (32,34).

Djelovanja STAT3:

- Gen p53- tumor supresorski gen i snažan inhibitor rasta stanica. Protein p53 zaustavlja napredovanje staničnog ciklusa u nekoliko točaka i potiče staničnu smrt kancerogenih stanica. Aktivirani STAT3 se veže na promotor p53 *in vitro* i *in vivo*, potiskujući aktivnost p53 u stanicama raka dojke.
- NF- κ B- transkripcijski faktor koji kontrolira transkripciju DNA, proizvodnju citokina i preživljavanje stanica. Razni upalni čimbenici, poput IL-6 su aktivatori STAT3. Ova dva TF su glavni regulatori onkogenih i upalnih gena. U usporedbi s reguliranom ekspresijom STAT3 i NF- κ B u zdravim stanicama, trajna ograničena ekspresija ovih gena neprekinutom aktivacijom STAT3 i NF- κ B rezultira kroničnom upalom i napredovanjem rasta stanica raka.
- Regulacija ekspresije citokina, kemokina, medijatora upale poput IL-6, IL-1 β , faktora stimulacije kolonija makrofaga, prostaglandina i ciklooksigenaze 2 (COX2, koji je potreban za proizvodnju prostaglandina)

Izravno ciljanje STAT3 kao novog pristupa za učinkovitiju terapiju raka vrlo je poželjno. Međutim, transkripcijski faktori nemaju intrinzičnu enzimsku aktivnost, što čini razvoj inhibitora STAT3 malim molekulama velikim izazovom (31).

Glavna značajka STAT3 kao obećavajuće mete za terapiju raka je da također ima ključnu ulogu u stromalnim stanicama, uključujući imunološke stanice, koje se regrutiraju u mikrookolišu tumora za promicanje njegove progresije (30).

2. Svrha rada

Teofilin je lako dostupan spoj koji posjeduje niz bioloških aktivnosti. Njegova biološki aktivni oblik s boljom bioraspoloživošću jest teofilin-7-octena kiselina. Pretraživanjem literature uvidjeli smo da derivati teofilin-7-octene kiseline pokazuju važne biološke učinke poput protutumorskog, antituberkuloznog i antiastmatičnog, a pored toga djeluju i diuretski i stimulacijski na CNS sustav. Nadalje, derivati tiazola također pokazuju široki spektar bioloških svojstava i strukturni su fragment brojnih prirodnih spojeva i komercijalnih lijekova.

Cilj ovog diplomskog rada bilo je pripremiti malu biblioteku tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline radi ispitivanja njihovih bioloških učinaka. Sintetizirano je 30 spojeva, no nisu svi uključeni u diplomski rad zbog potrebe za dodatnim pročišćavanjima. U radu je prikazana sinteza 15 tiazolamidnih derivata čija je biološka aktivnost predviđena korištenjem alata PASS.

3. Materijali i metode

3.1. Opće napomene

3.1.1. Kemikalije i reagensi

Sve kemikalije, otapala te kemijski reagensi bili su analitičke kvalitete i kupljeni su od komercijalnih dobavljača (Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, Fluka Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Njemačka, Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka i Sigma, St. Louis, MO, SAD, Combi-blocks, Combi-blocks Inc. San Diego, SAD, TCI, TCI-Europe, Zwijndrecht, Belgija, Kemika, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska). Svi početni materijali dobiveni su iz komercijalnih izvora (Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka, Fluka Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Njemačka, Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka i Sigma, St. Louis, MO, SAD) i korišteni su bez dodatnog pročišćavanja.

3.1.2. Napredovanje reakcija

Napredovanje reakcija praćeno je UPLC-MS/UV Waters sustavom (Waters, Waters Corporation, Milford, SAD) i tankoslojnom kromatografijom (TLC) upotrebom prethodno obloženih slojeva silika gela 60F254 (Merck, Darmstadt, Njemačka). Točke na pločama vizualizirane su pod UV svjetlom (254 nm).

Tijekom provođenja reakcija snimani su 2 minutni UPLC-MS/UV spektri u kiselom (pH=4) i lužnatom (pH=9). Za provjeru čistoće konačnog produkta (%) i potvrdu željene mase (m/z) snimljeni su 8 minutni UPLC-MS/UV spektri u kiselom i lužnatom. Snimljeni spektri analizirani su korištenjem MassLynx i FractionLynx programa.

3.1.3. Pročišćavanje dobivenih spojeva

Dobiveni amidni derivati pročišćeni su korištenjem flash kolonske kromatografije. Kolonska kromatografija provedena je pomoću sustava Biotage Isolera One koristeći PF-15S1HC-JP 12g i 4g (15 i 50 μm) kolone. Spojevi koji nisu uspješno pročišćeni na taj način, pročišćeni su korištenjem preparativne kromatografije. Ona je provedena na UNIPLATE™ pločama sa silikagelom (UV254, 20x 20 cm, 2000 μm).

3.1.4. NMR

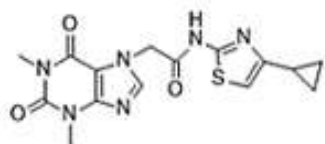
Spektri ^1H i ^{13}C nuklearne magnetske rezonancije (NMR) snimljeni su na instrumentima Bruker 400 i Bruker 600 (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Njemačka). Uzorci su otopljeni u deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d_6).

Dobiveni spektri analizirani su u programu SpinWorks4. Kemijski pomaci iskazani su u delta (δ) jedinicama u dijelovima na milijun (ppm), a uzorci cijepanja označeni su kao s, singlet; d, dublet; t, triplet; q, kvartet i m, multiplet. Konstante sprezanja zabilježene su u hercima (Hz).

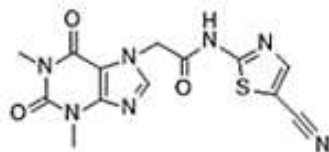
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva

Radi bolje preglednosti sintetizirane derivate teofilin-7-octene kiseline smo podijelili u tri skupine:

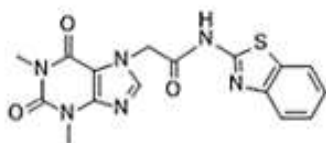
- a) tiazolni derivati **1-2**
- b) benzo[d]tiazolni derivati **3-6**
- c) 4-feniltiazolni derivati **7-15**



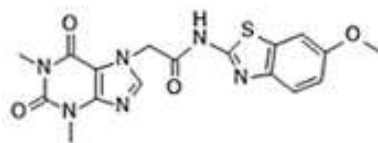
1



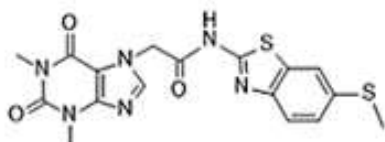
2



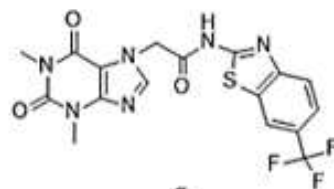
3



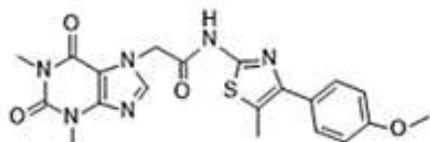
4



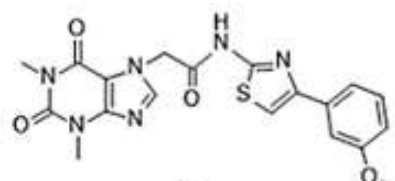
5



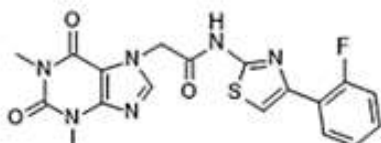
6



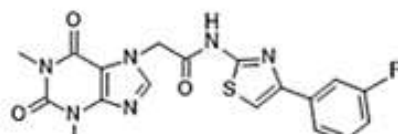
7



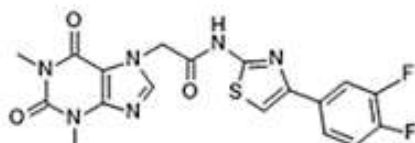
8



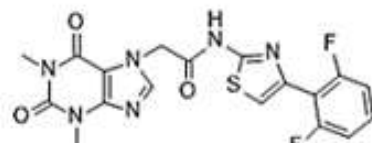
9



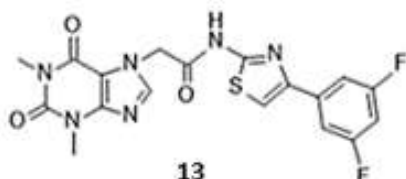
10



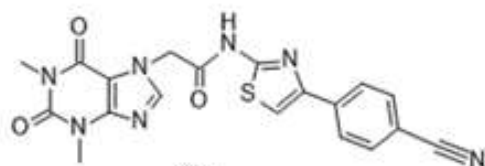
11



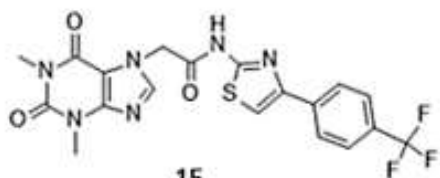
12



13



14



15

3.2.1. Sinteza spojeva

***N*-(4-ciklopropiltiazol-2-il)-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (1)**

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 mL) dodan je HATU (120 mg, 0,315 mmol) i DIPEA (54,9 µl, 0,315 mmol). Nakon 75 minuta miješanja dodan je 4-ciklopropil-2-tiazolamin (29,44 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana etil-acetatom i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 20:1). Dobivena je bijela krutina (13,5 mg, 17,84%). ES-MS: 361,10 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ/ppm): 12,52 (bs, 1H), 8,06 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 5,27 (s, 2H), 3,45 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,02-1,96 (m, 1H), 0,89-0,84 (m, 2H), 0,73-0,79 (m, 2H).

***N*-(5-cijanotiazol-2-il)-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (2)**

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 mL) dodan je HATU (120 mg, 0,315 mmol) i DIPEA (54,9 µl, 0,315 mmol). Nakon 75 minuta miješanja dodan je 4-trifluorometil-tiazol-2-ilamin (35,3 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan: metanol= 20:1). Ovo pročišćavanje nije bilo potpuno uspješno pa je spoj pročišćen preparativnom kromatografijom na silikagel GF pločama. Dobivena je bijela krutina (7,74 mg, 10,68%). ES-MS: 346,12 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ/ppm): 13,45 (bs, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 5,36 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,18 (s, 3H).

N-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (3)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 mL) dodan je HATU (120 mg, 0,315 mmol) i DIPEA (54,9 µl, 0,315 mmol). Nakon 75 minuta miješanja dodan je 2-amino benzotiazol (31,54 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (30,1 mg, 38,7%). ES-MS: 371,07 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12,86 (bs, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,00-7,96 (m, 1H), 7,79 (d, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,48-7,43 (m, 1H), 7,35-7,30 (m, 1H), 5,39 (s, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)-N-(6-metoksi-1,3-benzotiazol-2-il)acetamid (4)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 mL) dodan je HATU (120 mg, 0,315 mmol) i DIPEA (54,9 µl, 0,315 mmol). Nakon 40 minuta miješanja dodan je 2-Amino-6-metoksibenzotiazol (38 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana etil-acetatom (80mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (11,2 mg, 13,32%). ES-MS: 401,10 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12,73 (bs, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,67 (d, $J=8,8$ Hz, 1H), 7,57 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 7,04 (dd, $J=8,8, 2,6$ Hz, 1H), 5,37 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-dioekso-purin-7-il)-N-(6-metilsulfanil-1,3-benzotiazol-2-il)acetamid (5)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 mL) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 40 minuta miješanja dodan je 6-(metiltio)benzo[d]tiazol-2-amin (41,22 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom taku te ekstrahirana s etil-acetatom i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 20:1). Dobivena je bijela krutina (34,8 mg, 39,8 %). ES-MS: 417,06 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 600 MHz, δ /ppm): 12,85 (bs, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,91 (d, $J=1,8$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,36 (dd, $J=8,5, 1,9$ Hz, 1H), 5,38 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-dioekso-purin-7-il)-N-[6-(trifluorometil)-1,3-benzotiazol-2-il]acetamid (6)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 40 minuta miješanja dodan je 2-amino-6-(trifluorometil)benzotiazol (45,8 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 20:1). Ovo pročišćavanje nije bilo potpuno uspješno pa je spoj pročišćen preparativnom kromatografijom na silikagel GF pločama. Dobivena je bijela krutina (11,22 mg, 12,2 %). ES-MS: 439,03 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 600 MHz, δ /ppm): 13,12 (bs, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,93 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 7,75 (dd, $J=8,6, 1,6$ Hz, 1H), 5,40 (s, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-dioekso-purin-7-il)-N-[4-(4-metoksifenil)-5-metil-tiazol-2-il]acetamid (7)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(4-metoksifenil)-5-metil-tiazol-2-amin (46,26 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 20:1 -> 50:1). Dobivena je bijela krutina (15,1 mg, 16,32 %). ES-MS: 441,19 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12,56 (bs, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,60-7,56 (m, 2H), 7,04-6,99 (m, 2H), 5,30 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-dioekso-purin-7-il)-N-[4-(3-metoksifenil)tiazol-2-il]acetamid (8)

U otopinu teofilin-7-octene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(3-metoksifenil)-1,3-tiazol-2-amin hidrobromid (60,3 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (8,95 mg, 10%). ES-MS: 427,25 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12,78 (bs, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,51-7,44 (m, 2H), 7,35 (t, $J=8,0$ Hz, 1H), 6,91 (ddd, $J=8,2$ 2,6, 0,9 Hz, 1H), 5,35 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)-N-[4-(2-fluorofenil)thiazol-2-il]acetamid (9)

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(2-fluorofenil)-1,3-thiazol-2-amin (40,8 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Ovo pročišćavanje nije bilo potpuno uspješno pa je spoj pročišćen preparativnom kromatografijom na silikagel GF pločama. Dobivena je bijela krutina (10,26 mg, 11,8 %). ES-MS: 415,10 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ/ppm): 12,81 (bs, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,07-8,02 (m, 1H), 7,56 (d, *J*=2,3 Hz, 1H), 7,43-7,38 (m, 1H), 7,35-7,30 (m, 2H), 5,35 (s, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)-N-[4-(3-fluorofenil)thiazol-2-il]acetamid (10)

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(3-fluorofenil)-1,3-thiazol-2-amin (40,8 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobiven je bijeli prah (23,9 mg, 27,46 %). ES-MS: 415,09 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ/ppm): 12,81 (bs, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,78-7,75 (m, 1H), 7,72-7,68 (m, 1H), 7,52-7,47 (m, 1H), 7,20-7,15 (m, 1H), 5,35 (s, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

N-[4-(3,4-difluorofenil)thiazol-2-il]-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (11)

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)thiazol (44,57 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana sa smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (52,3 mg, 57,6 %). ES-MS: 433,04 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 600 MHz, δ /ppm): 12,80 (bs, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,92 (ddd, $J=12,0, 7,9, 2,1$ Hz, 1H), 7,78-7,75 (m, 2H), 7,55-7,49 (m, 1H), 5,35 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,19 (s, 3H).

N-[4-(2,6-difluorofenil)thiazol-2-il]-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (12)

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 2-amino-4-(2,6-difluorofenil)thiazol (44,57 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana sa smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (28,2 mg, 31,06 %). ES-MS: 433,12 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12,84 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,55-7,45 (m, 2H), 7,27-7,18 (m, 2H), 5,34 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,14 (s, 3H).

***N*-[4-(3,5-difluorofenil)thiazol-2-il]-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (13)**

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(3,5-difluorofenil)-1,3-tiazol-2-amin (44,57 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Ovo pročišćavanje nije bilo potpuno uspješno pa je spoj pročišćen preparativnom kromatografijom na silikagel GF pločama. Dobivena je bijela krutina (7,05 mg, 7,8%). ES-MS: 433,27 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 600 MHz, δ /ppm): 12,75 (bs, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,63-7,58 (m, 2H), 7,21 (tt, $J=9,3, 2,4$ Hz, 1H), 5,34 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,20 (s, 3H).

***N*-[4-(4-cijanofenil)thiazol-2-il]-2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)acetamid (14)**

U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(2-amino-tiazol-4-il)-benzonitril (44,15 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana sa smjesom diklormetan:izopropanol=7:3 (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 40:1 -> diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (33,6 mg, 38%). ES-MS: 422,07 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 600 MHz, δ /ppm): 12,84 (bs, 1H), 8,11-8,07 (m, 3H), 7,96 (s, 1H), 7,93-7,90 (m, 2H), 5,36 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,18 (s, 3H).

2-(1,3-dimetil-2,6-diokso-purin-7-il)-N-[4-[4 (trifluorometil)fenil] tiazol-2-il]acetamid (15)

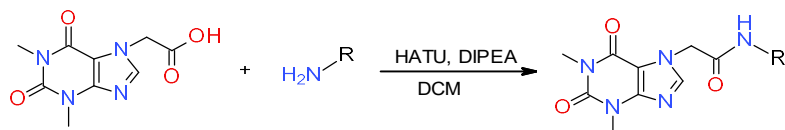
U otopinu teofilin-7-otene kiseline (50 mg, 0,21 mmol) u diklormetanu (sušen na sitima 4Å, 4 ml) dodan je HATU (240 mg, 0,63 mmol) i DIPEA (109,8 µl, 0,63 mmol). Nakon 6 sati miješanja dodan je 4-(4-trifluorometilfenil)tiazol-2-ilamin (51,29 mg, 0,21 mmol). Miješanje je nastavljeno preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je uparena pri sniženom tlaku te ekstrahirana s etil-acetatom (80 mL) i NaHCO₃ (2x5 mL). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtiran i propušten kroz fazni separator. Sirovi produkt je uparen pod sniženim tlakom i pročišćen kolonskom kromatografijom (eluens: diklormetan:metanol= 50:1). Dobivena je bijela krutina (44,5 mg, 45,63%). ES-MS: 465,12 [M+H]⁺.

¹H NMR (DMSO- δ_6 , 400 MHz, δ /ppm): 12.85 (bs, 1H), 8.11 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 5.35 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.18 (s, 3H).

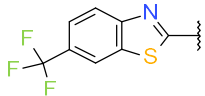
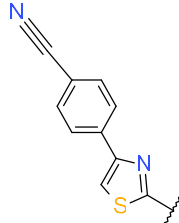
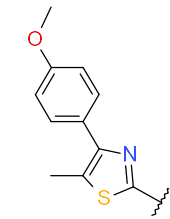
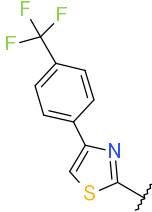
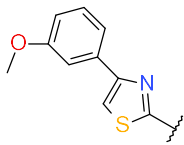
4. Rezultati i rasprava

4.1. Sinteza tiazolamidnih derivata

Uspješno su sintetizirani tiazolamidni derivati teofilin-7-octene kiseline u svrhu ispitivanja njihovih bioloških aktivnosti. Dobiveni spojevi podijeljeni su u 3 grupe ovisno o tiazolu.



Spoj	R	Spoj	R
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	

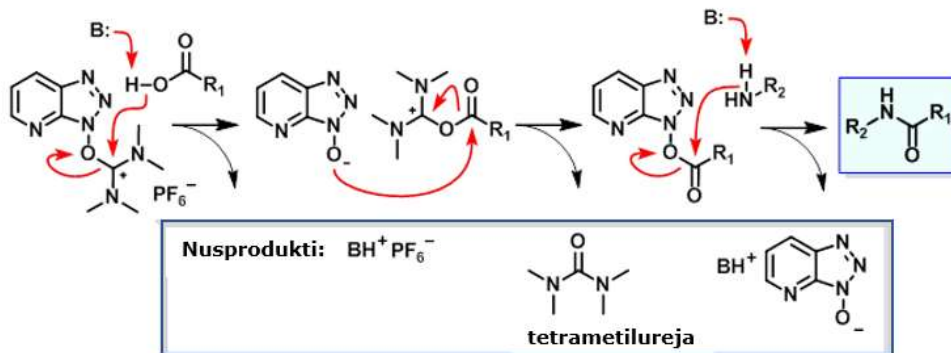
6		14	
7		15	
8			

Slika 12. Reakcija amidacije i prikaz sintetiziranih derivata.

Reakcije amidacije provedene su na jednak način korištenjem HATU (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinij-3-oksidiheksafluorofosfata) za aktivaciju kiseline. U reakcijsku smjesu najprije su dodani teofilin-7-octena kiselina, DIPEA (diizopropiletilamin) i HATU u diklormetanu (Slika 12.). Nakon aktivacije karboksilne kiseline, koje je trajalo otprilike 6 sati, dodan je amin. Završetak reakcije provjeren je snimanjem 2 minutnog UPLC-MS/UV spektra u kiselom i lužnatom mediju.

4.2. Mehanizam HATU/DIPEA amidacije

Na slici 13. prikazan je mehanizam aktivacije karboksilne kiseline pomoću HATU uz prethodnu deprotonaciju karboksilne kiseline koristeći tzv. Hünigovu bazu, odnosno DIPEA, i naknadnu *N*-acilaciju uz nastajanje amidne veze.



Slika 13. Prikaz mehanizma amidacije pomoću baze (DIPEA) i HATU. Po uzoru na (35).

Ove reakcije najčešće se izvode u tri različita reakcijska koraka: 1. deprotonacija karboksilne kiseline od strane baze (DIPEA) uz nastanak karboksilatnog aniona te napad nastalog aniona na ugljikov atom s nedostatkom elektrona u HATU, 2. reakcija nastalog HOAt aniona s aktiviranom kiselinom uz nastajanje aktiviranog OAt estera, 3. dodavanje nukleofila (amin) u reakciju – nukleofilni napad na aktivirani ester uz nastanak amidne veze.

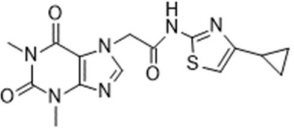
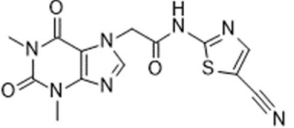
4.3. Rezultati in silico PASS analize

Rezultati PASS predviđanja interpretiraju se i koriste na sljedeći način:

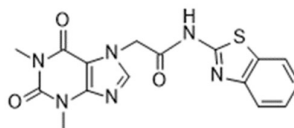
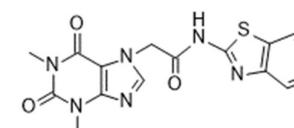
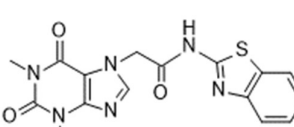
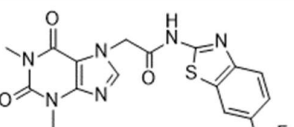
1. Samo se aktivnosti $\text{Pa} > \text{Pi}$ smatraju mogućima, odnosno uzimaju se u obzir kao potencijalna aktivnost za ispitivani spoj
2. Ako je $\text{Pa} > 0,7$, velika je mogućnost eksperimentalnog pronalaska aktivnosti
3. Ako je $0,5 < \text{Pa} < 0,7$, šanse eksperimentalnog pronalaska aktivnosti su manje, ali šansa da se pronađe strukturno novi spoj je veća.

Svi sintetizirani spojevi analizirani su korištenjem in silico PASS analize te su u tablici sažete aktivnosti svakoga spoja iz pojedine grupe uz pripadajuće Pa i Pi vrijednosti. Aktivnosti su hijerarhijski poredane od najviše vjerojatnosti prema najnižoj. Podebljane su aktivnosti koje imaju $\text{Pa} > 0,7$ i koje bi se eksperimentalno mogle testirati.

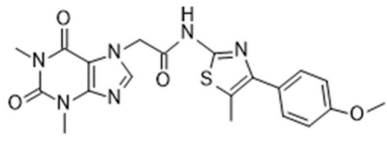
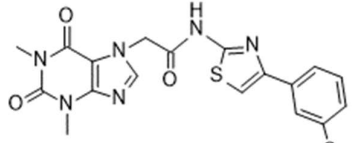
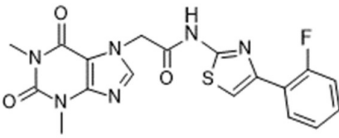
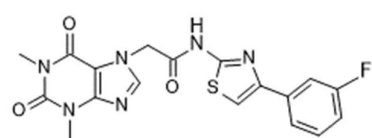
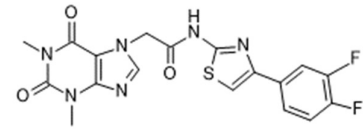
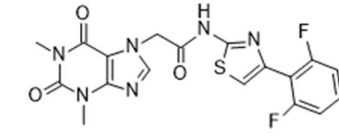
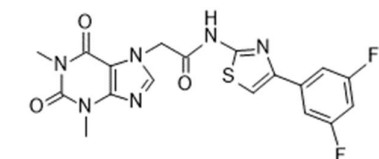
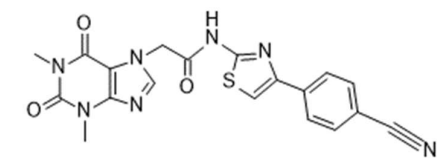
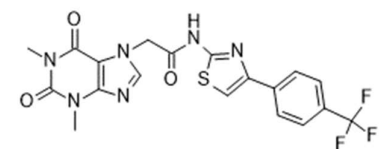
Tablica 3. Rezultati aktivnosti tiazolnih derivata 7-TAA (1-2).

Tiazolni derivati					
 <p>1</p>			 <p>2</p>		
Pa	Pi	Aktivnost	Pa	Pi	Aktivnost
0,707	0,039	Nootropik	0,649	0,009	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze
0,626	0,004	Imunomodulator	0,494	0,030	Inhibitor signalnih puteva transdukcije
0,624	0,005	Inhibicija transkripcijskog faktora STAT	0,525	0,081	Stimulator funkcije bubrega
0,593	0,014	Inhibitor CAMP fosfodiesteraze	0,440	0,004	Antagonist adenozijskog receptora
0,564	0,003	Antagonist adenozijskog receptora	0,465	0,052	Vazodilatator, periferni

Tablica 4. Rezultati aktivnosti benzo[d]tiazolnih derivata 7-TAA (3-6).

Benzo[d]tiazolni derivati					
 <p>3</p>			 <p>4</p>		
Pa	Pi	Aktivnost	Pa	Pi	Aktivnost
0,736	0,005	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze	0,775	0,004	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze
0,715	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,656	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,680	0,016	Respiratorni analeptik	0,610	0,020	Vazodilatator, periferni
0,686	0,045	Nootropik	0,581	0,017	CYP1A2 supstrat
0,639	0,016	Vazodilatator, periferni	0,586	0,024	Respiratorni analeptik
0,606	0,003	Antagonist adenozijskih receptora	0,551	0,009	Antiparkinsonik
 <p>5</p>			 <p>6</p>		
0,682	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,701	0,041	Nootropik
0,682	0,007	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze	0,614	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,618	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora	0,608	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora
0,612	0,005	Imunomodulator	0,613	0,012	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze
0,603	0,005	Supstrat flavin sadržavajuće monoooksigenaze (FMO)	0,612	0,018	Regulator metabolizma nukleotida

Tablica 5. Rezultati aktivnosti 4-feniltiazolnih derivata 7-TAA (**7-15**).

4-feniltiazolni derivati					
 <p>7</p>			 <p>8</p>		
Pa	Pi	Aktivnost	Pa	Pi	Aktivnost
0,805	0,003	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,664	0,008	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze
0,771	0,004	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze	0,548	0,003	Antagonist adenozijskih receptora
0,673	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora	0,542	0,013	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,650	0,003	Antagonist adenozijskih receptora	0,521	0,040	Vazodilatator, periferni
 <p>9</p>			 <p>10</p>		
0,802	0,003	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,781	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,719	0,036	Nootropik	0,715	0,037	Nootropik
0,640	0,004	Imunomodulator	0,656	0,003	Antagonist adenozijskih receptora
0,624	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora	0,651	0,004	Imunomodulator
0,617	0,003	Agonist adenozijskog receptora	0,622	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora
 <p>11</p>			 <p>12</p>		
0,757	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,747	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,690	0,044	Nootropik	0,657	0,003	Antagonist adenozijskih receptora
0,639	0,003	Antagonist adenozijskih receptora	0,640	0,004	Imunomodulator
0,636	0,004	Imunomodulator	0,604	0,005	Inhibitor transkripcijskog faktora
 <p>13</p>			 <p>14</p>		
0,801	0,003	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT	0,740	0,005	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze
0,762	0,025	Nootropik	0,713	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,670	0,003	Antagonist adenozijskih receptora	0,692	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora
0,646	0,004	Imunomodulator	0,652	0,003	Antagonist adenozijskih receptora
 <p>15</p>					

0,708	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT			
0,683	0,004	Inhibitor transkripcijskog faktora			
0,677	0,008	Inhibitor cAMP fosfodiesteraze			
0,686	0,045	Nootropik			

U tablici 3. prikazani su rezultati predviđanja spektra biološke aktivnosti za spojeve 1 i 2. Budući da spoj 1 ima samo jednu vrijednost $P_a > 0,7$, najveća je vjerojatnost da će se ta aktivnost eksperimentalno dokazati. Što se tiče benzo[d]tiazolnih derivata, spoj 3 bi eksperimentalno najvjerojatnije pokazao inhibiciju cAMP fosfodiesteraze (kao i spoj 4) te transkripcijskog faktora STAT, dok bi spoj 6 mogao djelovati kao nootropik, odnosno kognitivni pojačivač. Kod 4-feniltiazolnih derivata najviše spojeva ima vjerojatnost djelovanja kao inhibitor transkripcijskog faktora STAT, cAMP fosfodiesteraze te kao nootropik. Konačno, rezultati pokazuju da sve tri skupine spojeva imaju tri zajedničke aktivnosti sa vrijednošću $P_a > 0,7$, a to su inhibicija transkripcijskog faktora STAT, inhibicija cAMP fosfodiesteraze te nootropno djelovanje.

Iako s povećanjem vrijednosti P_a raste mogućnost eksperimentalnog pronalaženja određene aktivnosti, ove rezultate treba uzeti s dozom sumnje. Vjerojatnost P_a odražava sličnost strukture ispitivane molekule sa strukturama molekula koje se nalaze u skupu za učenje i čija je biološka aktivnost dokazana. Stoga, može se dogoditi da molekula koja ima strukturu netipičnu za ovaj skup za učenje pokaže nisku P_a vrijednost, te čak $P_a < P_i$.

Ukoliko se držimo kriterija $P_a > 0,7$, šanse za pronalaženje eksperimentalne aktivnosti su prilično visoke, ali pronađeni spojevi mogu biti bliski strukturni analozi poznatih lijekova, a ako pak odaberemo raspon $0,5 < P_a < 0,7$, šanse za otkrivanje eksperimentalne aktivnosti bit će manje, ali će spojevi biti manje slični poznatim farmaceutskim agensima.

5. Zaključak

Sinteza derivata teofilin-7-octene kiseline i istraživanje njihovih bioloških učinaka privlačna je istraživačima zbog mogućnosti pronalaženja novih derivata poželjnih bioloških učinaka. U literaturi se može pronaći veliki broj istraživanja koja opisuju protutumorske, antimikobakterijske, hipoglikemijske i antiastmatične učinke raznih derivata teofilin-7-octene kiseline.

Reakcije amidacije su posljednjih godina jedna od najčešće korištenih reakcija u izgradnji biološki aktivnih spojeva i mnogi lijekovi u kliničkoj primjeni u svojoj strukturi sadrži upravo amidnu vezu.

U ovom radu reakcijama amidacije sintetizirano je 15 tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline podijeljenih u tri skupine: a) tiazolni derivati **1-2**, b) benzo[d]tiazolni derivati **3-6** i c) 4-feniltiazolni derivati **7-15**.

Reakcije amidacije provedene su korištenjem HATU reagensa za aktivaciju kiseline i baze DIPEA. Većina spojeva je uspješno pročišćena flash kolonskom kromatografijom, pri čemu se kao najbolja mobilna faza pokazala smjesa diklormetan:metanol.

Strukture spojeva izvedene su na temelju ^1H NMR spektara i m/z vrijednosti dobivenih spektrometrijom masa. Sintetiziranim spojevima će se naknadno ispitati biološka aktivnost na potencijalne mete dobivene in silico analizom PASS. Kao statistički značajne mete djelovanje ovih derivata predviđeni su transkripcijski čimbenik STAT, cAMP fosfodiesteraza, a spojevi bi mogli imati i nootropno djelovanje.

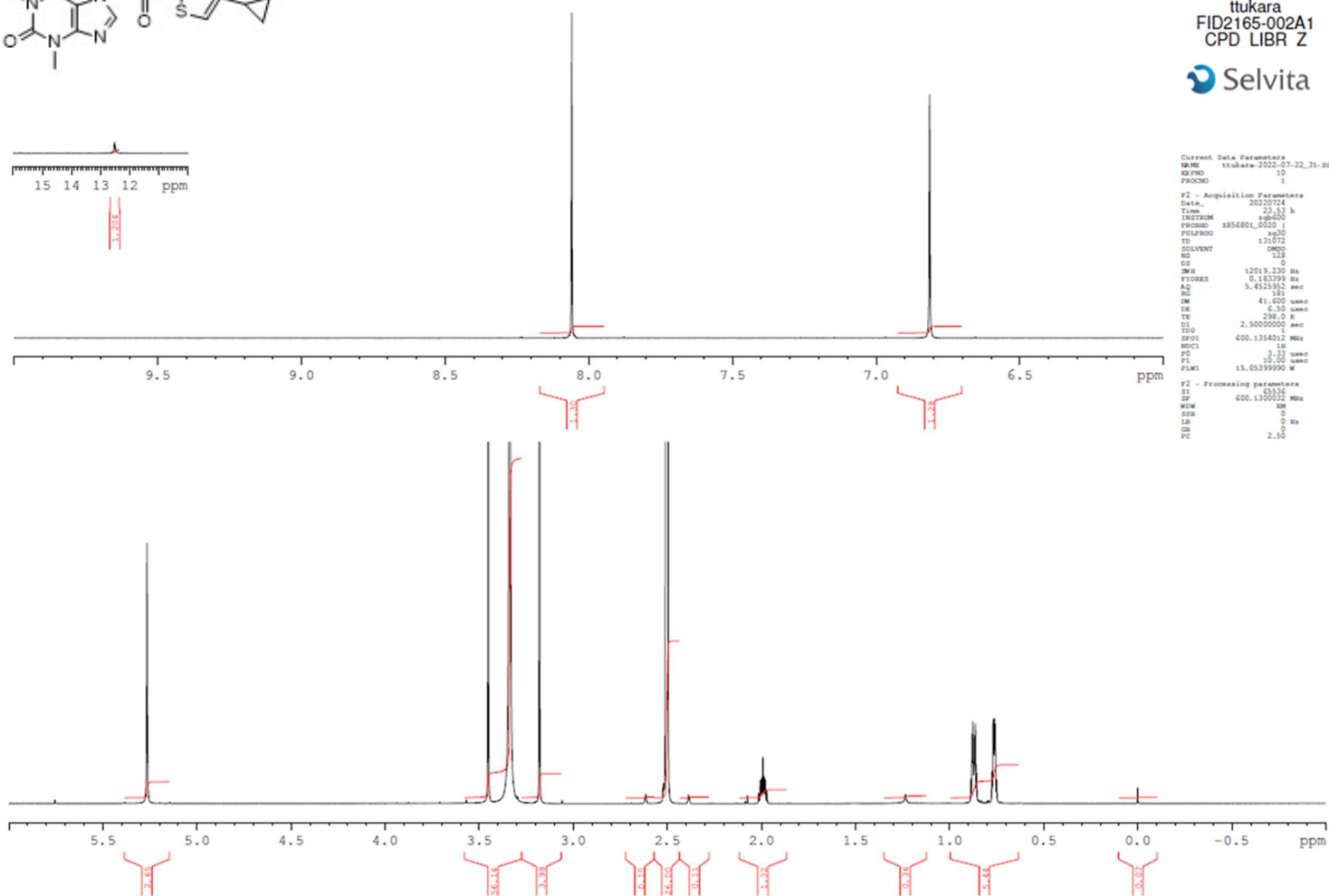
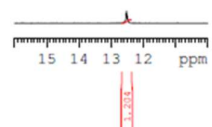
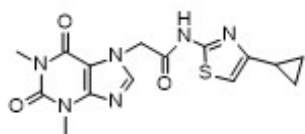
6. Literatura

1. Montaña LM, Sommer B, Gomez-Verjan JC, Morales-Paoli GS, Ramírez-Salinas GL, Solís-Chagoyán H, et al. Theophylline: Old Drug in a New Light, Application in COVID-19 through Computational Studies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
2. Voynikov Y, Stavrakov G, Tencheva J, Peikov P. Novel leucine derived amides of theophylline-7-acetic acid. *Comptes Rendus L'Academie Bulg des Sci.* 2013;66(10):1399–404.
3. Shahzadi I, Zahoor AF, Parveen B, Rasul A, Raza Z, Ahmad S, et al. Acefylline Derivatives as a New Class of Anticancer Agents: Synthesis, Molecular Docking, and Anticancer, Hemolytic, and Thrombolytic Activities of Acefylline-Triazole Hybrids. *J Chem.* 2022;2022.
4. Ye J, Mao L, Xie L, Zhang R, Liu Y, Peng L, et al. Discovery of a Series of Theophylline Derivatives Containing 1,2,3-Triazole for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Pharmacol.* 2021;12(October):1–12.
5. Barnes PJ. Theophylline. 2013;1–19.
6. Barnes PJ. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: New horizons. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):334–9.
7. Chang YL, Hsu YJ, Chen Y, Wang YW, Huang SM. Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017;8(60):101461–74.
8. Voynikov Y, Momekov G, Peikov P, Stavrakov G. Cytotoxicity assay on several theophylline-7-acetic acid amides with amino acids. *Pharmacia.* 2014;61(2):12–6.
9. Tsvetkova B, Tencheva J, Peikov P. Alkaline, enzymatic hydrolysis and physicochemical properties of 7-theopyllineacetic acid derivatives. *J Food Drug Anal.* 2003;11(3):191–4.
10. Shahzadi I, Zahoor AF, Rasul A, Mansha A, Ahmad S, Raza Z. Synthesis, hemolytic studies, and in silico modeling of novel acefylline-1,2,4-triazole hybrids as potential anti-cancer agents against MCF-7 and A549. *ACS Omega.* 2021;6(18):11943–53.
11. Voynikov Y, Valcheva V, Momekov G, Peikov P, Stavrakov G. Theophylline-7-acetic acid derivatives with amino acids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic Med Chem Lett [Internet].* 2014;24(14):3043–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.026>
12. Doregirae A, Kermani ET, Khabazzadeh H, Pouramiri B. Synthesis of new 1,3-thiazole derivatives; using 1-(4-carbamoylphenyl)-3-

- methylthiourea and 1-methyl-3-(quinolin-8-yl)thiourea as starting materials. *J Chil Chem Soc.* 2015;60(3):3021–3.
13. Yurttas L, Özkay Y, Karaca Gençer H, Acar U. Synthesis of Some New Thiazole Derivatives and Their Biological Activity Evaluation. *J Chem.* 2015;2015.
 14. Dawood KM, Raslan MA, Abbas AA, Mohamed BE, Abdellattif MH, Nafie MS, et al. Novel Bis-Thiazole Derivatives: Synthesis and Potential Cytotoxic Activity Through Apoptosis With Molecular Docking Approaches. *Front Chem.* 2021;9(August):1–16.
 15. Guo Y, Wang RY, Kang JX, Ma YN, Xu CQ, Li J, et al. Efficient synthesis of primary and secondary amides via reacting esters with alkali metal amidoboranes. *Nat Commun [Internet].* 2021;12(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-25836-5>
 16. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev.* 2009;38(2):606–31.
 17. Sabatini MT, Boulton LT, Sheppard TD. Borate esters: Simple catalysts for the sustainable synthesis of complex amides. *Sci Adv.* 2017;3(9):1–9.
 18. Pedrood K, Bahadorikhalili S, Lotfi V, Larijani B, Mahdavi M. Catalytic and non-catalytic amidation of carboxylic acid substrates [Internet]. Vol. 26, *Molecular Diversity*. Springer International Publishing; 2022. 1311–1344 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10252-0>
 19. Amide coupling reaction in medicinal chemistry. Coupling reagents [Internet]. [cited 2022 Sep 9]. Available from: <https://www.hepatochem.com/amide-coupling-medicinal-chemistry/>
 20. Amide Synthesis [Internet]. [cited 2022 Sep 9]. Available from: <https://www.fishersci.co.uk/gb/en/scientific-products/lab-reporter-europe/chemicals/amide-synthesis.html>
 21. El-Faham A, Albericio F. Morpholine-based immonium and halogenoamidinium salts as coupling reagents in peptide synthesis. *J Org Chem.* 2008;73(7):2731–7.
 22. Sabatini MT, Boulton LT, Sneddon HF, Sheppard TD. A green chemistry perspective on catalytic amide bond formation. *Nat Catal.* 2019;2(1):10–7.
 23. Bering L, Craven EJ, Sowerby Thomas SA, Shepherd SA, Micklefield J. Merging enzymes with chemocatalysis for amide bond synthesis. *Nat Commun.* 2022;13(1):1–10.
 24. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(W1):32–8.

25. Parasuraman S. Prediction of activity spectra for substances. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011;2(1):52–3.
26. Goel RK, Singh D, Lagunin A, Poroikov V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Med Chem Res.* 2011;20(9):1509–14.
27. Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik A V., Druzhilovskii DS, Pogodin P V., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chem Heterocycl Compd.* 2014;50(3):444–57.
28. Anand A, Sharma N, Khurana N. Prediction of Activity Spectra of Substances Assisted Prediction of Biological Activity Spectra of Potential Anti-Alzheimer'S Phytoconstituents. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(16):13.
29. Poroikov V, Filimonov D. PASS: Prediction of biological activity spectra for substances. *Predict Toxicol.* 2005;459–78.
30. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2014;14(11):736–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3818>
31. Yu H, Pardoll D, Jove R. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.
32. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal transducer and activator of transcription (STATs) proteins in cancer and inflammation: Functions and therapeutic implication. *Front Oncol.* 2019;9(FEB).
33. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999;10(1):105–15.
34. Clevenger C V. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol [Internet].* 2004;165(5):1449–60. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63403-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63403-7)
35. Amine to Amide Mechanism - HATU [Internet]. [cited 2022 Sep 11]. Available from: http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm

7. Dodaci



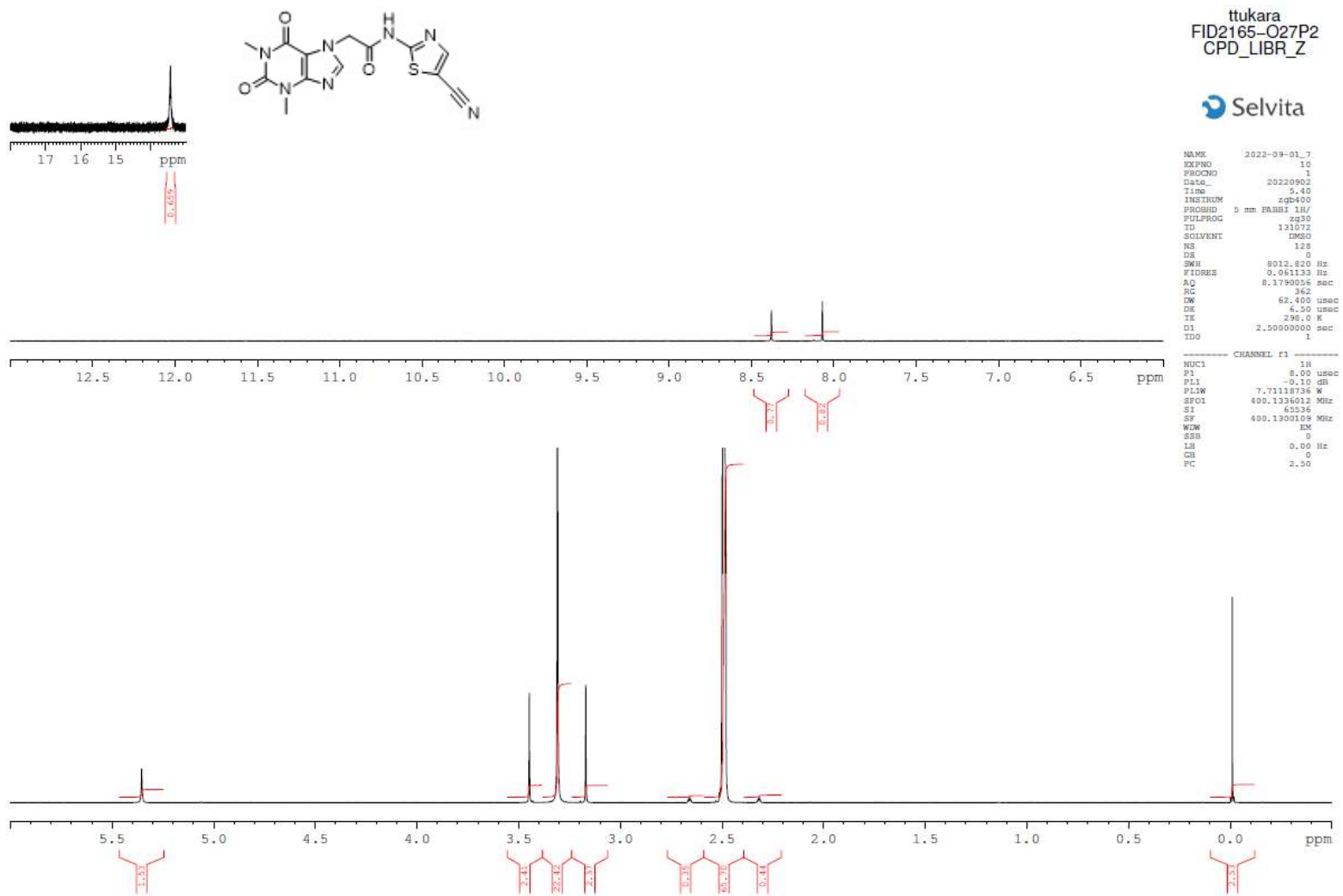
ttukara
FID2165-002A1
CPD LIBR Z

Current Data Parameters
NAME ttukara-2022-07-22_31-006
EXPNO 10
PROCNO 1

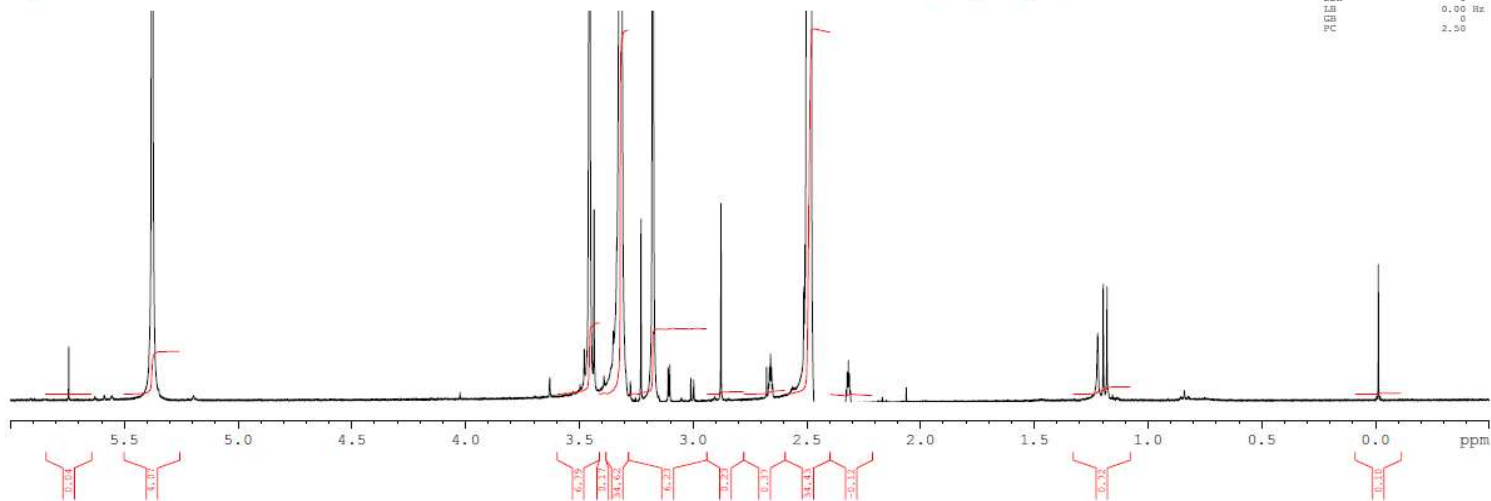
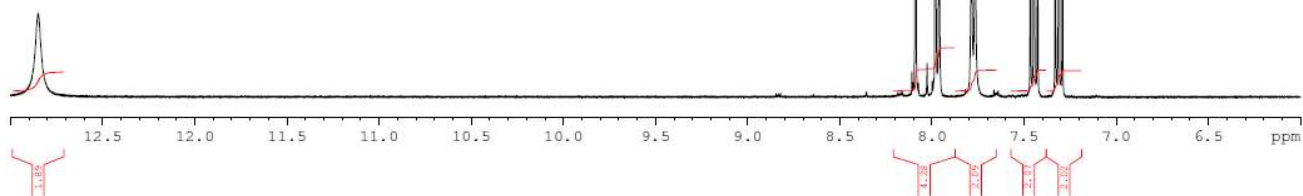
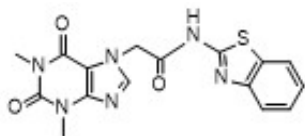
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220724
Time 23:33 h
INSTRUM spect
PROBHD 1H5MMQCPD05 (1
PULPROG zgpg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 128
DS 0
SWH 12019.250 Hz
FIDRES 0.183399 Hz
AQ 5.452992 sec
RG 181
DM 41.000 uant
DE 6.50
TE 298.2 K
TA 2.50000000 sec
TD0
SFO1 600.1354012 MHz
MPC1 14
P1 3.33 uant
P2 10.00 uant
PL1 15.0539990 dB
PL2

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 600.1354012 MHz
WDW EM
SSB 0
LA 0 Hz
GB 0
PC 2.50

Slika 14. ¹H NMR spektar spoja 1.



Slika 15. ^1H NMR spektar spoja 2.



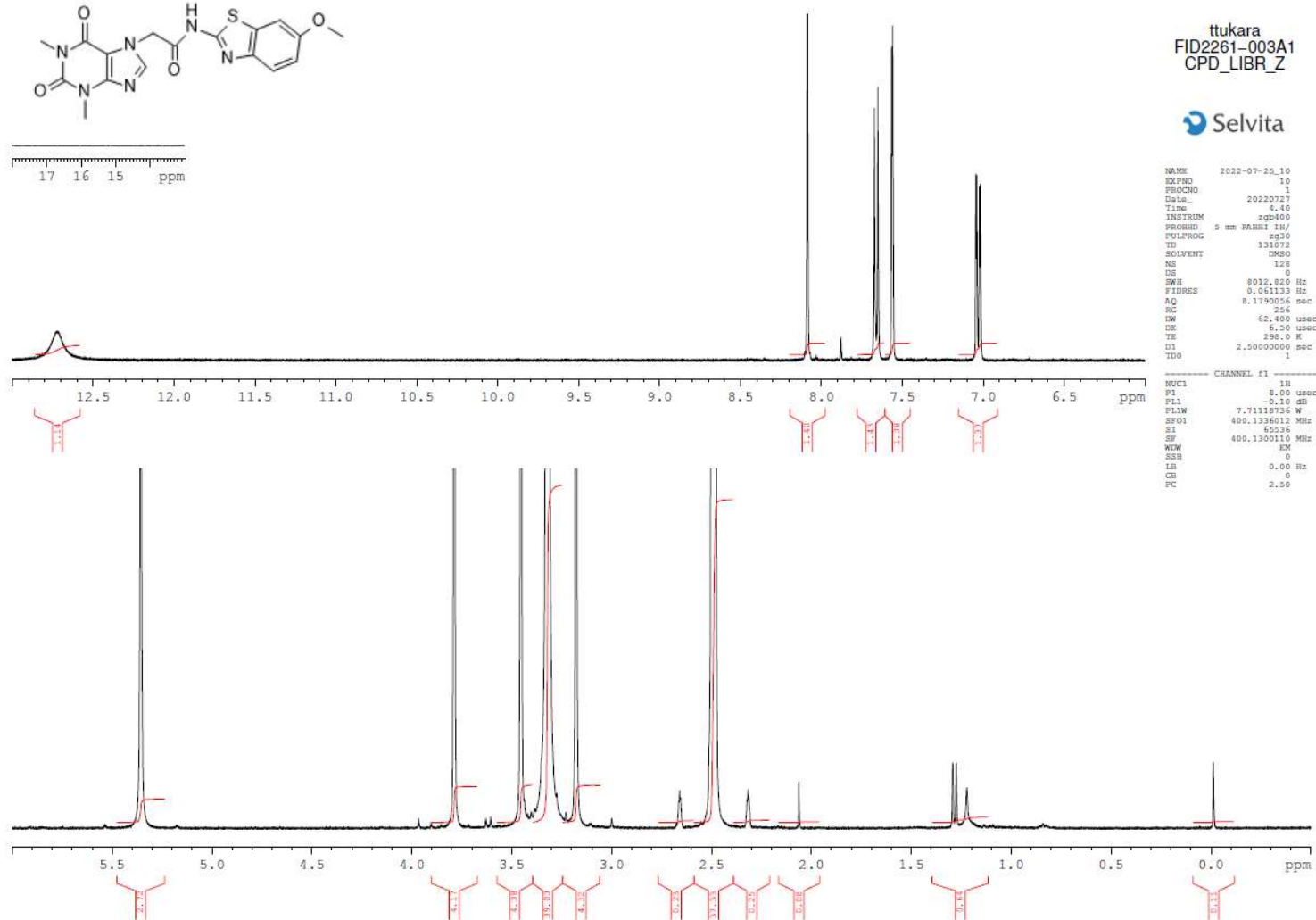
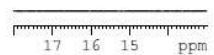
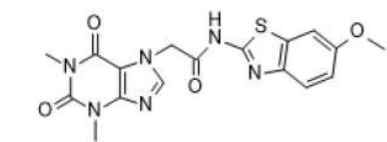
ttukara
FID2165-022A1
CPD_LIBR_Z



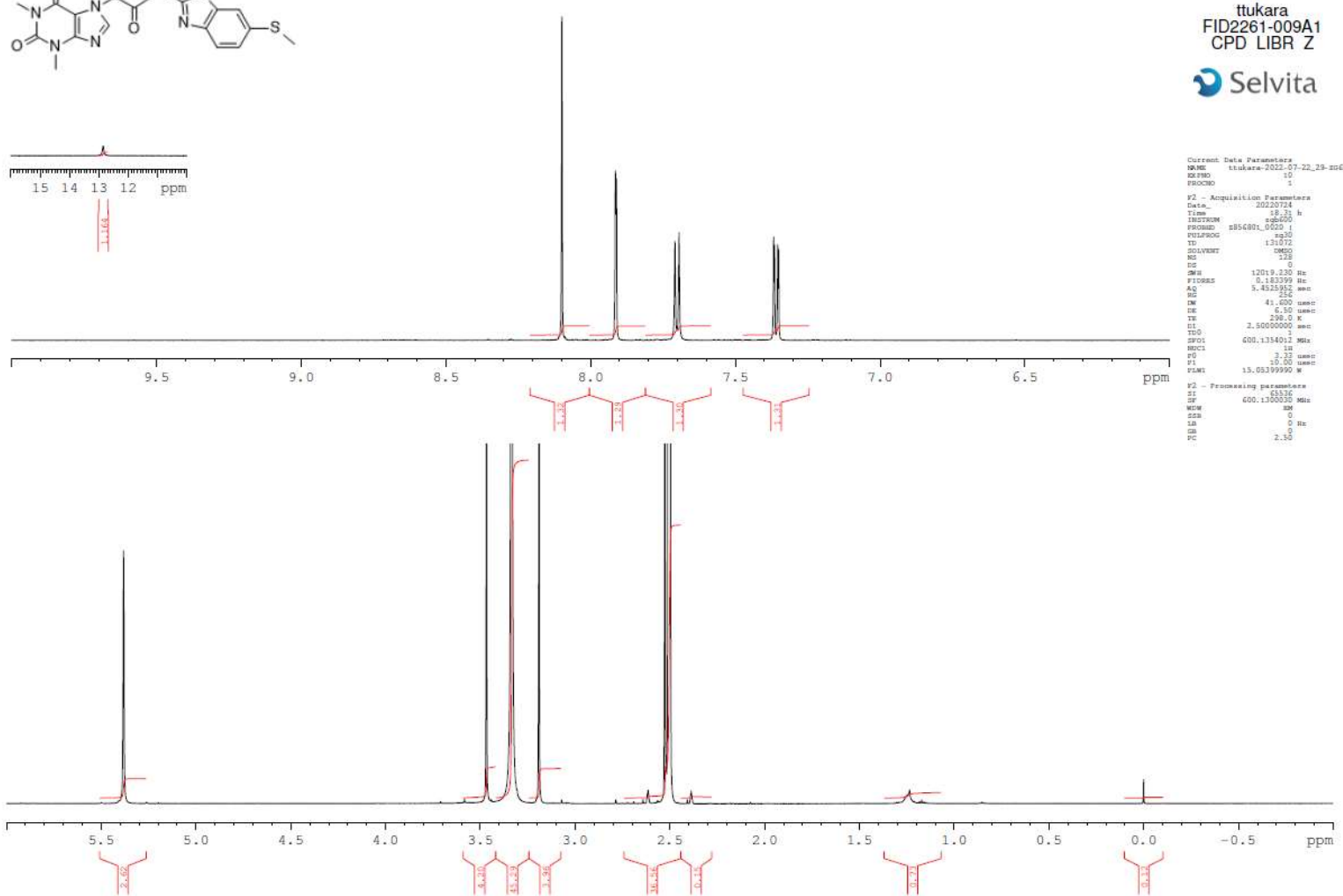
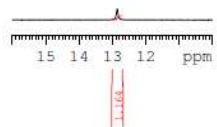
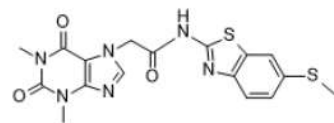
NAME 2022-07-25_11
EXPNO 10
PROCNO 1
Date_ 20220727
Time 10:27
INSTRUM zg30
PROBHD 5 mm PABH1 1H/
PULPROG zg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 128
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.061133 Hz
AQ 8.1790054 sec
RG 256
RC 62.400 usec
DE 8.50 usec
TK 298.0 K
DI 2.5000000 sec
TD 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 0.10 dB
PLW 7.71118736 W
SFO1 400.1326012 MHz
SI 65236
SF 400.1300109 MHz
WIM DM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 2.50

Slika 16. ¹H NMR spektar spoja 3.



Slika 17. ¹H NMR spektar spoja 4.



ttukara
FID2261-009A1
CPD LIBR Z

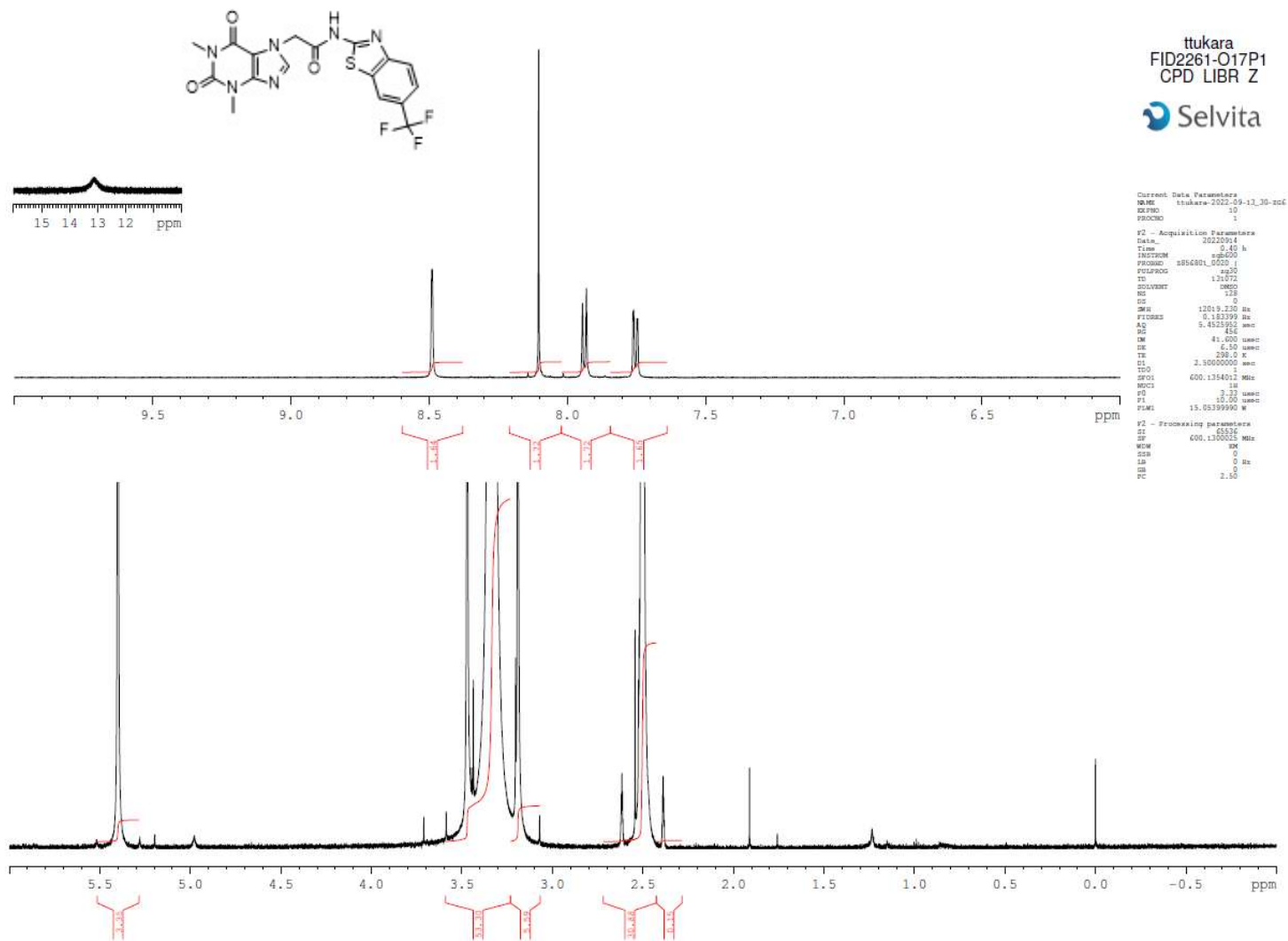


Current Data Parameters
NAME ttukara-2022-07-22-206
EXPNO 10
PROCNO 1

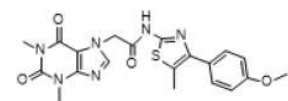
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220724
Time 08:31 h
INSTRUM agd400
PROBHD sB5C01_0020 1
PULPROG zg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 748
DS 8
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.143399 Hz
AQ 2.421362 sec
RG 250
SW 41.4000 sec
DE 6.50 sec
TE 298.0 K
SI 2.50000000 sec
SFO1 600.1354011 MHz
MCH1 14
PC 3.23 sec
F1 12.00 sec
F2 13.05199990 M

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 600.1354011 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0 Hz
PC 2.10

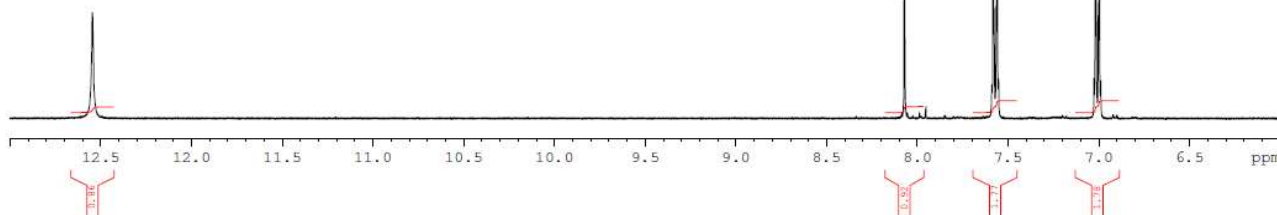
Slika 18. ¹H NMR spektar spoja 5.



Slika 19. ¹H NMR spektar spoja 6.



17 16 15 ppm

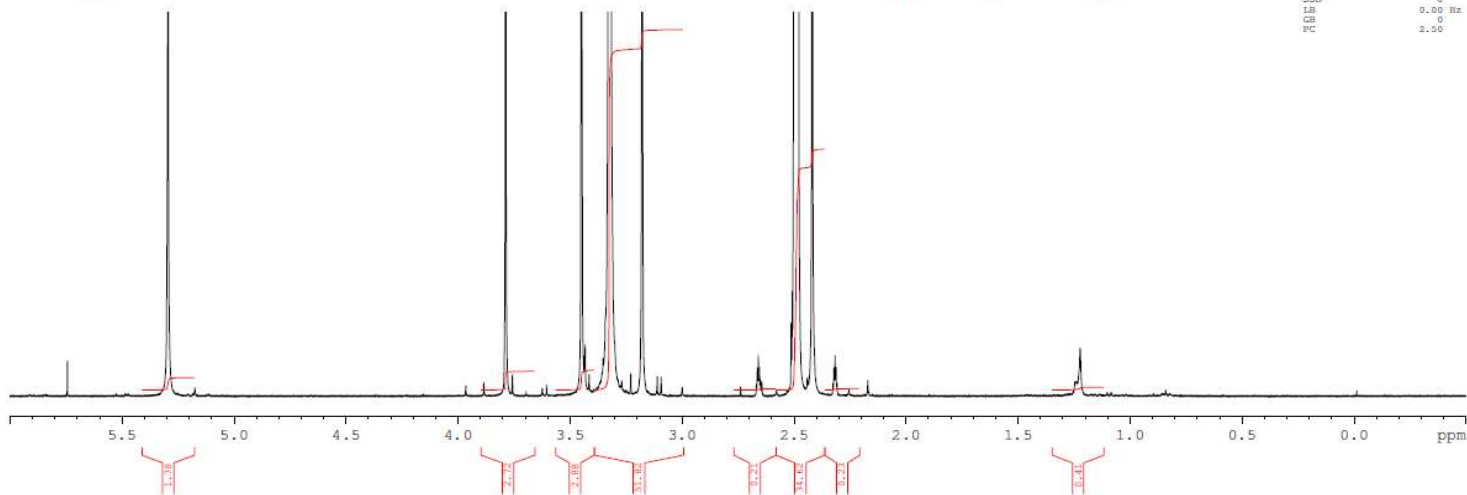


ttukara
FID2165-008A1
CPD_LIBR_Z

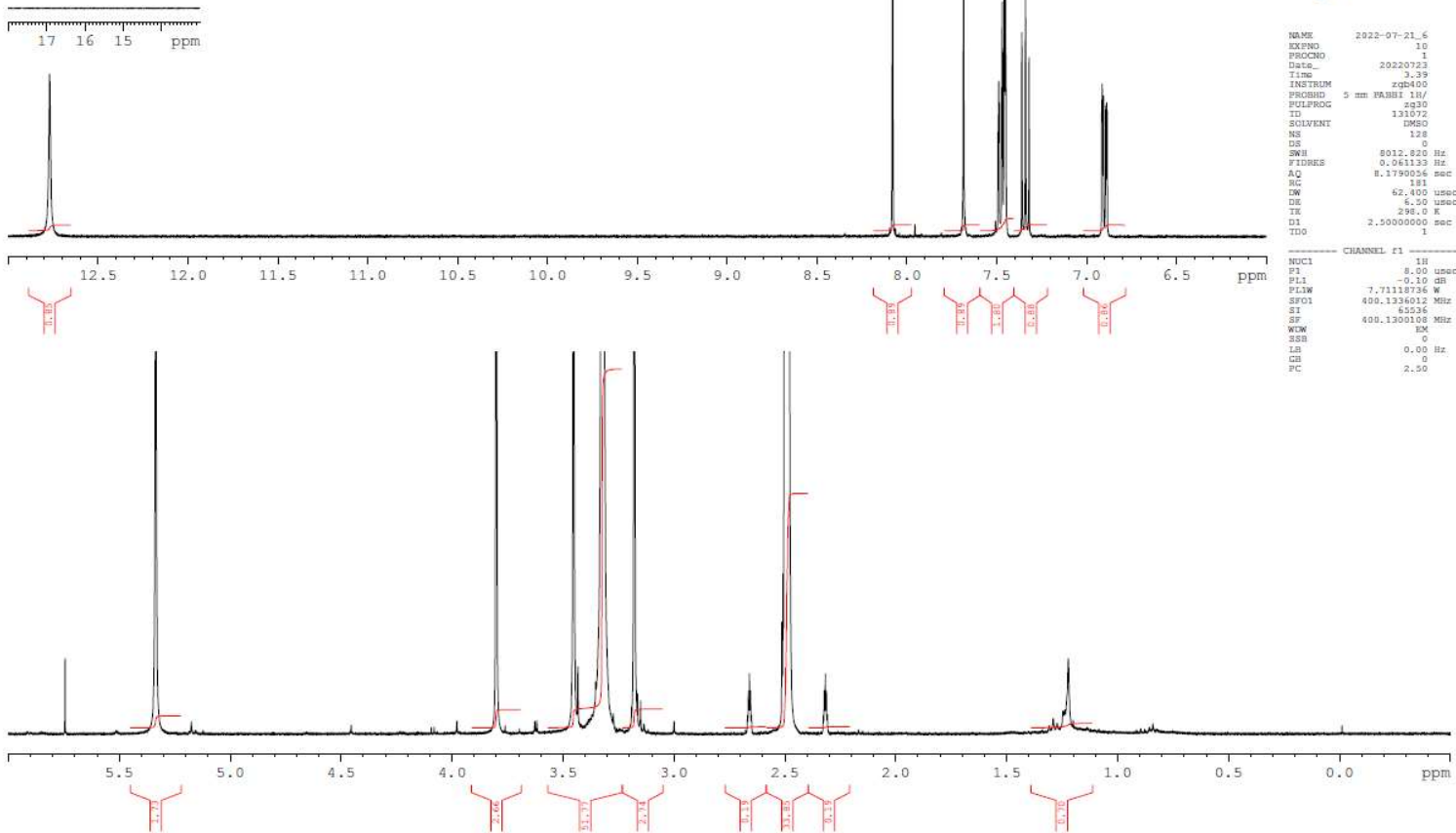
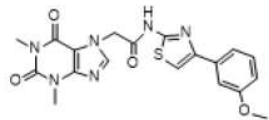


NAME 2022-07-21_7
EXPNO 20
PROCNO 1
DATE_ 20220723
TIME 19.17
INSTRUM zgpg300
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 128
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.061133 Hz
AQ 0.17900056 sec
RG 181
DW 62.400 usec
DE 6.30 usec
TE 298.0 K
D1 2.50000000 sec
TD0 1

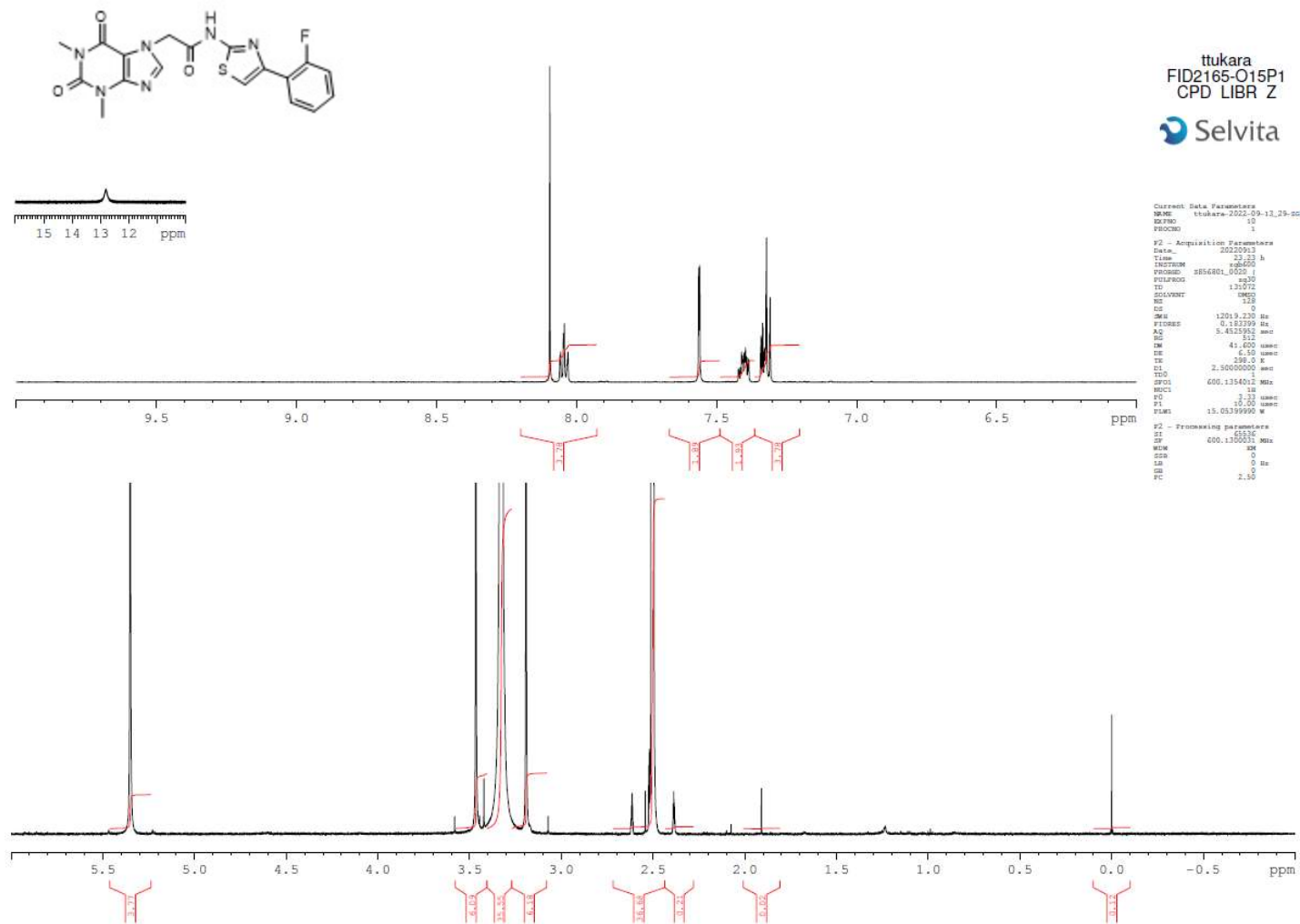
CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 0.10 dB
PLW 7.71319736 W
SFO1 400.1366012 MHz
SI 80536
SF 400.1300158 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 2.10



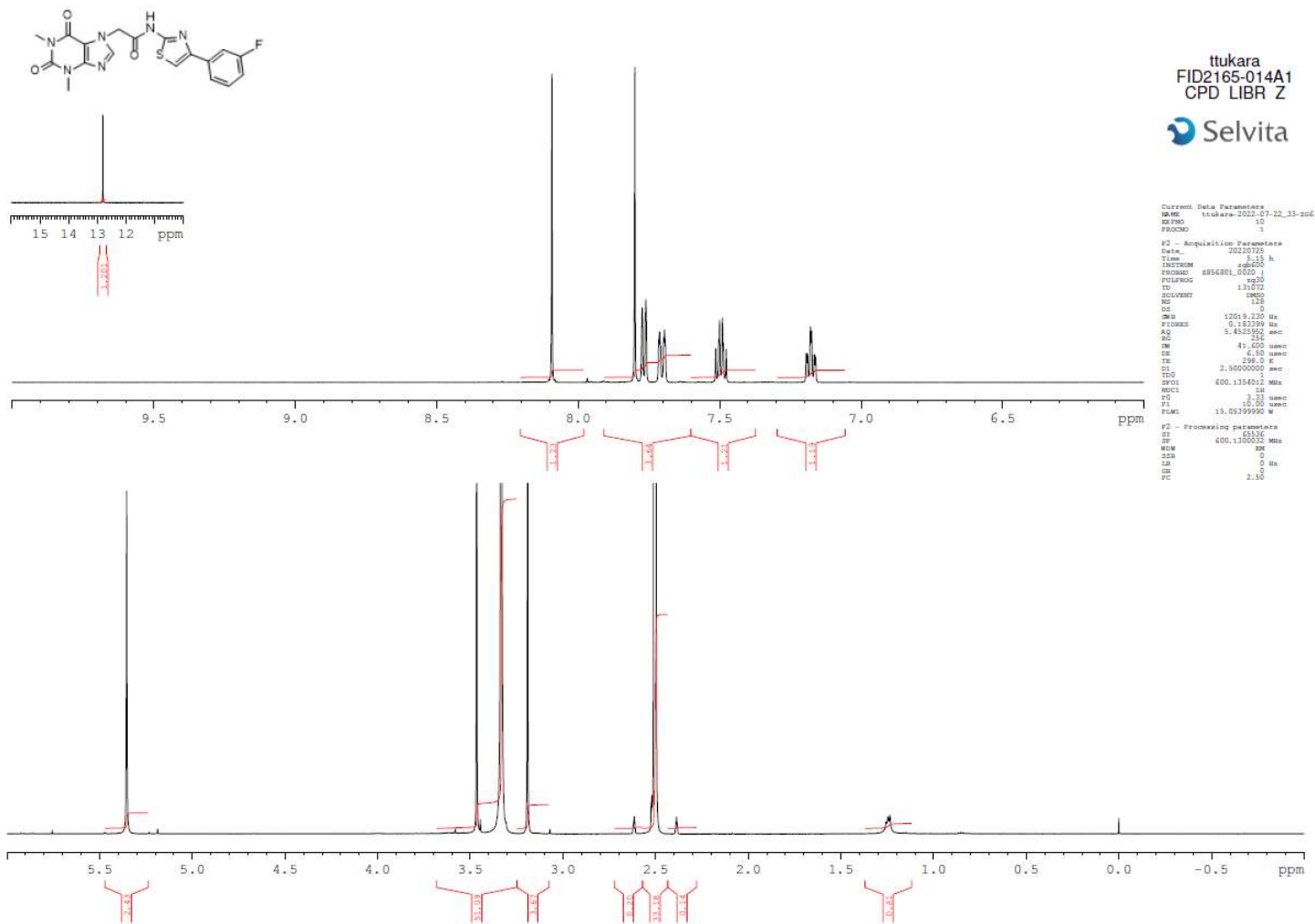
Slika 20. ¹H NMR spektar spoja 7.



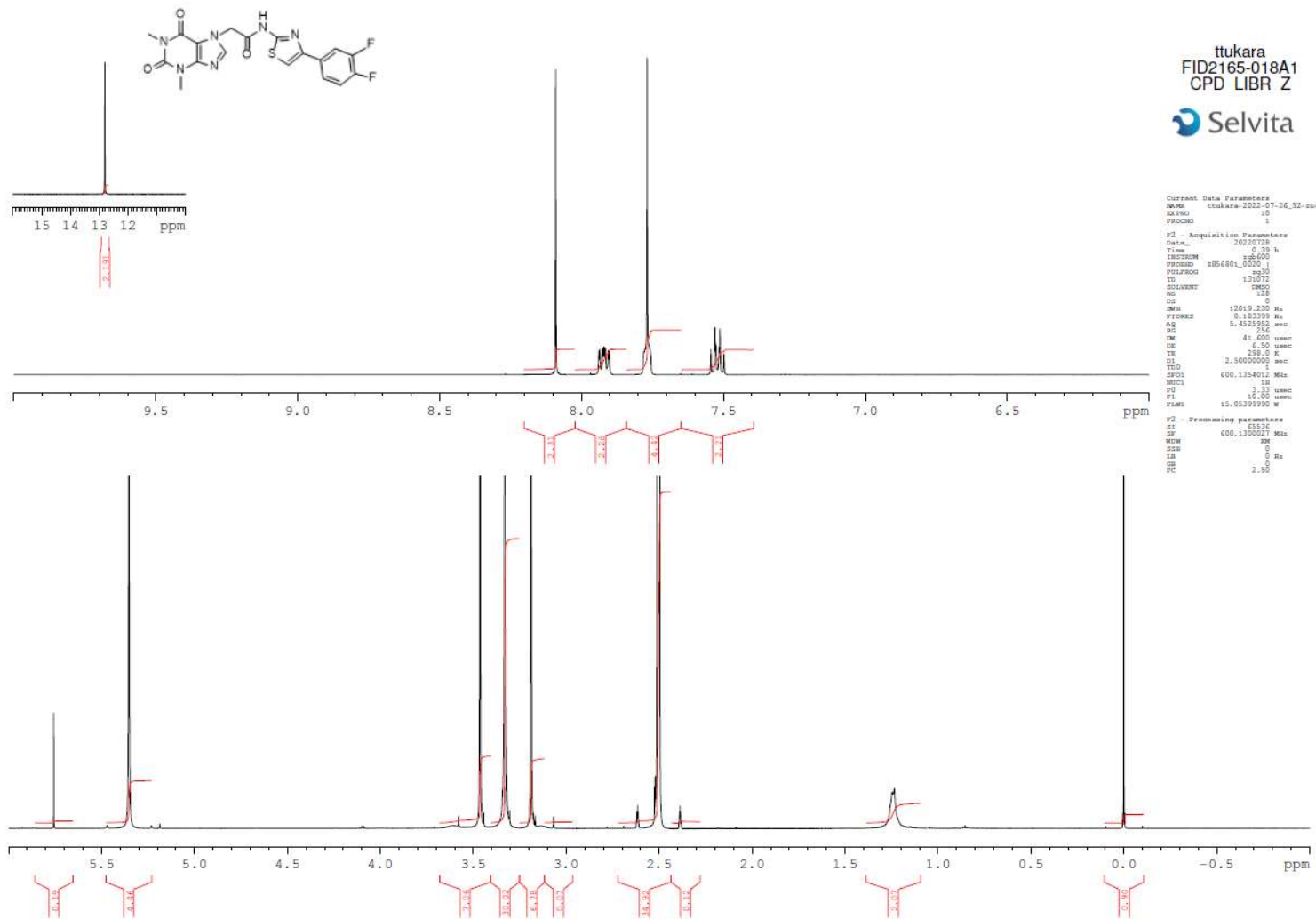
Slika 21. ¹H NMR spektar spoja 8.



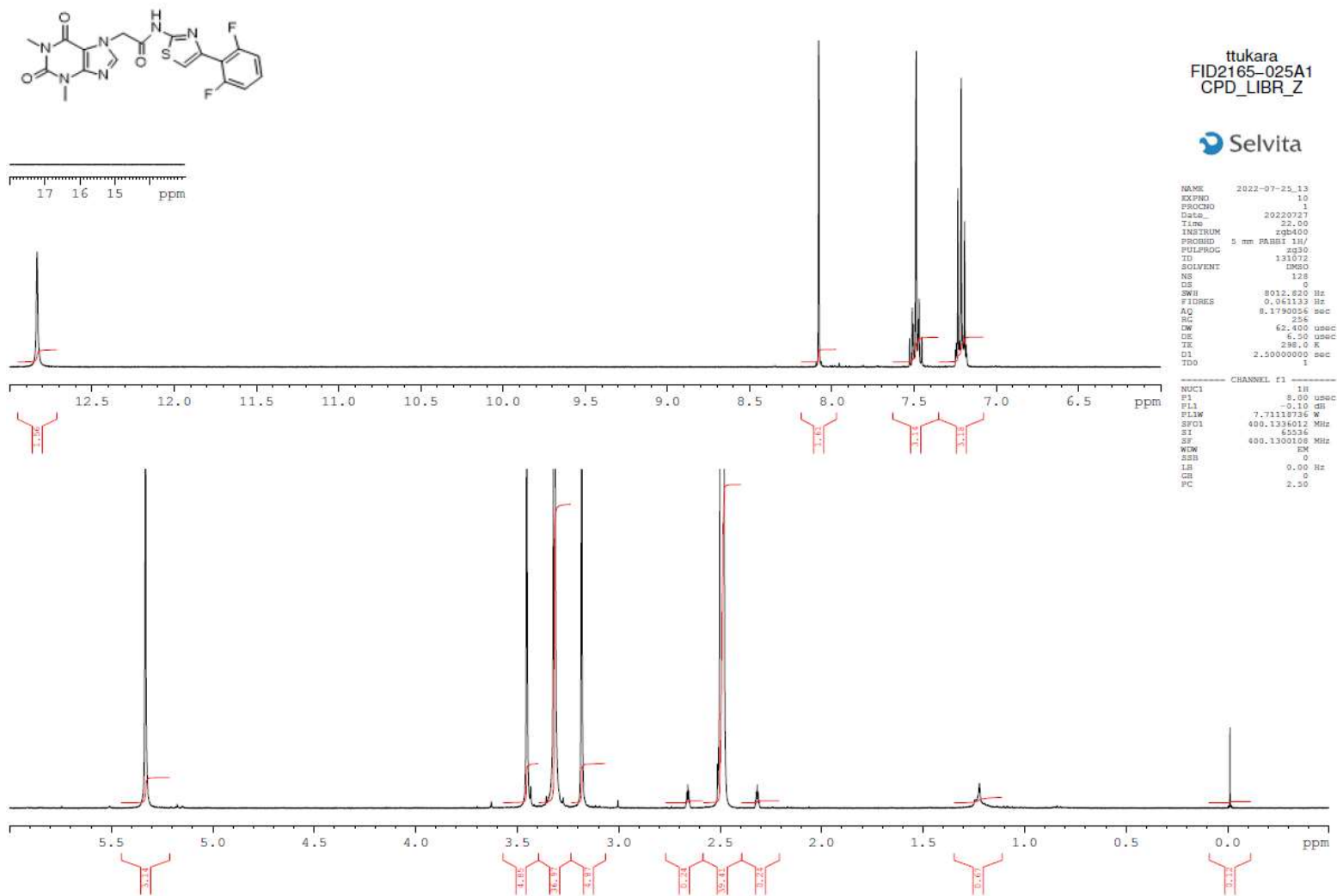
Slika 22. ¹H NMR spektar spoja 9.



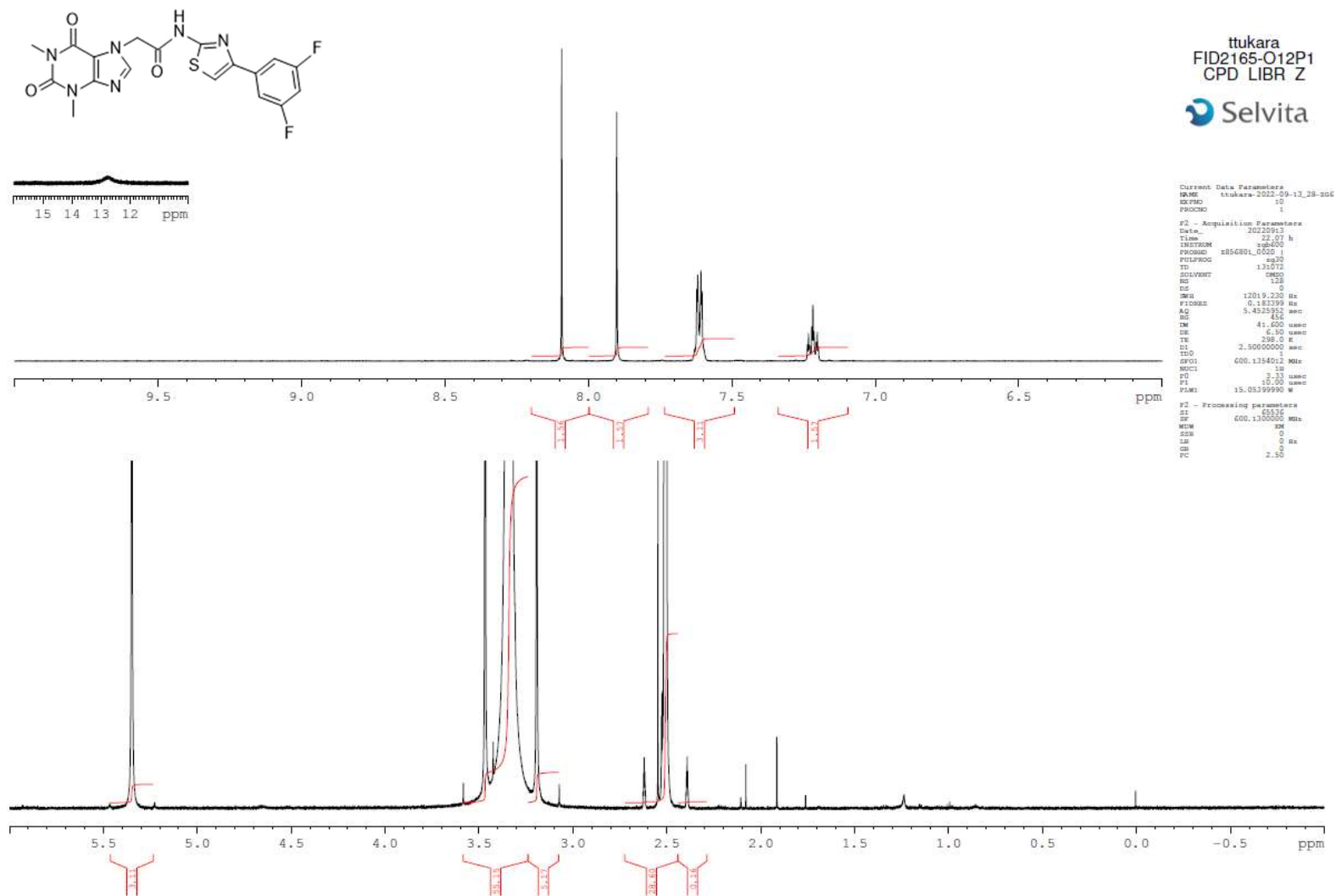
Slika 23. ¹H NMR spektar spoja 10.



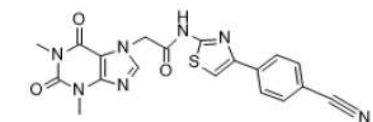
Slika 24. ¹H NMR spektar spoja 11.



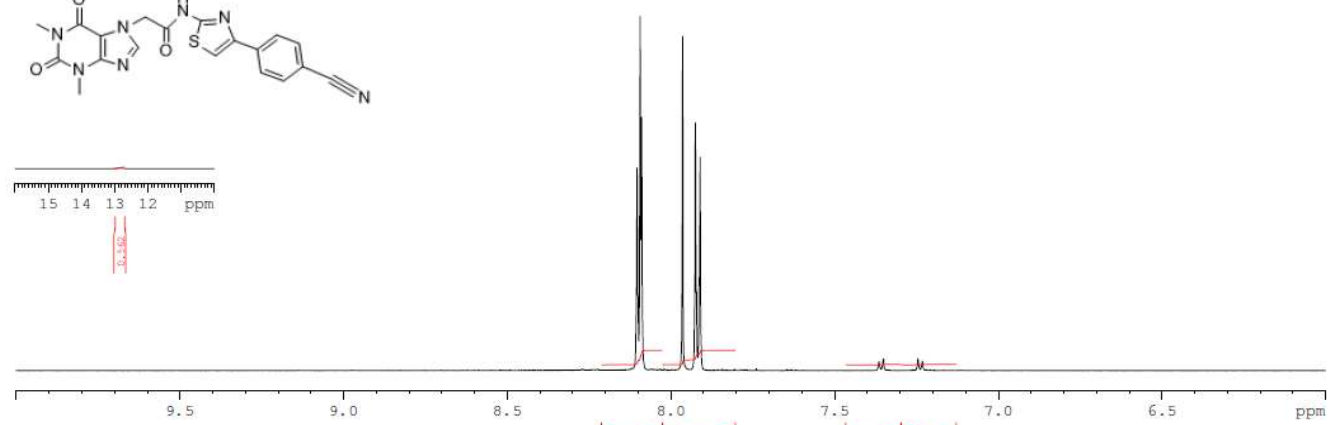
Slika 25. ¹H NMR spektar spoja 12.



Slika 26. ¹H NMR spektar spoja 13.



15 14 13 12 ppm



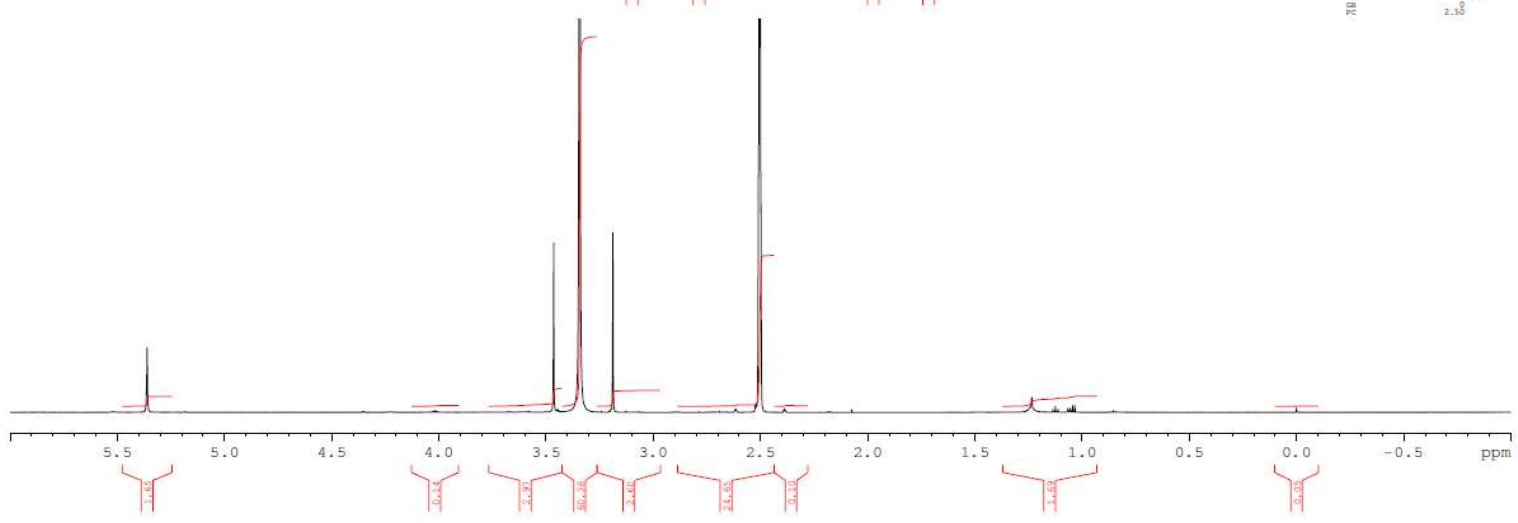
ttukara
FID2165-021A1
CPD LIBR Z



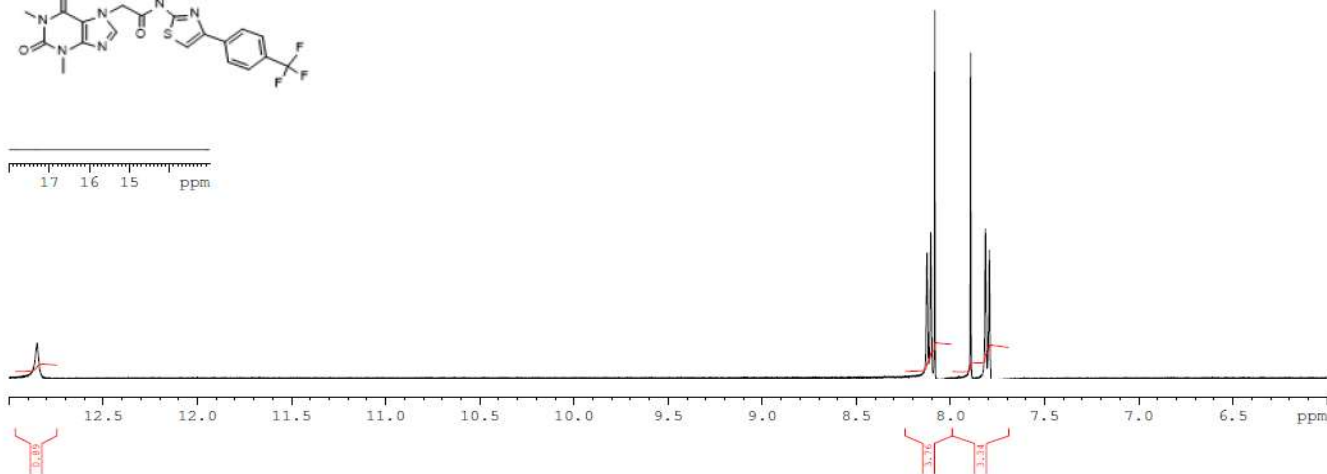
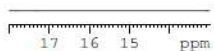
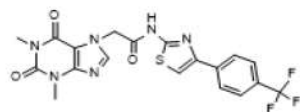
Current Data Parameters
NAME ttukara-2022-07-22_32-206
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220722
Time 7:24 h
INSTRUM aggr400
PROBHD 5BBO1-000 1
PULPROG zg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 2
DS 0
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.182399 Hz
AQ 5.422592 sec
RG 161
SW 41.600 sec
SE 6.50 sec
TE 290.0 K
SI 2.5000000 sec
SFO1 600.1354011 MHz
SFC1 10
SF 600.1354011 MHz
F1 10.0000000 MHz
F2 13.08199990 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65336
SF 600.1350017 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0 Hz
CB 0 Hz
PC 2.50



Slika 27. ¹H NMR spektar spoja 14.

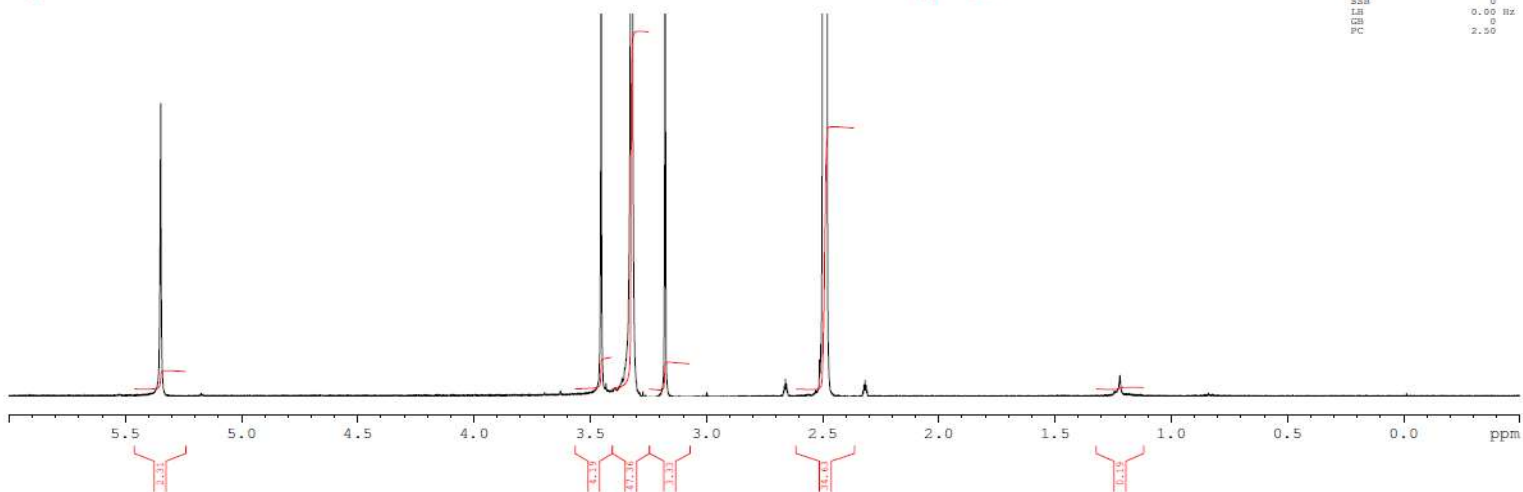


ttukara
FID2165-007A1
CPD_LIBR_Z



NAME 2022-07-21_5
EXPNO 10
PROCNO 1
Date_ 20220722
Time 12.01
INSTRUM zg30400
PROBHD 5 mm PABBI 1H/
PULPROG zg30
TD 131072
SOLVENT DMSO
NS 36
DS 0
SWH 8013.020 Hz
FIDRES 0.061133 Hz
AQ 8.1790056 sec
RG 128
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 2.5000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 0.10 dB
PL1W 7.7118736 W
SFO1 400.1366012 MHz
SI 65536
SF 400.1300108 MHz
WIM EM
SBB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 2.50




Slika 28. ^1H NMR spektar spoja 15.



Tea Tukara

Državljanstvo: hrvatsko  (+385) 994143599 **Datum rođenja:** 24/08/1998

 **E-adresa:** tea.tukara2@gmail.com

 **Adresa:** Josipa Jurja Strossmayera 164, 32252 Otok (Hrvatska)

OBRAZOVANJE | OSPOSOBLJAVANJE

Magistra medicinske kemije

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2020 – Trenutačno]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

Vrsta bodova: ECTS – **Broj bodova:** 120

Sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2017 – 2020]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

Konačna ocjena : 4,58; 85,934%; Magna Cum Laude

Vrsta bodova: ECTS – **Broj bodova:** 180

Završni rad: Uloga period gena u malignim bolestima, mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Elitza Petkova Markova-Car

Opća gimnazija

Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci [2013 – 2017]

Adresa: Trg bana Josipa Šokčevića , 32100 Vinkovci (Hrvatska)

<http://gimnazija-mareljkovica-vk.skole.hr/>

Osnovna škola

Osnovna škola Josipa Lovretića Otok [2005 – 2013]

Adresa: Josipa Jurja Strossmayera 142, 32252 Otok (Hrvatska)

<http://os-jlovretica-otok.skole.hr/>

RADNO ISKUSTVO

Izrada diplomskog rada

Selvita [04/2022 – 07/2022]

Mjesto: Zagreb

Zemlja: Hrvatska

- **Poduzeće ili sektor:** Odgoj I Obrazovanje

Eksperimentalni dio diplomskog rada: " Sinteza tiazolamidnih derivata teofilin-7-octene kiseline radi ispitivanja bioloških učinaka" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine proveden je u Selviti. Tijekom rada u Selviti stekla sam znanja i praksu vezanu uz organsku sintezu heterocikličkih spojeva, pročišćavanje organskih spojeva (flash i preparativna kromatografija) i analitičke tehnike (NMR, UPLC-MS/UV).

Studentski posao

Jadran galenski laboratorij

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Studentski posao u proizvodnji farmaceutskih proizvoda (Vizol, Aqua Maris, Dramina, Aknet) Moje dužnosti su obuhvaćale: kontrolu rada uređaja i reakcija zastoja ili odstupanja te sudjelovanje u njihovom rješavanju, provedbu kontrole procesa u skladu sa specifikacijom, analizu, rezultate i prijavu odstupanja nadređenom te dovršetak proizvodnje i prateće dokumentacije u skladu s GMP zahtjevima.

Laboratorijska stručna praksa

Laboratorij za koloide, polielektrolite i međupovršine, Odjel za biotehnologiju [06/2020 – 07/2020]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Moj rad sastojao se u pripremi otopina različitih udjela nanočestica od silikagela za daljnju analizu te provođenju analiza koristeći UV-Vis spektrofotometar, DLS (Dynamic Light Scattering), PALS (Phase Analysis Light Scattering), automatski titrator i centrifugu.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Duško Čakara

Studentski poslovi

[2017 – 2022]

Zemlja: Hrvatska

Tijekom studiranja imala sam prilike raditi preko student servisa. Od 2017. godine pa sve do 2021. tijekom ljeta sam radila kao sobarica u kompleksu apartmana Amarin u Rovinju. Također, imala sam prilike raditi i na lokalnim izborima u Rijeci kao član biračkog odbora, u trgovini s odjećom (Bombastik) te u proizvodnji farmaceutskih pripravaka u Jadran Galenskom Laboratoriju.

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **hrvatski**

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 **ČITANJE** C1 **PISANJE** C1

GOVORNA PRODUKCIJA C1

GOVORNA INTERAKCIJA C1

njemački

SLUŠANJE B2 **ČITANJE** B2 **PISANJE** B1

GOVORNA PRODUKCIJA B1

GOVORNA INTERAKCIJA

DIGITALNE VJEŠTINE

UCSF Chimera, PyMol, Avogadro, Spark, VMD. / Marvin / Microsoft (Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel, Microsoft Outlook) / Društvene mreže (Academia, ResearchGate, LinkedIn, Facebook, Instagram, Twitter, Youtube, i sl.)

VOZAČKA DOZVOLA: B

