

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jurgis Sūdžius

PIRIMIDINO JUNGINIŲ – POTENCIALIŲ
KARBOANHIDRAZIŲ SLOPIKLIŲ – SINTEZĖ IR
SAVYBĖS

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius 2011

Disertacija rengta 2006–2010 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Sigitas Tumkevičius

(Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P)

Turinys

Naudojamų sutrumpinimų sąrašas	5
Įvadas	6
1. Literatūros apžvalga.....	10
1.1. Karboanhidrazės (CA).....	10
1.1.1 CA funkcija ir pasiskirstymas organizme.....	10
1.1.2. CA aktyviojo centro struktūra ir katalitinio veikimo mechanizmas.....	12
1.2 CA slopikliai	13
1.2.1 Klasikiniai CA slopikliai	13
1.2.1.1. Su cinko jonu besijungianti grupė (CBG)	15
1.2.1.1.1 Sulfonamidai ir jų dariniai	17
1.2.1.1.2. Karboniliniai junginiai – hidroksamatai ir <i>N</i> -hidroksikarbamidai	20
1.2.1.1.3. Borono rūgštys ir fosfonatai	22
1.2.1.1.4. Aromatiniai ir heteroaromatiniai tioliai	23
1.2.1.2 Žiedo struktūros įtaka CBG pKa	24
1.2.1.3 Slopiklio molekulės sąveika su toliausiai nuo katalitinio komplekso nutolusiomis CA aktyviojo centro aminorūgštimis	28
1.2.1.3.1 Sąveika su hidrofobine ir hidrofiline aktyviojo CA centro sritimi	29
1.2.1.4. Slopiklio savybės, nesusijusios su slopiklio ir aktyviojo baltymo centro sąveika	32
1.2.2 Neklasikiniai CA slopikliai	34
1.2.2.1 Fenoliai ir poliaminai.....	34
1.2.2.2 Kumarinai ir tiokumarinai	37
1.2.2.3 Fulerenai	39
2. Rezultatai ir jų aptarimas	40
2.1. Teorinis hCA slopiklių sąveikos su baltymu tyrimas	40
2.1.1. Žinomos struktūros hCA slopiklių kompleksų dokinimas	40
2.1.2. Kryžminis dokinimas.....	45
2.1.3. Baltymų struktūrų modelių paruošimas.....	47
2.1.4. Ligandų modeliavimas.....	47
2.1.5. Dokinimo parametrų keitimas	49
2.1.6. Filtrų taikymas	49
2.1.7. Jungimosi konstantų korekcija	50
2.1.8. 4-[<i>N</i> -(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]- ir 4-{ <i>N</i> -[(pirimido[4',5':5,6]-tiopirano[2,3- <i>b</i>]indol-4-il)amino]}benzensulfonamidų dokinimas	52

2.2. Pirimidino junginių – potencialių karboanhidrazių slopiklių – sintezė ir savybės.....	55
2.2.1. Indolin-2-tiono kondensacija su pakeistais pirimidin-5-karbaldehidais....	55
2.2.2. Pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3- <i>b</i>]indolo darinių sintezė.....	58
2.2.3. 4-Chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3- <i>b</i>]indolo reakcijos su <i>O</i> -, <i>N</i> - ir <i>S</i> -nukleofilais.....	66
2.2.4. Potencialių hCA slopiklių – (4-pirimidinil)- ir (pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3- <i>b</i>]indol-4-il)aminobenzensulfonamidų – sintezė	67
2.2.5. Rentgenostruktūrinė hCAII kompleksų su slopikliais analizė.....	75
Išvados	80
Eksperimentinė dalis.....	82
Literatūros sąrašas.....	114
Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas.....	126
Priedas.....	128

Naudojamų sutrumpinimų sąrašas

ADME – biologiškai aktyvaus junginio absorbcija, pernaša, metabolizmas ir šalinimas iš organizmo (*angl.* Absorbtion, Distribution, Metabolism and Excretion);

AZM – acetazolamidas;

CA – karboanhidrazė (EC 4.2.1.1); b – jaučio (*angl.* bovine), h – žmogaus (*angl.* human), m – pelės (*angl.* murine);

CBG – su cinko jonu besijungianti grupė;

CNS – centrinė nervų sistema;

DFT – tankio funkcionalo teorija (*angl.* Density Functional Theory);

DMF – *N,N*-dimetilformamidas;

DMSO – dimetilsulfoksidai;

ITC – izoterminio titravimo kalorimetrija (*angl.* Isothermal Titration Calorimetry);

PDB – baltymų duomenų bankas (<http://www.rcsb.org>) (*angl.* Protein Data Bank);

SAR – struktūros ir aktyvumo sąryšis (*angl.* Structure – Activity Relationship);

TFA – trifluoroacto rūgštis;

TFM – trifluormetansulfonamidas;

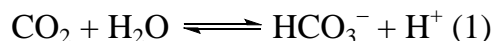
THF – tetrahidrofuranas;

TSA – terminio poslinkio analizė (*angl.* Thermal Shift Assay).

Aminorūgštys žymimos standartine trijų raidžių koduote, po jos nurodant numerį baltymo aminorūgščių sekoje.

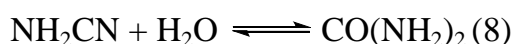
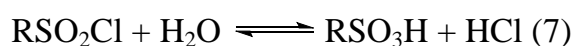
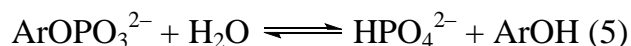
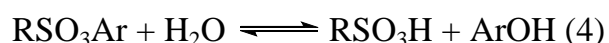
Įvadas

Grįžtamasis CO₂ hidratavimas ir virsmas į hidrokarbonato jonus ir protonus (lygtis 1) yra paprasta, tačiau gyvybiškai svarbi fiziologinė reakcija.



Žmogaus organizme ši reakcija svarbi daugeliui fiziologinių ir patologinių procesų – kvėpavimui, CO₂ ir hidrokarbonato jono pernašai tarp metabolizuojančių audinių ir plaučių, pH ir CO₂ savireguliaciai, elektrolitų apykaitai įvairiuose organuose ir audiniuose, biosintezės reakcijoms (pvz., gliukogenezėi, lipogenezėi, urėjagenezėi), rezorbcijai kauluose, kalcifikacijai ir auglių susidarymui. CO₂ hidratavimas organizme vyksta ir savaime, tačiau nepakankamai, tad ją katalizuoja ypatingai efektyvūs metalofermentai karboanhidrazės (CA arba EC 4.2.1.1).

α-CA katalizuoja ne tik grįžtamąją CO₂ hidratavimo reakciją, bet silpnai katalizuoja ir kitas hidratavimo ar hidrolizės reakcijas [1]:



Ar CA katalitinis aktyvumas šiose reakcijose turi reikšmės organizmui, nėra žinoma, tačiau šiomis reakcijomis kartais remiamasi matuojant CA slopinimą. Be to, kai kurių slopiklių – tioksolono [2], kumarinų, tiokumarinų [3] – veikimas yra siejamas CA esteraziniu (esterių hidrolizės katalizės) veikimu.

α-CA pasiskirstymas organizme – organuose ir audiniuose bei ląstelės viduje – yra labai įvairus, tad įvairūs CA veiklos nukrypimai, ypač hiperfunkcija, lemia rimtus sutrikimus [1, 4, 5]. Sutrikusi citozolinės CAII ir membraninių CAIV, XII ir XIV veikla inkstuose gydoma diuretikais,

slopinančiais šias karboanhidrazes. Glaukoma gydoma vietiškai slopinant CAII. Kraujo krešėjimo sutrikimai iš dalies yra susiję su CAI, kuri yra vienas iš daugelio šio proceso dalyvių. Pastaruoju metu atlikti tyrimai rodo, kad slopinant CAII bei mitochondrines CAVA ir CAVB, dalyvaujančias lipogenezėje, galima kovoti su nutukimu. Slopinant CAIX ir CAXII, kurios yra svarbios auglių vystymuisi (rūgština terpė), galima kovoti su vėžiniais susirgimais. Kaulų audiniuose gausiai esančių CAII, IV ir XIV hiperfunkcija lemia neorganinių komponentų transportą per osteoklastų membraną į išorę, taip prarandant kalcio jonus. Tad šių fermentų slopikliai ateityje gali būti naudojami kaip preparatai nuo osteoporozės.

Šiuo metu apie 30 karboanhidrazių slopiklių [4] yra naudojami kaip klinikiniai preparatai arba yra klinikinių tyrimų stadijoje. Nemažėjanti mokslinė šios temos aktualumą rodo ir tai, kad žurnale „Nature“ straipsniai apie karboanhidrazių slopinimą publikuojami nuo pat pirmojo slopiklio atradimo 1940 m. [6] iki dabar [4]. Deja, su dideliu α -CA homologiškumu ir plačiu pasiskirstymu organizme susijęs mažas slopiklių atrankumas. Todėl daugelis šiuo metu medicininėje praktikoje naudojamų CA slopiklių turi įvairių šalutinių poveikių: galimas galūnių tirpimas ir dilgčiojimas, metalinis prieskonis, depresija, nuovargis, svorio kritimas, sumažėjęs libido, inkstų akmenligė, virškinamojo trakto sudirgimas, metabolinė acidozė ar trumpalaikė trumparegystė. Tad šiuo metu didžiausias CA slopiklių sintezės iššūkis yra jų atrankumas konkrečiai izoformai.

Šio darbo tikslas – racionalus potencialių žmogaus karboanhidrazių slopiklių – 4-[N-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidų – kūrimas. Tikslu buvo siekiama dviem etapais.

Pirmasis etapas yra teorinis šių junginių sąveikos su aktyviuoju įvairių hCA izoformų centru tyrimas, atliktas norint išsiaiškinti, ar 4-[N-(pirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidai, turintys pakaitus 2-, 5- ir 6-oje pirimidino žiedo padėtyje, gali įsiterpti į aktyvųjį baltymo centrą, ir apytiksliai įvertinti įvairių funkcinių grupių įtaką jungimuisi su juo.

Antrojo etapo metu buvo sintetinami potencialūs hCA slopikliai. Bendradarbiaujant su Biotechnologijos instituto mokslininkais, kurie atliko hCA slopinimo susintetintais junginiais tyrimus, tobulintos šių junginių hCA slopinimo savybės. Slopiklių struktūros modifikuotos keičiant jungtuko tarp benzensulfonamido ir heterociklo fragmento ilgį ir įvedant naujus pakaitus pirimidino žiede, kai kuriais atvejais taip sudarant naujas heterociklines sistemas.

Mokslinį naujumą pagrindžiantys darbo rezultatai

Ištirta indolin-2-tionų kondensacija su 2,4,6-pakeistais pirimidin-5-karbaldehidais ir parodyta, kad pirimidin-5-karbaldehiduose 4-oje ir 6-oje padėtyse nesant aktyvių nukleofugų susidaro *E*-konfigūracijos 3-(5-pirimidinilmetilen)indolin-2-tionai, o 4-ojoje padėtyje esant chloro atomui, susidaro iki šiol neaprašytos heterociklinės sistemos – pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas ir 5*H*-pirimido[4',5':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indolas. Taip pat buvo ištirtas 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo reakingumas su nukleofilais. Paruošta paprasta ir efektyvi potencialių hCA slopiklių – 4-[*N*-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų – sintezės metodika, ištirta šių junginių sąveika su hCAI, II, VII ir XIII bei parodyta, kad jie stipriai-vidutiniškai slopina karboanhidrazes.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Indolin-2-tionams reaguojant su pirimidin-5-karbaldehidais, neturinčiais 4-oje ir 6-oje pirimidino padėtyse aktyvių nueinančiųjų grupių, susidaro (*E*)-3-(5-pirimidinilmetilen)indolin-2-tionai. Pastarieji dalyvauja hetero-Dilso-Alderio reakcijoje su butino dirūgšties dimetilesteriu, sudarydami atitinkamus tiopirano[2,3-*b*]indolo darinius.
2. Reaguojant indolin-2-tionams su 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehidais susidaro pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas ir 5*H*-pirimido[4',5':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indolas.
3. 5-cian-, formil- arba nitro- 4,6-dichlorpirimidinų chloro atomo pakeitimas 4-amino(alkil)benzensulfonamidais ir tolimesnis gautų junginių

modifikavimas pakeičiant antrąjį chloro atomą įvairiais nukleofilais yra patogus 4-[*N*-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų, 5-oje padėtyje turinčių cian-, formil- arba nitrogrupės sintezės būdas.

4. Atliekant teorinius 4-[*N*-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų ir 4-{*N*-[(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)]amino}benzensulfonamidų sąveikos su hCAI, II, VA, VB ir IX tyrimus (dokinant) galima kokybiškai įvertinti šių junginių sąveiką su aktyviuoju baltymo centru.
5. Susintetinti 4-[*N*-(2,5,6-pakeisti pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidai jungiasi su hCA kaip tipiški klasikiniai CA slopikliai, o jų hCA slopinimo aktyvumą lemia sulfonamido grupės sąveika su katalitiniu cinko jonu ir pirimidino fragmento sanglauda su aminorūgšties Phe131 šoninės grandinės benzeno žiedu.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Karboanhidrazės (CA)

1.1.1 CA funkcija ir pasiskirstymas organizme

Įvairiuose organizmuose yra penkių evoliuciškai nesusijusių genų šeimų koduojamos karboanhidrazės: α -CA (stuburiniuose, bakterijose, dumbliuose, žaliųjų augalų citoplazmoje), β -CA (daugiausiai bakterijose, dumbliuose, vienskilčių ir dviskilčių augalų chloroplastuose, daugelyje grybų), γ -CA (daugiausiai archėjose ir kai kuriose bakterijose), δ -CA (kai kuriuose jūrų titnagdumbliuose) ir ζ -CA (kai kuriuose jūrų titnagdumbliuose). Šiuo metu žinduoliuose yra aptikta 16 α -CA arba joms giminingų baltymų izoformų, besiskiriančių katalitiniu aktyvumu ir pasiskirstymu ląstelės viduje. (lentelė 1.1) [7]

Lentelė 1.1. α -CA izoformų aktyvumas ir pasiskirstymas ląstelės viduje bei organuose ir audiniuose.

Baltymo izoforma	Katalitinis aktyvumas (CO ₂ hidratavimas)	Pasiskirstymas ląstelėje	Pasiskirstymas audiniuose ir organuose
CAI	Vidutiniškai aktyvus	Citozolis	Eritrocitai, virškinamasis traktas
CAII	Labai aktyvus	Citozolis	Eritrocitai, akys, virškinamasis traktas, kaulų osteoklastai, inkstai, plaučiai, sėklidės, smegenys
CAIII	Labai mažai aktyvus	Citozolis	Griaučių raumenys, adipocitinės ląstelės
CAIV	Labai aktyvus	Prijungtas prie membranų	Inkstai, plaučiai, kasa, smegenų kapiliarai, žarnynas, širdies raumenys
CAVA	Mažai – vidutiniškai aktyvus*	Mitochondrijos	Kepenys
CAVB	Labai aktyvus	Mitochondrijos	Širdies ir griaučių raumenys, kasa, inkstai, stuburo vamzdelis, virškinamasis traktas
CAVI	Vidutiniškai aktyvus	Tarpląstelinis (sekretuojamas į seiles/pieną)	Seilių ir pieno liaukos
CAVII	Labai aktyvus	Citozolis	CNS
CARP** VIII	Nekatalitinis	Citozolis	CNS
CAIX	Vidutiniškai – labai aktyvus	Transmembraninis	Augliai, virškinamojo trakto gleivinė
CARP X	Nekatalitinis	Tarpląstelinis	CNS
CARP XI	Nekatalitinis	Tarpląstelinis	CNS
CAXII	Mažai aktyvus	Transmembraninis	Inkštų, žarnyno, dauginimosi sistemos epitelis, akys, augliai
CAXIII	Vidutiniškai aktyvus	Citozolis	Inkstai, smegenys, plaučiai, pilvo ertmė, dauginimosi traktas
CAXIV	Vidutiniškai aktyvus	Transmembraninis	Inkstai, smegenys, kepenys
CAXV	Mažai aktyvus	Prijungtas prie membranų	Inkstai

*Mažai aktyvus esant pH 7,4, vidutiniškai aktyvus esant pH 8,2 arba didesniai.

**CARP (nuo angl. CA Related Protein) – neaktyvus CA giminingas baltymas, aktyviajame centre neturintis cinko jono.

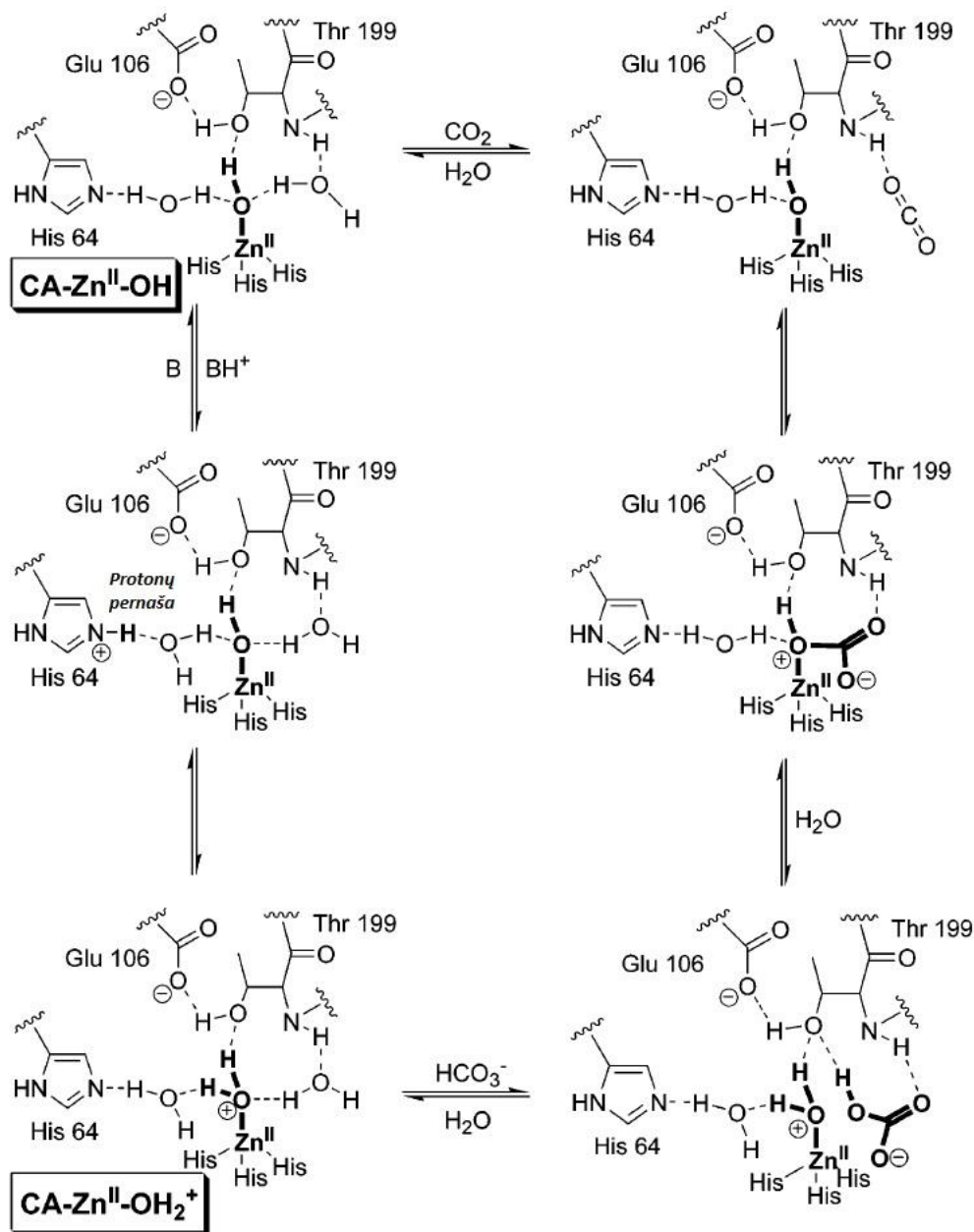
1.1.2. CA aktyviojo centro struktūra ir katalitinio veikimo mechanizmas

Visų α -CA aktyviajame centre yra Zn (II) jonas, koordinuojamas His94*, His96 ir His119 imidazolo grupių ir hidroksido jono (arba vandens molekulės), išsidėsčiusių netaisyklingo tetraedro forma. Ši struktūra yra kūgio pavidalo įduboje, kurios vienoje sienos srityje dominuoja hidrofilinės, o kitoje – hidrofobinės aminorūgščių šoninės grandinės.

Grižtamasis CO₂ hidratavimas aktyviajame α -CA centre vyksta dviem pakopomis [8]. Pirmoji pakopa yra prie cinko jono prijungtos hidroksigrupės nukleofilinė CO₂ ataka, susidarant prie cinko jono prijungtam hidrokarbonatui, kuris po to pakeičiamas vandens molekule. Modeliavimo rezultatai [9] ir tyrimai su hCA II mutantais [10] rodo, kad CO₂ nėra koordinuojamas su Zn(II), o silpnai jungiasi su hidrofobine baltymo sritimi 3–4 Å atstumu nuo Zn-OH komplekso. Tik tuomet OH⁻ grupė atakuoja CO₂, susidaro Zn-HCO₃ kompleksas, kuris suardomas vandens molekule ir į terpę patenka HCO₃⁻ jonas. Antrosios pakopos metu nuo Zn-OH₂⁺ komplekso atsikyla protonas ir atsistato aktyvi komplekso forma. Protono pernaša į terpę vyksta per kelias vidumolekulines ir tarpmolekulines stadijas, tačiau didžiausią įtaką šiam procesui turi His64, veikiantis kaip protonų siurblys [11]. Atlikti tyrimai rodo, kad α -CA katalizės greitį riboja protono pernaša nuo Zn-OH₂⁺ komplekso į terpę [12] ir CO₂ difuzijos greitis [13].

Bendras CO₂ hidratavimo mechanizmas pateiktas paveiksle 1.1.2-1 [1]. Nors geriausiai ištirtas hCAII izoformos mechanizmas, didelis α -CA izoformų homologiškumas ir atitinkamai labai panaši baltymo aktyviojo centro struktūra leidžia teigti, kad ir kitose α -CA CO₂ hidratavimas vyksta taip pat.

* Čia ir toliau aminorūgštys numeruojamos pagal hCAI aminorūgščių seką.



Pav. 1.1.2-1. Grįžtamojo CO₂ hidratavimo aktyviajame αCA centre mechanizmas.

1.2 CA slopikliai

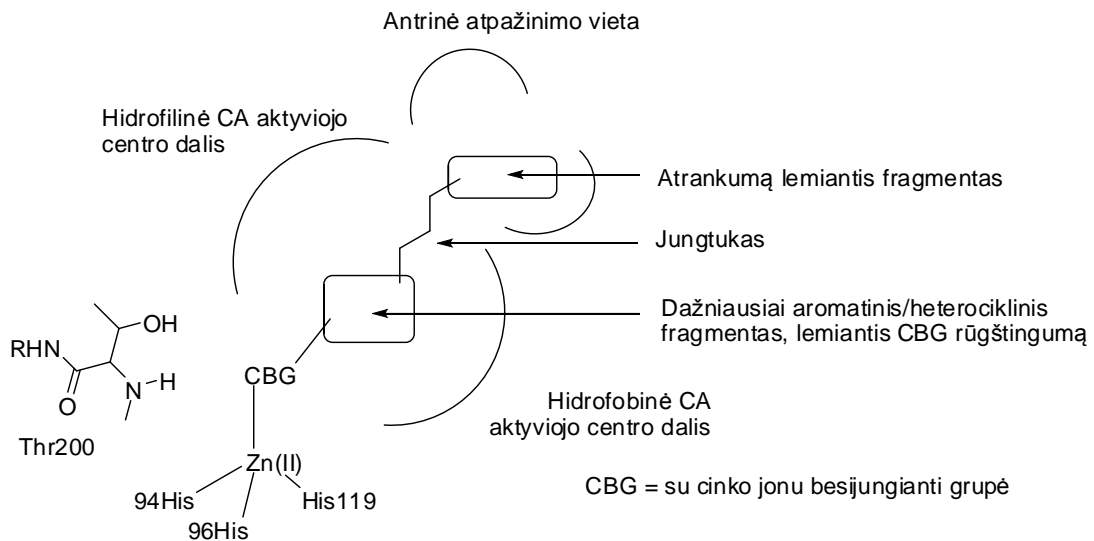
1.2.1 Klasikiniai CA slopikliai

Nuo to laiko, kai 1940 m. T. Mannas ir D. Keilinas [6] žurnale „Nature“ paskelbė straipsnį apie selektyviai karboanhidrazę slopinantį junginį sulfanilaminą (**I**) (pav. 1.2.1-1), yra susintetinta gausybė CA slopiklių ir nustatytas jų veikimo principas.



Pav. 1.2.1-1. 4-aminobenzensulfonamidas (I)

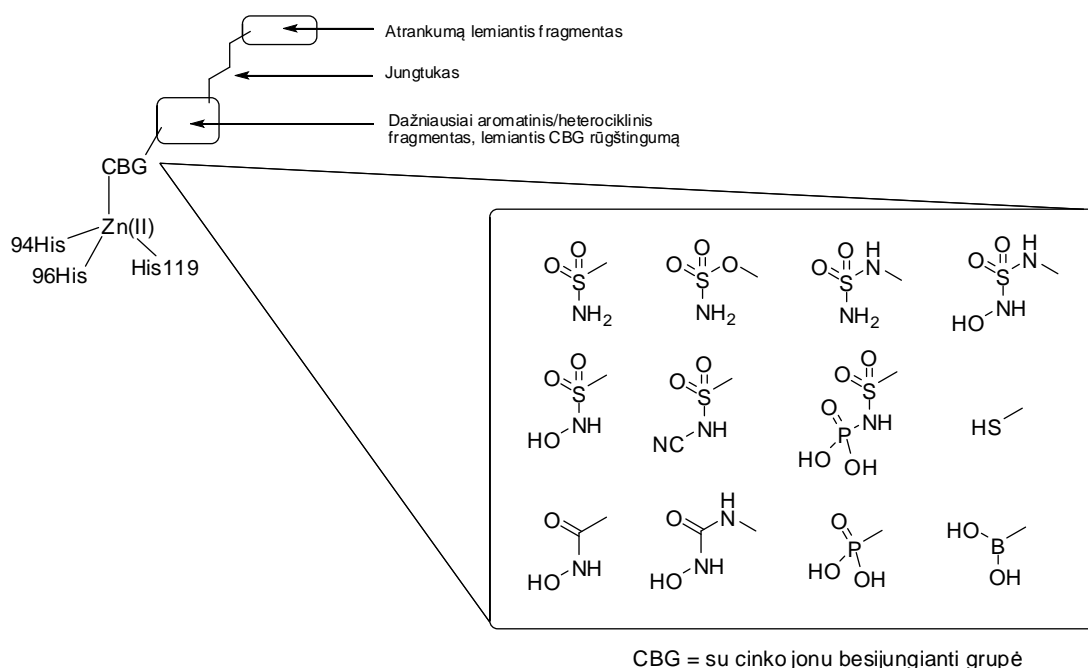
Paveiksle 1.2.1-2 pavaizduotas klasikinių CA slopiklių išsidėstymas aktyviajame baltymo centre. Slopiklio struktūrą galima suskirstyti į tris pagrindines dalis: funkcinę grupę, sąveikaujanti su Zn(II) atomu (paveiksle CBG), fragmentas, leidžiantis reguliuoti šios funkcinės grupės savybes, ir dažniausiai jungtuku atskirtas molekules fragmentas, lemiantis kitas junginio savybes – tirpumą, hidrofiliškumą ir, idealiu atveju, atrankumą konkrečiai CA izoformai.



Pav. 1.2.1-2. Principinė klasikinių CA slopiklių struktūros schema.

Neklasikiniai CA slopikliai, jungdamiesi prie aktyviojo CA centro, su cinko jonais nesąveikauja.

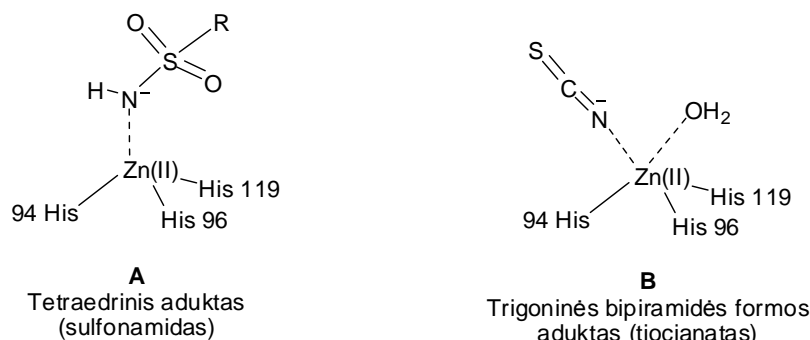
1.2.1.1. Su cinko jonu besijungianti grupė (CBG)



Pav. 1.2.1.1-1. Klasikinių CA slopiklių su cinko jonu besijungianti grupė.

Svarbi klasikinių CA slopiklių dalis – su cinko jonu besijungianti grupė (toliau CBG). Norint parinkti gerą CBG, reikia suprasti jos jungimosi prie CA mechanizmą ir saveiką su gretimų aminorūgščių šoninėmis grandinėmis.

Visi CA slopinantys junginiai su Zn(II) jonu jungiasi anijonine forma. Jungimasis gali vykti vienu iš dviejų mehanizmų: pakeičiant prie cinko jono prijungtą hidroksido anijoną ar vandens molekulę ir susidarant tetraedriniam kompleksui (pav. 2.2.1.1-2 A) arba tiesiog anijonui prisijungiant prie katalitinio komplekso ir susidarant trigoninės bipiramidės formos kompleksui (pav. 1.2.1.1-2 B). Manoma, kad kai kuriais atvejais aduktas gali pereiti iš vienos formos į kitą [14, 15].



Pav. 1.2.1.1-2. Slopiklio jungimasis prie katalitinio α -CA Zn-OH komplekso. A: tetraedriniis aduktas, B: trigoninės bipiramidės formos aduktas.

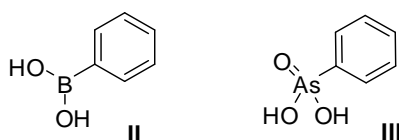
Kitas labai svarbus veiksnys CBG jungimuisi yra jos sąveika su šalia Zn(II) esančiu treoninu (Thr199). Treoninas su CBG sudaro vandenilinių ryšių tinklą: amidinis NH sąveikauja su CBG sulfono arba karbonilo fragmentu, o šoninės grandinės hidroksigrupė – su sulfonamido, sulfamido, sulfamato NH arba hidrosamato ar *N*-hidroksikarbamido OH grupėmis. Tai iš dalies paaiškina gerokai stipresnę šių funkcinių grupių sąveiką su cinko jonu, lyginant su sulfatų [16] arba antrinių sulfonamidų [17] sąveika.

Siekiant įvertinti įvairių CBG įtaką slopiklio jungimuisi su aktyviuoju CA centru, buvo atlikta aibė tyrimų su junginiais, turinčiais kiek įmanoma mažesnius arba identiškus pakaitus prie šios grupės. Tiriant CA aktyviojo centro sąveiką su neorganiniais izosteriniais ir izoelektriniais sulfatui, nitratui ir karbonatui anijonais buvo parodyta, kad tarp anijono geometrijos (tetraedrinė ar trigoninė) ir sąveikos su aktyviuoju baltymo centru priklausomybės nėra. Esminį vaidmenį šiuo atveju atlieka anijono centrinio atomo prigimtis [16, 18]. Geriausiai su cinko jonu kompleksą sudaro sieros (VI) junginiai – sulfamidas ($K_i = 0,88 - 1130 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [16, 19-21]), sulfamatas ($K_i = 0,93 - 390 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [16, 19-21]), trifluormetansulfonamidas ($K_i = 0,002 - 0,9 \mu\text{M}$ CAI, II, III, IV [22]), *N*-hidroksisulfamidas (0,57 – 4,05 hCAI, II, IX, XII [20]) bei anglies dariniai – karbonato anijonas ($K_i = 8,6 - 95000 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [16, 19, 21]), tritiokarbonato anijonas ($K_i = 8,7 - 36150 \mu\text{M}$ hCAI, II, III, VII, XIII [18]), *N,N*-dietilditiokarbonato anijonas ($K_i = 0,79 - 1470 \mu\text{M}$ hCAI, II, III, VII, XIII [18]), *N*-hidroksikarbamidas ($K_i = 23 - 113 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA, IX [23, 24]). Konkrečios slopinimo konstantos pateiktos lentelėje 1.2.1.1-1.

Kai kurie neorganiniai anijonai taip pat gerai jungiasi su CA aktyviuoju centru. Pvz., cianatas ($K_i = 0,25 - 15000 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [14, 19, 21]), tiocianatas ($K_i = 170 - 39000 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [14, 19, 21]), cianidas ($K_i = 0,5 - 9200 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [14, 21]), azidas ($K_i = 1,2 - 65100 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII [14, 19, 21]), hidrosulfidas ($K_i = 0,6 - 5200 \mu\text{M}$

hCAI, II, IV, VA/B, VII, IX, mCAXIII[14, 19, 21]) (lentelė 1.2.1.1-1). Jie jungiasi geriau nei halogenidai, halogenatai, sulfatas, nitratas, d-elementų (IV-VI) rūgščių anijonai, polisulfatai ir t. t. [14, 16, 19, 21]. Beje, svarbu paminėti, kad organinės fosforo rūgštys, skirtingomis sąlygomis gali veikti ir kaip silpni hCAI slopikliai, ir kaip silpni aktyvatoriai [25-27].

Taip pat CA vidutinėmis slopinimo savybėmis pasižymi ir arilborono (fenilborono rūgštis (II) $K_i = 0,88\text{--}58600 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, mCAXIII [14, 19, 21]) bei arilarsono rūgštys (fenilarsono rūgštis (III) $K_i = 0,87\text{--}49200 \mu\text{M}$ hCAI, II, IV, VA/B, VII, mCAXIII [14, 19, 21]) (pav. 1.2.1.1-3).



Pav. 1.2.1.1-3. Fenilborono (II) ir arilarsono (III) rūgštys.

Lentelė 1.2.1.1-1. Kai kurių neorganinių junginių CA izoformų slopinimo konstantos.

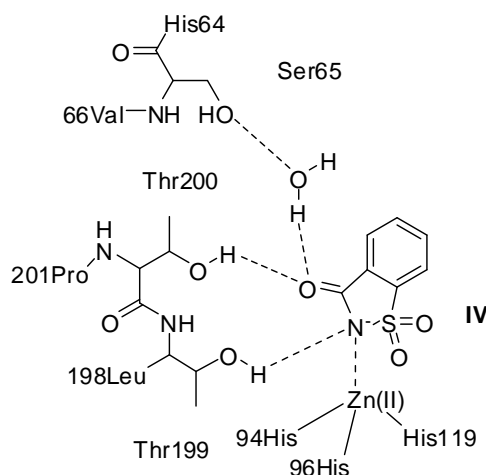
	$K_i, \mu\text{M}$								
	hCAI	hCAII	hCAIII	hCAIV	hCAVA/hCAVB	hCAVII	hCAIX	hCAXII	mCAXIII
$\text{CF}_3\text{SO}_2\text{NH}^-$	0,016	0,002	0,9	0,045	-	-	-	-	-
$\text{NH}_2\text{SO}_2\text{O}^-$	21	390	-	0,93	120/660	9,5	9,2	10,7	21500
$\text{NH}_2\text{SO}_2\text{NH}^-$	310	1130	-	0,88	840/84	6,8	9,6	13,2	140
$\text{HOHNSO}_2\text{NH}^-$	4,05	0,57	-	-	-	0,87	-	1,34	-
CO_3^{2-}	15000	73000	-	5700	720/930	270	8,6	-	5500
CS_3^{2-}	8,7	8,8	9,9	-	-	36150	-	-	430
$\text{NH}_2\text{CON}(\text{OH})^-$	-	28	-	113	31/-	-	23	-	-
$\text{Et}_2\text{NCS}_2^-$	0,79	3,1	6,5	-	-	1470	-	-	56
CNO^-	0,7	(20)30	0,5	(30)610	28/70	15200	43	-	0,25
SCN^-	200	1600	-	39000	740/76	170	130	-	740
CN^-	0,5	20	-	770	15/8	9200	4	-	65
N_3^-	0,2	1500	-	65100	300/270	1410	5	-	4800
SH^-	0,6	40	-	3900	23/8	1240	7	-	5200

1.2.1.1.1 Sulfonamidai ir jų dariniai

Nuo 1940 m., kai buvo aprašytas pirmas CA slopiklis [6], buvo manoma, kad pirminio sulfonamido fragmentas junginyje yra būtina sąlyga CA slopinimui. Tačiau jau 1948 m. buvo parodyta, kad ir antriniai sulfonamidai, turintys piridino, tiazolo, guanidino pakaitus [17], yra CA slopikliai, nors jų aktyvumas dažnai yra $10^2\text{--}10^4$ kartų mažesnis. Tiriant *N*-acilintus

arilsulfonamidus, nustatyta, kad įvedus net tokią santykinai nedidelę grupę, kaip acetilgrupė, labai pablogėja junginių CA slopinimo savybės [28].

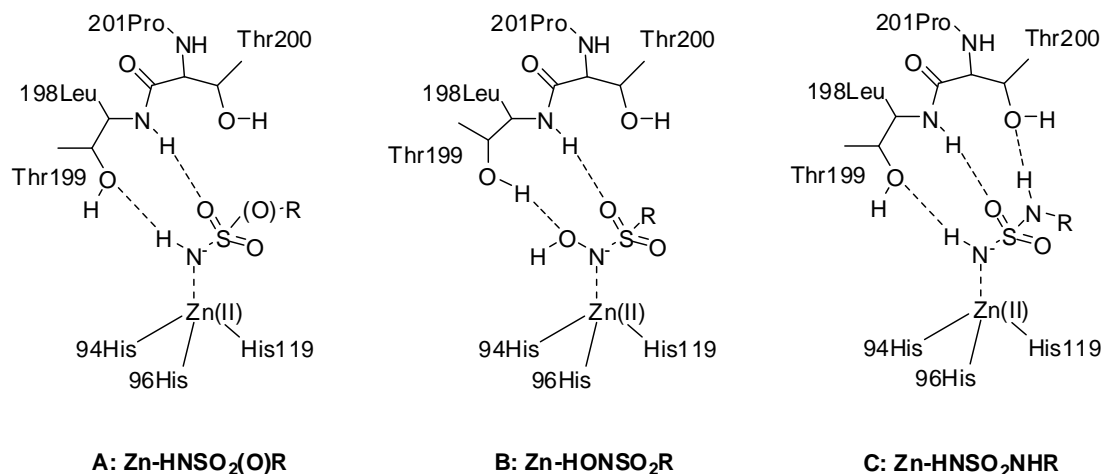
Tokius rezultatus nesunku paaiškinti faktu, kad, esant dideliame pakaitui sulfonamido fragmente, šis aktyviajame CA centre yra gerokai nutolęs nuo Zn(II) ir su juo nesudaro komplekso [29]. Kone vienintele išimtimi, kai antrinis sulfonamidas stipriai slopina CA, galima laikyti atrankų hCAVII slopinimą sacharinu **IV** ($K_i = 10$ nM) [30], kuriame sulfonamidas yra laktaminis ir dėl to neužima daug vietos. Nors sacharino komplekso su hCAVII kristalografinių duomenų nėra, remiantis atitinkamo komplekso su hCAII struktūra bei modeliavimo duomenimis, buvo parodyta, kad tokią stiprią sacharino sąveiką su hCAVII lemia papildoma vandenilinių ryšių sistema tarp sacharino C=O grupės, vandens molekulės ir serino (Ser65) hidroksigrupės (pav. 1.2.1.1.1-1).



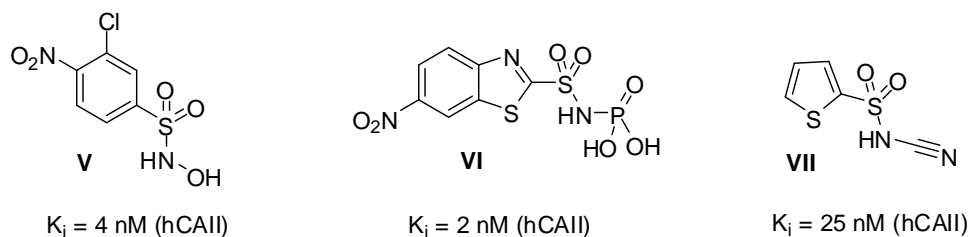
Pav. 1.2.1.1.1-1. Sacharino komplekso su aktyviuoju hCAVII centru schema.

Ir tik per pastaruosius du dešimtmečius, kai naudojant rentgenostruktūrinę analizę imta detaliau nagrinėti, kaip sulfonamidinė grupė sąveikauja su aktyviuoju baltymo centru, buvo parodyta, kad kompaktiškas, vandenilinius ryšius galintis sudaryti pakaitas prie sulfonamido grupės ne tik nepablogina, bet dar ir pagerina šią sąveiką [15] (pav. 1.2.1.1.1-2). Tai gali būti ypatingai svarbus momentas, lemiantis ne tik sisteminį CA slopinimą, bet ir atrankumą konkrečiai baltymo izoformai. Nors šie tyrimai atvėrė plačias galimybes sintetinti CA slopiklius su naujo tipo CBG, tokių darbų nėra daug – aprašyta vos kelių junginių, turinčių *N*-hidroksisulfonamido [31, 32], *N*-fosforilsulfonamido [26, 33] ar *N*-ciansulfonamido [34] fragmentus, sąveika su

hCA. Vis tik šiuo metu yra žinoma junginių, turinčių šias CBG, kurie hCAII slopina ypač efektyviai, pvz., 3-chlor-*N*-hidroksi-4-nitrobenzensulfonamido **V**, 6-nitrobenzo[*d*]tiazol-2-ilsulfonilfosforamidinės rūgšties **VI**, *N*-ciantiofen-2-sulfonamido **VII** K_i mažesnė nei 25 nM [35] (pav. 1.2.1.1.1-3).

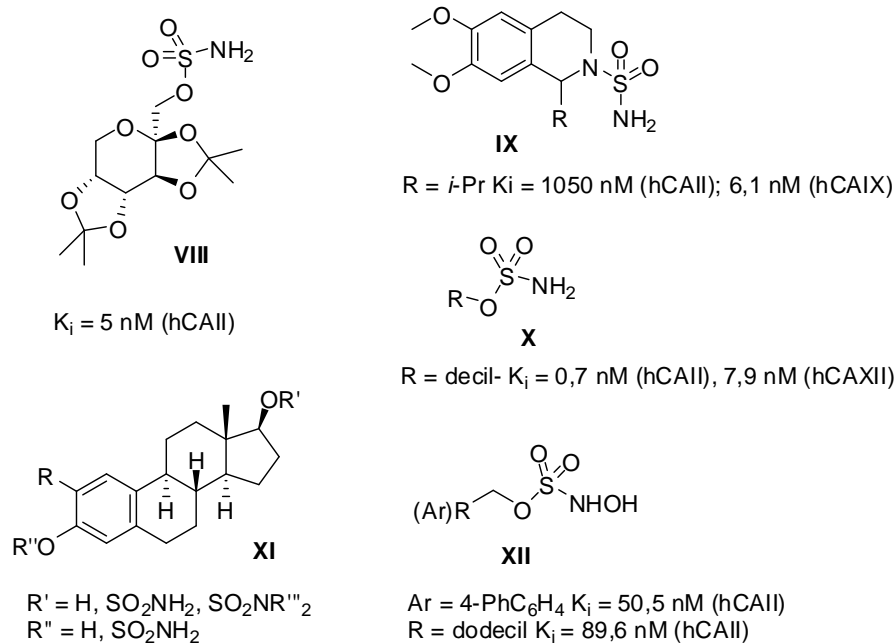


Pav. 1.2.1.1.1-2. CBG sąveikos su aktyviuoju α -CA centru schema. **A:** sulfonamidai ir sulfamatai; **B:** *N*-hidroksisulfonamidai; **C:** sulfamidai.



Pav. 1.2.1.1.1-3. 3-chlor-*N*-hidroksi-4-nitrobenzensulfonamido **V**, 6-nitrobenzo[*d*]tiazol-2-ilsulfonilfosforamidinės rūgšties **VI**, *N*-ciantiofen-2-sulfonamido **VII** struktūra ir hCAII slopinimo aktyvumas.

Kiti sulfonamidų analogai – sulfamidai [36] ir sulfamatai [37] – yra daug plačiau nagrinėti. Atlikus šią CBG modifikaciją buvo nustatyta, kad net nearomatiniai sulfamidai ir sulfamatai (topiramatas **VIII**, 6,7-dimetoksi-3,4-dihidroizochinolin-2(1*H*)-sulfonamidai **IX**, alkilsulfamatai **X**, estradioliai **XI**) [38-42] bei *N*-hidroksisulfamidai [37, 43] (alkil-, arilmetilen *N*-hidroksisulfamatai **XII**) CA slopina efektyviai (pav. 1.2.1.1.1-4).



Pav. 1.2.1.1.1-4. Topiramato **VIII**, 6,7-dimetoksi-3,4-dihidroizochinolin-2(1*H*)-sulfonamido **IX**, alkilsulfamato **X**, estradiolio **XI** bei alkil-, arilmetilen- *N*-hidroksisulfamatų **XII** struktūra ir hCA slopinimo aktyvumas.

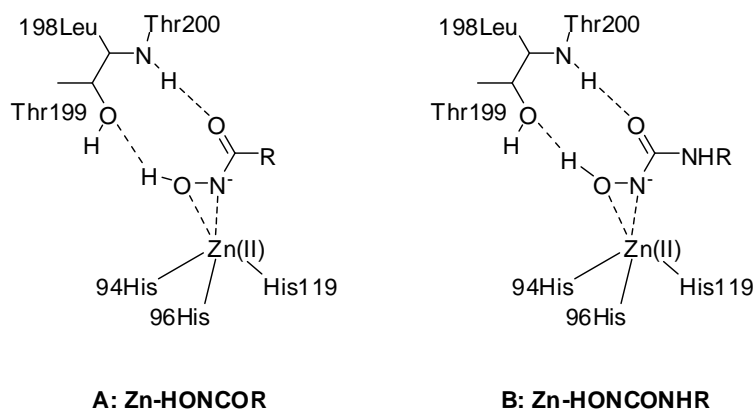
Stiprus sulfamatų ir sulfamidų jungimasis prie CA aktyviojo centro aiškinamas keliais veiksniais – analogiška sulfonamidui sąveika su aktyviuoju CA centru bei didesne konformacine laisve, leidžiančia likusam slopiklio fragmentui geriau prisitaikyti prie fermento aktyviojo centro. Lyginant sulfonamidų ir sulfamidų sąveiką su CA aktyviuoju centru, stebima papildoma sąveika tarp sulfamido aminogrupės ir Thr200 hidroksigrupės [44]. Remiantis kristalografiniais duomenimis [41], sulfamatai taip kaip sulfamidai papildomos sąveikos su aktyviuoju CA centru nesudaro. Tiek sulfamatų, tiek sulfamidų atveju, tiltelinio O arba N atomo tarp sulfonamidinės grupės ir likusio slopiklio fragmento buvimas stipriai keičia slopiklio išsidėstymą aktyviajame CA centre. Tokiu būdu galima keisti junginio aktyvumą (net iki 10^5 karto) [42, 45, 46] ir atrankumą konkrečiai CA izoformai [47].

1.2.1.1.2. Karboniliniai junginiai – hidroksamatai ir *N*-hidroksikarbamidai

Karbonato anijonas ir karboksilatai pasižymi silpnu aktyvumu – karbonato ir įvairių karboksirūgščių K_i paprastai gerokai viršija $1 \mu\text{M}$ [25]. Pastaruoju metu buvo nustatyta, kad šių CBG tioanalogai pasižymi didesniu aktyvumu

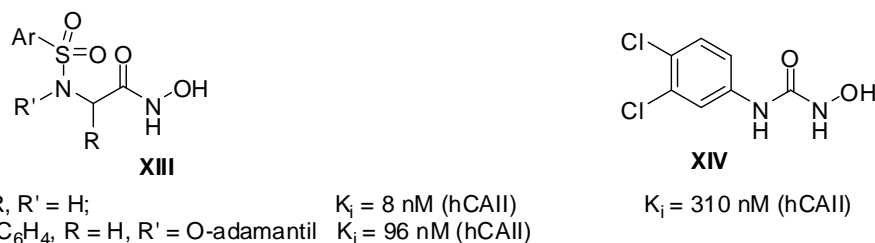
[18]: CS_3^{2-} už CO_3^{2-} jungiasi su hCAI 10^3 , o su hCAII 10^4 kartų geriau. Manoma, kad efektyvesnį tioanalogų jungimąsi su CA lemia stiprus S-Zn ryšys. Deja, kol kas apie efektyvius slopiklius šių CBG pagrindu nepranešta.

Kitos potencialios CBG – hidroksamatas ir hidroksikarbamidas [23, 24] – su aktyviuoju α -CA centru taip pat jungiasi anijono forma [48], o gerą jungimąsi su aktyviuoju CA centru geriausiai paaiškina šių junginių hidroksigrupių sąveika su šalia Zn(II) esančio Thr199 hidroksi- ir amidine grupėmis (pav. 1.2.1.1.2-1 A ir B) [23].



Pav. 1.2.1.1.2-1. CBG sąveikos su aktyviuoju α CA centru schema. **A:** hidroksamatai; **B:** *N*-hidroksikarbamidai.

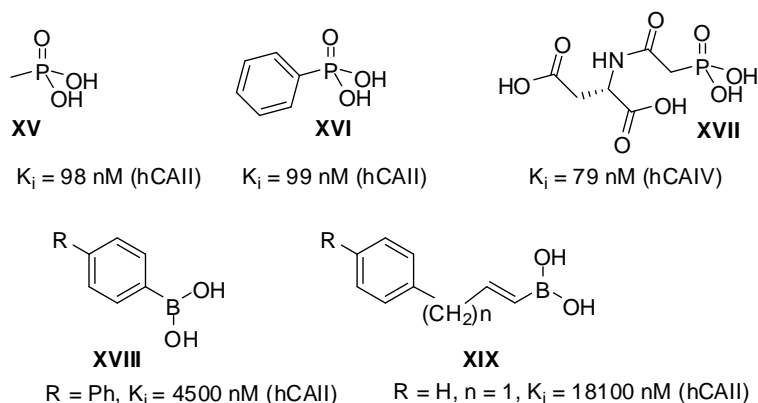
Tokios sąveikos svarbą gerai pademonstruoja karbamido ir *N*-hidroksikarbamido aktyvumų palyginimas – įvedus hidroksigrupę K_i išaugano ~450 mM iki ~0,1 mM (hCAI arba hCAII). Hidroksikarbamido arba hidroksamato fragmentus turintys junginiai pasižymi vidutiniu arba stipriu CA slopinimo aktyvumu [*N*-hidroksi-2-(arilsulfonamido)acetamidai **XIII**, 1-(3,4-dichlorfenil)-3-hidroksikarbamidas **XIV** – K_i 8÷900 nM [23, 24, 49] (pav. 1.2.1.1.2-2)].



Pav. 1.2.1.1.2-2 *N*-hidroksi-2-(arilsulfonamido)acetamidų **XIII** ir 1-(3,4-dichlorfenil)-3-hidroksikarbamido **XIV** struktūra ir hCAII slopinimo aktyvumas.

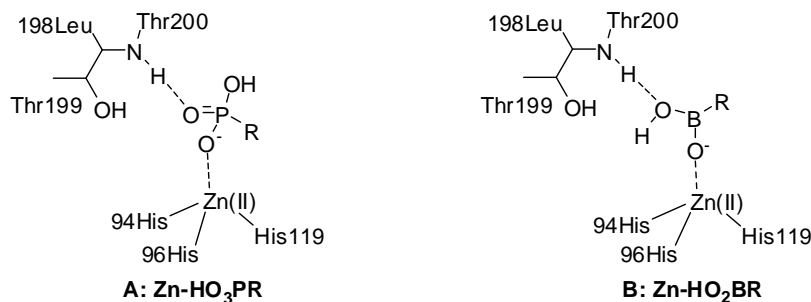
1.2.1.1.3. Borono rūgštys ir fosfonatai

Ieškant alternatyvių sulfonamidams CBG, buvo atlikti ir fosforo [26, 50] bei borono [51] rūgščių darinių CA slopinimo tyrimai. Fosfato anijonai hCA slopina geriau, nei atitinkami karbonato anijonai [50]. Tirtų fosfono ir borono rūgščių įvairovė yra labai maža, ir tik keletas jų pasižymi vidutiniu CA slopinimu: metilfosfono rūgšties **XV** ir fenilfosfono rūgšties **XVI** $K_i \sim 100$ nM (hCAII), *N*-(fosfonoacetil)-L-aspartato **XVII** $K_i \sim 80$ nM (hCAIV), o borono rūgščių **XVIII**, **XIX** $K_i > 3,7$ μ M (hCAI, II, IX, XII) (pav. 1.2.1.1.3-1).



Pav. 1.2.1.1.3-1. Metilfosfono rūgšties **XV**, fenilfosfono rūgšties **XVI**, *N*-(fosfonoacetil)-L-aspartato **XVII** ir borono rūgščių **XVIII**, **XIX** struktūra bei hCA slopinimo aktyvumas.

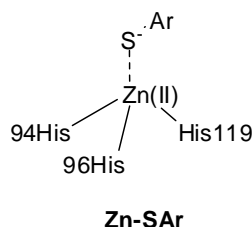
Kristalografinių duomenų apie šių junginių kompleksus su CA yra nedaug [27], tad vienareikšmiškai spręsti apie sąveiką su CA aktyviuoju centru sudėtinga, tačiau manoma, kad tiek fosfono, tiek borono rūgštys su CA aktyviuoju centru sąveikauja panašiai kaip sulfonatai ar sulfonamidai – anijonine forma jungiasi su katalitiniu cinko jonu, o P=O ar B-OH fragmentai sudaro vandenilinius ryšius su triptofano amido grupe [27, 51] (pav. 1.2.1.1.3-2).



Pav 1.2.1.1.3-2. CBG sąveikos su aktyviuoju α CA centru schema. **A:** fosfonatai; **B:** borono rūgštys.

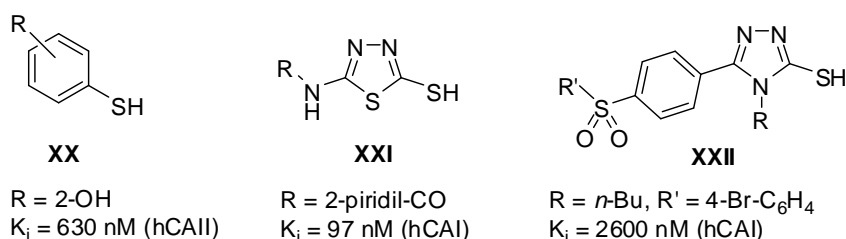
1.2.1.1.4. Aromatiniai ir heteroaromatiniai tioliai

Dar viena klasikinių CA slopiklių grupė yra aromatiniai / heteroaromatiniai tioliai. Šių junginių CBG veikimas pagrįstas vien tik stipriu Zn-S ryšiu (pav. 1.2.1.1.4-1), kurį galima stebėti jau hidrosulfido ir CA sąveikoje [14, 19, 21].



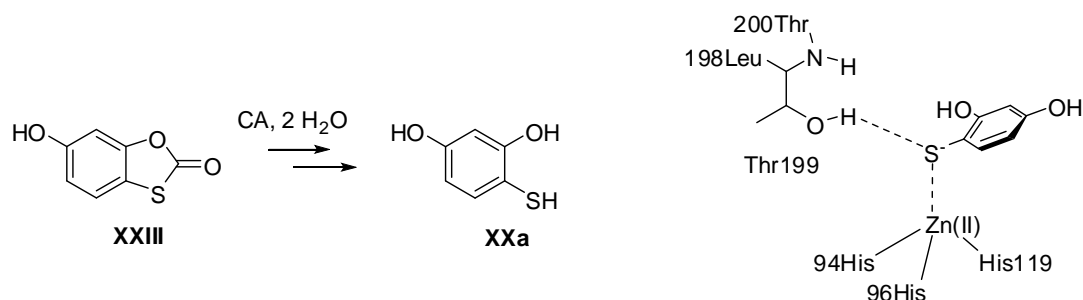
Pav. 1.2.1.1.4-1. CBG sąveikos su aktyviuoju α CA centru schema: aromatiniai ir heteroaromatiniai tioliai.

Aromatiniai tioliai (**XX**), 2-merkpto-1,3,4-tiadiazolai (**XXI**) ir 3-merkpto-1,2,4-triazolai (**XXII**) (pav. 1.2.1.1.4-2) paprastai yra mikromolinės eilės CA slopikliai [52, 53], aktyvumu neprilygstantys sulfonamidams.



Pav. 1.2.1.1.4-2. Aromatinių tiolių (**XX**), 2-merkpto-1,3,4-tiadiazolų (**XXI**) ir 3-merkpto-1,2,4-triazolų (**XXII**) struktūra ir hCA slopinimo aktyvumas

Įdomus šiai grupei priklausantis slopiklis yra tioksolonas **XXIII** (6-hidroksibenzo-1,3-oksatiolan-2-onas). Pats tioksolonas su CA nesijungia, tačiau CA, pasižyminti silpnu esteraziniu aktyvumu, katalizuoja jo hidrolizę ir susidaro CA slopinantis 4-merkpto-1,3-benzendiolis **XXa** [2] (pav. 1.2.1.1.4-3).



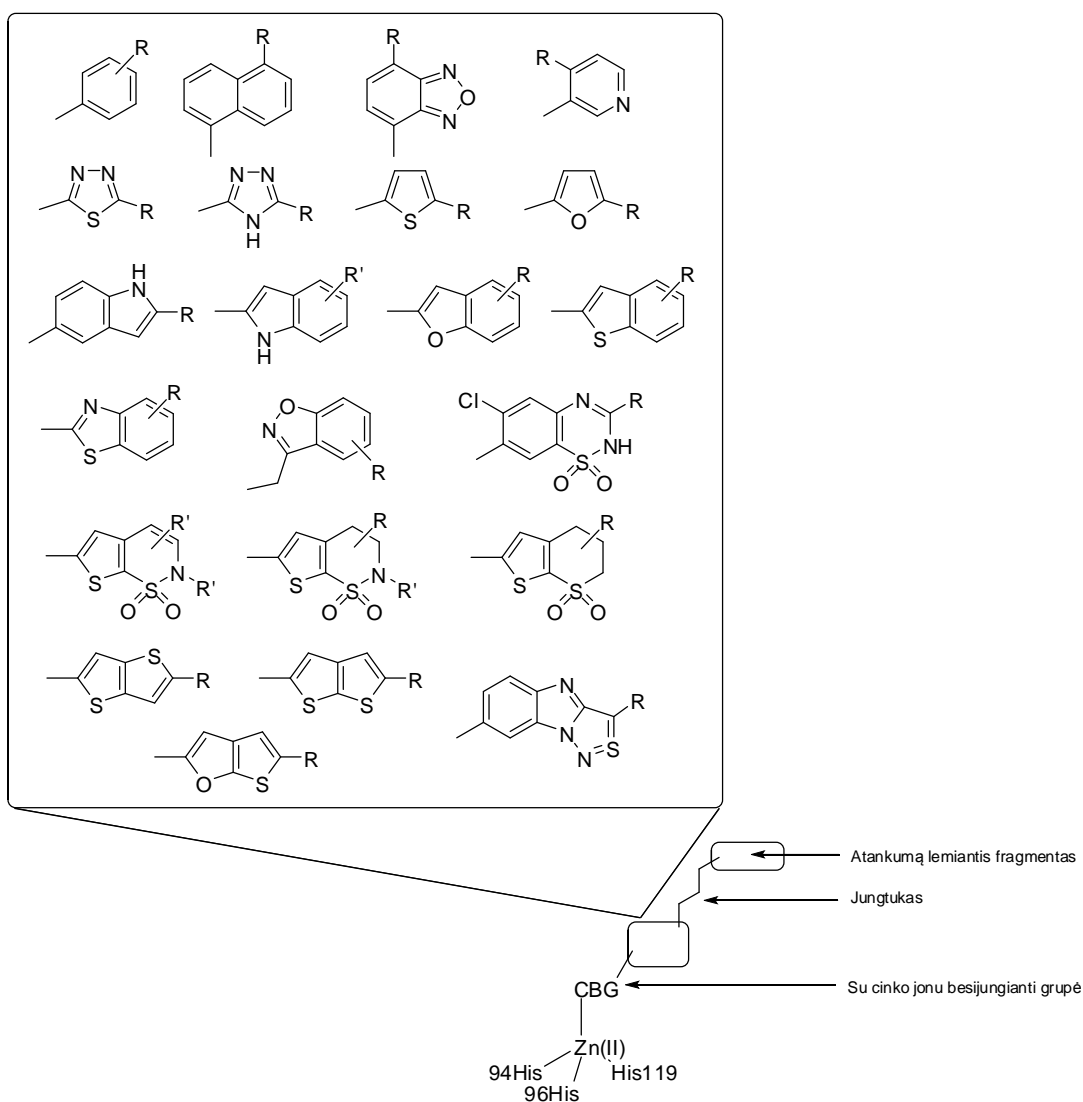
Pav. 1.2.1.1.4-3. Tioksolono **XXIII** hidrolizės ir hidrolizės produkto **XXa** sąveikos su aktyviuoju hCAII centru schemas.

Tiesa, įvairūs autoriai gana prieštaringai vertina tokios struktūros slopiklių potencialą. Viena vertus, tioksolonas (tiksliau, jo hidrolizės produktas) visas šiuo metu žinomas CA, išskyrus hCAI, slopina labai panašiai ir vidutiniškai aktyviai ($K_i = 5 \div 9 \mu\text{M}$ hCAII, III, IV, VA/B, VI, VII, IX, XII, XIV, mCAXIII, XV ir $\sim 90 \text{ nM}$ hCAI). Todėl tam tikrai izoformai atrankų slopiklį šiuo pagrindu kurti esą neefektyvu [54]. Antra vertus, SAR analizė parodė, kad tioksolono analogų CA slopinimo aktyvumą galima žymiai padidinti [2]. Terapiškai tokio tipo preparatai yra aktualūs pacientams, turintiems alergiją sulfonamidams.

1.2.1.2 Žiedo struktūros įtaka CBG pKa

Tolimesnis slopiklio molekulės skirstymas į žiedą, jungtuką ir antrinio atpažinimo fragmentą yra labai sąlyginis. Įvairūs slopikliai gali neturėti kurios nors šių dalių arba jas taip formaliai atskirti nėra paprasta. Žiedo fragmentas paprastai išskiriamas tuo atveju, jei prie jo yra tiesiogiai prijungta CBG. Tokį skirstymą lemia tai, kad aromatinis arba heteroaromatinis žiedas ir pakaitai, tiesiogiai prijungti prie jo, stipriai veikia CBG rūgštinės savybės. Jau anksčiau buvo minėta, kad slopikliai su Zn(II) jungiasi aktyvia anijono forma, tad rūgštinės CA slopiklių CBG savybės yra vienos svarbiausiųjų. pK_a vertė CBG jungimuisi su aktyviuoju CA centru yra svarbi dviem aspektais. Pirma, nuo jos priklauso aktyvios slopiklio formos koncentracija tirpale. Šiuo atžvilgiu yra pageidautina kuo mažesnė pK_a vertė. Antra, pK_a vertė apibūdina CBG anijono Lewis'o bazingumą, lemiantį Zn(II)-CBG ryšio ir vandenilinių ryšių su aplinkinėmis aminorūgštimis stiprumą. Tad šiuo atveju pageidautina kuo didesnė pK_a vertė.

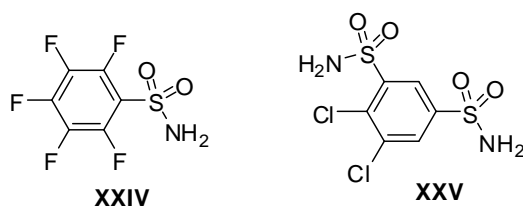
Aromatinis/heterociklinis fragmentas, lemiantis CBG rūgštingumą



Pav. 1.2.1.2-1. Aromatiniai / heterocikliniai CA slopiklių fragmentai, lemiantys CBG rūgštingumą ir slopiklio erdvinę struktūrą.

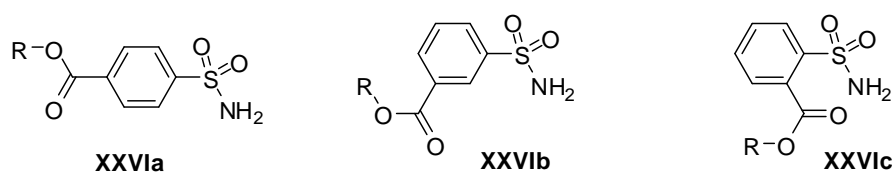
Fizikocheminiais metodais nagrinėjant CAII ir aromatinių benzulfonamidų sąveiką *in vitro*, buvo parodyta, kad geriausiai su CAII jungiasi slopikliai, kurių CBG pK_a yra panašios vertės į buferinio tirpalo pH ($pK_a = pH \pm 1$) [1]. Šis pastebėjimas svarbus ne tik sisteminių CA slopiklių kūrimui, bet gali būti panaudotas ir atrankių CAVA, VB, IX ir XII slopiklių kūrimui. Mitochondrijose, kuriose yra CAVA ir CAVB, terpė gerokai bazingesnė – pH ~9, o CA IX ir XII superraiška stebima augliuose, kur pH vertės yra žymiai mažesnės (sveikų žmogaus audinių pH ~7,52, o augliuose gali sumažėti net iki 6 [55, 56]). Konkrečias slopiklių CBG pK_a vertes autoriai nurodo retai, tačiau bendra tendencija yra tokia, kad mažėjant elektronų tankiui

žiede, sulfonamidų pK_a mažėja. Tipinės benzonsulfonamidų pK_a vertės yra $9 \div 10$ [57], ir tik įvedus daug elektronų akceptorinių grupių, galima žymiai sumažinti šią vertę. Pvz., pentafluorbenzensulfonamido **XXIV** $pK_a = 8,2$ [58], 4,5-dichlor-1,3-benzendisulfonamido **XXV** $pK_a = 7,5$ [59] (pav. 1.2.1.2-2). Atitinkamai furan-2-, tiofen-2-, tieno[2,3-*b*]furan-2- sulfonamidų $pK_a = 8,5 \div 10$ [60], 1,3,4-tiadiazol-2-, benzo[*d*]tiazol-2- sulfonamidų $pK_a = 7,5 \div 8,5$ [1, 57].



Pav. 1.2.1.2-2. Pentafluorbenzensulfonamidas **XXIV** ir 4,5-dichlor-1,3-benzendisulfonamidas **XXV**

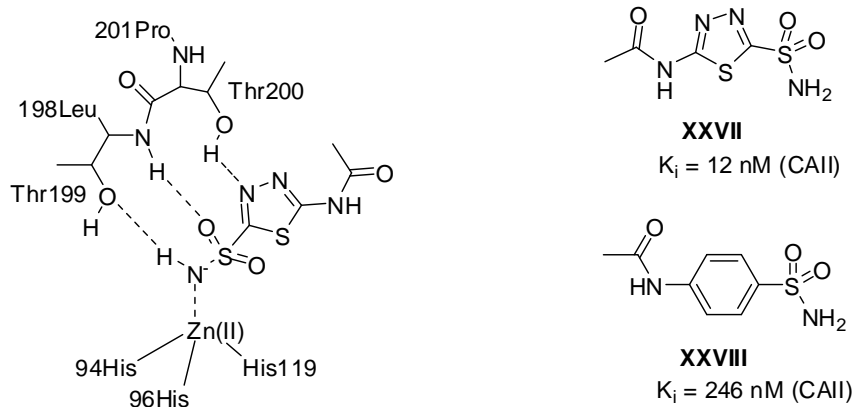
Vertinant slopiklio jungimąsi su aktyviuoju CA centru, nepakanka atsižvelgti vien tik į pakaitų, esančių prie aromatinio / heteroaromatinio žiedo, įtaką rūgštinėms CBG savybėms. Įvedus vieną ar daugiau pakaitų į aromatinį / heteroaromatinį žiedą, keičiasi ir jo hidrofobiškumas bei erdvinė struktūra, kas taipogi stipriai veikia slopiklio jungimąsi. Vienas tokių pavyzdžių gali būti *o*-, *m*- ir *p*-sulfamoilbenzoatų **XXVIa-c** (pav. 1.2.1.2-3) jungimasis prie hCAII. Nors karboksilato pakaito padėčiai artėjant prie sulfonamido grupės, jos pK_a nežymiai mažėja, hCAII slopinimas, lyginant *o*- ir *p*-sulfamoilbenzoatus, dėl erdvinės sąveikos silpnėja 10^2 - 10^3 karto [57].



Pav. 1.2.1.2-3. *o*-, *m*- ir *p*-sulfamoilbenzoatai **XXVIa-c**.

Žiedo heteroatomai dalyvauja papildomoje sąveikoje su polinėmis aminorūgštimis, esančiomis šalia katalitinio komplekso arba vandens molekulėmis. Pavyzdžiui, acetazolamido 1,3,4-tiadiazolo žiedo N(3) atomas su Thr200 šoninės grandinės hidroksigrupe sudaro vandenilinį ryšį [61], papildomai stabilizuojantį acetazolamido **XXVII** – hCAII kompleksą (pav. 1.2.1.2-4). Ši sąveika bei rūgštingesnė sulfonamido grupė kartu lemia

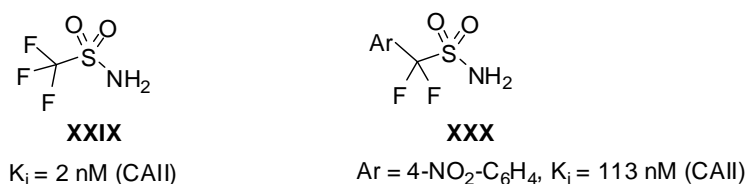
acetazolamido daugiau nei 20 kartų stipresnį nei *N*-(4-sulfamoilfenil)acetamido **XXVIII** jungimąsi su hCAII [62]. Be to, His64 taip pat gali dalyvauti sąveikoje su poliniais pakaitais aromatiniaame / heteroaromatiniame žiede [63, 64] (žr. skyrelį 1.2.1.3.1 „Sąveika su hidrofobine ir hidrofile aktyviojo CA centro sritimi“).



Pav. 1.2.1.2-4. Acetazolamido **XXVII** komplekso su hCAII aktyviuoju centru schema.

Dėl tų pačių priežasčių kiekybiškai įvertinti, kiek reikšmės slopiklio, kuriame CBG prijungta prie kondensuotos žiedų sistemos (naftaleno [65], benzo[*c*]1,2,5oksadiazolo [66] indolo [67-69], benzo[*b*]furano [67], benzo[*b*]tiofeno [70], benzo[*d*]tiazolo [71], benzo[*d*]izooksazolo [72], tieno[2,3-*b*]furano [60], tieno[2,3-*b*]tiofeno [73], tieno[3,2-*b*]tiofeno [73], tieno[2,3-*b*]tiopirano [74, 75], tieno[3,2-*b*]tiopirano [74], tieno[3,2-*e*]-1,2-tiazino [76], benzimidazo[1,2-*c*][1,2,3]tiadiazolo [77]), jungimuisi turi pK_a , o kiek žiedo hidrofobinė sąveika ir erdvinės savybės, yra sudėtinga.

Žemiausias pK_a reikšmės turi ne aromatiniai / heteroaromatiniai sulfonamidai, o trifluormetansulfonamidas **XXIX** [22] ($pK_a = 5,9$) ir jo dariniai – arildifluormetasulfonamidai **XXX** [78] ($pK_a = 6 \div 7,2$) (pav. 1.2.1.2-5). Tai veikiausiai yra viena iš priežasčių, dėl ko šios grupės junginiai yra geri CA slopikliai [22, 78, 79] ($K_i = 2 \div 5000 \text{ nM hCAI}$, $2 \div 670 \text{ nM hCAII}$).



Pav. 1.2.1.2-5. Trifluormetansulfonamido **XXIX** ir arildifluormetasulfonamido **XXX** struktūra ir hCAII slopinimo aktyvumas.

Viena aril / heteroarilfosfono rūgščių silpno hCA slopinimo priežasčių gali būti santykinai didelis jų rūgštingumas [80] ($pK_{a1} = 1 \div 3$). Tuo tarpu aril / heteroarilborono rūgščių pK_a verčių ribos yra mažesnės ir apima didesnį diapazoną [81] ($pK_a = 4,2 \div 9,0$); todėl jos yra patrauklūs pirmtakai hCA slopiklių sintezėje.

Akivaizdus CBG rūgštingumo įtakos pavyzdys yra hCA slopinimas sulfamidais ir sulfamatais. Tyrinėjant identišką slopiklių porą, besiskiriančias tik šiomis CBG, buvo pastebėta, kad sulfamatai hCA slopina $10\text{--}10^3$ karto stipriau nei atitinkami sulfamidai. Kone vienintelis tokio skirtumo paaiškinimas yra šių funkcinių grupių pK_a skirtumas – tirtų sulfamatų pK_a vertė yra apie 8,6, o sulfamidų apie 10,7 [82]. Yra duomenų, rodančių, kad tik aromatiniai sulfamidai, turintys elektronų akceptorinius pakaitus benzeno žiede, hCA slopina geriau nei atitinkami sulfamatai [37].

1.2.1.3 Slopiklio molekulės sąveika su toliausiai nuo katalitinio komplekso nutolusiomis CA aktyviojo centro aminorūgštimis

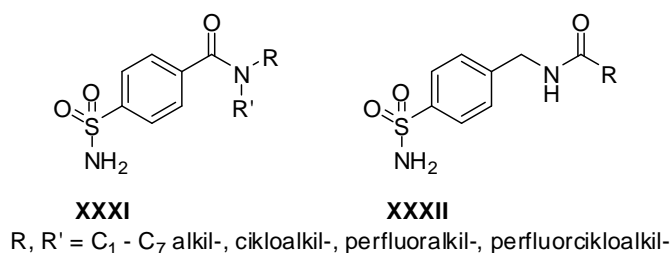
Visų hCA, išskyrus hCAI, hCAIII ir hCAXIII, aktyviojo centro srities, dalyvaujančios sąveikoje su CBG, aminorūgščių seka yra identiška [83]. His94, His96, His119, ir Zn(II) sudaro kompleksą su CBG, Glu106, Leu198 (hCAIII Phe), Thr199 ir Thr200 (hCAI His200, hCAXIII Val200) orientuoja substrato ar slopiklio padėtį aktyviajame centre. Nors dėl kitų aminorūgščių įtakos erdviškai jų padėtis gali labai nežymiai skirtis, slopiklio atrankumą turėtų lemti sąveika su tolimesnių CA aktyviojo centro aminorūgščių šoninėmis grandinėmis.

Struktūros skirtumai šalia katalitinės srities hCAI ir hCAIII atveju stipriai veikia slopiklių jungimąsi prie jų. hCAIII vietoje Leu198 turi Phe198, kurio šoninė grandinė yra erdviškai gerokai didesnė. Šio skirtumo pakanka, kad hCAIII su praktiškai visais CA slopikliais jungtųsi labai silpnai ($K_i \gg 10\mu\text{M}$). hCAI, turinti His200, o ne Thr200, taip pat gerokai silpniau sąveikauja su daugeliu slopiklių. hCAI ypatingai jautrus pakaito vietai benzeno ar heterociklo žiede – *o*-pakeisti benzensulfonamidai su hCAI jungiasi žymiai silpniau [84]–[86], nei kitose padėtyse pakaitus turintys slopikliai.

Toliau nuo katalitinio centro nutolusios CA aktyviojo centro srities įtaką slopiklių atrankumui nagrinėti yra sudėtinga, nes nėra daugelio CA izoformų rentgenostruktūrinės CA ir slopiklio kompleksų analizės duomenų. Greičiausiai dėl paties baltymo savybių ir to, kad daug izoformų yra aptiktos per pastarąjį dešimtmetį, daugiausia tokių duomenų yra apie hCAI ir hCAII. Likusių CA analizė dažniausiai remiasi modeliavimo darbais.

1.2.1.3.1 Sąveika su hidrofobine ir hidrofiline aktyviojo CA centro sritimi

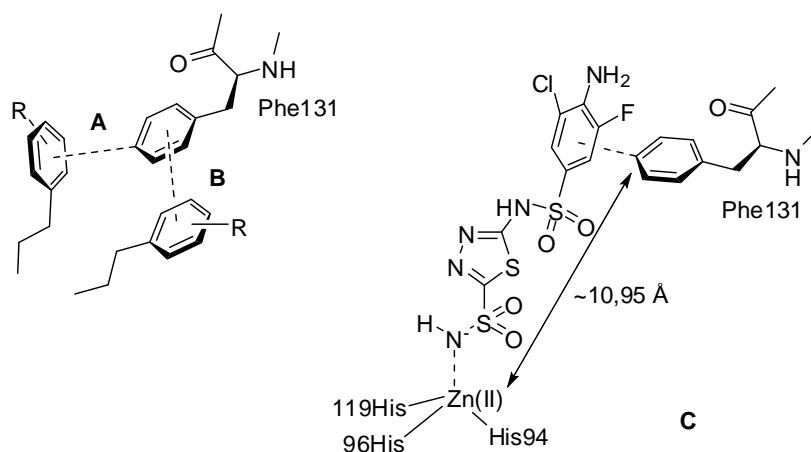
Tiriant bCAII sąveiką su 4-sulfamoilbenzamidais **XXXI** ir *N*-(4-sulfamoilbenzil)karboksamidais **XXXII**, turinčiais įvairaus ilgio ir šakotumo alkilgrupes (pav. 1.2.1.3.1-1), buvo parodyta, kad hidrofobinėje sąveikoje dalyvaujant alifatinėms grandinėms, nuo alkilo šakotumo ar ciklinio fragmento buvimo jungimosi konstanta nepriklauso [87]. Kitaip tariant, kadangi nėra specifinės sąveikos tarp aminorūgščių šoninių grandinių ir alkilo fragmento, sąveikos stiprumas priklauso vien nuo hidrofobinės grupės paviršiaus ploto. Hidrofobinės grupės paviršiaus plotas didėja, įvedant papildomas CH₂ grupes arba vandenilio atomus pakeičiant fluoru. Farmakokinetiniu požiūriu, fluoro įvedimas turi nemažą privalumą – fluorinti angliavandeniai organizme metabolizuojami gerokai lėčiau, o perfluorinti apskritai nemetabolizuojami, tad tokio vaisto veikimo trukmė daug ilgesnė.



Pav. 1.2.1.3.1-1. Alkil-, cikloalkil- 4-sulfamoilbenzamidai **XXXI** ir *N*-(4-sulfamoilbenzil)karboksamidai **XXXII**.

Iš visų nepolinės hCA aktyviojo centro srities aminorūgščių verta išskirti tik 131-ąją, kurios prigimtis įvairiose izoformose skiriasi: hCA I, IV, IX, XII, XIV ir XV atveju – tai aminorūgštys, turinčios įvairaus šakotumo ir ilgio alifatinės grandinės, o II, III, VA/VB, VI, VII ir XIII atveju – aromatinės aminorūgštys. Tai yra svarbi sritis kuriant atrankius CA slopiklius, nes

aromatinis šoninės aminorūgšties grandinės fragmentas gali dalyvauti sanglaudoje su aromatiniais ar heteroaromatiniais slopiklio fragmentais. Tokia sąveika yra stipresnė už hidrofobinę sąveiką, tad ji labiau stabilizuoja CA-slopiklio kompleksą [88]. Tyrimai, atlikti su hCAII mutantais, vietoje Phe131 turinčiais Val131, rodo, kad ši sąveika slopiklio jungimąsi pagerina iki 6 kartų [89]. Dažniausiai tokia aromatinių žiedų sanglauda vyksta Phe131 benzeno žiedui briauna sąveikaujant su aromatinium/heteroaromatinium slopiklio fragmentu [41, 76, 89]–[91] (pav. 1.2.1.3.1-2, sąveika A). Tik retais atvejais sanglauda vyksta persiklojant žiedų plokštumoms [88, 92] (pav. 1.2.1.3.2-1, sąveika B). Atstumas hCAII tarp Zn(II) ir Phe131 benzeno žiedo yra apie 10,6–11,2 Å, tad tokioje sanglaudoje gali dalyvauti aromatiniai slopiklio fragmentai, nuo benzensulfonamido fragmento atskirti 2–3 atomų ilgio jungtuku (pav. 1.2.1.3.1-2 C).

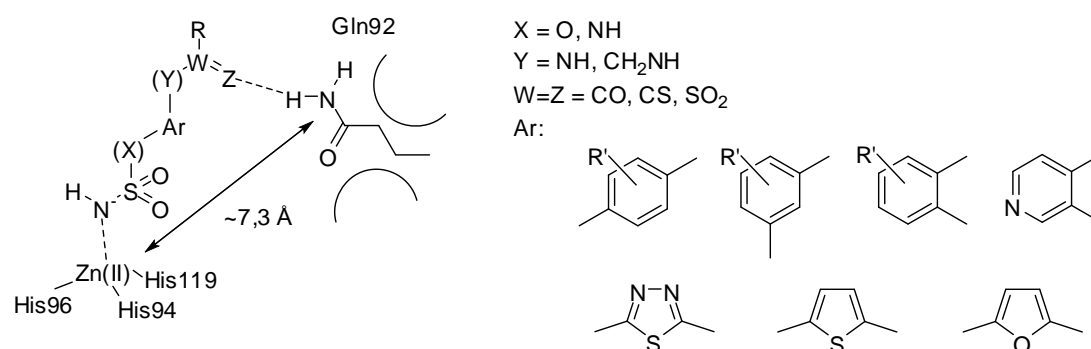


Pav. 1.2.1.3.1-2. Aromatinių žiedų sanglauda: **A** – briauna į plokštumą; **B** – žiedų sanglauda plokštumomis; **C** – sanglaudos briauna į plokštumą hCAII – slopiklio komplekse pavyzdys (PDB kodas 2hoc).

Hidrofilinė sąveika kur kas sunkiau prognozuojama nei hidrofobinė, nes joje dalyvauja ne tik hidrofiliinė aktyviojo CA centro sritis, bet ir vandens molekulės. Hidrofilinę aktyviojo CA centro sieną, be jau minėtų cinko joną kompleksuojančių His94, 96 ir 119 bei substrato ar slopiklio padėtį fiksuojančių Glu106, Thr119, 200, sudaro Gln92, His64 bei toliausiai nuo katalitinio centro esančios Asn62 ir 67.

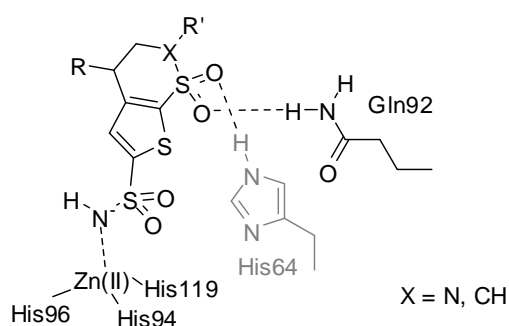
Gln92 šoninė grandinė yra ganėtinai ilga. Tačiau dėl glaudaus kitų aminorūgščių šoninių grandinių išsidėstymo ji yra mažai judri (atstumas tarp δ

karbonilinės grupės anglies atomo ir cinko jono yra $7,2 \div 7,7$ Å). Šoninės grandinės gale esanti amidinė grupė yra geras tiek vandenilinio ryšio donoras, tiek akceptorius. Todėl tiesiogiai arba per vandens molekules ji gali sąveikauti su daugeliu tirpumą gerinančių slopiklio fragmentų – amidais [93], sulfonamidais [94-96], sulfonais [97], tiokarbamidais [98] – ir taip stabilizuoti daugelio slopiklių kompleksus su CA (pav. 1.2.1.3.1-3). Kita vertus, ši aminorūgštis yra visose žinomose hCA izoformose, tad ji turėtų mažai veikti hCA izoformų slopinimo atrankumą.



Pav. 1.2.1.3.1-3. Slopiklio fragmentai ir jų padėtis sąveikoje su Gln92.

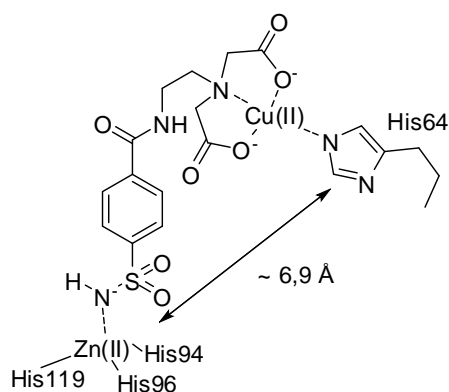
His64 hCA atlieka ypatingai svarbią funkciją – veikia kaip protonų siurblys katalitiniame CO₂ hidratavimo cikle. Šios aminorūgšties šoninė grandinė yra nutolusi panašiu atstumu nuo katalitinio cinko jono komplekso kaip Gln92 ir gali dalyvauti analogiškoje sąveikoje su slopiklio poliniais fragmentais (pav. 1.2.1.3.1-4).



Pav. 1.2.1.3.1-4. Slopiklio sąveikos su Gln92 ir His64 pavyzdys.

Tačiau imidazolo žiedas paprastai būna protonizuotos formos ir yra tik vandenilinio ryšio donoras. Dėl šios priežasties slopikliai turintys tik lengvai besiprotonuojančius arba teigiamai įkrautus pakaitus su hCA jungiasi silpniau [99].

Dėl savo funkcijos CO₂ hidratavimo cikle His64 tapo labai įdomios slopiklių grupės taikiniu. Benzensulfonamidai, turintys jungtuku atskirtą vario aminodiacetato fragmentą, šią aminorūgštį naudoja kaip antrinį atpažinimo fragmentą. Vario aminodiacetatas su histidino imidazolo fragmentu sudaro patvarų kompleksą ir neleidžia šiam fragmentui dalyvauti protonų pernašoje (pav. 1.2.1.3.1-5) [100]. Be to, keičiant jungtuko ilgį ir struktūrinius elementus, galima pasiekti gana žymaus įvairių hCA izoformų slopinimo atrankumo [101, 102].

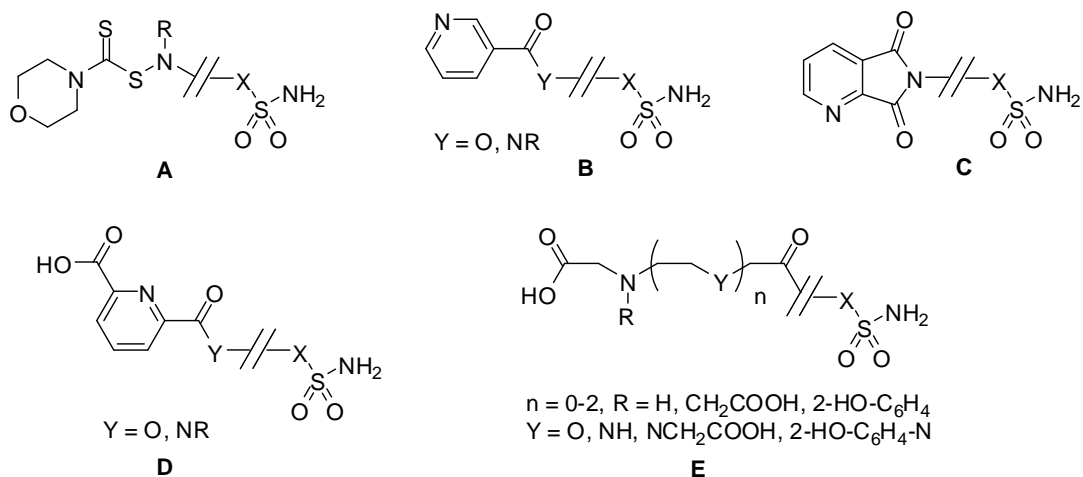


Pav. 1.2.1.3.1-5. Vario diaminoacetato fragmento sąveikos su His64 schema.

1.2.1.4. Slopiklio savybės, nesusijusios su slopiklio ir aktyviojo baltymo centro sąveika

Farmakologiniu požiūriu svarbi ne tik slopiklio sąveika su taikiniu, bet ir su ADME susiję veiksniai – tirpumas vandenyje ar buferiniame tirpale, stabilumas tokiose sistemose, perėjimas per membranas ir metabolizmas.

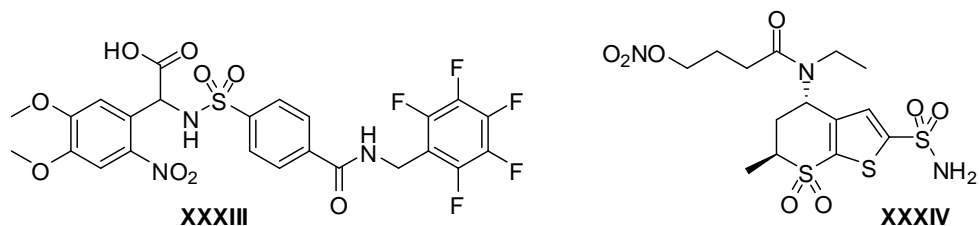
Siekiant išlaikyti abi savybes – tirpumą vandenyje ar buferiniame tirpale bei gebėjimą pereiti per membranas, įvairūs hCA slopikliai gali būti modifikuojami morfolinotiokarbonilsulfenilamino (pav. 1.2.1.4-1 A) [103], nikotino rūgšties (pav. 1.2.1.4-1 B) [104], piridin-2,3- arba -2,6-dikarboksirūgščių (pav. 1.2.1.4-1 C ir D) [105], poliaminopolikarboksilatų (pav. 1.2.1.4-1 E) [106] fragmentais, gamtinėmis ir modifikuotomis aminorūgštimis [93, 107, 108], dipeptidais [109], oligopeptidais [110], mono- ir disacharidais [111-115].



Pav. 1.2.1.4-1. Slopiklio tirpumą vandenyje gerinantys fragmentai.

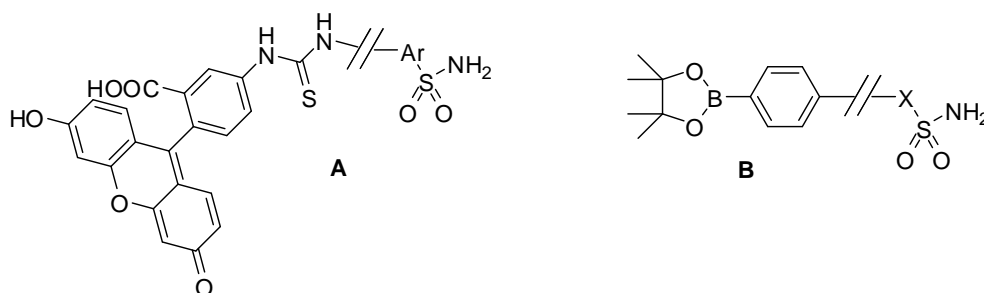
Vien sąveika tarp baltymo ir slopiklio pagrįstas hCA slopiklių atrankumas yra labai sunkiai pasiekiamas ir dažnai mažai išreikšta savybė, bet kartais ją galima padidinti remiantis skirtingu hCA izoformų pasiskirstymu organizme. Transmembranines hCA IX, XII ir XIV, prijungtas prie membranos IV ir XV bei į seiles ir pieną sekretuojamą VI galima atrankiai slopinti slopikliais, negalinčiais pereiti per ląstelės membranas. Tokiomis savybėmis pasižymi slopikliai, turintys teigiamai įkrautus fragmentus, pvz., ketvirtines amonio druskas [116] arba piridinio katijoną [69, 117-120].

Įvairūs fragmentai prie CA slopiklių prijungiami ir siekiant kitų tikslų. Slopiklio veikimo trukmei prailginti įvedami nemetabolizuojami polifluorinti fragmentai [87, 121, 122] arba lengvai pašalinama grupė blokuojamas sulfonamido fragmentas [123] (pvz., fotojautrus benzonsulfonamidas **XXXIII**) (pav. 1.2.1.4-2). Glaukomi gydyti skirtus preparatus galima papildomai funkcionalizuoti NO (jo trūkumas stebimas akies skystyje sergant šia liga) išskiriančiais fragmentais – nitratais (pvz., 5,6-dihidro-4*H*-tieno[2,3-*b*]tiopiran-2-sulfonamidas **XXXIV**) (pav. 1.2.1.4-2) [124].



Pav. 1.2.1.4-2. fotojautrus benzonsulfonamidas **XXXIII** ir NO išskiriantis 5,6-dihidro-4*H*-tieno[2,3-*b*]tiopiran-2-sulfonamidas **XXXIV**.

Hipoksiniai augliai sunkiai pasiduoda klasikinei chemo- ir radioterapijai; juose vyksta hCAIX ir XII superraiška. Tad diagnostiniais tikslais buvo susintetinti fluoresceino fragmentus turintys CA slopikliai [125, 126] (pav. 1.2.1.4-3 A). Šio tipo auglių gydymui buvo susintetinti boro atomą turintys slopikliai (pav. 1.2.1.4-3 B), kuriuos galima naudoti neutroninėje radiochemoterapijoje [47], pagrįstoje ^{10}B geba sugerti žemos energijos neutronų spinduliuotę ir susidarant ^7Li ir α dalelėms.



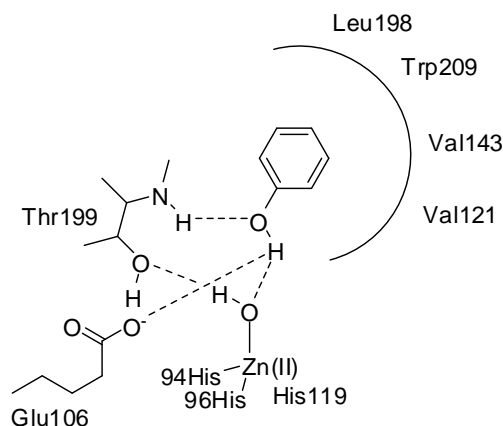
Pav. 1.2.1.4-3. Hipoksinių auglių diagnostikai ir gydymui skirtų CA slopiklių fluorescuojantis (**A**) ir boro turintis (**B**) fragmentai.

1.2.2 Neklasikiniai CA slopikliai

Neklasikiniai CA slopikliai pasižymi tuo, kad jų molekulės tiesiogiai cheminio ryšio su katalitiniu cinko jonu nesudaro. Yra keli tokių slopiklių veikimo principai. Pagal vieną jų, slopiklis sąveikauja ne su katalitiniu cinko jonu, o su aktyviu Zn(II)-OH ar Zn(II)-OH_2^+ kompleksu, taip „įkalindamas“ hidroksido anijoną arba vandens molekulę (fenoliai ir poliaminai). Kiti būdai yra pagrįsti erdviniu CA aktyviojo centro užblokavimu (kumarino ir fulereno dariniai).

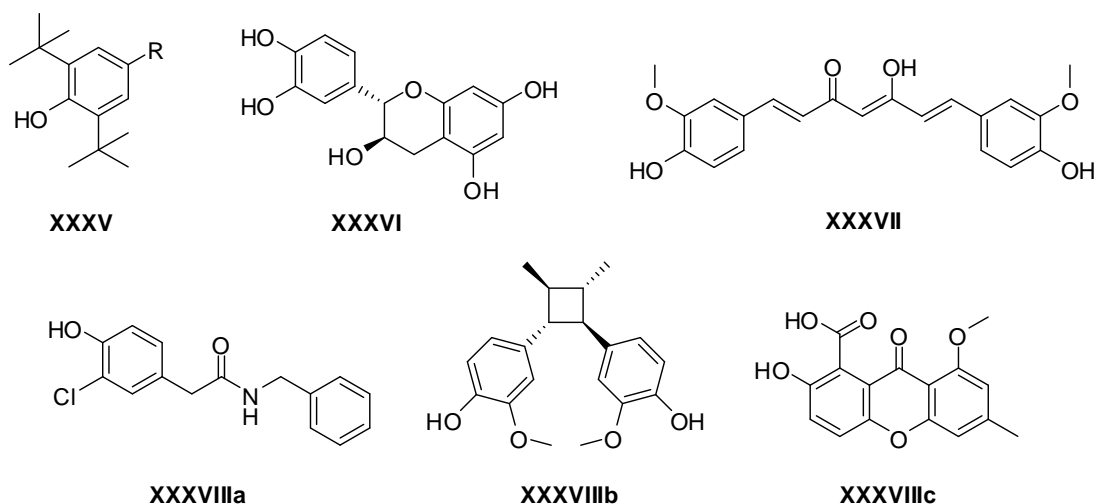
1.2.2.1 Fenoliai ir poliaminai

Tai, kad fenolis pasižymi silpnomis CA slopinimo savybėmis, žinoma seniai [127], tačiau būtent jo jungimosi su CA pobūdis yra unikalus. Užuoat pakeitęs prie Zn(II) prijungtą OH^- anijoną ar vandens molekulę, fenolis su ja sudaro vandenilinį ryšį. Kitą silpną vandenilinį ryšį fenolio OH grupė sudaro su Thr199 amidiniu fragmentu bei Glu106. Tuo tarpu benzeno žiedas dalyvauja hidrofobinėje sąveikoje su Trp209, Val121, Leu198 ir Val143 [128] (pav. 1.2.2.1-1).



Pav. 1.2.2.1-1. Fenolio sąveiko su aktyviuoju hCA centru schema.

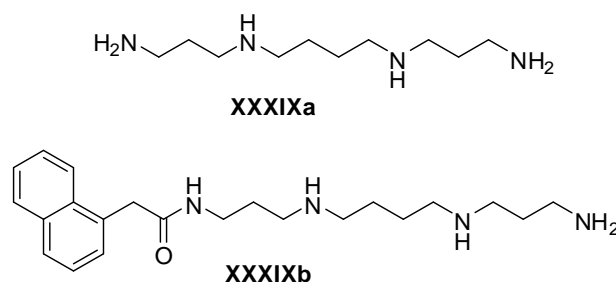
Nors fenoliai kaip CA slopikliai tirti nedaug, tačiau tam tikrą sąryšį tarp struktūros ir aktyvumo galima įžvelgti. Su hCAI ir hCAII geriausiai jungiasi fenoliai **XXXV** (pav. 1.2.2.1-2), 2-oje ir 6-oje padėtyse turintys erdviškai dideles hidrofobines *tert*-butilgrupes [129]. Tokios struktūros junginiai ir keletas gamtinių polifenolių (pvz., katechinas **XXXVI**, kurkuminas **XXXVII** (pav. 1.2.2.1-2)) yra vidutiniai CA slopikliai ($K_i=0,38-12 \mu\text{M}$) [129, 130]. Tuo tarpu gamtiniai 2-chlor-, 2-metoksi-, 2-karboksifenoliai **XXXVIIIa-c** (pav. 1.2.2.1-2) atrankiai slopina mitochondrinės hCAVA ir hCAVB. Šių CA K_i vyrauja tarp 70 ir 125 nM, ir yra daugiau nei 10^3 kartų mažesnė nei hCAI ir hCAII [131]. Deja, apie tokio atrankumo priežastis galima tik spėlioti, nes kol kas yra labai mažai duomenų apie hCAVA ir VB tretines struktūras.



Pav. 1.2.2.1-2. Fenolių **XXXV–XXXVIII** struktūros.

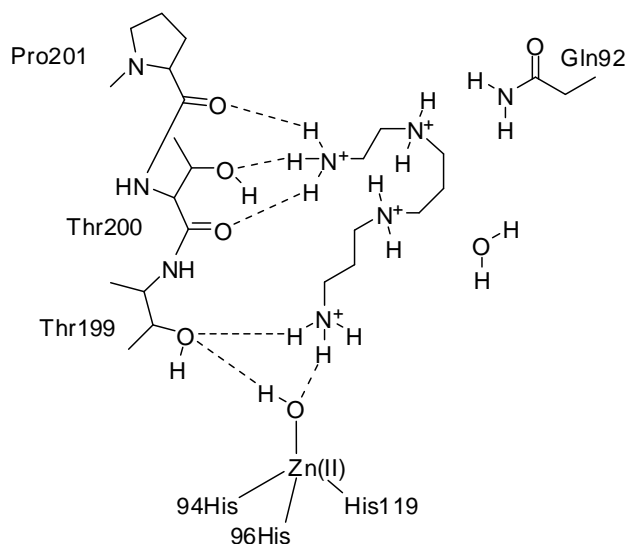
Panašiu principu kaip ir fenoliai, t. y. nesuardydami katalitinio Zn-OH komplekso, o sąveikaudami su juo, hCA slopina ir poliaminai (pvz., sperminas

XXXIXa ar jo acilintas darinys **XXXIXb** (pav. 1.2.2.1-3)) [132]. Šie junginiai fiziologinėje terpėje paprastai egzistuoja polikatijono pavidalu. CA geriausiai slopina poliaminai, turintys bent septynių atomų ilgio grandinę, kurioje yra nuo dviejų iki keturių azoto atomų. Būtina slopiklio sąlyga yra terminalinė NH₂ grupė, tuo tarpu kitos aminogrupės gali būti funkcionalizuotos, o tolimoji terminalinė grupė gali turėti net erdviškai didelius pakaitus.



Pav. 1.2.2.1-3. Poliaminų **XXXIX** struktūros.

Aprašytos struktūros poliaminai yra vidutiniai arba stiprūs sisteminiai CA slopikliai ($K_i = 40 \div 10000$ nM). Toks gana netikėtas poliaminų CA slopinimo aktyvumas gali būti aiškinamas tuo, kad terminalinis aminos sudaro vandenilinių ryšių su katalitiniu Zn(II)-OH kompleksu ir dalyvauja vandenilinių ryšių tinkle su Thr199, Thr200, Pro201, Gln92 bei vandens molekulėmis (pav. 1.2.2.1-4).



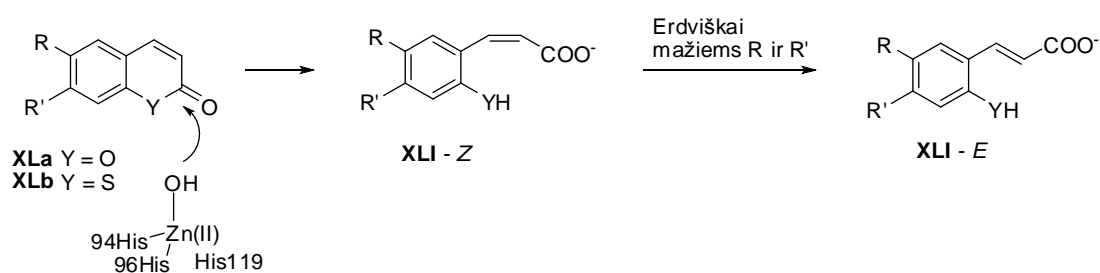
Pav. 1.2.2.1-4. Spermino **XXXIXa**, esančio tetrakatijono forma, sąveikos su aktyviuoju hCAII centru schema.

Dėl didelės konformacinės laisvės šie poliaminai lengvai prisitaiko prie aktyviojo baltymo centro ir gerai sąveikauja su visomis hCA izoformomis. Iš visų hCA izoformų silpniausiai su poliaminiais sąveikauja hCAI ($K_i > 1400$

nM), šalia katalitinio cinko jono komplekso turinti teigiamai įkrautą His200 imidazolo fragmentą. Tuo tarpu hCAIV, vienintelė iš visų izoformų turinti šalia aktyviojo centro polinę 202-ąją aminorūgštį (Thr202 vietoj Pro202 arba Val200), šių poliaminų yra slopinama geriausiai ($K_i = 10 \div 100$ nM).

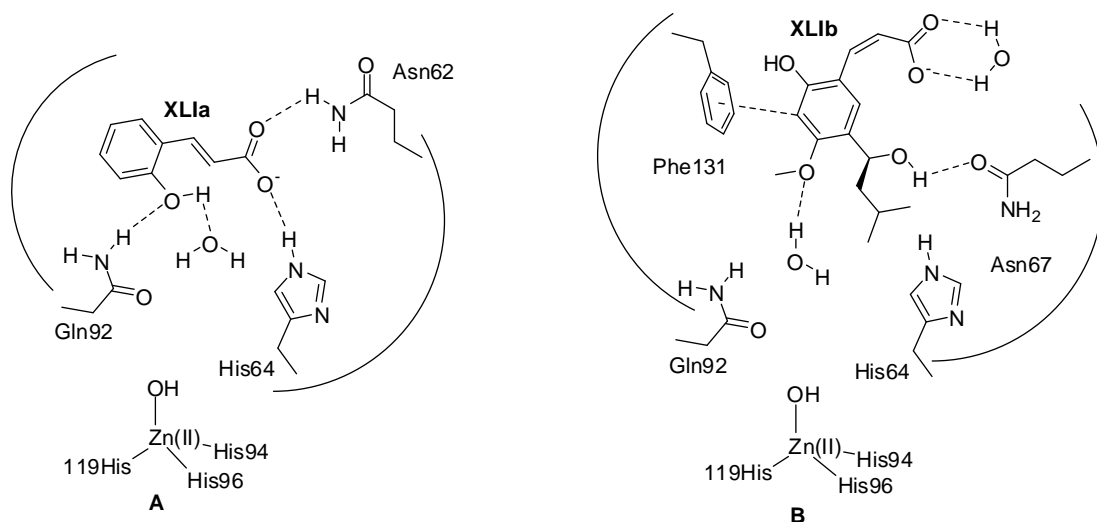
1.2.2.2 Kumarinai ir tiokumarinai

Per pastaruosius porą metų aptikti [133] ir intensyviai tyrinėjami kumarinai **XLa** ir tiokumarinai **XLb** hCA slopina jungdamiesi prie šių fermentų aktyviojo centro žiočių, taip jį užblokuodami. Kumarinas bei tiokumarinas patys nėra slopikliai, o aktyvūs yra jų hidrolizės produktai [3] (pav. 1.2.2.2-1).



Pav. 1.2.2.2-1. Kumarino hidrolizės ir izomerizacijos schema.

Pačios hCA, pasižyminčios silpnu esteraziniu aktyvumu, katalizuoja aktyvios šio tipo slopiklių formos susidarymą. 6-ojoje ir 7-ojoje kumarino žiedo padėtyse esančių pakaitų dydis lemia, ar vyks susidariusios nesočiosios rūgšties *Z-E* izomerizacija. Nesant pakaitų šiose padėtyse, matyt, dėl pakankamos erdvės, vyksta izomerizacija. Susidariusių 2-hidroksi(2-merkapt)cinamono rūgščių **XLI** kompleksą su hCA aktyviuoju centru stabilizuoja karboksilato sudaromi vandeniliniai ryšiai su Asn62 ir His64 bei vandeniliniai ryšiai, susidarantys tarp fenolinės hidroksigrupės ir Gln92 [134] (pav. 1.2.2.2-2 A).

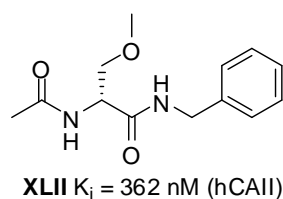


Pav. 1.2.2.2-2. *E*-2-hidroksicinamono rūgšties **XLla** (A) ir *Z*-2-hidroksi-4-(1*S*-3-metilbutil)-3-metoksicinamono rūgšties **XLlb** (B) sąveikos su hCAII aktyviuoju centru schema.

Jeigu kumarino 6-ojoje ir 7-ojoje padėtyse yra erdviškai dideli pakaitai, nesočiosios rūgšties *cis-trans* izomerizacija nevyksta. *Z*-2-hidroksi-4-(1*S*-3-metilbutil)-3-metoksicinamono rūgšties **XLlb** atveju slopiklio ir CA kompleksą daugiausiai stabilizuoja *Z*-cinamono rūgšties ir Phe131 benzeno žiedų sanglauda bei stipri slopiklio 2-hidroksiizopentilfragmento hidroksigrupės sąveika su šonine Asn67 grandine [3] (pav. 1.2.2.2-2 B).

Pagrindinis šio tipo slopiklių privalumas yra didelis atrankumas konkrečioms hCA izoformoms. Tikėtina to priežastis yra ta, kad slopiklis sąveikauja ne su katalitine hCA aktyviojo centro dalimi, kuri kone visoms hCA yra identiška, o su gerokai didesne aminorūgščių įvairove pasižyminčiomis baltymo sritimis. Jau dabar, praėjus dviems metams po pirmosios publikacijos šia tema, yra aprašyti hCA II [134], IX [135] ir XIII [134] atrankūs slopikliai, konkrečią izoformą slopinantys 100 kartų geriau, nei bet kurią kitą.

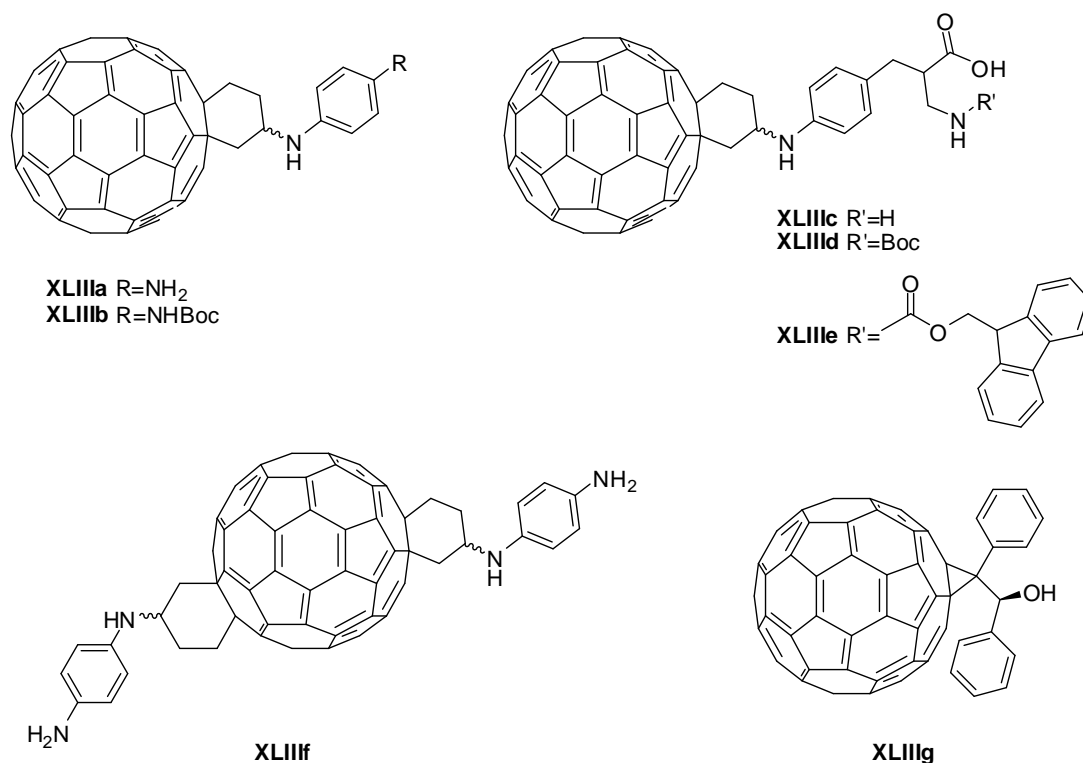
Atradus šį slopinimo mechanizmą, juo taip pat aiškinamas ir kitų iki šiol nesuprasto CA slopinimo mechanizmo junginių (pvz., lakozamido **XLII** (pav. 1.2.2.2-3)) aktyvumas [136].



Pav. 1.2.2.2-3. Lakozamido **XLII** struktūra ir hCAII slopinimo aktyvumas.

1.2.2.3 Fulerenai

Remiantis panašiu veikimo principu kaip ir kumarinai, t. y. uždariant įėjimą į aktyvųjį CA centrą, buvo pasiūlyta dar viena CA slopiklių grupė – funkcionalizuoti fulerenai **XLIIIa-g** [137]. Šios slopiklių grupės veikimo principas pagrįstas tuo, kad fulereno (C_{60}), kaip ir daugelio CA aktyviojo centro žiočių, skersmuo yra apie 1 nm.



Pav. 1.2.2.3-1. hCA slopikliai – fulerenai.

Be to, norint, kad fulerenas tirptų vandenyje, jį būtina funkcionalizuoti įvedant daug polinių funkcinių grupių turintį fragmentą. Toks fragmentas, pakliuvęs į aktyvųjį CA centrą, stabilizuoja slopiklio ir baltymo kompleksą sąveikaudamas su polinėmis aminorūgščių šoninėmis grandinėmis – His64, His94, His96, Val121, Thr200. Kol kas aprašyti vos keli šio tipo slopikliai, pasižymintys silpnu arba vidutiniu CA slopinimo aktyvumu ($K_i = 0,73\div 111 \mu\text{M}$).

2. Rezultatai ir jų aptarimas

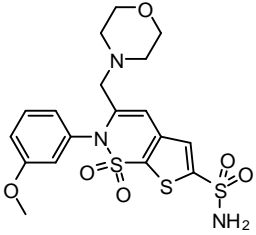
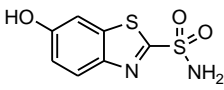
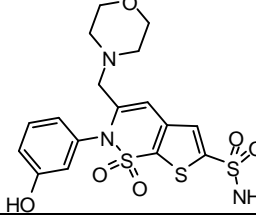
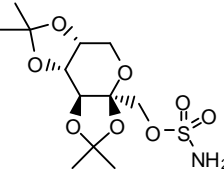
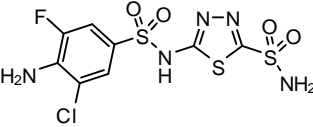
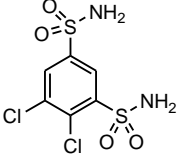
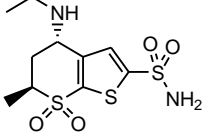
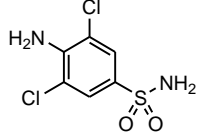
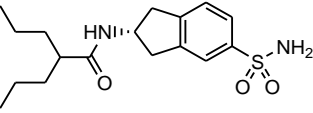
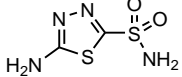
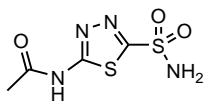
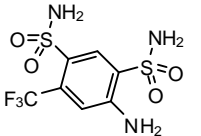
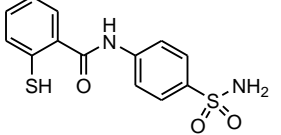
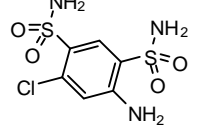
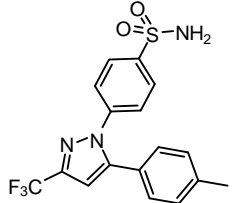
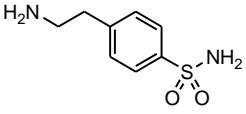
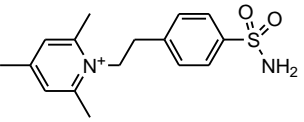
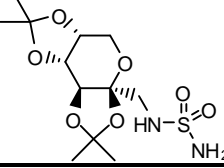
2.1. Teorinis hCA slopiklių sąveikos su baltymu tyrimas

Dokimas – tai molekulių modeliavimo metodas, kurį naudojant yra parenkamos geriausiai su aktyviuoju baltymo centru sąveikaujančios mažų molekulių konformacijos. Kiekvienos konformacijos sąveiką su aktyviuoju baltymo centru įvertina ir prognozuojamai geriausiai sąveikaujančias konformacijas atrenka taip vadinama įverčio funkcija (angl. scoring function). Toks modeliavimo metodas dažnai taikomas norint iš didelių junginių rinkinių atrinkti junginius, galimai geriausiai besijungiančius su tiriamu baltymu. Yra sukurta daug dokimo programų – tiek komercinių, tiek atvirojo kodo, besiskiriančių ir dokimo algoritmais, ir įverčio funkcija, tačiau kurios nors išskirti kaip pranašesnės už kitas negalima [138]. Šiame darbe buvo naudojama programa eHiTS [139, 140]. Ji buvo pasirinkta dėl jos neribojamos prieigos akademinėi visuomenei, gana patogaus naudojimo ir automatinio molekulių jonizavimo modeliavimo galimybės.

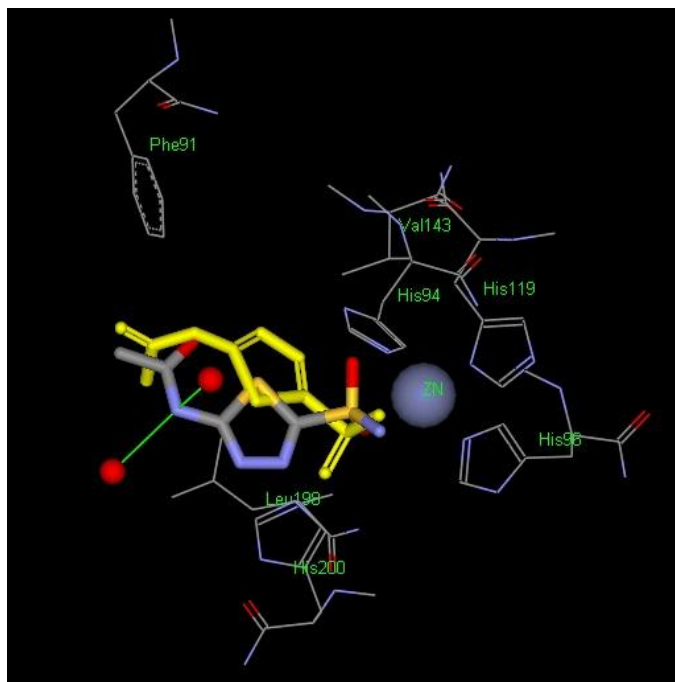
2.1.1. Žinomos struktūros hCA slopiklių kompleksų dokimas

Siekiant įvertinti programos eHiTS gebą prognozuoti ligandų jungimąsi prie karboanhidrazių, parinkta 20 baltymo ir ligando kompleksų (lentelė 2.1.1-1), kurių struktūros yra nustatytos kristalų rentgenostruktūrine analize ir yra žinomi hCA slopinimo duomenys. Iš slopiklių, esančių šiuose kompleksuose sudarytas junginių rinkinys 1.

Lentelė 2.1.1-1. Kompleksai, iš kurių ligandų sudarytas junginių rinkinys 1.

Nr.	Ligandas	hCA	PDB kodas	Nr.	Ligandas	hCA	PDB kodas
1		II	1i8z	10		II	1zfg
2		II	1i9l	11		II	1eou
3		II	2hoc	12		II	2pou
4		II	1cil	13		II	1zge
5		II	2qo8	14		II	2hnc
6		I	1azm	15		II	2pow
		II	1yda				
		XII	1jd0				
7		II	2hd6	16		II	2pov
8		II	1oq5	17		II	2nng
9		II	1ze8	18		II	2h15

Atliktas šių junginių dokinimas programa eHiTS v6.2 (nekeičiant numatytųjų dokinimo parametrų), naudojant neoptimizuotas rentgenostruktūrinę analizę nustatytas baltymo ir ligando struktūras. Ne visada žemiausios energijos komplekso modelis gerai atitinka kristalografiškai nustatytą komplekso struktūrą, nors pagrindinės tendencijos išlieka – ligandas aktyviajame centre yra orientuotas teisingai, t.y. sulfonamidinė grupė yra nukreipta į aktyviojo baltymo centro cinko joną. Toks reiškinys nesunkiai paaiškinamas faktu, kad dokinant programa automatiškai pašalina visas kristalinėje gardelėje esančias vandens molekules, įskaitant ir tas, kurios gali turėti lemiamą įtaką ligando orientacijai aktyviajame baltymo centre.

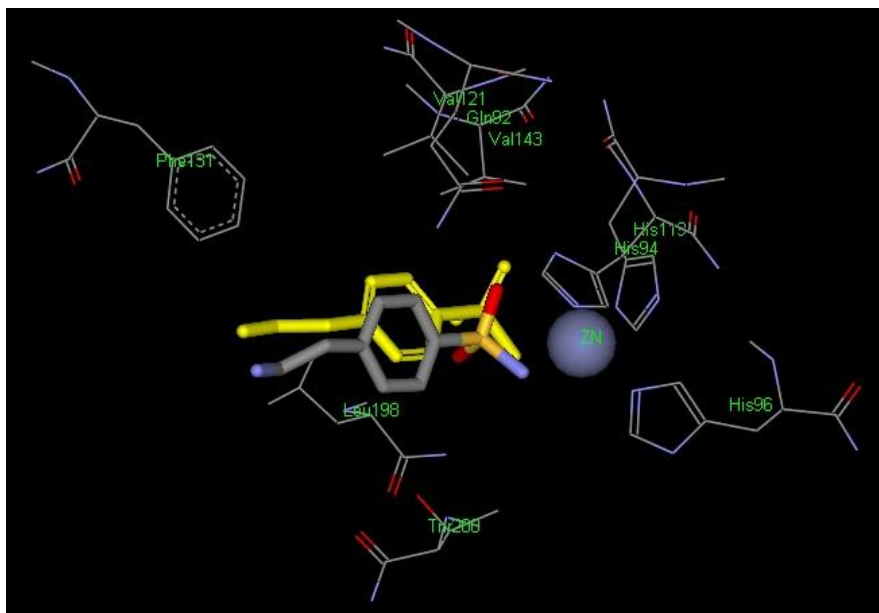


Pav. 2.1.1.-1. Acetazolamido padėtis aktyviajame hCAI centre. Kristalografiškai nustatyta (nuspalvintas pagal atomų spalvas, PDB kodas 1azm) bei dokinimo metu įvertinta kaip stipriausios sąveikos (geltona spalva) padėtis

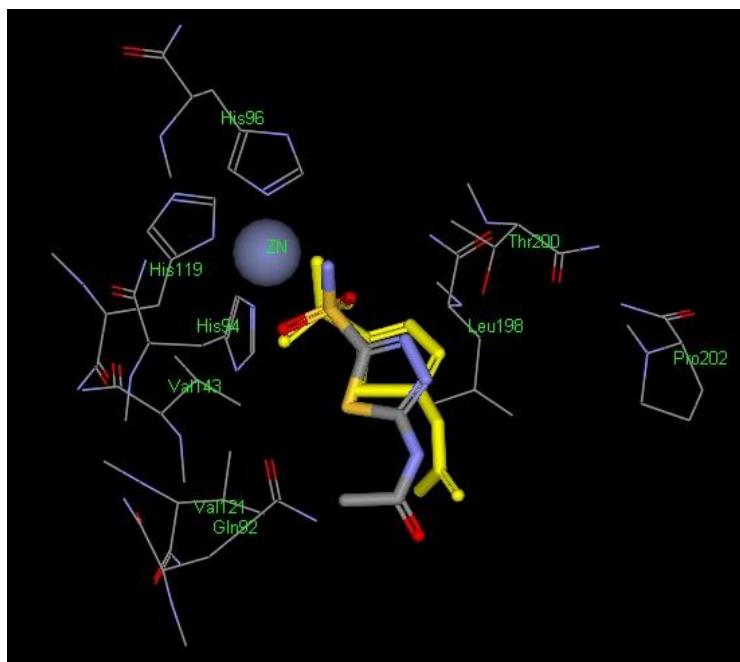
Paveiksle 2.1.1.-1 pateikiamas pavyzdys, kuriame vandens molekulės, esančios aktyviajame baltymo centre orientuoja ligandą kitaip, nei prognozuojama dokinant. hCAI aktyviajame centre esančios acetazolamido molekulės amidinė NH grupė sudaro vandenilinius ryšius su dviem vandens molekulėm (paveiksle pavaizduoti kaip žali brūkšneliai). Šiuo atveju ligandas yra ne viena acetazolamido molekulė, o visas acetazolamido – vandens kompleksas, tuo tarpu modeliuojant vertinama tik acetazolamido molekulės

sąveika su aktyviojo baltymo centro aminorūgščių šoninėmis grandinėmis ir katalitiniu cinko jonu.

Jei baltymo ir ligando komplekse vandens molekulės ryškus vaidmens neatlieka, programa eHiTS patenkinamai įvertina mažos organinės molekulės padėtį jame (pav 2.1.1-2, 2.1.1-3).



Pav. 2.1.1-2 4-(2-aminoetil)benzensulfonamido padėtis aktyviajame hCAII centre. Kristalografiškai nustatyta (nuspalvintas pagal atomų spalvas, PDB kodas 2nng) bei dokavimo metu įvertinta kaip stipriausios sąveikos (geltona spalva) padėtis



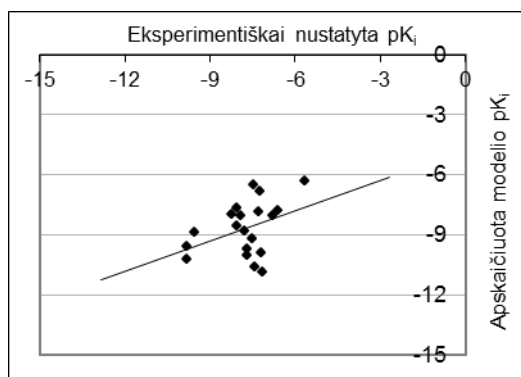
Pav.2.1.1-3 Acetazolamido padėtis aktyviajame hCAXII centre. Kristalografiškai nustatyta (nuspalvintas pagal atomų spalvas, PDB kodas 1jd0) bei dokavimo metu įvertinta kaip stipriausios sąveikos (geltona spalva) padėtis

Tačiau, nesant ligando ir baltymo kompleksų rentgenostruktūrinės analizės duomenų, yra sunku nuspręsti ar dokininimo būdu parinkta ligando konformacija ir orientacija kompleksuose yra teisinga ir optimali. Todėl buvo patikrinta, kaip pirmosios, antrosios ir trečiosios žemiausiosios energijos modeliai (išreikšti prognozuojama jungimosi konstanta) atitinka nustatytas ligandų jungimosi konstantas (lentelė 2.1.1.-2).

Lentelė 2.1.1-2. Eksperimentiškai nustatytos slopinimo konstantos (pK_{iE}) ir įvertintos slopinimo konstantos pirmosios (pK_{i1}), antrosios (pK_{i2}) ir trečiosios (pK_{i3}) žemiausiosios energijos kompleksuose junginių rinkiniui 1.

Ligandas	hCA	PDB kodas	pK_{iE}	pK_{i1}	pK_{i2}	pK_{i3}
1	II	1i8z	-9,824	-9,582	-8,08	-7,944
2	II	1i91	-9,824	-10,225	-9,232	-8,119
3	II	2hoc	-9,523	-8,84	-8,814	-7,823
4	II	1cil	-8,046	-8,545	-8,47	-8,136
5	II	2qo8	-8,046	-7,62	-7,317	-6,842
6	II	1yda	-7,921	-8,009	-7,229	-7,194
7	II	2hd6	-7,796	-8,773	-7,844	-7,819
8	II	1oq5	-7,678	-9,717	-9,681	-9,602
9	II	1ze8	-7,678	-9,986	-9,652	-9,156
10	II	1zfg	-7,523	-9,199	-9,121	-8,664
11	II	1eou	-7,444	-6,498	-6,137	-5,855
12	II	2pou	-7,42	-10,612	-10,129	-10,071
13	II	1zge	-7,301	-7,815	-7,175	-7,127
14	II	2hnc	-7,222	-6,837	-6,075	-6,042
15	II	2pow	-7,201	-9,884	-9,758	-9,078
16	II	2pov	-7,125	-10,834	-10,336	-10,221
17	II	2nng	-6,796	-8,023	-7,918	-7,489
18	II	2h15	-5,671	-6,324	-6,28	-6,151
6	I	1azm	-6,602	-7,781	-7,382	-7,377
6	XII	1jd0	-8,244	-7,983	-7,708	-7,583

Eksperimentinių ir sumodeliuotų K_i atitikimas yra labai žemas tiek pirmosios ($R^2 = 0,1523$), tiek antrosios ($R^2 = 0,0826$), tiek trečiosios ($R^2 = 0,0176$) žemiausiosios energijos kompleksuose, tačiau turimoje sistemoje aktyvumą geriausiai aprašo žemiausiosios energijos kompleksai (grafikas 2.1.1-1).



Grafikas 2.1.1.-1. Koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytos slopinimo konstantos ir įvertintos slopinimo konstantos žemiausiosios energijos kompleksuose junginių rinkiniui 1. $pK_{iE} = 0,5055 \times pK_{iI} - 4,7399$ ($R^2 = 0,1523$).

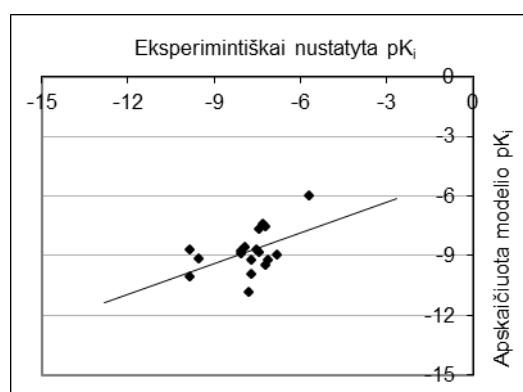
2.1.2. Kryžminis dokinimas

Kryžminis dokinimas yra to paties ligandų rinkinio dokinimas į kelis to paties baltymo modelius, siekiant rasti tinkamiausią baltymo modelį, su kuriuo toliau bus atliekamas ligandų jungimosi modeliavimas. Šiam tikslui parinkti aštuoni baltymo modeliai iš didžiausia skiriamąja geba kristalografiškai nustatytų kompleksų bei laisvos hCAII struktūrų. Dokinimui naudotas junginių rinkinys 1. Kryžminio dokinimo rezultatai pateikti lentelėje 2.1.2.-1. Koreliacija tarp eksperimentinių ir dokinimo metu gautų K_i yra labai silpna arba jos apskritai nėra ($R^2 = 0,0036-0,2402$). Tolimesniems dokinimo eksperimentams naudojamas hCAII modelis iš labiausiai sąveikai aprašyti tinkamo komplekso (PDB kodas 2fou).

Lentelė 2.1.2.-1. Eksperimentiškai nustatytos hCA II slopinimo konstantos (pK_{iE}) ir įvertintos slopinimo konstantos (pK_{iD}) žemiausios energijos junginių rinkinio 1 ir hCAII iš įvairių kristalografiškai nustatytų struktūrų kompleksuose.

Nr.	pK_{iE}	pK_{iD} (1cil)*	pK_{iD} (1oq5)	pK_{iD} (1eou)	pK_{iD} (2pou)	pK_{iD} (2pov)	pK_{iD} (2pow)	pK_{iD} (2fou)	pK_{iD} (1ca2)
1	-9,824	-7,344	-8,939	-8,291	-8,276	-7,566	-8,07	-8,689	-8,882
2	-9,824	-10,265	-9,622	-5,864	-8,551	-10,016	-7,035	-10,062	-9,279
3	-9,523	-11,149	-9,035	-8,745	-8,812	-8,521	-8,408	-9,189	-8,545
4	-8,046	-8,545	-6,949	-6,604	-9,848	-8,284	-7,97	-8,895	-6,887
5	-8,046	-8,861	-6,884	-6,2	-8,229	-9,336	-9,611	-8,78	-8,752
6	-7,921	-7,104	-8,267	-7,155	-8,208	-8,71	-6,756	-8,577	-8,034
7	-7,796	-9,167	-9,215	-8,465	-9,105	-9,95	-9,602	-10,858	-9,55
8	-7,678	-11,256	-9,717	-8,292	-10,583	-9,766	-11,486	-9,209	-10,269
9	-7,678	-9,353	-8,555	-7,919	-9,77	-9,801	-9,131	-9,921	-9,286
10	-7,523	-7,738	-9,127	-7,845	-8,625	-8,176	-8,253	-8,689	-8,981
11	-7,444	-7,716	-7,715	-6,498	-6,869	-8,525	-8,229	-7,686	-6,481
12	-7,42	-8,052	-8,577	-7,62	-10,612	-7,131	-8,061	-8,852	-7,964
13	-7,301	-6,6	-6,796	-5,357	-7,903	-8,471	-6,406	-7,448	-6,766
14	-7,222	-7,255	-7,158	-6,172	-8,297	-8,565	-6,702	-7,563	-7,039
15	-7,201	-9,098	-10,023	-8,028	-9,138	-9,875	-9,884	-9,518	-8,668
16	-7,125	-7,991	-8,91	-8,279	-9,957	-10,834	-8,968	-9,237	-9,603
17	-6,796	-8,821	-8,193	-8,041	-9,393	-9,336	-9,03	-8,997	-8,191
18	-5,671	-7,214	-5,867	-6,205	-7,039	-8,481	-4,975	-6,02	-6,216

*skliausteliuose nurodytas komplekso, iš kurio imta baltymo struktūra, PDB kodas,



Grafikas 2.1.2.-1. Koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytos slopinimo konstantos ir įvertintos slopinimo konstantos, junginių rinkinį 1 dokinant į hCAII aktyvųjį centrą iš rentgenostruktūrine analize nustatyto komplekso 2fou. $pK_{iE} = 0,5121 \times pK_{iD} - 4,7804$ ($R^2 = 0,2402$).

Tokio prasto atitikimo priežastys gali būti dviejų tipų: 1) modeliavimo netikslumai ar klaidos ir 2) jungimosi konstantų nustatymo neatitikimai dėl skirtingų nustatymo metodų ir sąlygų, rentgenostruktūrinės analizės netikslumai bei baltymo ir ligando komplekso struktūriniai skirtumai kietojoje fazėje ir tirpale.

Kadangi esamų eksperimentinių jungimosi konstantų ar rentgenostruktūrinių duomenų patikrinti ar keisti nėra galimybės, teorinio

ligandų jungimosi su baltymu prognozavimo tikslumą didinti galima būtų tobulinant dokavimo algoritmą ar optimizuojant ligandų geometriją keliais skirtingais metodais ir teorijos lygiais (molekulinė mechanika, pusiau empiriniai metodai, *ab initio* metodai). Nekeičiant algoritmo *per se*, dokavimo tikslumą padidinti galima ir varijuojant dokavimo parametrais: dokavimo tikslumu, taikyti filtrus, atrenkančius junginius, kuriais dokavimo programos negali tinkamai operuoti, apmokyti algoritmą mokomuoju junginių rinkiniu.

2.1.3. Baltymų struktūrų modelių paruošimas

Siekiant atlikti analogišką analizę su visomis aktyviomis hCA izoformomis buvo sudaryti likusių hCA modeliai. hCAI, hCAIII, hCAIV ir hCAXII modeliai sudaryti iš rentgenostruktūrine analize nustatytų kompleksų arba laisvų baltymų struktūrų pašalinant visus ligandus ir į kristalinę gardelę įsiterpusius junginius (hCAI iš 1azm, hCAIII iš 2hfw, hCAIV iš 1znc ir hCAXII iš 1jd0). Likusių hCA žinomos tikslai pirminės baltymo struktūros, todėl jų modeliai sudaryti remiantis panašiausių pagal savo aminorūgščių seką baltymų struktūra. Tam buvo naudota programa *DeepView/Swiss-PdbViewer* v.3.7, galutines tretines struktūras sudaranti automatizuotoje palyginamojo baltymų modeliavimo tarnybinėje stotyje (An Automated Comparative Protein Modelling Server). hCAVB, hCAVI, hCAVII, hCAIX, hCAXIII struktūros sudarytos remiantis hCAII (PDB identifikacinis kodas 2fou), hCAVA – remiantis mCAVA (PDB identifikacinis kodas 1dmy), o hCAXIV – remiantis mCAXIV (PDB identifikacinis kodas 1rj6). Cinko jonas įterptas po tretinės struktūros modeliavimo.

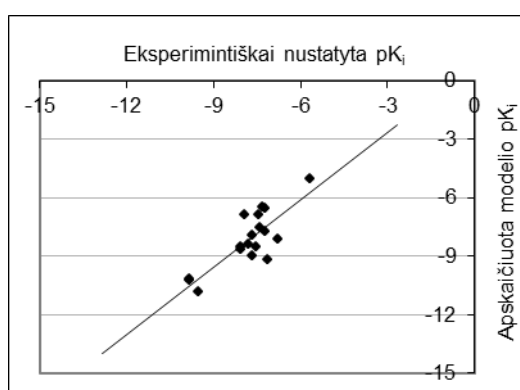
2.1.4. Ligandų modeliavimas

Ligandų iš junginių rinkinio 1 geometrijos optimizacija buvo atlikta trimis metodais: MM+ (molekulinė mechanika) [141], PM3 (pusiau empirinis) [142] ir AM1 (pusiau empirinis) [143]. *Ab initio*/DFT metodo atsisakyta dėl per didelių kompiuterinių resursų sąnaudos. Atliktas gauto ligandų modelių rinkinio dokavimas į hCAII modelį. Koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytos slopinimo konstantos ir dokinant apskaičiuotos slopinimo

konstantos silpna, jei yra naudojami pusiau empiriniais metodais sumodeliuotų ligandų modeliai, tačiau naudojant molekulinės mechanikos metdu gautus ligandų modelius, atitikimas yra geras ($R^2 = 0,6734$). Eksperimentiškai nustatytos ir dokimo metu gautos slopinimo konstantos pateiktos lentelėje 2.1.4.-1. Grafike 2.1.4.-1 pateikta koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytų ir apskaičiuotų slopinimo konstantų, gautų, dokinant MM+ metodu optimizuotos geometrijos ligandus į hCAII.

Lentelė 2.1.4.-1. Eksperimentiškai nustatytų ir dokimo metu apskaičiuotų pK_i , naudojant MM+, PM3 ir AM1 metodais optimizuotos geometrijos ligandus iš junginių rinkinio 1.

Junginys	Ekspeimentišškai nustatytas pK_i	Apskaičiuotas pK_i		
		MM+	PM3	AM1
1	-9,824	-10,259	-7,127	-6,131
2	-9,824	-10,165	-7,818	-7,174
3	-9,523	-10,827	-9,507	-9,645
4	-8,046	-8,5	-7,27	-6,972
5	-8,046	-8,623	-9,065	-7,945
6	-7,921	-6,902	-7,474	-7,008
7	-7,796	-8,415	-7,18	-9,541
8	-7,678	-7,913	-7,672	-9,964
9	-7,678	-9,003	-10,331	-8,538
10	-7,523	-8,504	-7,618	-7,926
11	-7,444	-6,881	-5,318	-5,377
12	-7,42	-7,534	-7,675	-8,928
13	-7,301	-6,447	-6,52	-6,991
14	-7,222	-6,531	-7,703	-7,191
15	-7,201	-7,702	-10,782	-8,769
16	-7,125	-9,151	-8,629	-9,229
17	-6,796	-8,148	-7,226	-8,512
18	-5,671	-5,063	-5,428	-5,52



Grafikas 2.1.4.-1. Koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokimo metu apskaičiuotų pK_i naudojant MM+ metodu optimizuotos geometrijos ligandus. $pK_{iE} = 1,1540 \times pK_{iD} + 0,8357$ ($R^2 = 0,6734$).

Atsižvelgiant į šiuos duomenis, tolimesnis ligandų modeliavimas buvo atliekamas MM+ metodu (geometrijos optimizavimas atliktas naudojant konjuguoto gradiento metodą, kol pasiekiami konvergencijos vertė 0,05 kcal/Å). Paruoštas 328 junginių, kurių jungimosi duomenys su karboanhidrazėmis yra žinomi, modelių rinkinys (rinkinys 2, žr. priedą, lentelė B). Junginių rinkinys 2 dokintas į visų hCA izoformų modelius, o analizuojami tik tie duomenys, kurių eksperimentinės jungimosi konstantos konkrečiam fermentui yra žinomos. Pakankamas eksperimentinių duomenų kiekis atlikti statistinę analizę yra tik hCAI, hCAII, hCAVA, hCAVB ir hCAIX izoformoms. Todėl likusioms izoformoms ši analizė nebuvo atliekama. Deja, atlikus rinkinio 2 dokinimą į visų hCA izoformų modelius tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokinimo metu gautų jungimosi konstantų koreliacijos nėra.

2.1.5. Dokinimo parametrų keitimas

Tikintis pagerinti dokinimo rezultatus buvo mėginta padidinti programos eHiTS modeliavimo tikslumą, didinant komplekso geometrijos sprendinių skaičių. Sprendinių skaičius buvo padidintas nuo 6720 kompleksų su nekintančia (įvesties) ligando konformacija ir papildomais 300 konformacinės paieškos variantais kiekvienam kompleksui iki maksimalaus programos leidžiamo 22080 kompleksų su nekintančia (įvesties) ligando konformacija ir papildomais 1050 konformacinės paieškos variantais kiekvienam kompleksui. Papildomų sprendinių radimas rezultatų nepaveikė nei rinkinio 1, nei rinkinio 2 atveju.

2.1.6. Filtrų taikymas

Koreliacijos tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokinimo metu gautų slopinimo konstantų išnykimas pereinant nuo junginių rinkinio 1 prie junginių rinkinio 2 galimas dėl dviejų priežasčių. Viena galima priežastis – junginių rinkinio 1 atveju gauta pirmojo tipo klaida (klaidingas teigiamas rezultatas). Kita priežastis – junginių rinkinyje 2 yra daug junginių, kurių modeliais programos eHiTS dokinimo algoritmas negali pilnai operuoti. Siekiant

išsiaiškinti antrosios priežasties įtaką, buvo taikyti filtrai, iš ligandų rinkinio pašalinantys netinkamus ligandus.

Programos eHiTS, kaip ir daugelio kitų dokavimo programų, algoritmai nearomatinius žiedus traktuoja kaip nelanksčią struktūrą ir negali keisti jų konformacijos. Todėl gana dažnai junginių, turinčių tokius stuktūrinius elementus, o ypač angliavandenių atveju, programa nesugeba jų net patalpinti į baltymo aktyviojo centro modelį, ir jų aktyvumą prognozuoja labai mažą. Dėl šios priežasties buvo naudotas filtras 1, pašalinantis visus junginius, turinčius neplokščius ciklinius fragmentus. Gautas ligandų modelių rinkinys 2F1 (243 junginiai, žr. priedą, lentelę B).

Kita galima problema yra ta, kad programa eHiTS atlieka tik tam tikrą apibrėžtą konformacinę paiešką. Todėl klaidų tikimybė junginiams, turintiems didelę konformacinę laisvę, labai išauga. Dėl šios priežasties buvo pritaikyti filtrai 2, 3, 4 ir 5, iš duomenų rinkinio 2F1 papildomai pašalinantys junginių, turinčių daugiau nei 10, 8, 6 ir 5 ryšius, aplink kuriuos galimas laisvas sukimasis, modelius. Taip gauti ligandų modelių rinkiniai 2F2 (215 junginių, žr. priedą, lentelę B), 2F3 (176 junginiai, žr. priedą, lentelę B), 2F4 (134 junginiai, žr. priedą, lentelę B) ir 2F5 (110 junginių, žr. priedą, lentelę B).

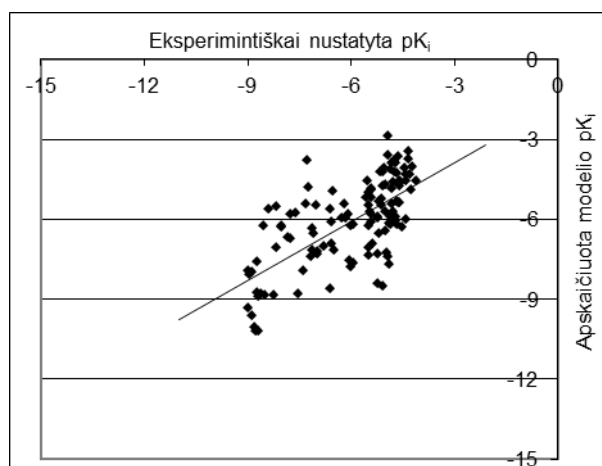
Atlikus dokavimo eksperimentus su junginių rinkiniais 2F1–2F5, paaiškėjo, kad net griežta ligandų atranka rezultatų nepagerina iki patenkinamo lygio: koreliacijos koeficientas ligandų rinkiniams 2F4 ir 2F5 hCAII atveju yra atitinkamai $R^2 = 0,1531$ ir $R^2 = 0,1799$.

2.1.7. Jungimosi konstantų korekcija

Kita tikėtina dokavimo rezultatų netikslumų priežastis susijusi su įverčio funkcijos parametrizavimo netikslumais. Skaičiuojant bendrąją ligando jungimosi prie aktyviojo baltymo centro jungimosi energiją, yra nepakankamai įvertinamos arba pervertinamos kai kurios jos dedamosios dalys (pavyzdžiui, hCA atveju – elektrostatinė ligando sąveika su aktyviajame centre esančiu metalo katijonu ir šoninių aminorūgščių grandinių sąveika su ligandu). Ši

problema gali ypatingai išryškėti, kai ligandų molekulės labai skiriasi dydžiu, funkcinių grupių skaičiumi, poliškumu ir t. t.

Siekiant apytiksliai įvertinti, ar programos eHiTS įverčio funkcija yra tinkamai parametrizuota hCA, buvo nustatyta, kad dokavimo metu gautos jungimosi konstantos nuokrypis nuo eksperimentiškai nustatytos jungimosi konstantos priklauso nuo molekulės dydžio, išreikšto molekuline mase ($R^2 = 0,4702$ (hCAI), $R^2 = 0,2756$ (hCAII), $R^2 = 0,1847$ (hCAVA), $R^2 = 0,3727$ (hCAVB) ir $R^2 = 0,2519$ (hCAIX)). Tą patvirtina ir kiek geresnis eksperimentinių ir sumodeliuotų rezultatų atitikimas (ligandų rinkiniui 2F4 $R^2 = 0,4544$ (hCAI), $R^2 = 0,3255$ (hCAII), $R^2 = 0,2232$ (hCAVA), $R^2 = 0,2214$ (hCAVB), kai dokavimo metu gautoms jungimosi konstantoms naudojama korekcija pagal masę $pK'_{ID} = pK_{ID} + y$, kur $y = -0,0117 \times M(\text{lig}) + 4,3378$ (hCAI); $y = 0,007 \times M(\text{lig}) - 0,9441$ (hCAII); $y = -0,0081 \times M(\text{lig}) + 1,0298$ (hCAVA); $y = -0,0111 \times M(\text{lig}) + 1,4239$ (hCAVB). hCAIX atveju koreliacijos nėra. Koreliacijos tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokavimo metu apskaičiuotų ir koreguotų pagal masę pK'_{ID} pavyzdys pateiktas grafike 2.1.7-1.



Grafikas 2.1.7-1. Koreliacija tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokavimo metu apskaičiuotų ir koreguotų pagal masę hCAI pK'_{ID} . $pK_{IE} = 0,7354 \times pK'_{ID} - 1,6673$ ($R^2 = 0,4544$).

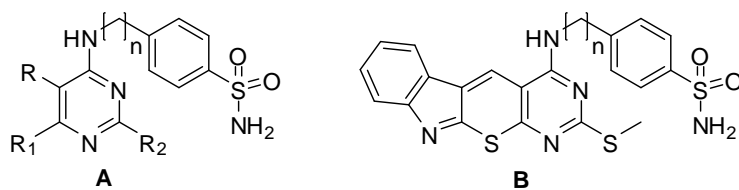
Prastesnis atitikimas tarp eksperimentiškai nustatytų ir dokavimo metu gautų jungimosi konstantų hCAVA, hCAVB bei hCAIX atveju gali būti sąlygotas to, kad šių baltymų struktūros yra nustatytos ne eksperimentiškai, o gautos modeliavimo būdu, remiantis panašios aminorūgščių sekos baltymų struktūromis. Kadangi programos eHiTS parametrizavimas hCA yra

netinkamas, kiekybiškai įvertinti norimų sintetinti naujų karboanhidrazes slopinančių junginių aktyvumą šiuo metodu yra neįmanoma. Kita vertus, junginio išsidėstymas aktyviajame baltymo centre – sulfonamidinės grupės sąveika su cinko jonu, polinių ir nepolinių slopiklio fragmentų sąveika su atitinkamų aminorūgščių šoninėmis grandinėmis – gali būti prognozuojamas.

2.1.8. 4-[N-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]- ir 4-{N-[(pirimido[4',5':5,6]-tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]}benzensulfonamidų dokinimas

Nežiūrint to, kad dokinimo būdu kiekybiškai įvertinti norimų sintetinti junginių karboanhidrazių slopinimo aktyvumo nepavyksta, kokybiniam sąveikos su hCA įvertinimui buvo atlikti 4-[N-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų (**A**) ir N-[(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]benzensulfonamidų (**B**) (junginių rinkinys 3, 56 junginiai, žr. priedą, lentelę C) sąveikos su hCAI, II, VA, VB ir IX teoriniai tyrimai.

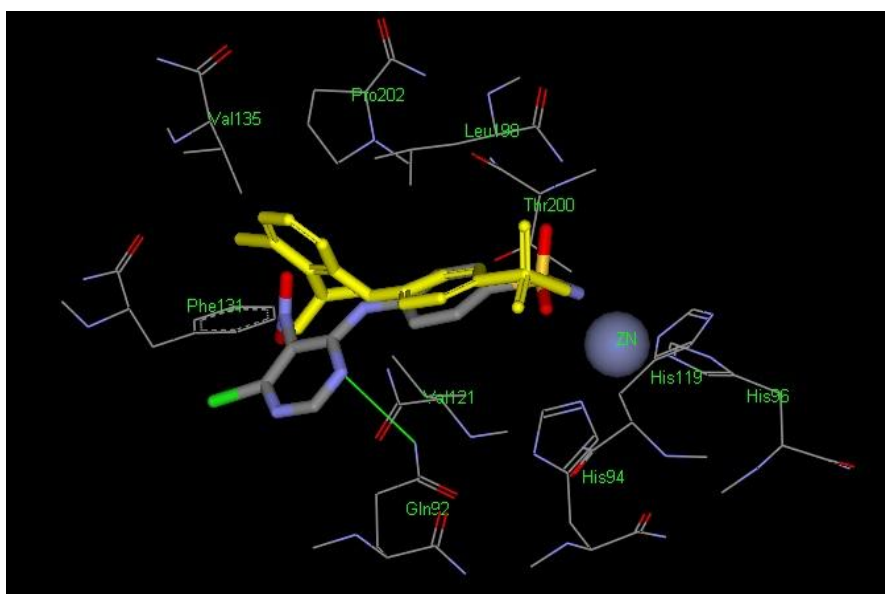
Pirimidino darinius – 4-[N-(2,5,6-pakeistus pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidus ir 4-{N-[(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]}benzensulfonamidus (pav. 2.1.8.-1) – šiam tikslui panaudoti paskatino literatūroje [144, 145] minimi sėkmingi mėginimai hCA slopinti 4-[N-(4,6-pakeistais 1,3,5-triazin-2-il)amino]benzensulfonamidais. Pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo fragmento pasirinkimą lėmė jo struktūriniai ypatumai. Visų pirma, juos taip pat galima laikyti 4- ir 5- padėtyse atitinkamai pakeistais pirimidino dariniais. Be to, mažai polinė keturių kondensuotų žiedų sistema gali sąveikauti su baltymų aktyviojo centro aminorūgščių nepolinėmis šoninėmis grandinėmis, o šios sistemos dydis gali lemti slopiklio atrankų jungimąsi prie kurios nors hCA izoformos.



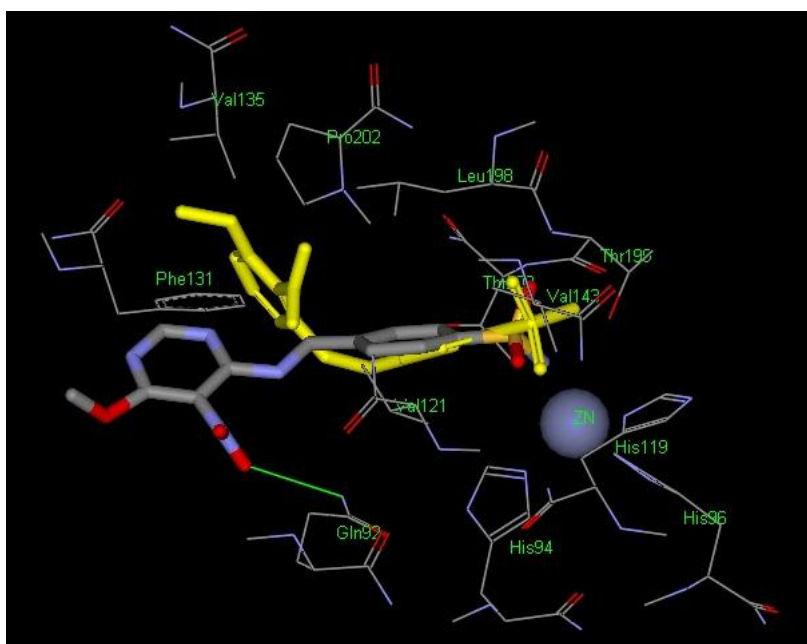
R = NO₂, CHO, CN; R₁ = Cl, OCH₃, NHCH₂Ph; R₂ = H, SCH₃
n = 0, 1, 2

Pav. 2.1.8-1. 4-[N-(2,5,6-pakeisti pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidai **A** ir 4-{N-[(pirimido[4',5':5,6]-tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]}benzensulfonamidai **B**.

Gautų kompleksų modelių analizė rodo, kad visi tirti junginiai telpa aktyviajame baltymo centre ir turėtų išsidėstyti kaip tipiški klasikiniai hCA slopikliai sulfonamidinei grupei sąveikaujant su cinko jonu, o pirimidino žiedas bei jame esantys pakaitai gali dalyvauti sąveikose su baltymo aktyviojo centro aminorūgščių fragmentais. Pav. 2.1.8.-2 ir 2.1.8-3 pateiktas vėliau kristalografiškai nustatytų (žr. skyrelį 2.2.5.) ir dokinant sumodeliuotų kompleksų palyginimas. Abiem atvejais benzensulfonamido fragmento padėtis modelyje yra analogiška eksperimentiškai nustatytai, o pirimidino fragmento padėtį lemia sąveika su Phe131 šoninės grandinės benzeno žiedu. Tačiau modeliuose yra nepakankamai įvertinta pirimidino žiedo ir jo 5-ojoje padėtyje esančios nitrogrupės sąveika su Gln92 šoninės grandinės amido funkcinėje grupei, kuri vandenilniais ryšiais (paveikslukuose pažymėti žalia linija) ir nulemia, kurioje Phe131 benzeno žiedo pusėje yra pirimidino fragmentas.

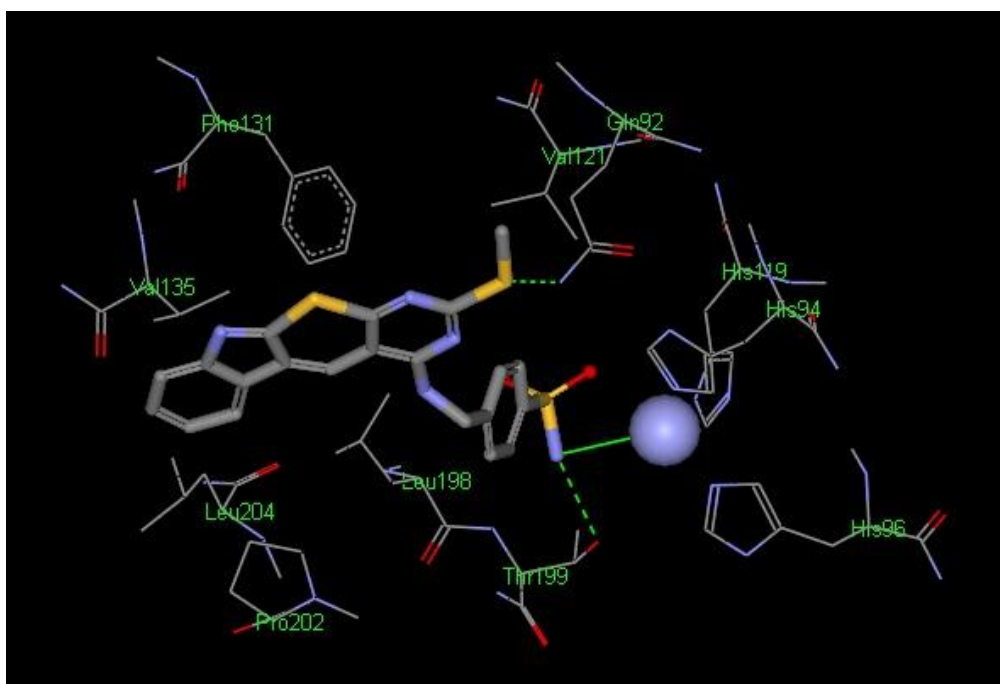


Pav. 2.1.8-2. 4-[N-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido padėtis aktyviajame hCAII centre. Kristalografiškai nustatyta (nuspalvintas pagal atomų spalvas, PDB kodas 3m40) ir dokinimo metu įvertinta stipriausios sąveikos (geltona spalva) padėtis.



Pav. 2.1.8-3. 4- $\{N$ -[6-metoksi-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}benzensulfonamido padėtis aktyviajame hCAII centre. Kristalografiškai nustatyta (nuspalvintas pagal atomų spalvas, PDB kodas 3mhl) ir dokinimo metu įvertinta stipriausios sąveikos (geltona spalva) padėtis.

Dokinimo duomenys rodo, kad 4- $\{N$ -[(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]}benzensulfonamidai **B** taip pat turėtų gerai tilpti į aktyviuosius hCAI, II, VA, VB, IX centrus (pav. 2.1.8-4). Prognozuojama tipiška benzensulfonamido sąveika su cinko jonu ir šalia jo esančiomis aminorūgščių šoninėmis grandinėmis, pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo fragmentas turėtų sąveikauti su nepolinių aminorūgščių (hCAII atveju Val121, Phe131, Val135, Leu198, Pro202, Leu204) šoninėmis grandinėmis, o 2-osios padėties metiltiogrupės sudaromas vandenilinis ryšys su Gln92 – papildomai sustiprinti sąveiką su aktyviais hCA centrais.



Pav. 2.1.8-4. Prognozuojama 4-{*N*-[(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)amino]metil}benzensulfonamido padėtis aktyviajame hCAII centre.

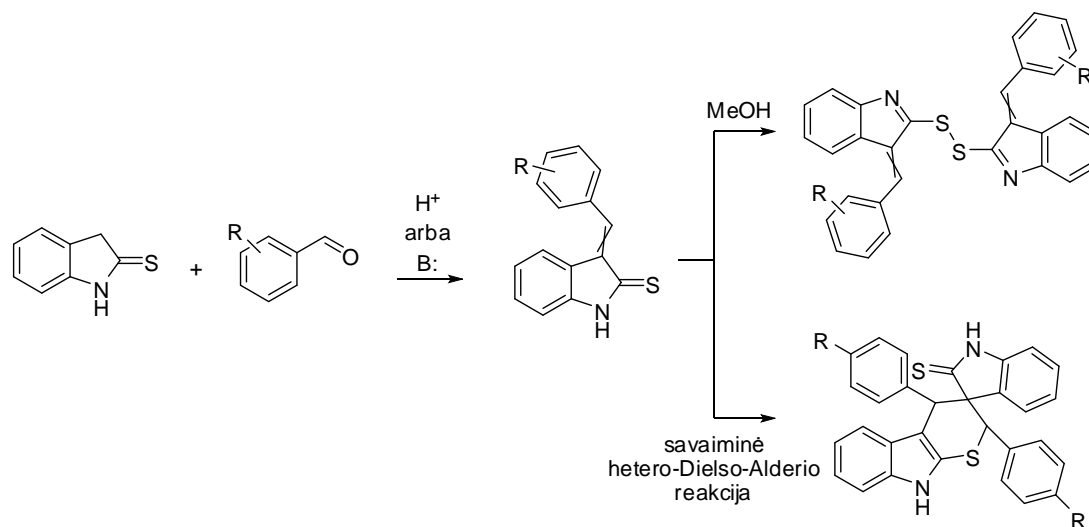
Taigi junginiai **A** ir **B** gali būti potencialūs hCA slopikliai. Tuo remiantis šiame darbe buvo ištirta junginių **A** ir **B** sintezė, ištirtas susintetintų sulfonamidų hCA slopinantis aktyvumas ir jų sąveika su aktyviuoju baltymo centru.

2.2. Pirimidino junginių – potencialių karboanhidrazių slopiklių – sintezė ir savybės

2.2.1. Indolin-2-tiono kondensacija su pakeistais pirimidin-5-karbaldehidais.

Indolin-2-tiono, priešingai nei oksindolo, kondensacijos reakcijų su aromatiniais aldehidais metu, priklausomai nuo sąlygų, gali susidaryti įvairūs produktai. Pvz., darbe [146] buvo parodyta, kad, atliekant kondensacijos reakciją bazinės arba rūgštinės katalizės sąlygomis, susidaro atitinkami 3-arilidenindolin-2-tionai, kurie jau kambario temperatūroje dalyvauja tarpusavio [4+2] cikloprisijungimo reakcijoje ir susidaro spiro(indolo)tiopirano[2,3-*b*]indolo dariniai. Atliekant reakciją 90 °C temperatūroje ir katalizatoriumi naudojant piperidiną, buvo susintetinti atitinkami 3-arilidenindol-2-tionai [147]. Pastarieji lengvai oksiduojasi kambario temperatūroje metanolio tirpale,

sudarydami atitinkamus bis(3-ariliden-1,3-dihidroindol-2-il)disulfidus [148] (schema 2.2.1-1).

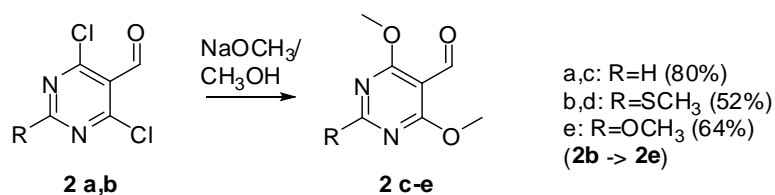


Schema 2.2.1-1.

Atliekant indolin-2-tiono (**1a**) kondensacijos reakciją su mūsų pasirinktu 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehidu (**2a**) metanolyje, etanolyje arba 2-propanolyje, o baze naudojant piperidiną, trietilaminą arba natrio 2-propanoliatą 2-propanolyje, susidaro neišskirstomas produktų mišinys. Šalutinių reakcijų gausą, matyt, lemia aktyvūs pirimidino 4- ir 6- padėtyse esantys chloro atomai, kurie bazinėmis sąlygomis gali būti pakeisti alkoksigrupėmis. Taip pat gali vykti indolin-2-tiono S-alkilimo chlorpirimidinu (**2a**) reakcija. Neatmestina ir Cannizzaro reakcijos galimybė bei kondensacijos reakcijos produktų savaiminė dimerizacija hetero-Dielso-Alderio reakcijos būdu [146].

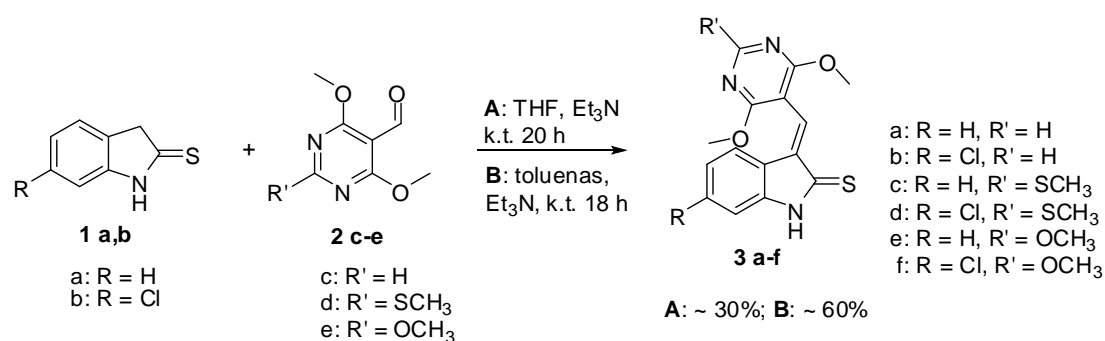
Siekiant sumažinti šalutinių reakcijų tikimybę ir tuo pačiu įvertinti, ar tiriamos kondensacijos reakcijos metu gali susidaryti dimerizacijos produktai, buvo nutarta indolin-2-tioną kondensuoti su pirimidinkarbaldehidais, neturinčiais kitų aktyvių pakaitų. Tuo tikslu buvo susintetinti 4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehidai **2c-e** (schema 2.2.1-2) 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehidus **2a,b** kambario temperatūroje veikiant dviem ekvivalentais natrio metoksido metanolio tirpale. 2-metiltio-4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehido (**2d**) sintezės metu buvo pastebėtas dalinis 2-metiltiogrupės pakeitimas. Visiškas metiltiogrupės ir chloro atomų

pakeitimas metoksigrupėmis, susidarant 2,4,6-trimetoksipirimidin-5-karbaldehydai (**2e**) buvo pasiektas padidinus natrio metoksido kiekį iki 4 ekvivalentų ir prailginus reakcijos trukmę nuo 3 iki 24 val.



Schema 2.2.1-2

Atsižvelgiant į tai, kad atliekant pirimidin-5-karbaldehydo **2b** reakcijas alkoholiuose, esant bazei 2-metiltiogrupė gali būti pakeista atitinkama alkoksigrupe, jo kondensacijos reakcijos su indolin-2-tionais **1a,b** buvo atliekamos tetrahidrofurane, baze naudojant trietilaminą, reakcijos mišinį maišant kambario temperatūroje 20 val. Šiomis sąlygomis 3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionai (**3a-f**) susidaro nedidelėmis (~30%) išieigomis (schema 2.2.1-3). Jas padidinti dvigubai pavyksta polinį tirpiklį pakeitus nepoliniu toluenu.



Schema 2.2.1-3.

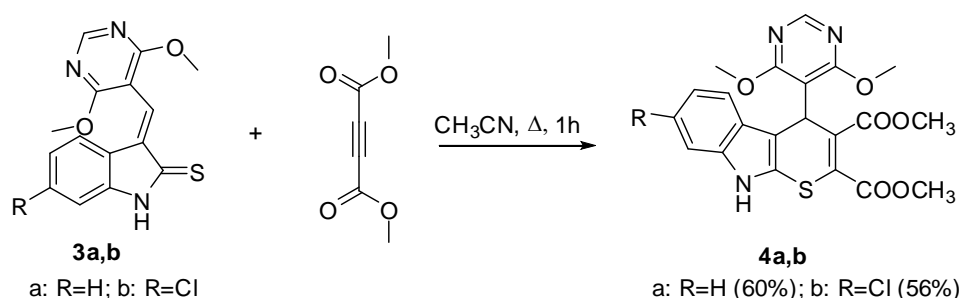
Visų junginių **3a-f** BMR spektruose stebimas tik vienas spektrinių smailių rinkinys. Todėl galima daryti išvadą, kad reakcijos metu susidarydavo tik vienas diastereomeras. Tačiau iš spektrinių duomenų nustatyti 3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionų (**3a-f**) dvigubą ryšio konfigūraciją yra gana keblu. Šios problemos sprendimui buvo atlikti molekulinio modeliavimo eksperimentai. Abiejų (*Z*- ir *E*-) izomerų geometrijos kiekvienam junginiui buvo optimizuotos B3LYP/6G31(d,p) metodu [149, 150] ir palygintos jų energijos. Visais atvejais *E*- izomerai už *Z*- izomerus yra

termodinamiškai stabilesni daugiau nei 3 kcal/mol (lentelė 2.2.1-1), tad ši struktūra ir buvo priskirta susintetintiems junginiams.

Lentelė 2.2.1-1. 3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionų (**3a-f**) *Z*- ir *E*-izomerų susidarymo šilumos skirtumai.

Junginys	3a	3b	3c	3d	3e	3f
$\Delta E (E_E-E_Z)$, kcal/mol	-3,086	-3,128	-3,137	-3,224	-3,136	-3,268

3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionų sintezės metu dimerizacijos produktų nesusidarė. Be to, *E*-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionai yra pakankamai stabilūs tolueno virimo temperatūroje (kristalinant juos iš tolueno, pašalinių produktų susidarymo nepastebėta). Nežiūrint to, buvo įdomu įsitikinti, ar *E*-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionai gali dalyvauti hetero-Dielso-Alderio reakcijoje. Tuo tikslu buvo atlikta junginių **3a,b** reakcija su butino dirūgšties dimetilesteriu (schema 2.2.1-4). Nustatyta, kad jau po 1 val. virinimo acetonitrile reakcija visiškai įvyksta, susidarant dimetil-4,9-dihidrotiopirano[2,3-*b*]indol-2,3-dikarboksilatams (**4a,b**).



Schema 2.2.1-4.

Taigi, buvo parodyta, kad indolin-2-tionai lengvai reaguoja su pirimidin-5-karbaldehydais, susidarant vienam diastereomerui – (*E*)-3-(5-pirimidinilmetilen)indolin-2-tionams. Pastarieji gali dalyvauti hetero-Dielso-Alderio reakcijoje su butino dirūgšties dimetilesteriu, sudarydami atitinkamus tiopirano[2,3-*b*]indolo darinius.

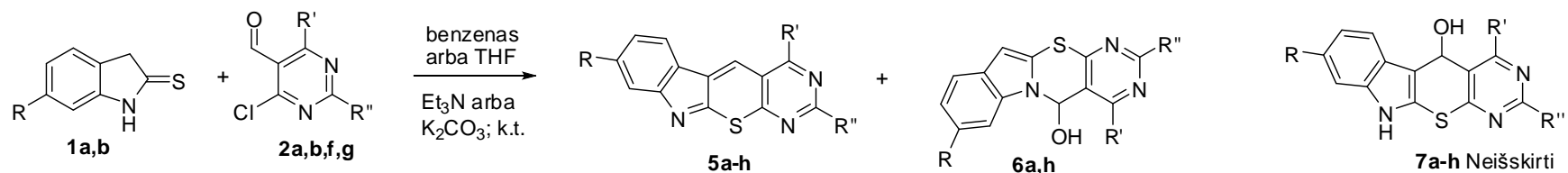
2.2.2. Pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo darinių sintezė

Pirimidin-5-karbaldehydų ketvirtoje žiedo padėtyje esant aktyviam chloro atomui, galima ir kita indolin-2-tionų reakcijos su tokiais aldehydais kryptis, t.

y. pirmiausia gali vykti indolin-2-tionų *S*-alkilinimo atitinkamais 4(ar 6)-chlorpirimidin-5-karbaldehidais reakcija. 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) reakcijos su indolin-2-tionu (**1a**) pirminiai tyrimai parodė, kad atliekant reakciją benzene kambario temperatūroje ir baze naudojant kalio karbonatą arba trietilaminą, susidaro 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5a**) (schema 2.2.2-1), Reakcijos metu vyksta ne tik indolin-2-tiono *S*-alkilinimas, bet ir kondensacija tarp aldehidinės grupės pirimidino žiede ir trečios indolo padėties.

Tokią gauto junginio **5a** struktūrą patvirtina ¹H-BMR spektre stebimi šeši protonų signalai – singletinis signalas ties 2,72 m.d., atitinkantis metiltiogrupę, keturi protonų signalai 7,43 – 7,79 m.d. srityje, savo sukinio-sukinio sąveikos konstantomis atitinkantys 1,2-dipakeistų benzeno darinių spektrus, bei singletinis signalas ties 8,62 m.d., atitinkantis C(5)-H protoną. ¹³C-BMR spektre matomi 14 neekvivalentiškų anglies atomų signalai: metiltiogrupės – ties 14,7 m.d., penki intensyvūs signalai – ties 119,6, 121,6, 123,9, 124,0 ir 130,8 m.d., kurie, remiantis DEPT eksperimentu, priskirtini anglies atomams, turintiems ryšį su vandenilio atomu. Tris signalus 115 – 133 m.d. srityje galima priskirti C4a, C5a ir C5b atomams, o penki signalai 155 – 172 m.d. srityje yra priskirtini C2, C4, C9a, C10a ir C11a atomams. Junginio **5a** IR spektre nėra NH ar OH valentiniams vibraciniams svyravimams būdingų absorbcijos juostų.

Reakciją tarp 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) ir indolin-2-tiono (**1a**) atliekant tetrahidrofurane (12 val.) kambario temperatūroje, baze naudojant trietilaminą, be 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo (**5a**) susidaro šalutinis produktas, kurio ¹H-BMR spektriniai duomenys gali atitikti dvi galimas struktūras **6a** ir **7a**.

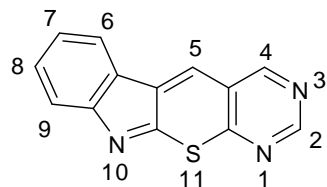
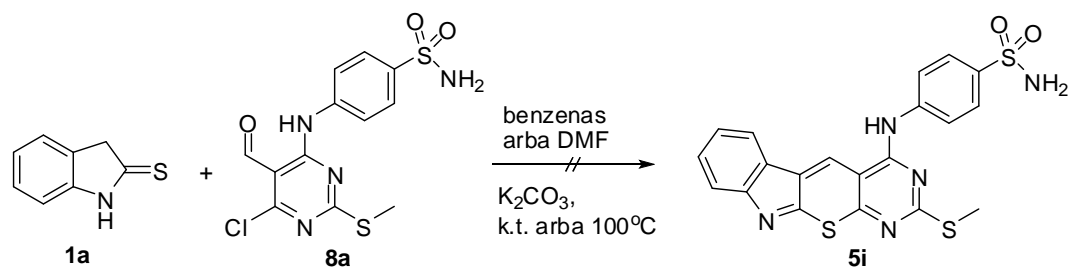


1a: R=H
1b: R=Cl

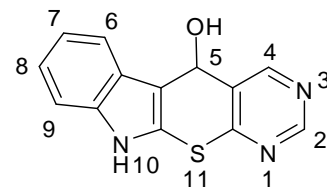
2a: R'=Cl, R''=H
2b: R'=Cl, R''=SCH₃
2f: R'=OCH₃, R''=H
2g: R'=OCH₃, R''=SCH₃

5a: R = H, R' = Cl, R'' = SCH₃ (66%)
5b: R = H, R' = Cl, R'' = H (52%)
5c: R = Cl, R' = Cl, R'' = H (40%)
5d: R = Cl, R' = Cl, R'' = SCH₃ (26%)
5e: R = H, R' = OCH₃, R'' = H (23%)
5f: R = H, R' = OCH₃, R'' = SCH₃ (30%)
5g: R = Cl, R' = OCH₃, R'' = H (27%)
5h: R = Cl, R' = OCH₃, R'' = SCH₃ (13%)

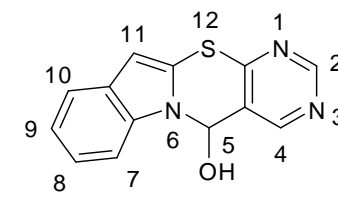
6a: R = H, R' = Cl, R'' = SCH₃ (10%)
6h: R = Cl, R' = OCH₃, R'' = SCH₃ (18%)



pirimido[4',5':5,6]tiopirano
[2,3-*b*]indolas



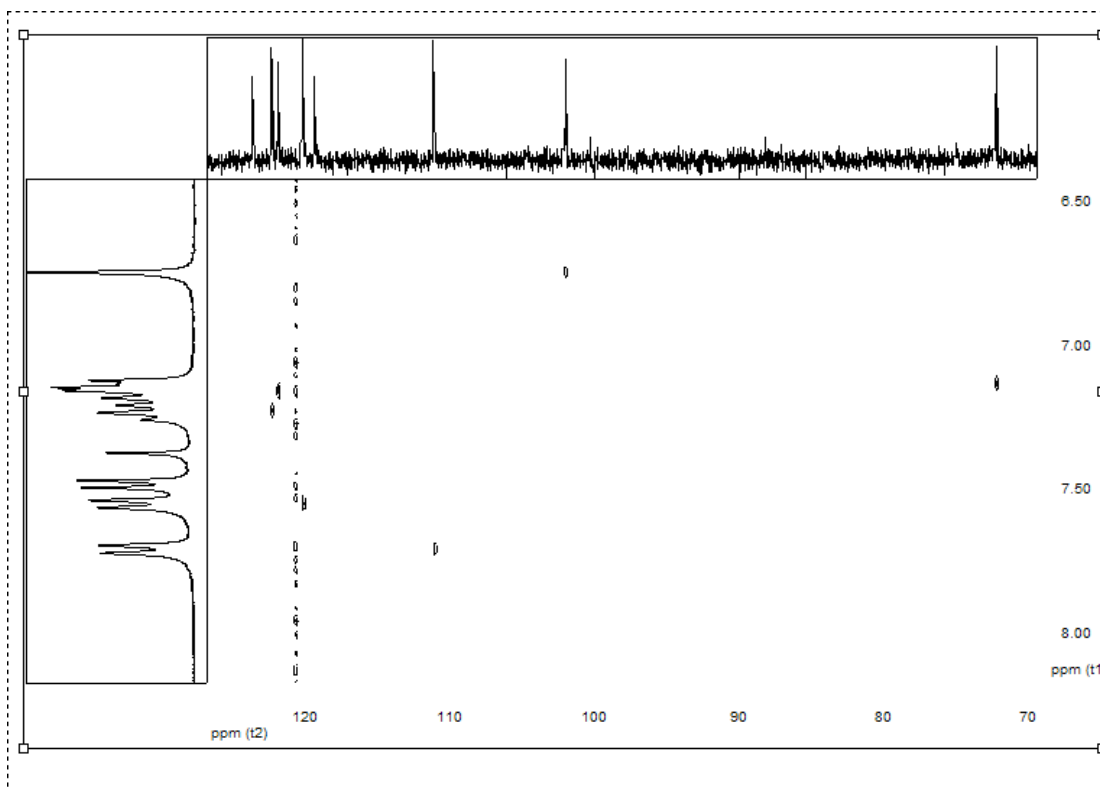
5,10-dihidropirimido[4',5':5,6]tiopirano
[2,3-*b*]indolas



5*H*-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino
[3,2-*a*]indol-5-olis

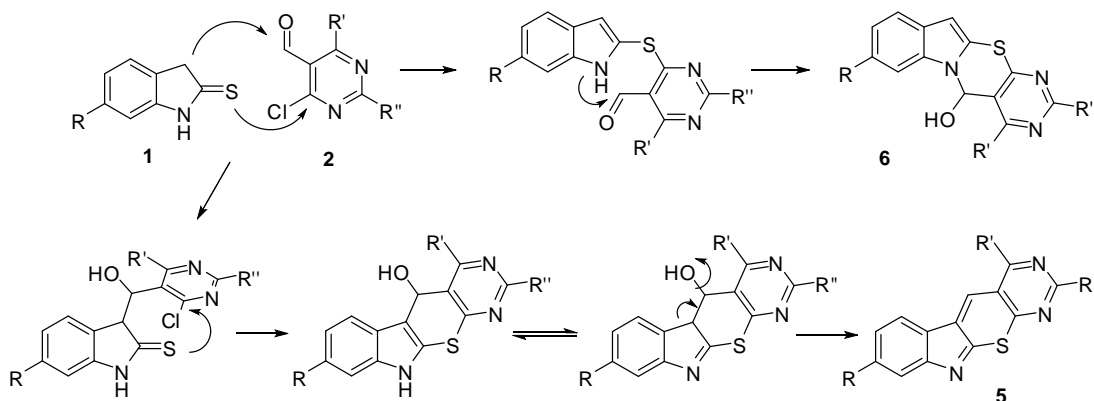
Schema 2.2.2-1.

Gauto produkto ^1H -BMR spektre platus singletas ties 6,75 m.d. gali būti priskirtas tiek NH grupei junginyje **7a**, tiek C(11)H protonui junginyje **6a**. Abiejų junginių CH-OH fragmentas turėtų duoti tokį patį signalų rinkinį. Atlikus DEPT eksperimentą, ^{13}C -BMR spektre ties 14,6 m.d., 72,2 m.d., 102,0 m.d., 111,1 m.d., 120,1 m.d., 121,9 m.d. bei 122,3 m.d. matomi septyni signalai, priskirtini anglies atomams, turintiems ryšį su vandeniliu. Smailė ties 14,6 m.d. atitinka SCH_3 grupę, smailė ties 72,2 m.d. atitinka CHOH fragmentą, o keturios smailės 111,1–122,3 m.d. srityje – indolo fragmento C(7), C(8), C(9) ir C(10) atomus. Papildomas C(H) signalas, kurio cheminis poslinkis yra ties 102,0 m.d., gali būti priskirtas indolo fragmento C(11) atomui. Šie duomenys byloja, kad susidaręs šalutinis junginys yra 4-chlor-2-metiltio-5*H*-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indol-5-olis (**6a**). Visos ^1H -BMR spektro smailės konkreitiems protonams buvo priskirtos atlikus HETCOR eksperimentą. Iš pav. 2.2.2.-1. pateikto spektro matyti, kad vandenilio atomas, kurio cheminis poslinkis yra ties 7,48 m.d. su anglies atomu ryšio nesudaro. Todėl jis buvo priskirtas OH grupei. Koreliacija tarp cheminių poslinkių ties 72,2 m.d. (^{13}C -BMR) ir 7,07 m.d. (^1H -BMR) leidžia šiuos poslinkius priskirti atitinkamai C(5)-H ir C(5)-**H** atomams. Koreliacija tarp ^{13}C -BMR smailės ties 102,0 m.d. ir singlito ^1H -BMR spektre ties 6,75 m.d. šiuos signalus leidžia priskirti atitinkamai C(11)-H ir C(11)-**H**. C(7)-H, C(8)-H, C(9)-H ir C(10)-H anglies ir protonų cheminiai poslinkiai priskirti remiantis koreliacija HETCOR spektre bei sukinio-sukinio sąveikos konstantomis J ^1H -BMR spektre.



Pav. 2.2.2-1. 4-chlor-2-metiltio-5*H*-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indol-5-olio HETCOR BMR spektras.

Junginio **6a** susidarymą galima paaiškinti tuo, kad poliškesniame tirpiklyje indolin-2-tiono C=S ryšio alkilinimas ima vykti greičiau nei nepoliniame tirpiklyje. Susidarius tarpiniam S-alkilintam indolo dariniui, indolo žiedas tampa aromatinium, kurio NH grupė dėl reakcijos mišinyje esančios bazės lengvai deprotonuojasi. Susidaręs N-nukleofilas toliau reaguoja su pirimidino žiede esančia aldehydine grupe ir susidaro junginys **6a**. Schemoje 2.2.2-2 pateiktas numanomas pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolų **5** ir 5*H*-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indol-5-olių **6** susidarymo kelias.



Schema 2.2.2-2.

Pagal junginio **5a** sintezės metodiką buvo mėginta susintetinti ir kitus pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolus, kaip pradinius junginius naudojant pirimidin-5-karbaldehidus **2a,b** bei indolin-2-tionus **1a,b**. Tačiau reakcijos tarp minėtų reagentų vyko susidarant sudėtingiems junginių mišiniams, todėl 4-chlorpirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5b**) ir 4,8-dichlorpirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5c**) buvo išskirti vos keliolikos procentų išeiga. Reakcija tarp 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) ir 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) apskritai nevyko, matyt, dėl pirmojo junginio blogo tirpumo benzene. Todėl buvo nuspręsta sukurti kitą junginių **5b-d** sintezės metodiką, t. y. pirma generuoti atitinkamo indolin-2-tiono anijoną *in situ*, į tirpalą pridėdant bazės, o aldehido kiekį dozuoti, lėtai lašinant jo tirpalą. Tokia metodika pasirinkta tikintis, kad pirma susidaręs indolin-2-tiono anijonas atakuos chlorpirimidin-5-karbaldehido karbonilgrupe ir bus išvengta pirmalaikio tiono alkilavimo. Taikant šią metodiką, reakcija tarp junginių **1a,b** ir **2a,b** vyko gana vienareikšmiškai ir 4-chlorpirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5b**), 4,8-dichlorpirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5c**) bei 4,8-dichlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (**5d**) buvo išskirti 26–50 % išeigomis. Dėl prastesnio 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) tirpumo nepoliniuose tirpikliuose reakcijos buvo atliekamos tetrahidrofurane (schema 2.2.2-1). Šiuo atveju indolin-2-tiono anijono išankstinis generavimas yra ypatingai svarbus, nes poliniuose tirpikliuose, kaip minėta anksčiau, sieros alkilavimas vyksta greičiau.

Taip pat buvo išmėginta galimybė sintetinti 4-pakeistus pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolus, naudojant 4-chlorpirimidin-5-karbaldehidus, šeštojoje padėtyje jau turinčius pakaitą. Tam tikslui buvo pasirinkti 6-metoksipirimidin-5-karbaldehidai **2f,g** ir 4-[*N*-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamidas (**8a**). 4-chlor-6-metoksipirimidin-5-karbaldehidai **2f** ir **2g** buvo susintetinti remiantis panašių junginių sintezės metodikomis [151], kuomet chloro atomai 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehiduose **2a** ir **2b** pakeisti metoksigrupe 3 val.

virinant šiuos aldehidus metanolyje esant vienam trietilamino ekvivalentui. 4-[*N*-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)]aminobenzensulfonamido (**8a**) sintezė aprašyta skyrelyje 2.2.4. Išbandžius įvairias reakcijos sąlygas bei metodikas, nedidelėmis išiegomis buvo susintetinti 4-metoksipirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolai (**5e-h**). Tuo tarpu susintetinti junginį **5i**, atliekant ciklokondensacijos reakciją tarp indolin-2-tiono (**1a**) ir 4-[*N*-(6-chlor-2-metiltio-4-pirimidinil)amino]benzensulfonamido (**8a**), nepavyko (schema 2.2.2-1). Kaip bus parodyta toliau (žr. skyrelį 2.2.3.), 4-pakeistus 2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolus vidutinėmis išiegomis galima sintetinti iš 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo (**5a**) naudojant nukleofilinio pakeitimo reakcijas.

Papildomam pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolų **5a-h** struktūrų įrodymui B3LYP/6G31(d,p)//B3LYP/6G31(d,p) metodu buvo apskaičiuotos šių junginių branduolių ekranavimo konstantos. Jos į cheminį poslinkį perskaičiuotos lyginant su TMS branduolių ekranavimo konstantomis. Eksperimentiškai nustatyti ir apskaičiuoti ¹H ir ¹³C cheminiai poslinkiai ir paklaidos pateikti lentelėje 2.2.2.-1. Didžiausias eksperimentinių ir apskaičiuotų cheminių poslinkių neatitikimas yra tuo atveju, kai spektrai gauti naudojant junginių tirpalus DMSO. Tokie rezultatai nėra netikėti, nes junginių geometrija bei savybės modeliuojamos neatsižvelgiant į molekulę supančią aplinką. Tuo tarpu, junginių, turinčių polines grupes, sąveika su poliniu tirpikliu tirpaluose yra gana stipri ir turi nevienodą įtaką branduolių ekranavimui. Geras tokios tirpiklio įtakos pavyzdys gali būti 8-chlor-2-metiltio-4-metoksipirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo (**5h**) tirpalų CDCl₃ ir DMSO-D₆ ¹H-BMR spektrai. C(5)-**H** ir C(6)-**H** signalai spektre, užrašytame DMSO-D₆ tirpale, yra pasislinkę apie 0,5 m.d. į silpnesnių laukų pusę, lyginant su atitinkamais signalais užrašius spektrą CDCl₃ tirpale (lentelė 2.2.2.-1). Tačiau tirpiklio įtaka metiltio- ir metoksigrupės bei kitų aromatinių protonų cheminiams poslinkiams nėra didelė. Pakankamai didelis apskaičiuotų ir eksperimentinių metiltiogrupės cheminių poslinkių neatitikimas (apie 0,3 m.d.), matyt, yra sisteminė paklaida.

Lentelė 2.2.2.-1. Eksperimentiškai nustatyti, $\delta(E)$, ir apskaičiuoti, $\delta(M)$, pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolų **5a-h** 1H ir ^{13}C cheminiai poslinkiai ir paklaidos.

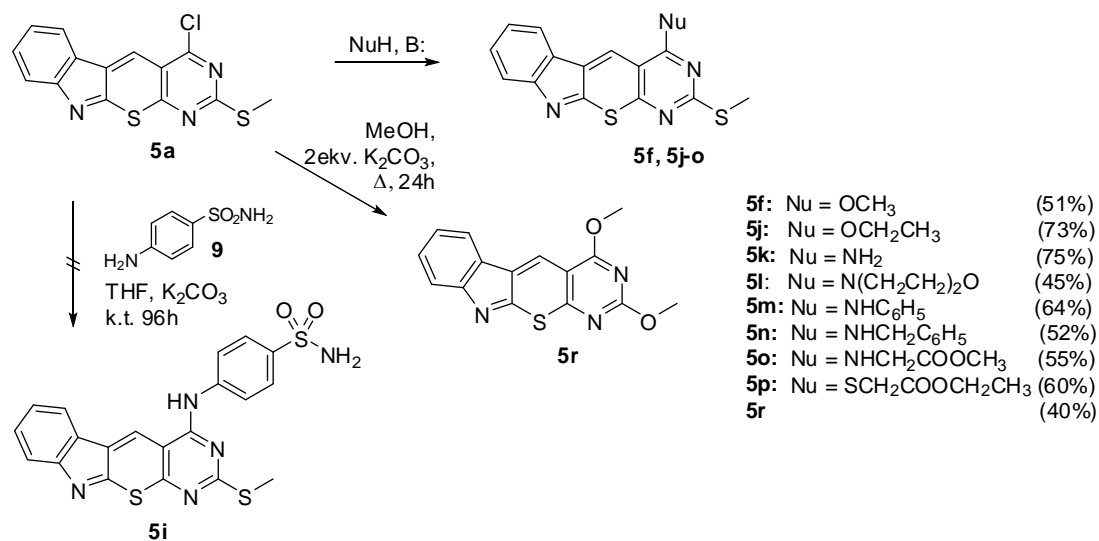
	5a			5b			5c			5d			5e			5f			5g			5h			5h		
	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. ^{††}	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. ^{††}	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. ^{††}	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.	$\delta(E)$, m.d. [†]	$\delta(M)$, m.d.	$\Delta(\delta)$, m.d.
C5-H	8,62	8,25	0,37	8,66	8,42	0,24	8,55	8,39	0,16	8,79	8,22	0,57	8,61	8,48	0,13	8,55	8,32	0,23	8,58	8,46	0,12	9,01	8,30	0,71	8,54	8,30	0,24
C6-H	8,09	7,98	0,11	8,13	8,08	0,05	8,40	7,94	0,46	8,20	7,84	0,36	8,05	8,00	0,05	8,01	7,92	0,09	7,91	7,86	0,05	8,41	7,78	0,63	7,90	7,78	0,12
C7-H	7,43	7,36	0,07	7,43	7,40	0,03	7,38	7,26	0,12	7,26	7,21	0,05	7,38	7,33	0,05	7,36	7,30	0,06	7,32	7,19	0,13	7,42	7,15	0,27	7,33	7,15	0,18
C8-H	7,63	7,62	0,01	7,66	7,69	0,03	-	-	-	-	-	-	7,60	7,62	0,02	7,56	7,56	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9-H	7,79	7,71	0,08	7,79	7,76	0,03	7,71	7,63	0,08	7,57	7,58	0,01	7,78	7,74	0,04	7,76	7,67	0,09	7,71	7,61	0,10	7,74	7,56	0,18	7,72	7,56	0,16
C2-H	-	-	-	8,98	8,93	0,05	9,21	8,95	0,26	-	-	-	8,76	8,84	0,08	-	-	-	8,79	8,85	0,06	-	-	-	-	-	-
SMe	2,72	2,36	0,36	-	-	-	-	-	-	2,60	2,36	0,24	-	-	-	2,67	2,37	0,30	-	-	-	2,67	2,37	0,30	2,69	2,37	0,32
OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,27	4,12	0,15	4,23	4,04	0,19	4,29	4,12	0,17	4,21	4,04	0,17	4,25	4,04	0,21
C2	171,9	171,3	0,6	155,6	148,5	7,1	151,3	148,7	2,6	164,4	171,8	7,4	155,4	150,0	5,4	172,3	172,2	0,1	156,2	150,3	5,9	-	-	-	172,7	172,7	0
C4	160,7	163,0	2,3	161,7	164,8	3,1	160,8	165,0	4,2	161,2	163,2	2,0	163,5	160,0	3,5	161,1	158,3	2,8	163,1	160,2	2,9	-	-	-	162,7	158,3	4,4
C4a	115,3	113,5	1,8	120,2	118,3	1,9	124,3	118,2	6,1	112,4	113,4	1,0	110,2	108,6	1,6	106,4	104,9	1,5	110,2	108,5	1,7	-	-	-	106,4	104,9	1,5
C5	123,9	117,5	6,4	123,1	116,8	6,3	123,8	117,4	6,4	123,5	118,1	5,4	122,2	116,0	6,2	123,4	116,5	6,9	123,0	116,7	6,3	-	-	-	123,5	117,3	6,2
C5a	132,2	129,8	2,4	134,9	131,3	3,6	133,0	130,2	2,8	129,4	127,8	1,6	132,4	128,6	3,8	130,0	126,6	3,4	131,4	127,5	3,9	-	-	-	135,4	125,5	9,9
C5b	125,5	121,1	4,4	125,4	120,7	4,7	127,4	119,0	8,4	126,7	119,3	7,4	125,8	121,0	4,8	125,9	121,2	4,7	124,1	119,3	4,8	-	-	-	124,5	119,6	4,9
C6	121,6	115,9	5,7	122,1	116,6	5,5	117,3	116,6	0,7	123,2	115,9	7,3	121,4	115,8	5,6	121,0	115,2	5,8	122,0	115,8	6,2	-	-	-	119,5	115,3	4,2
C7	124,1	117,8	6,3	124,4	117,9	6,5	124,1	118,6	5,5	124,5	118,4	6,1	123,6	117,0	6,6	123,5	116,9	6,6	123,7	117,7	6,0	-	-	-	124,1	117,5	6,6
C8	130,6	124,9	5,7	131,7	125,8	5,9	134,6	142,2	7,6	133,8	141,2	7,4	130,5	124,5	6,0	129,8	123,7	6,1	136,2	140,7	4,5	-	-	-	138,1	139,7	1,6
C9	119,2	115,5	3,7	119,8	115,7	4,1	117,2	116,5	0,7	118,2	116,2	2,0	119,4	115,3	4,1	119,1	115,1	4,0	119,6	116,1	3,5	-	-	-	121,6	115,8	5,8
C9a	154,9	150,7	4,2	155,5	151,0	4,5	151,0	151,6	0,6	154,2	151,3	2,9	156,5	150,7	5,8	155,1	150,4	4,7	156,8	151,3	5,5	-	-	-	155,9	151,0	4,9
C10a	160,4	158,6	1,8	161,1	159,5	1,6	159,3	161,2	1,9	159,5	160,2	0,7	161,6	159,8	1,8	164,0	158,9	5,1	163,4	161,5	1,9	-	-	-	164,1	160,4	3,7
C11a	165,0	166,4	1,4	165,0	166,7	1,7	163,9	166,4	2,5	162,9	166,2	3,3	167,0	165,8	1,2	165,7	165,3	0,4	167,1	165,7	1,4	-	-	-	165,8	165,2	0,6
SMe	14,7	19,2	4,5	-	-	-	-	-	-	14,0	19,2	5,2	-	-	-	14,7	19,0	4,3	-	-	-	-	-	-	14,8	19,0	4,2
OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,4	52,8	2,6	55,4	52,9	2,5	55,5	53,0	2,5	-	-	-	55,5	53,0	2,5

[†] Eksperimentiniai spektrai užrašyti CDCl₃ tirpale.

^{††} Eksperimentiniai spektrai užrašyti DMSO-D₆ tirpale.

2.2.3. 4-Chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo reakcijos su *O*-, *N*- ir *S*-nukleofilais

Susintetinti šiame darbe pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolai **5a-f** yra pirmieji naujos heterociklinės sistemos atstovai. Todėl atrodė tikslinga junginio **5a** pavyzdžiu atlikti reakcijas su kai kuriais nukleofiliniais reagentais ir tuo pačiu įvertinti jų taikymo galimybes aminobenzensulfonamidų, turinčių šį heterociklinį fragmentą, sintezėje. Buvo atliktos 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano-[2,3-*b*]indolo (**5a**) reakcijos su įvairiais *N*-, *O*- ir *S*-nukleofilais (schema 2.2.3.-1). Nustatyta, kad chloro atomas 4-oje heterociklo padėtyje gana nesunkiai gali būti pakeistas pasirinktais nukleofilais. Pakeitimo reakcijos vyko kambario temperatūroje. Junginio **5a** reakcijos su anilinu, morfolinu, aminoacto rūgšties metilesteriu ir tioglikolio rūgšties etilesteriu buvo atliekamos tetrahidrofurane. 4-Metoksi- (**5f**), 4-etoksi- (**5j**) ir 4-amino-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano-[2,3-*b*]indolo (**5k**) sintezės atliekamos maišant **5a** atitinkamuose alkoholiuose, esant kalio karbonato, arba, atitinkamai, vandeninio amoniako tirpale.



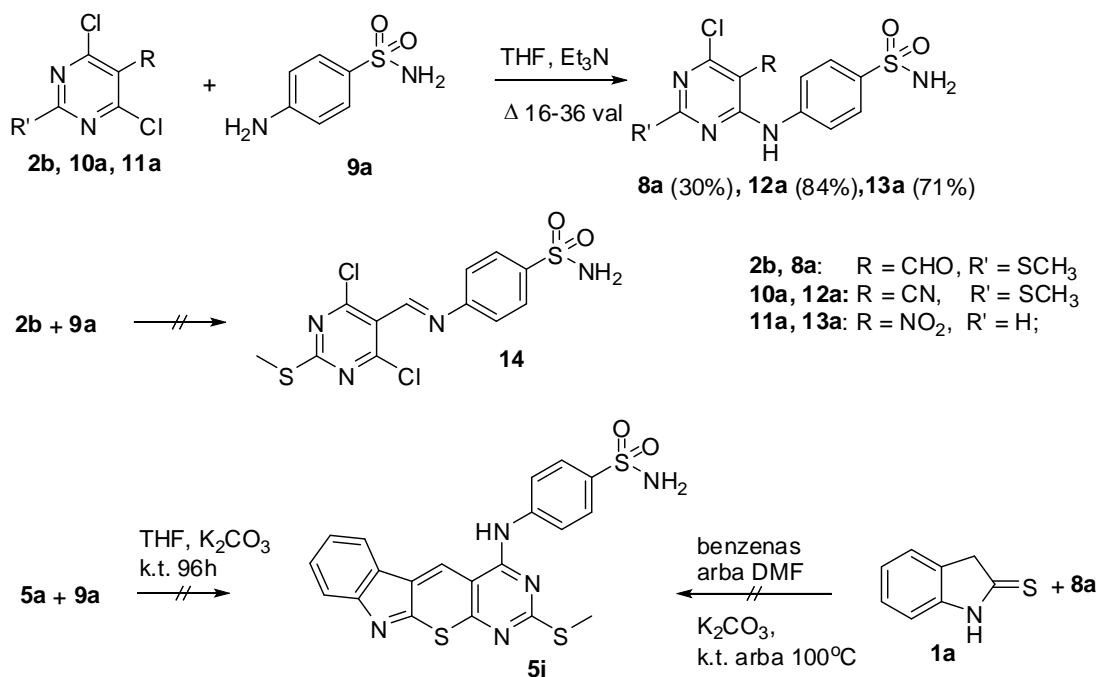
Schema 2.2.3.-1.

Tik atliekant junginio **5a** reakciją su metanoliu, esant kalio karbonato, buvo pastebėtas ir dalinis metiltiogrupės pakeitimas metoksigrupe. Visiškai šį virsmą atlikti galima ilgesnį laiką reakcijos mišinį virinant metanolyje esant bazės pertekliui. Reikia pažymėti, kad bandymai vienareikšmiškai atlikti 4-

chloro atomo junginyje **5a** pakeitimą 4-aminobenzensulfonamidine grupe buvo nesėkmingi. Reakcijų metu susidarydavo junginių mišinys, iš kurio dėl labai blogo junginių tirpumo daugelyje tirpiklių nepavyko išskirti individualių komponentų. Alternatyvi junginio **5i** sintezė – indolin-2-tiono **1a** ciklokondensacijos reakcija su 4-[*N*-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidu (**8a**) taip pat nepavyko (žr. psl. 64).

2.2.4. Potencialių hCA slopiklių – (4-pirimidinil)- ir (pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)aminobenzensulfonamidų – sintezė

Literatūriniai duomenys apie įvairių klasių heterociklinių sulfonamidų hCA slopinantį aktyvumą ir šio darbo metu atlikti dokininimo rezultatai (skyrelis 2.1.8) leido tikėtis, kad pirimidino bei naujos heterociklinės sistemos pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo fragmentus turintys aminobenzensulfonamidai gali pasižymėti hCA slopiklių savybėmis, o įvairūs pakaitai šiuose heterocikluose gali turėti įtakos jų atrankumui slopinti vieną ar kelias hCA izoformas. Pirmieji junginiai **8a**, **12a**, **13a** ir **5i** hCA slopinimui sintetinti veikiant pradinis pirimidinus **2b**, **10a**, **11a** ir **5a** 4-aminobenzensulfonamidu **9a**. Reakcija atliekama tetrahidrofurane, baze naudojant trietilaminą arba, junginio **5i** sintezės atveju, kalio karbonatą (schema 2.2.4-1).



Schema 2.2.4-1.

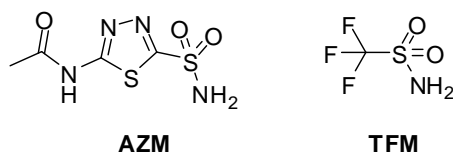
Tirpiklio pasirinkimą lėmė blogas 4-aminobenzensulfonamido tirpumas nepoliniuose tirpikliuose. Junginiai **8a**, **12a** ir **13a** susidaro reakcijos mišini virinant 16–36 val. 4-[N-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido (**8a**) sintezės atveju imino **14** susidarymas nepastebėtas. Spektriniai duomenys byloja, kad reakcijos metu susidarė tik nukleofilinio pakeitimo produktai.

Junginių **8a**, **12a** ir **13a** ¹H-BMR spektruose 7,72–7,92 m.d. srityje stebimi keturių 4-aminobenzensulfonamido fragmento benzeno žiedo protonų signalai, singletinis signalas ties 7,36–7,38 m.d., atitinkantis du sulfonamido grupės protonus, ir 10,25–10,44 m.d. srityje esantis NH grupės singletinis signalas, kuris formildarinio **8a** atveju patvirtina jo, o ne imino **14**, susidarymą. Monopakeitimą patvirtina išvardintų protonų santykis su kitų funkcinių grupių protonais: junginio **13a** atveju – su vienu pirimidino 2-osios padėties protonu (singletinis signalas ties 8,61 m.d.), junginio **12a** atveju – su 3-imis 2-metiltiogrupės protonais (singletinis signalas ties 2,47 m.d.), o junginio **8a** atveju – su 3-imis 2-metiltiogrupės protonais (singletinis signalas ties 2,57 m.d.) bei formilgrupės protonu (singletinis signalas ties 11,26 m.d.). ¹³C-BMR spektruose stebimų signalų kiekis taip pat patvirtina 4-osios ir 6-osios pirimidino žiedo padėties anglies atomų neekvivalentiškumą. IR spektruose

stebimos intensyvos NH grupių valentiniam svyravimui būdingos absorbcijos juostos ties 3320-3340 ir 3240-3270 cm^{-1} bei junginio **8a** aldehidinio C=O valentiniams svyravimams būdinga stiprios absorbcijos juosta ties 1638 cm^{-1} ir junginio **12a** būdinga ciangrupės valentinio svyravimo vidutinio stiprumo absorbcijos juosta ties 2222 cm^{-1} .

Kaip jau buvo minėta, matyt, dėl nepakankamo 4-aminobenzensulfonamido aminogrupės nukleofiliškumo susintetinti 4-[*N*-(pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)]aminobenzen-sulfonamido **5i** nepavyko.

Biotechnologijos institute (BTI), naudojant terminio poslinkio analizės (TSA) ir izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITC) metodus, buvo išmatuotos junginių **8a**, **12a** ir **13a** jungimosi su hCAI, hCAII, hCAVII ir hCAXIII konstantos (lentelė 2.2.4.-1). Lentelėje palyginimui pateikti plačiai naudojamo farmakologinio preparato acetazolamido (**AZM**) ir labai aktyvaus, bet nestabilaus [22] trifluormetansulfonamido (**TFM**) (pav. 2.2.4-1) aktyvumai, nustatyti tomis pačiomis sąlygomis.



Pav. 2.2.4-1. Acetazolamido (**AZM**) ir trifluormetansulfonamido (**TFM**) formulės

Gauti duomenys rodo, kad junginių aktyvumas yra geras – jungimosi konstantos yra mikro- ir submikromolinės eilės ir yra panašios į acetazolamido jungimosi su atitinkamomis hCA izoformomis konstantas. Išskirti galima būtų 4-[*N*-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidą (**13a**), kuris yra aktyvus ir atrankus hCAXIII slopiklis.

Lentelė 2.2.4.-1. Junginių **8a**, **12a** ir **13a** jungimosi su hCA I, II, VII ir XIII konstantos (μM) 37°C temperatūroje.

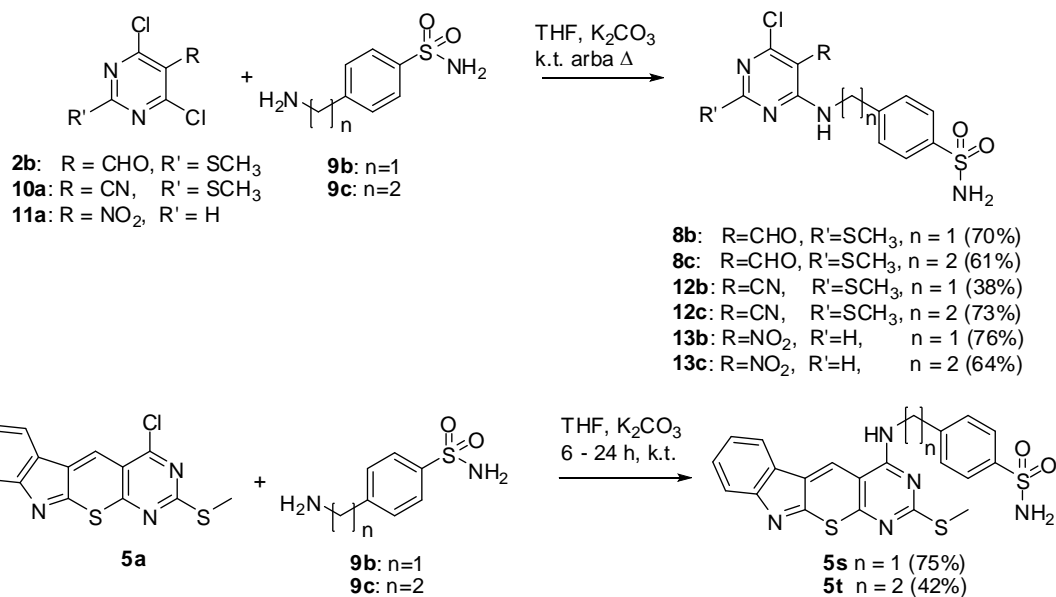
Eilės Nr.	Junginys	hCA I		hCA II		hCA VII		hCA XIII	
		TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC
1	8a	1,0	2,8	0,17	0,32	4,0	ND	ND	ND
2	12a	1,4	20	0,071	0,22	0,83	1,7	0,091	0,12
3	13a	0,13	0,26	0,091	0,17	0,13	0,77	0,002	0,014
	AZM	1,4	0,78	0,017	0,018	ND	ND	0,050	0,065
	TFM	0,05	ND	0,13	0,091	0,036	0,029	0,020	0,027

ND – nėra duomenų daugiausia dėl nepakankamo junginių tirpumo.

Vidutinis standartinis nuokrypis matuojant abiem metodais yra $\pm 25\%$.

Tolimesniam slopiklių modifikavimui buvo pasirinktas tiltelio ilginimo tarp heterociklo ir benzensulfonamido fragmentų kelias. Taip modifikuoti slopiklio molekulės yra tikslinga dėl dviejų priežasčių. Visų pirma, esant tilteliui tarp heterociklo ir benzeno žiedų, yra keičiama slopiklio heterociklo fragmento absoliuti padėtis benzensulfonamido atžvilgiu, dėl ko šis fragmentas gali sąveikauti su kitomis fermento aktyviojo centro aminorūgštimis. Antra, didėja slopiklio molekulės konformacinė laisvė, dėl ko slopiklio heterociklo fragmentas gali užimti patogesnę padėtį sąveikai su šoninėmis fermento aktyviojo centro aminorūgščių grandinėmis.

Naudojant 4-aminometilbenzensulfonamido hidrochloridą (**9b**) arba 4-(2-aminoetil)benzensulfonamidą (**9c**), buvo susintetinti junginių **5i**, **8a**, **12a** ir **13a** analogai **8b,c**, **12b,c**, **13b,c** ir **5s,t** 38–76 % išeiga (schema 2.2.4-2). Nė vienu atveju, reaguojant 4,6-dichlorpirimidinams **2b**, **10a** ir **11a** su aktyviais benzensulfonamidais **9b** ar **9c**, dipakeitimo produktai nesusidaro. Priešingai nei 4-[*N*-(pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)]aminobenzensulfonamido **5i** atveju, jo analogai **5s** ir **5t** susidaro vienareikšmiškai ir jų išskyrimas yra paprastesnis (išeiga 42–75 %).



Schema 2.2.4-2.

Deja, junginių **5s** ir **5t** tirpumas vandenyje yra per mažas (mažesnis nei 100 μM), kad galima būtų išmatuoti jų jungimosi su hCA konstantas. Tad tolimesniems slopiklių tyrimams benzensulfonamidų, turinčių pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo pakaitus, buvo atsisakyta.

Keičiant tiltelio ilgį tarp slopiklio heterociklo fragmento ir benzensulfonamido, cianpirimidinų **12b** ir **12c** aktyvumas nesikeitė, tačiau formilpirimidinų **8b**, **8c** atveju šis pokytis yra gana žymus (lentelė 2.2.4-2.). Formilpirimidinų **8a** ir **8c**, kuriuose tarp heterociklo ir benzensulfonamido fragmentų yra atitinkamai 1 ir 3 tilteliniai atomai, aktyvumas yra panašus, o 4- $\{[N-(6\text{-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il})\text{amino}]\text{metil}\}$ benzensulfonamido (**8b**), turinčio 2 tiltelinius atomus, hCAI, hCAII ir hCAVII slopinimas išauga daugiau nei 10 kartų. Šiuo atveju galima tikėtis, kad heterociklo fragmentas dalyvauja papildomoje gan stiprioje sąveikoje su baltymo aktyviuoju centru.

Lentelė 2.2.4-2. Junginių **8a-c**, **12a-c**, **13a-c** ir **15b** jungimosi su hCA I, II, VII ir XIII konstantos nustatytos TSA ir ITC metodais, μM esant $37\text{ }^\circ\text{C}$.

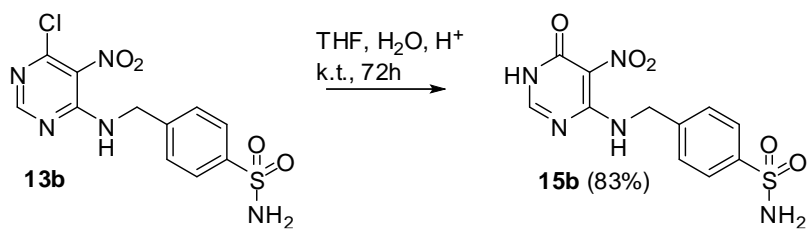
Eilės Nr.	Junginys	hCA I		hCA II		hCA VII		hCA XIII	
		TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC
1	8a	1,0	2,8	0,17	0,32	4,0	ND	ND	ND
2	12a	1,4	20	0,071	0,22	0,83	1,7	0,095	0,12
3	13a	0,13	0,26	0,091	0,17	0,13	0,78	0,002	0,014
4	8b	0,0071	0,083	0,024	0,043	0,10	0,10	0,028	0,13
5	8c	0,11	0,48	0,11	0,35	1,0	0,77	0,033	0,19
6	12b	0,10	ND	0,17	ND	0,10	ND	0,14	ND
7	12c	0,33	ND	0,42	ND	0,10	ND	0,10	ND
8	13b [†]	0,013	0,099	0,0002	0,043	0,005	0,40	0,0001	0,01
9	13c [†]	0,063	0,39	0,17	0,22	0,0017	0,41	0,0002	0,39
10	15b	0,17	ND	0,20	ND	0,25	ND	0,020	ND
	AZM	1,4	0,78	0,017	0,018	ND	ND	0,050	0,065
	TFM	0,05	ND	0,13	0,091	0,036	0,029	0,020	0,027

[†] junginiai tirpale eksperimento sąlygomis nėra stabilūs ir jungimosi konstantos vertė priklauso nuo mėginio laikymo trukmės.

ND – nėra duomenų daugiausia dėl nepakankamo junginių tirpumo.

Vidutinis standartinis nuokrypis matuojant abiem metodais yra $\pm 25\%$.

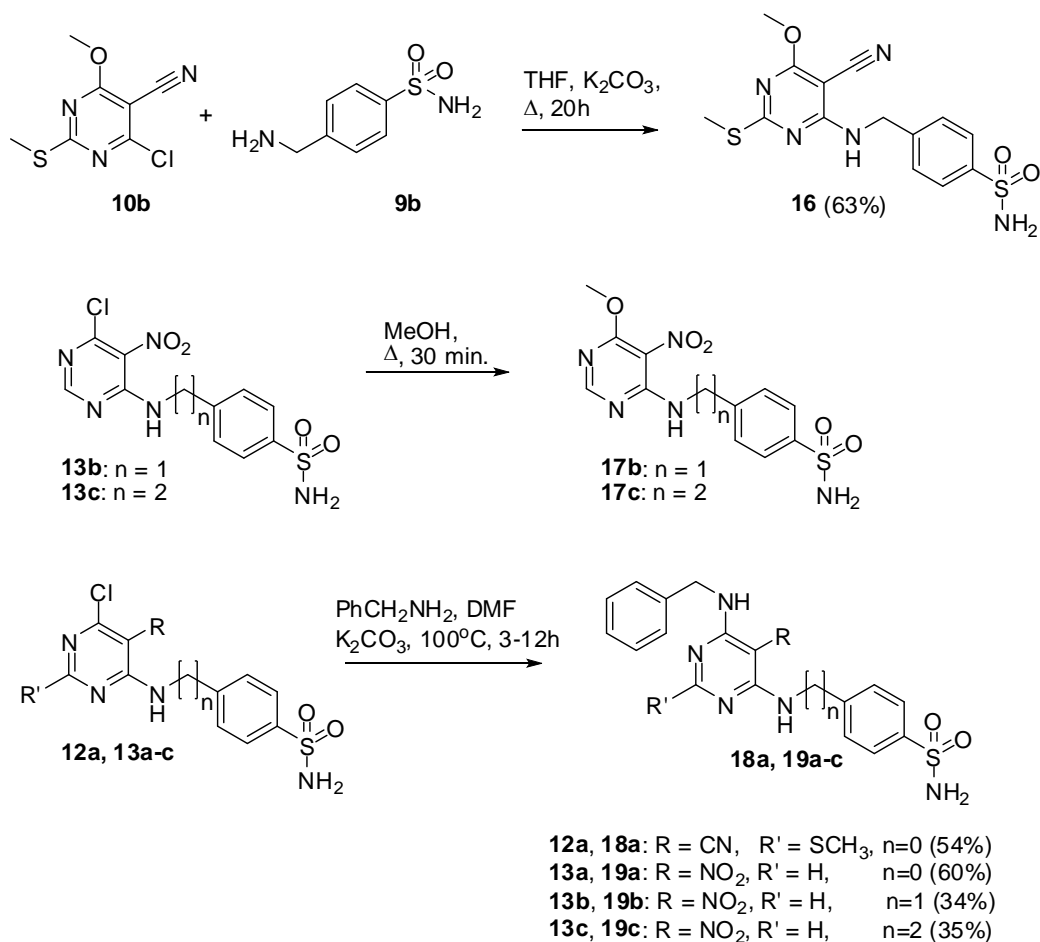
Matuojant junginių **13b** ir **13c** aktyvumą buvo pastebėta, kad šių junginių aktyvumas krenta praėjus kelioms dienoms nuo junginio tirpalo paruošimo. Tai gali būti dėl chlorpirimidinų **13** vartimo oksopirimidinais **15** jungimosi konstantų nustatymo sąlygomis (fosfatinis buferis (pH=7), turintis 50 mM NaCl ir 0,5-2 % DMSO). Siekiant tai patvirtinti, buvo susintetintas 4- $\{[N-(5\text{-nitro-6-okso-1,6-dihidro-4-pirimidinil)amino}]metil\}$ benzensulfonamidas (**15b**) (schema 2.2.4-3) ir nustatyta jo jungimosi konstantos su hCA izoformomis. Lyginant su šviežiai paruošto junginio **13b** mėginio aktyvumu, junginio **15b** aktyvumas yra 10^1 – 10^3 karto mažesnis, tačiau tai gali būti sąlygota ne tik paties slopiklio aktyvumo kritimo, bet ir to, kad nustoja vykti negrįžtamasis slopinimas (negrįžtamasis slopinimas gali vykti dėl slopiklio molekulės aktyvių grupių kovalentinės sąveikos su aktyviojo hCA centro aminorūgščių šoninėmis grandinėmis). Beje, 4- $\{[N-(5\text{-nitro-6-okso-1,6-dihidro-4-pirimidinil)amino}]metil\}$ benzensulfonamidas (**15b**), kaip ir nitropirimidinas **13a**, atrankiai jungiasi su hCAXIII.



Schema 2.2.4.-3.

Šeštoje pirimidino padėtyje esančio chloro atomo pakeitimas taip pat, tik lėčiau, gali vykti ir kituose junginiuose. Todėl buvo nuspręsta vietoje chloro atomo įvesti kitus, ne tokius reakingus pakaitus. Tam buvo pasirinkti nesunkiai įvedami metoksi- ir benzilamino pakaitai. Metoksigrupė yra erdviškai mažas pakaitas, todėl jis iš esmės neturėtų keisti slopiklio išsidėstymo aktyviajame baltymo centre, o benzilamino pakaitas, priešingai, yra gana didelis ir gali dalyvauti papildomoje sąveikoje su baltymo aktyviojo centro aminorūgščių nepolinėmis šoninėmis grandinėmis. Kadangi aldehidinis fragmentas taip pat yra gana aktyvus, siekiant išvengti nevienareikšmiškų hCA slopinimo duomenų (dėl galimos kovalentinės sąveikos gali būti stebimas negrįžtamasis slopinimas), šią funkcinę grupę turinčių junginių taip pat atsisakyta.

4-[*N*-(5-cian-2-metiltio-6-metoksipirimidin-4-il)amino]benzenesulfonamidas (**16**) buvo susintetintas keičiant chloro atomą 4-chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbonitile (**10b**) 4-aminometilbenzenesulfonamidu (**9b**), o junginiai **17–19** susintetinti modifikuojant jau esamas struktūras (schema 2.2.4-4.). Metoksidariniai **17b,c** gauti virinant chlorderinius **13b,c** metanolyje 30 min. Chloro atomo pakeitimui benzilaminogrupe prireikė griežtesnių sąlygų – reakcijos mišinys keletą valandų buvo šildomas 100 °C temperatūroje dimetilformamido tirpale, esant kalio karbonato.



Schema 2.2.4-4.

Į 6-ąją 5-cian- ir 5-nitropirimidinių padėtį įvedus benzilamino pakaitus arba į 6-ąją 5-cianpirimidino padėtį įvedus metoksipakaitą, labai sumažėja junginių tirpumas vandenyje. Junginių **18a, 19a-c** tirpumas vandenyje tampa per mažas, kad galima būtų įvertinti jų aktyvumą ITC metodu, o junginio **16** aktyvumo nustatyti nepavyksta nė vienu iš taikytų metodų.

Pakeitus chloro atomą 5-cianpirimidine **12a** benzilaminogrupe, jo hCA slopinimo aktyvumas sumažėja daugiau nei 100 kartų (lentelė 2.2.4.-3), o 5-nitropirimidinuose **13a-c** chloro atomą pakeitus metoksi- ar benzilaminogrupėmis, ryškus bendro aktyvumo pokyčio lyginant su 5-nitropirimidino **13a** aktyvumu, nėra. Tačiau šie junginiai atrankiai slopina nebe hCAXIII, o hCAI (**19a,b**) arba hCAII (**19c**) (lentelė 2.2.4-3).

Lentelė 2.2.4-3. hCA slopinimui susintetintų 4-[N-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų **8–19** jungimosi su hCA I, II, VII ir XIII konstantos, nustatytos TSA ir ITC metodais, μM , esant $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Eilės Nr.	Junginys	hCA I		hCA II		hCA VII		hCA XIII	
		TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC	TSA	ITC
1	8a	1,0	2,8	0,17	0,32	4,0	ND	ND	ND
2	12a	1,4	20	0,071	0,22	0,83	1,7	0,095	0,12
3	13a	0,13	0,26	0,091	0,17	0,13	0,78	0,002	0,014
4	8b	0,0071	0,083	0,024	0,043	0,10	0,10	0,028	0,13
5	8c	0,11	0,48	0,11	0,35	1,0	0,77	0,033	0,19
6	12b	0,10	ND	0,17	ND	0,10	ND	0,14	ND
7	12c	0,33	ND	0,42	ND	0,10	ND	0,10	ND
8	13b[†]	0,013	0,099	0,0002	0,043	0,005	0,40	0,0001	0,01
9	13c[†]	0,063	0,39	0,17	0,22	0,0017	0,41	0,0002	0,39
10	15b	0,17	ND	0,20	ND	0,25	ND	0,020	ND
11	17b	0,014	0,11	0,050	0,056	0,83	0,83	0,067	0,24
12	17c	0,067	0,28	0,071	0,15	0,13	0,44	0,13	0,23
13	18a	100	ND	100	ND	3300	ND	100	ND
14	19a	0,071	ND	0,17	ND	10	ND	0,50	ND
15	19b	0,025	ND	0,10	ND	4,2	ND	0,33	ND
16	19c	0,63	ND	0,016	ND	1,4	ND	0,50	ND
	AZM	1,4	0,78	0,017	0,018	ND	ND	0,050	0,065
	TFM	0,05	ND	0,13	0,091	0,036	0,029	0,020	0,027

[†] junginiai tirpale eksperimento sąlygomis nėra stabilūs ir jungimosi konstantos vertė priklauso nuo mėginio laikymo trukmės.

ND – nėra duomenų, daugiausia dėl nepakankamo junginių tirpumo.

Vidutinis standartinis nuokrypis matuojant abiem metodais yra $\pm 25\%$.

2.2.5. Rentgenostruktūrinė hCAII kompleksų su slopikliais analizė

Biotechnologijos institute buvo atlikti 5-nitropirimidinų **13a**, **15b**, **17b**, **17c** ir **19b** bei 5-formilpirimidinų **8a** ir **8b** kompleksų su hCAII kristalografiniai tyrimai (PDB kodai atitinkamai 3m40, 3mhi, 3mhl, 3m3x, 3mhm, 3mho ir 3m5e).

Lentelė 2.2.5-1. Junginių kompleksų su hCAII rentgenostruktūrinių kristalografinių duomenų rinkimo ir patikslinimo statistika.

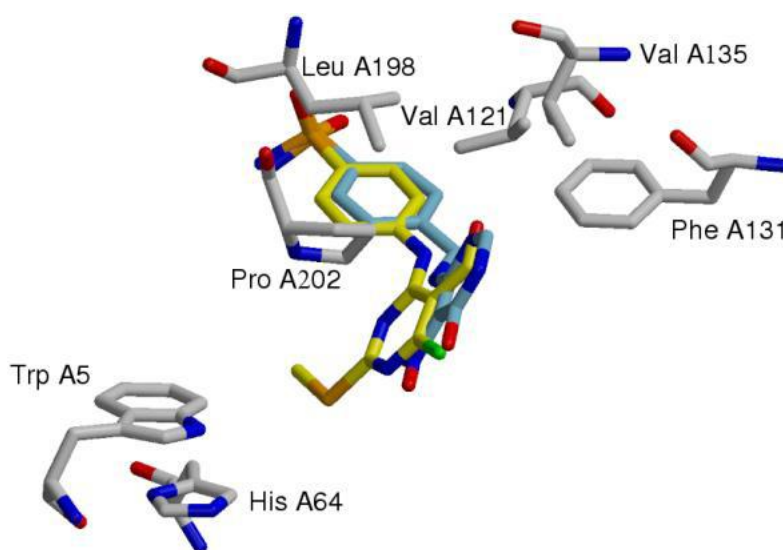
<i>Junginys</i>	8a	8b	13a	15b	17b	17c	19a
<i>PDB identifikacijos kodas</i>	3MHO	3M5E	3M40	3MHI	3MHL	3M3X	3MHM
Temperatūra	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K
Erdvinė grupė	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Gardelės parametrai, Å	a=42,13, b=41,21, c=72,08, α=γ=90, β=104,30	a=42,42, b=41,49, c=72,43, α=γ=90, β=104,49	a=42,18, b=41,16, c=72,48, α=γ=90, β=104,54	a=42,24, b=41,24, c=71,95, α=γ=90, β=104,43	a=41,71, b=40,68, c=70,72, α=γ=90, β=104,13	a=42,04, b=41,05, c=71,0, α=γ=90, β=104,39	a=42,25, b=41,17, c=72,24, α=γ=90, β=104,10
Skiriamosios gebos riba, Å (išorinis sluoksnelis)	1,15	1,70	1,60	1,70	1,90	1,77	1,50
Unikalių atspindžių skaičius (bendras)	85194 (566937)	27116 (314528)	30141 (176541)	26639 (251427)	18388 (280542)	26749 (299614)	37716 (154392)
Pilnumas (%) galutinis (išorinis sluoksnelis)	99,9 (99,7)	100,0 (100,0)	94,4 (90,2)	99,9 (99,3)	100,0 (100,0)	98,3 (97,6)	97,3 (96,1)
I/σ ₁ galutinis (išorinis sluoksnelis)	20,3 (4,1)	32,8 (13,0)	10,2 (6,4)	31,2 (10,7)	37,9 (7,5)	50,5 (17,8)	25,4 (5,8)
R _{merge} galutinis (išorinis sluoksnelis)	6,7 (32,3)	5,4 (11,7)	16,1 (20,2)	4,5 (18,5)	7,6 (25,2)	3,9 (7,9)	3,3 (15,7)
Atomų skaičius	2468	2488	2410	2437	2202	2504	2500
Tirpiklio molekulių skaičius	291	332	234	282	120	295	294
Prisijungusių buferio molekulių skaičius	2	0	0	0	0	0	0
Testinio rinkinio dydis	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
R _{cryst} (R _{free})	17,5 (19,2)	16,4 (20,2)	15,2 (22,4)	16,2 (21,5)	16,2 (22,1)	16,2 (22,1)	13,3 (18,8)
RMS ryšiai / kampai	0,006/ 1,182	0,011/ 1,304	0,026/ 1,947	0,029/ 2,234	0,023/ 1,993	0,028/ 2,197	0,028/ 2,117
Vidutiniai B-faktoriai (Å ²)	11,401	12,68	14,491	14,065	25,434	16,159	15,419
Pagrindinė grandinė	9,461	13,2454	11,6688	11,1913	23,7181	13,2707	12,427
Šoninės grandinės	10,726	11,441	14,2259	13,8444	26,1502	15,7152	15,0619
Tirpiklis	20,6237	24,1527	28,0151	22,7711	32,7987	27,4072	26,1515
Jonai	5,53	4,98	6,32	9,3	16,33	7,11	7,67
Kofaktoriai	12,7227	17,7765	20,8162	28,8634	34,152	34,3517	31,499

$R_{merge} = \sum_h \sum_{i=1}^{n_h} \left| \langle I_h \rangle - I_{hi} \right| / \sum_h \sum_{i=1}^{n_h} I_{hi}$, kur I_{hi} yra intensyvumo vertė i -tajam atspindžio h matavimui, $h = (h, k, l)$, suma \sum_h apima visus matuotus atspindžius, o $\langle I_h \rangle$ yra vidutinis išmatuotas atspindžio h intensyvumas; n_h yra atspindžių h matavimų skaičius.

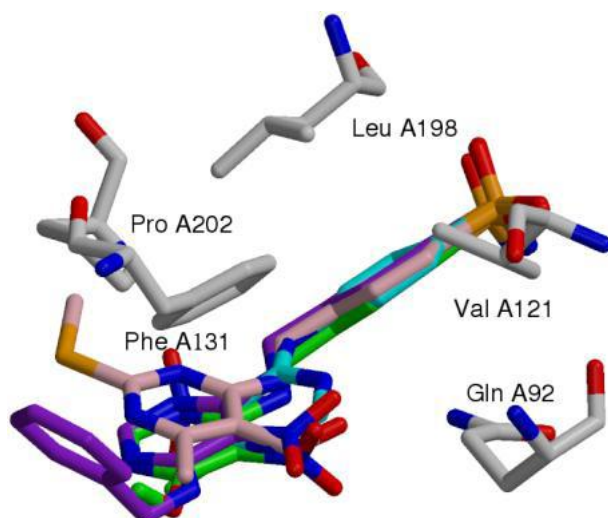
Visuose kompleksuose slopiklių benzensulfonamido fragmentas yra orientuotas link cinko jono, su kuriuo sudaro ryšį, benzeno žiedo sukimasis yra sustabdytas dėl van der Waalso sąveikos su aktyvųjų baltymo centrą sudarančių aminorūgščių šoninėmis grandinėmis. Val121 ir Thr200 sudaro sąveiką su benzeno žiedo briauna, o Leu198 – su plokštuma.

Junginiuose **8a,b**, **13a**, **15b**, **17b,c** ir **19b** yra stebima vandenilinio ryšio sąveika tarp nitro- ar aldehydinės grupės ir 4-oje pirimidino žiedo padėtyje esančios NH grupės.

Pirimidino žiedas šiuose kompleksuose aptinkamas trijose pozicijose. Viena galimų pirimidino žiedo pozicijų stebima 4-[*N*-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido (**8a**) ir 4-[[5-nitro-6-okso-1,6-dihidro-4-pirimidinil)amino]metil]benzensulfonamido (**15b**) kompleksuose su hCAII, kuomet pirimidino žiedo padėtis yra nulemiama hidrofobinės sąveikos su Pro202, Val135 ir Phe131, o 5-formilpirimidino **8a** – papildomai ir su Trp5 bei His64 (pav. 2.2.5-1).



Pav. 2.2.5-1. 4-[*N*-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido (**8a**) (geltona spalva) ir 4-[[5-nitro-6-okso-1,6-dihidro-4-pirimidinil)amino]metil]benzensulfonamido (**15b**) (mėlyna spalva) padėtis aktyviajame hCA II centre. Baltymo aminorūgštys yra pavaizduotos pilkai. Vaizdas generuotas naudojant MOLSCRIPT [152], Raster3D [153] ir BOBSCRIPT [154].



Pav. 2.2.5-2. 4- $\{[N-(6\text{-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]metil}\}$ benzensulfonamido (**8b**) (rausva spalva), 4- $[N-(6\text{-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido$ (**13a**) (žalsvai mėlyna spalva), 4- $\{[N-(6\text{-metoksi-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}\}$ benzensulfonamido (**17b**) (žalia spalva) ir 4- $\{[N-(6\text{-benzilamino-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}\}$ benzensulfonamido (**19b**) (purpurinė spalva) padėtis aktyviajame hCA II centre. Baltymo aminorūgštys yra pavaizduotos pilka spalva. Vaizdas generuotas naudojant MOLSCRIPT [152], Raster3D [153] ir BOBSCRIPT [154].

Tuo tarpu junginių **8b**, **13a**, **17b** ir **19b** pirimidino žiedas aktyviajame hCAII centre yra beveik statmenai pasisukęs plokštumos, kurioje yra junginių **8a** ir **15b** pirimidino žiedas, atžvilgiu. Tokią padėtį lemia pirimidino žiedo sanglauda su Phe131 benzeno žiedu bei vandenilinis ryšys tarp Gln92 aminogrupės ir slopiklio nitro- arba formilgrupių (pav.2.2.5-2.). hCAII aktyviajame centre slopikliai, kuriuose tarp benzensulfonamido ir pirimidino fragmentų yra vieno ar dviejų atomų tiltelis, išsidėsto taip pat. Išskirtinis 5-formilpirimidino **8a** ir 5-nitropirimidino **15b** išsidėstymas yra nulemtas aktyviajame centre esančios papildomos DMSO molekulės, įsiterpusios tarp Phe131 ir Gln92. Šiuo atveju DMSO molekulės pateko iš motininio slopiklių tirpalo, tačiau junginių aktyvumo matavimams jos neturėtų turėti įtakos dėl skirtingų eksperimentų atlikimo sąlygų. Matuojant aktyvumą vandeniniuose tirpaluose, slopiklis greitai prisijungia prie aktyviojo baltymo centro. Tuo tarpu nustatant kristalinę struktūrą, baltymo kristalai yra ilgai mirkomi slopiklio tirpale, tad maža DMSO molekulė gali greičiau pasiskverbti į kristalinę baltymo gardele.

Esant ilgam tilteliui (3 atomai) tarp benzensulfonamido ir pirimidino fragmentų (junginys **17c**), pirimidino fragmentas yra toliau nuo katalitinio Zn

atomo ir yra išsidėstęs vienodu atstumu tarp hidrofobinių Pro202, Val135 ir Phe131 aminorūgščių šoninių grandinių. Nitrogrupė šiuo atveju su baltymu sąveikos nesudaro, o sąveikauja su aktyviojo baltymo centro kišenėje esančiomis tirpiklio molekulėmis.

Pirimidino žiedo 6-ojoje padėtyje esantis benzilamino fragmentas išeina iš aktyviojo baltymo centro kišenės ir rentgenostruktūrinės analizės duomenys rodo, kad jis gana laisvai gali keisti konformaciją, tad papildomos sąveikos nesudaro ir slopiklio aktyvumo nedidina.

Išvados

1. Nustatyta, kad indolin-2-tionai lengvai reaguoja su pirimidin-5-karbaldehidais, neturinčiais 4-oje ir 6-oje pirimidino padėtyse aktyvių nukleofugų, susidarant (*E*)-3-(5-pirimidinilmetilen)indolin-2-tionams. Parodyta, kad pastarieji dalyvauja hetero-Dilso-Alderio reakcijoje su butino dirūgšties dimetilesteriu, sudarydami atitinkamus tiopirano[2,3-*b*]indolo darinius.
2. Ištirta indolin-2-tionų sąveika su 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehidais ir susintetintos dvi iki šiol neaprašytos heterociklinės sistemos – pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas ir 5*H*-pirimido[4',5':5,6][1,3]tiazino[3,2-*a*]indolas. Parodyta, kad 4-chlor-2-metiltiopirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo chloro atomas lengvai dalyvauja nukleofilinio pakeitimo reakcijose su įvairiais azoto, deguonies ir sieros nukleofilais, susidarant 4-pakeistiems 2-metiltiopirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolams.
3. Paruošta paprasta ir efektyvi 4-[*N*-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų, 5-oje padėtyje turinčių cian-, formil- arba nitrogrupės sintezės metodika, pagal kurią 5-cian-, formil- arba nitro-4,6-dichlorpirimidinuose galima selektyviai pakeisti vieną chlorogrupę 4-amino(alkil)benzensulfonamidais, o esant formilgrupei – išvengti imino susidarymo. Taip pat pagal šias metodikas galima toliau modifikuoti gautus junginius pakeičiant antrąjį chloro atomą įvairiais nukleofilais.
4. Ištirtos programos eHiTS taikymo galimybės kiekybiniam ir kokybiniam slopiklių žmogaus karboanhidrazių slopinimo konstantų ir sąveikų su baltymu prognozavimui. Nustatyta, kad programa eHiTS kiekybiškai prognozuoti pakankamu tikslumu hCA slopinimo konstantų negalima. Tačiau slopiklio – hCA komplekso struktūrą galima prognozuoti pakankamai patikimai ir šis metodas gali būti taikomas hCA slopiklių paieškai.

5. Atlikti 4-[*N*-(2,5,6-pakeistų pirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidų ir 4-[*N*-(pirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indol-4-il)]aminobenzensulfonamidų sąveikos su hCAI, II, VA, VB ir IX teoriniai tyrimai prognozuoja tipišką klasikiniams CA slopikliams sąveiką su aktyviuoju baltymo centru.
6. hCA slopinimo tyrimams susintetinta 19 naujų junginių ir išmatuotas jų hCAI, II, VII ir XIII slopinimo aktyvumas. 4-[*N*-(2,5,6-pakeisti pirimidin-4-il)amino](metil-,etil-)benzensulfonamidai 5-oje pirimidino žiedo padėtyje turintys cian-, formil- arba nitrogrupes, o 6-oje pirimidino žiedo padėtyje turintys benzilamino-, chloro-, metoksi- arba oksogrupes yra stiprūs-vidutiniai nano- ir mikromolinės eilės slopikliai, galintys atrankiai slopinti hCAI, hCAII arba hCAXIII.
7. Atlikus keleto susintetintų junginių kompleksų su hCAII rentgenostruktūrinę analizę, parodyta, kad jie jungiasi su hCA kaip tipiški klasikiniai CA slopikliai ir jų hCA slopinimo aktyvumą lemia sulfonamido grupės sąveika su katalitiniu cinko jonu bei pirimidino fragmento sanglauda su aminorūgšties Phe131 šoninės grandinės benzeno žiedu.

Eksperimentinė dalis

Žmogaus karboanhidrazių, kurių tretinė struktūra rentgenostruktūrine analize nėra nustatyta, o žinoma tik pirminė baltymo struktūra, pirminiai modeliai sudaryti, remiantis panašiausių pagal savo aminorūgščių seką baltymų struktūra, naudojant programą DeepView/Swiss-PdbViewer v.3.7 [155]. Galutinės tretinės struktūros optimizuojamos automatizuotoje palyginamojo baltymų modeliavimo tarnybinėje stotyje (An Automated Comparative Protein Modelling Server).

Junginių geometrija MM+ [141] (molekulinė mechanika), PM3 [142] (pusiau empirinis) ir AM1 [143] (pusiau empirinis) metodais buvo optimizuota programa Hyperchem Pro v.6.03 naudojant konjuguoto gradiento metodą, kol pasiekiami konvergencijos vertė 0,05 kcal/Å.

Dokinimas atliktas programa eHiTS v.6.03 [139, 140], naudojant numatytuosius parametrus arba didžiausią tikslumo lygį (22080 kompleksų su nekintančia ligando konformacija ir papildomais 1050 konformacinės paieškos variantais kiekvienam kompleksui).

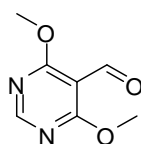
Skaičiavimai *ab initio*/DFT metodais atlikti programa Gaussian[®] 03W Rev. C.01[156], geometrijos optimizavimą atliekant B3LYP/6G31(d,p) metodu [149, 150], o branduolių ekranavimo konstantas skaičiuojant GIAO B3LYP/6G31(d,p) metodu [157]. Skaičiavimams buvo naudojami numatytieji algoritmai bei jų parametrai.

Susintetintų junginių lydymosi temperatūros buvo nustatytos atvirose kapiliaruose Thermo Scientific 9100 Series prietaisu ir yra nekoreguotos. IR spektrai užrašyti Perkin-Elmer FT-IR spektrofotometru Spectrum BX II KBr arba nujole, UV spektrai užrašyti Perkin-Elmer UV/VIS Lamda 20 spektrofotometru chloroformo tirpaluose. ¹H ir ¹³C BMR spektrai užrašyti Varian Unity Inova spektrometru (300 ir 75 MHz, atitinkamai) vidiniu standartu naudojant likutinius tirpiklių signalus. Aukštos skiriamosios gebos masių spektrai (HRMS) užrašyti Dual-ESI Q-TOF 6520 masės spektrometru (Agilent Technologies), naudojant tiesioginį pavyzdžio įvedimą. Elementinės

analizės atliktos Vilniaus universiteto Organinės chemijos katedros Elementinės analizės laboratorijoje. Susintetintų medžiagų grynumas ir reakcijų eiga buvo kontroliuojama plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu, naudojant silica gel 60 F254 plokšteles (Merck). Kolonėlinė chromatografija atlikta, naudojant silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck).

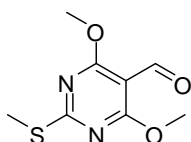
Junginiai **1a,b** [158], **2a,b** [159], **10a** [159], **11a** [160] susintetinti pagal literatūroje aprašytas metodikas.

4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehidas (**2c**)



Į natrio metanoliato tirpalą metanolyje, paruoštą prieš reakciją iš 97 mg (4,2 mmol) natrio ir 30 ml bevandenio metanolio, kambario temperatūroje sudedama 354 mg (2 mmol) 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehido. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 3 val., išpilamas į 100 ml vandens, filtruojamas, filtratas ekstrahuojamas dichlormetanu (3 × 30 ml), ekstraktai sujungiami ir džiovinami bevandeniu natrio sulfatu. Tirpalas nugarinamas sumažintame slėgyje. Liekana apjungiama su anksčiau nufiltruotomis nuosėdomis ir kristalinama iš heksano. Išeiga 270 mg (80 %), lyd. t. 134–136 °C, (iš heksano). Lit. [161] lyd. t. 135–137 °C (sk.), lit. [162] lyd.t. 142–143 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 1690 (CO). ^1H -BMR (300 MHz, CDCl_3) δ , m.d.: 4,11 (s, 6H, 2 OCH_3), 8,53 (s, 1H, C(2)-H), 10,38 (s, 1H, CHO). ^{13}C -BMR (75 MHz, CDCl_3) δ , m.d.: 55,3, 102,5, 160,9, 170,6, 186,8.

2-metiltio-4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehidas (**2d**)

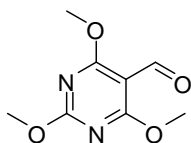


Junginys **2d** sintetinamas iš 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) pagal junginio **2c** sintezės metodiką. Gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Reakcijos trukmė 3 val.

Išeiga 222 mg (52 %), lyd. t. 133 °C (iš heksano). IR (KBr), cm^{-1} : 1674(CO). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 2,60 (s, 3H, SCH_3), 4,10 (s, 6H, 2 OCH_3), 10,26 (s, 1H, CHO). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 14,6, 55,3, 98,9, 169,7, 176,8, 186,2.

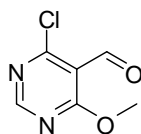
HRMS apsk. ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 215,0485$, rasta 215,0482.

2,4,6-trimetoksipirimidin-5-karbaldehidas (2e)



Į natrio metanoliato tirpalą metanolyje, paruoštą prieš reakciją iš 184 mg (8 mmol) natrio ir 30 ml bevandenio metanolio, kambario temperatūroje sudedama 354 mg (2 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**). Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 24 val. Po to išpilamas į 100 ml vandens, filtruojamas, filtratas ekstrahuojamas dichlormetanu (3×30 ml), ekstraktai sujungiami ir džiovinami bevandeniu natrio sulfatu. Tirpalas nugarinamas sumažintame slėgyje, liekana apjunginama su anksčiau nufiltruotomis nuosėdomis. Junginys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Išeiga 252 mg (64 %), lyd. t. 133–136 °C (iš heksano), Lit. [161], lyd.t. 130–133 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 1692 (CO). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 4,07 (s, 3H, OCH_3), 4,10 (s, 6H, 2 OCH_3), 10,22 (s, 1H, CHO). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 55,3, 55,7, 98,3, 166,3, 172,9, 185,5.

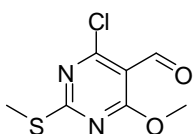
4-Chlor-6-metoksipirimidin-5-karbaldehidas (2f)



Į 354 mg (2 mmol) 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehido (**2a**) suspensiją 30 ml metanolio sulašinama 280 μl (2 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys virinamas 3 valandas, išpilamas į 100 ml vandens, filtruojamas, filtratas ekstrahuojamas dichlormetanu (3×30 ml), ekstraktai sujungiami, džiovinami bevandeniu natrio sulfatu ir sausas tirpalas nugarinamas sumažintame slėgyje. Nuosėdos ir kietas likutis apjungiami ir gryninami kolonėlinės

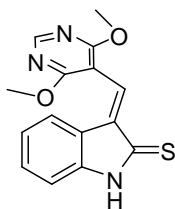
chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Išeiga 210 mg (61 %), lyd. t. 78–80 °C (iš heksano). IR (KBr), cm^{-1} : 1690 (CO). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 4,19 (s, 3H, OCH_3), 8,70 (s, 1H, C(2)-H), 10,46 (s, 1H, CHO). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 56,0, 157,6, 160,4, 162,7, 169,9, 186,5.

4-Chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbaldehidas (2g)



Junginys **2g** sintetinamas iš 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) pagal 4-chlor-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2f**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 3 val. Išeiga 73 %. Lyd. t. 101–103 °C (iš heksano), lit. lyd. t. 98–99 °C [163]. IR (KBr), cm^{-1} : 1693 (CO). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 2,61 (s, 3H, SCH_3), 4,08 (s, 3H, OCH_3), 10,18 (s, 1H, CH). ^{13}C -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 14,7, 56,3, 110,1, 161,0, 169,3, 176,3, 186,4.

(E)-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3a)



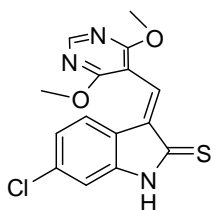
Metodas A: Į 60 mg (0,4 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) ir 67 mg (0,4 mmol) 4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehido (**2c**) tirpalą 5 ml tetrahidrofurano sulašinama 56 μl (0,4 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 20 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje iki sausumo. Produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – benzenas:chloroformas 2:1 ÷ eteris:chloroformas 1:1). Išeiga 32 mg (27 %), lyd. t. 193–194 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3438 (NH). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 3,97 (s, 6H, 2 OCH_3), 6,85 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, C(7)H), 7,01-7,06 (m, 2H, C(4)H ir C(5)H), 7,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, C(6)H), 7,80 (s, 1H, CH), 8,65 (s, 1H, C(2')H), 12,69 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 55,3,

100,6, 110,9, 123,6, 124,7, 125,2, 128,7, 130,5, 137,7, 144,7, 158,4, 168,0, 192,5.

HRMS apsk. (C₁₅H₁₃N₃O₂S): [M+H]⁺ = 300,0801, rasta 300,0797.

Metodas B: Į 60 mg (0,4 mmol) indolin-2-tiono ir 67 mg (0,4 mmol) 4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehido tirpalą 5 ml tolueno sulašinama 56 µl (0,4 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 16 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje iki sausumo. Produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – benzenas:chloroformas 2:1 ÷ eteris:chloroformas 1:1). Išeiga 72 mg (60 %).

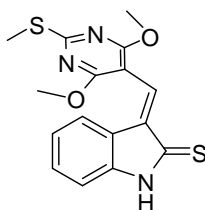
(E)-6-chlor-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3b)



Junginys **3b** sintetinamas iš 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) ir 4,6-dimetoksipirimidin-5-karbaldehido (**2c**) pagal (E)-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) sintezės metodiką. Išeiga 30 % (metodas A), 50 % (metodas B). lyd. t. 222–224 °C. IR (KBr), cm⁻¹: 3427 (NH). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 3,97 (s, 6H, 2 OCH₃), 6,84 (d, J = 8,2 Hz, 1H, C(7)H), 7,02 (d, J = 1,2 Hz, 1H, C(4)H), 7,09 (dd, J₃ = 8,2 Hz, J₄ = 1,2 Hz 1H, CH), 7,82 (s, 1H, C(5)H), 8,64 (s, 1H, C(2')H), 12,75 (s, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 55,3, 100,5, 110,8, 123,3, 123,5, 126,6, 129,3, 134,7, 136,6, 145,9, 158,6, 168,0, 193,3.

HRMS apsk. (C₁₅H₁₂ClN₃O₂S): [M+H]⁺ = 334,0412, rasta 334,0408.

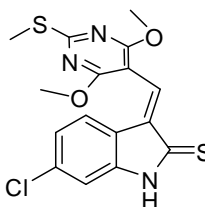
(E)-3-[(2-metiltio-4,6-dimetoksimirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3c)



Junginys **3c** sintetinamas iš indolin-2-tiono (**1a**) ir 2-metiltio-4,6-dimetoksimirimidin-5-karbaldehido (**2d**) pagal (*E*)-3-[(4,6-dimetoksimirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) sintezės metodiką. Išeiga 58 % (metodas B), lyd. t. 177–178 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3408 (NH). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 2,63 (s, 3H, SCH_3), 3,97 (s, 6H, 2 OCH_3), 6,90 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, CH), 7,00–7,08 (m, 2H, 2CH), 7,28 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, CH), 7,81 (s, 1H, CH), 12,64 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,5, 55,3, 96,4, 110,8, 123,5, 124,9, 125,4, 129,3, 130,1, 136,7, 144,5, 167,4, 172,3, 192,5.

HRMS apsk. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 346,0678$, rasta 346,0672.

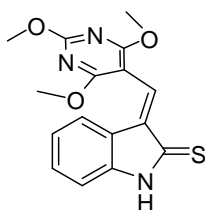
(E)-6-chlor-3-[(2-metiltio-4,6-dimetoksimirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3d)



Junginys **3d** sintetinamas iš 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) ir 2-metiltio-4,6-dimetoksimirimidin-5-karbaldehido (**2d**) pagal (*E*)-3-[(4,6-dimetoksimirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) sintezės metodiką. Išeiga 23 % (metodas A), 43 % (metodas B) lyd. t. 196–197 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3419 (NH). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 2,63 (s, 3H, SCH_3), 3,97 (s, 6H, 2 OCH_3), 6,89 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, C(7)H), 7,01 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, C(4)H), 7,11 (dd, $J_3 = 8,3$ Hz, $J_4 = 1,7$ Hz, 1H, C(5)H), 7,83 (s, 1H, CH), 12,71 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,5, 55,4, 96,3, 110,6, 123,2, 123,8, 126,7, 130,0, 134,2, 135,5, 145,7, 167,4, 172,6, 193,3.

HRMS apsk. ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 380,0289$, rasta 380,0286.

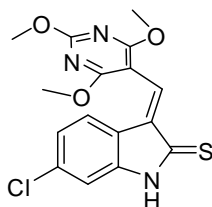
(E)-3-[(2,4,6-trimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3e)



Junginys **3e** sintetinamas iš indolin-2-tiono (**1a**) ir 2,4,6-trimetoksipirimidin-5-karbaldehido (**2e**) pagal (*E*)-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) sintezės metodiką. Išeiga 73 % (metodas B), lyd. t. 190–192 °C (iš tolueno). IR (KBr), cm^{-1} : 3391 (NH). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 4,02 (s, 6H, 2 OCH_3), 4,11 (s, 3H, OCH_3), 6,96-7,06 (m, 3H, C(4)H, C(5)H ir C(6)H), 7,25 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, C(6)H), 8,14 (s, 1H, CH), 10,04 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 54,8, 55,4, 95,0, 109,8, 123,1, 125,2, 125,5, 129,0, 131,2, 135,6, 142,9, 165,2, 169,9, 193,4.

HRMS apsk. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 330,0907$, rasta 330,0903.

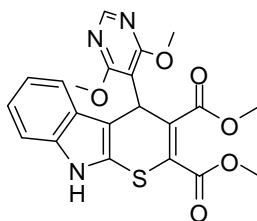
(E)-6-chlor-3-[(2,4,6-trimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tionas (3f)



Junginys **3f** sintetinamas iš 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) ir 2,4,6-trimetoksipirimidin-5-karbaldehido (**2e**) pagal (*E*)-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) sintezės metodiką. Išeiga 38 % (metodas A), 60 % (metodas B), lyd. t. 223 °C (sk.). IR (KBr), cm^{-1} : 3420 (NH). ^1H -BMR ($\text{DMSO-}D_6$) δ , m.d.: 3,95 (s, 6H, 2 OCH_3), 4,02 (s, 3H, OCH_3), 6,88 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, C(7)H), 7,00 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, C(4)H), 7,09 (dd, $J_3 = 8,3$ Hz $J_4 = 1,0$ Hz, 1H, C(5)H), 7,85 (s, 1H, CH), 12,66 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR ($\text{DMSO-}D_6$) δ , m.d.: 55,3, 55,7, 94,5, 110,6, 123,1, 123,9, 126,6, 130,5, 133,9, 134,9, 145,5, 165,3, 169,8, 193,3.

HRMS apsk. ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 364,0517$, rasta 364,0516.

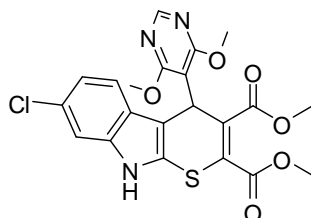
Dimetil 4-(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)-4,9-dihidrotiopirano[2,3-*b*]indol-2,3-dikarboksilatas (4a)



Į 128 mg (0,43 mmol) (*E*)-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3a**) suspensiją 10 ml acetonitrilo sulašinamas 58 μ l (0,47 mmol) butino dirūgštis dimetilesterio tirpalas 5 ml acetonitrilo. Reakcijos mišinys virinamas 1 val. Ataušinus iki kambario temperatūros, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje iki sausumo, produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – eteris) ir gauta geltona alyva džiovinama vakuume, kol susidaro kristalinė medžiaga. Išeiga 114 mg (60 %), lyd. t. 190–191 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3383 (NH), 1730 (CO). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 3,59 (s, 3H, OCH_3), 3,82 (s, 3H, OCH_3), 3,98 (s, 6H, 2 OCH_3), 5,98 (s, 1H, CH), 6,95 (td, $J_3 = 7,8$ Hz, $J_4 = 0,9$ Hz, 1H, C(7)H), 7,06 (td, $J_3=8,1$ Hz, $J_4 = 1,2$ Hz, 1H, C(6)H), 7,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, C(8)H), 7,31 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, C(5)H), 8,38 (s, 1H, C(2')H), 11,51 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 32,1, 53,1, 54,2, 55,3, 104,1, 104,4, 111,6, 117,1, 120,3, 122,2, 123,3, 126,0, 129,3, 131,0, 137,3, 156,4, 164,9, 167,1, 168,0.

HRMS apsk. ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 442,1068$, rasta 442,1060.

Dimetil 7-chlor-4-(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)-4,9-dihidrotiopirano[2,3-*b*]indol-2,3-dikarboksilatas (4b)

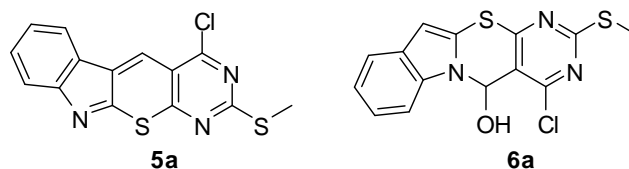


Junginys **4b** sintetinamas iš (*E*)-6-chlor-3-[(4,6-dimetoksipirimidin-5-il)metilen]indolin-2-tiono (**3b**) ir butino dirūgštis dimetilesterio pagal dimetil 4-(4,6-dimetoksi-pirimidin-5-il)-4,9-dihidrotiopirano[2,3-*b*]indol-2,3-

dikarboksilato (**4a**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 1 val. Išeiga 56 %, lyd. t. 220–222 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3390 (NH), 1729 (CO). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 3,59 (s, 3H OCH₃), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,97 (s, 6H, 2 OCH₃), 5,94 (s, 1H, CH), 6,99 (dd, $J_3 = 8,4$ Hz, $J_4 = 1,4$ Hz, 1H, C(6)H), 7,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, C(8)H), 7,39 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, C(5)H), 8,39 (s, 1H, C(2')H), 11,71 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 32,0, 53,2, 54,2, 55,4, 100,2, 104,2, 104,4, 111,4, 118,3, 120,7, 124,7, 124,8, 126,9, 129,4, 130,7, 137,7, 156,6, 164,8, 167,0, 168,0.

HRMS apsk. ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 476,0678$, rasta 476,0661.

4-chlor-2-metiltiopirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5a) ir 4-chlor-2-metiltio-5H-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino[3,2-a]indol-5-olis (6a)



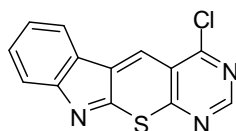
Metodas A: Į 149 mg (1 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) ir 223 mg 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) tirpalą 10 ml benzeno pridedama 150 mg (1,1 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 12 val, filtruojamas, nuosėdos plaunamos 3×10 ml benzeno, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis džiovinamas ir gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Junginio **5a** išeiga 210 mg (66 %), lyd. t. 183 °C (sk.) (iš chloroformo). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 2,72 (s, 3H, SCH₃), 7,43 (td, 1H, $J_3 = 7,3$ Hz, $J_4 = 1,0$ Hz, C(7)-H), 7,63 (td, 1H, $J_3 = 8,0$ Hz, $J_4 = 1,0$ Hz, C(8)-H), 7,79 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, C(9)-H), 8,09 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, C(6)-H), 8,62 (s, 1H, C(5)-H). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 14,7, 115,3, 119,2, 121,6, 123,9, 124,1, 125,5, 130,6, 132,2, 154,9, 160,4, 160,7, 165,0, 171,9. UV, λ , nm (lge): 271 (4,31), 312 (4,27), 374 (4,10), 390 (4,22), 410 (4,15).

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_3\text{S}_2\text{Cl}$): C, 52,91; H, 2,54; N, 13,22. Rasta: C, 53,29; H, 2,49; N, 13,04.

Metodas B: Į 149 mg (1 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) ir 223 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano sulašinama 154 µl (1,1 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 12 val., filtruojamas, nuosėdos plaunamos 3 × 10 ml tetrahidrofurano, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis džiovinamas ir gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Išskirti du junginiai 33 mg (10 %) junginio **6a** (r.f. 0,34) ir 98 mg (31 %) junginio **5a** (r.f. 0,26). Junginio **6a** lyd. t. 173 °C (iš benzeno). IR, cm⁻¹: 3289 (OH). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 2,56 (s, 3H, SCH₃), 6,75 (s, 1H, C(11)-H), 7,13 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, C(5)-H), 7,16 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H C(9)-H), 7,23 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, C(8)-H), 7,48 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, OH), 7,55 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, C(7)-H), 7,71 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H C(10)-H). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 14,6, 72,2, 102,0, 111,0, 119,3, 120,1, 121,9, 122,3, 123,6, 129,0, 136,8, 159,6, 164,1, 171,7. UV, λ, nm (lgε): 272 (4,51), 343 (3,98).

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₄H₁₀N₃OS₂Cl): C, 50,07; H, 3,00. Rasta: C, 50,26; H, 3,16.

4-chlorpirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (**5b**)

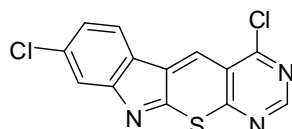


Į 149 mg (1 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) ir 140 µl (1 mmol) trietilamino tirpalą 10 ml tetrahidrofurano kambario temperatūroje per 1 val. sulašinamas 177 mg (1 mmol) 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehido (**2a**) tirpalas 15 ml tetrahidrofurano. Reakcijos mišinys dar maišomas kambario temperatūroje 45 min, filtruojamas, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis džiovinamas, tirpinamas minimaliame kiekyje chloroformo ir gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Išeiga 140 mg (52 %), lyd. t. 212 °C (iš chloroformo). ¹H-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 7,43 (td, 1H, *J*₃ = 7,5 Hz, *J*₄ = 0,7 Hz, C(7)-H), 7,66 (td, 1H, *J*₃ = 7,5 Hz, *J*₄ = 0,7 Hz, C(8)-H), 7,79 (dt, 1H, *J*₃ = 7,5 Hz, *J*₄ = 0,7 Hz, C(9)-H), 8,13 (dt, 1H, *J*₃ = 7,5

Hz, $J_4 = 0,7$ Hz, C(6)-H) 8,66 (s, 1H, C(5)-H), 8,98 (s, 1H, C(2)-H). ^{13}C -BMR (CDCl₃) δ , m.d.: 119,8, 120,2, 122,1, 123,1, 124,4, 125,4, 131,7, 134,9, 155,5, 155,6, 161,1, 161,7, 165,0. UV, λ , nm (lg ϵ): 276 (4,44), 317 (4,09), 356 (3,97), 371 (4,06), 390 (3,91).

HRMS apsk. (C₁₆H₁₅N₃O₃S): [M+H]⁺ = 272,0044, rasta 272,0042.

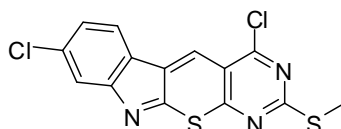
4,8-dichlorpirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5c)



Į 184 mg (1 mmol) 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano sulašinama 140 μl (1 mmol) trietilamino. Tirpalas, gautas ištirpinus 178 mg (1 mmol) 4,6-dichlorpirimidin-5-karbaldehido (**2a**) 15 ml tetrahidrofurano, per valandą sulašinamas į 6-chlorindolin-2-tiono tirpalą. Reakcijos mišinys maišomas 12 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje ir gautas produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuntas chloroformas su 0 ÷ 50 % eterio). Išeiga 120 mg (40 %), lyd. t. 233–235 °C. ^1H -BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 7,38 (dd, 1H, $J_3 = 8,3$ Hz, $J_4 = 1,7$ Hz, C(7)-H), 7,71 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, C(9)-H), 8,40 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C(6)-H), 8,55 (s, 1H, C(5)-H), 9,21 (s, 1H, C(2)-H). ^{13}C -BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 117,2, 117,3, 123,8, 124,1, 124,3, 127,4, 131,7, 133,0, 134,6, 151,3, 159,3, 160,8, 163,9.

HRMS apsk. (C₁₃H₅N₃SCl₂): [M+H]⁺ = 305,9654, rasta 305,9651.

4,8-dichlor-2-metiltiopirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5d)

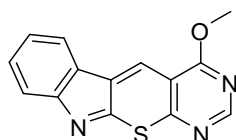


Į 184 mg (1 mmol) 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) tirpalą 15 ml tetrahidrofurano sulašinama 140 μl (1 mmol) trietilamino. Tirpalas, gautas ištirpinus 223 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) 15 ml tetrahidrofurano, per valandą sulašinamas į 6-chlorindolin-2-tiono tirpalą. Reakcijos mišinys maišomas 12 val. kambario temperatūroje,

filtruojamas, nuosėdos praplaunamos 3×10 ml tetrahidrofurano, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje ir gautas produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas chloroformas su $0 \div 50$ % eterio). Išeiga 92 mg (26 %) lyd. t. 234–236 °C. ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 2,60 (s, 3H, SCH_3) 7,26 (dd, 1H, $J_3 = 8,2$ Hz, $J_4 = 1,7$ Hz, C(7)-H), 7,57 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, C(9)-H), 8,20 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, C(6)-H), 8,79 (s, 1H, C(5)-H). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,0, 112,4, 118,2, 123,2, 123,5, 124,5, 126,7, 129,4, 133,8, 154,2, 159,5, 161,2, 162,9, 164,4.

HRMS apsk. $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}_2\text{Cl}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 351,9531$, rasta 351,9527.

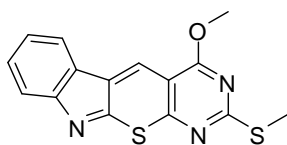
4-metoksipirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5e)



Į 86 mg (0,5 mmol) 4-chlor-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2f**) ir 74 mg (0,5 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) tirpalą 7 ml benzeno sulašinta 70 μl trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas 3 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis džiovinamas ir gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas chloroformas su $5 \div 15$ % eterio). Išeiga 30 mg (23 %), lyd. t. 182 °C (iš chloroformo). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 4,27 (s, 3H, OCH_3), 7,38 (td, 1H, $J_3 = 7,5$ Hz, $J_4 = 1,1$ Hz, C(7)-H), 7,60 (td, 1H, $J_3 = 7,8$ Hz, $J_4 = 1,1$ Hz, C(8)-H), 7,78 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, C(9)-H), 8,05 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, C(6)-H), 8,61 (s, 1H, C(5)-H), 8,76 (s, 1H, C(2)-H). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 55,4, 110,2, 119,4, 121,4, 122,2, 123,6, 125,8, 130,5, 132,4, 155,4, 156,5, 161,6, 163,5, 167,0. UV, λ , nm (lg ϵ): 283 (4,50), 356 (4,06), 371 (4,17), 390 (4,02).

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_3\text{SO}$): C, 62,91; H, 3,39. Rasta: C, 63,33; H, 3,47.

2-metiltio-4-metoksipirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5f)

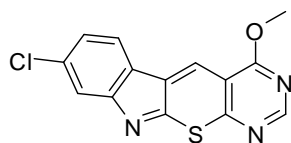


Metodas A: Į 240 mg (1,6 mmol) indolin-2-tiono (**1a**) ir 350 mg (1,6 mmol) 4-chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2g**) tirpalą 15 ml benzeno pridedama 250 mg (1,8 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 24 val., filtruojamas, nuosėdos plaunamos 3 × 10 ml benzeno, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis džiovinamas ir kristalinamas iš etilacetato. Išeiga 150 mg (30 %), lyd. t. 220–222 °C (iš etilacetato). ¹H-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 2,67 (s, 3H, SCH₃), 4,23 (s, 3H, OCH₃) 7,36 (td, 1H, *J*₃ = 7,5 Hz, *J*₄ = 0,9 Hz, C(7)-H), 7,56 (td, 1H, *J*₃ = 7,9 Hz, *J*₄ = 1,1 Hz, C(8)-H), 7,76 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, C(9)-H), 8,01 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, C(6)-H) 8,55 (s, 1H, CH). ¹³C-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 14,7, 55,4, 106,4, 119,1, 121,0, 123,4, 123,5, 125,9, 129,8, 130,0, 155,1, 161,1, 164,0, 165,7, 172,3. UV, λ, nm (lgε): 282 (4,43), 304 (4,35), 316 (4,21), 369 (4,36), 408 (4,31).

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₆H₁₁N₃S₂O): C, 57,49; H, 3,54; N, 13,41. Rasta: C, 57,41; H, 3,45; N, 12,43.

Metodas B: Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml metanolio pridedama 70 mg (0,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 3 val. ir pilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir perkristalinamos iš etilacetato. Išeiga 40 mg (51 %).

8-chlor-4-metoksipirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5g)

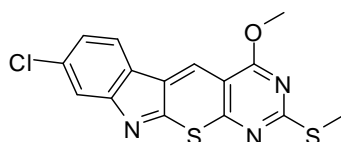


Į 86 mg (0,5 mmol) 4-chlor-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2f**) ir 92 mg (0,5 mmol) 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) tirpalą 7 ml benzeno sulašinama 70

µl trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas 3 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje, gautas produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas chloroformas su 0 ÷ 10 % eterio). Išeiga 40 mg (27 %), lyd. t. 217 °C (iš etilacetato). ¹H-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 4,29 (s, 3H, OCH₃) 7,32 (dd, 1H, *J*₃ = 18,2 Hz, *J*₄ = 1,8 Hz, C(7)-H), 7,71 (d, 1H, *J* = 1,8 Hz, C(9)-H), 7,91 (d, 1H, *J* = 18,2 Hz, C(6)-H), 8,58 (s, 1H, C(5)-H), 8,79 (s, 1H, C(2)-H). ¹³C-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 55,5, 110,2, 119,6, 122,0, 123,0, 123,7, 124,1, 131,4, 136,2, 156,2, 156,8, 163,1, 163,4, 167,1. UV (CHCl₃), λ, nm (lgε): 284 (4,52), 363 (4,12), 379 (4,22), 399 (4,09).

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₄H₈ClN₃SO): C, 55,72; H, 2,67. Rasta: C, 55,96; H, 2,77.

8-chlor-2-metiltio-4-metoksipirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5h)

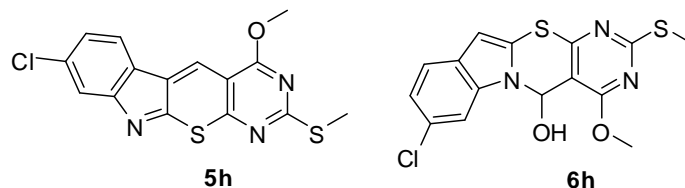


Į 184 mg (1 mmol) 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) tirpalą 15 ml tetrahidrofurano sulašinama 140 µl (1 mmol) trietilamino. Tirpalas, gautas ištirpinus 218 mg (1 mmol) 4-chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2g**) 15 ml tetrahidrofurano, per valandą sulašinamas į 6-chlorindolin-2-tiono tirpalą Reakcijos mišinys maišomas 12 val. kambario temperatūroje, filtruojamas, nuosėdos praplaunamos 3 × 10 ml tetrahidrofurano, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje ir gautas produktas gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas dichlormetanas su 0 ÷ 15 % eterio). Išeiga 46 mg (13 %) lyd. t. 201–203 °C (iš benzeno). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 2,67 (s, 3H, SCH₃), 4,21 (s, 3H, OCH₃), 7,42 (dd, *J*₃ = 8,2 Hz, *J*₄ = 1,8 Hz 1H, C(7)-H), 7,74 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, C(9)-H), 8,41 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, C(6)-H), 9,01 (s, C(5)-H). ¹H-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 2,69 (s, 3H, SCH₃), 4,25 (s, 3H, OCH₃), 7,33 (dd, *J*₃ = 8,1 Hz, *J*₄ = 1,8 Hz 1H, C(7)-H), 7,72 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, C(9)-H), 7,90 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, C(6)-H), 8,54 (s, C(5)-H). ¹³C-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 14,8, 55,5, 106,4,

119,5, 121,6, 123,5, 124,1, 124,5, 135,4, 138,1, 155,9, 162,7, 164,1, 165,8, 172,7.

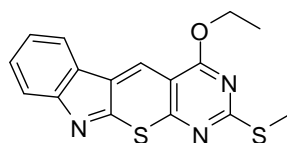
HRMS apsk. (C₁₅H₁₀ClN₃OS₂): [M+H]⁺ = 348,0027, rasta 348,0025.

8-chlor-2-metiltio-4-metoksipirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5h)
ir 8-chlor-2-metiltio-4-metoksi-5H-pirimido[5',4':5,6][1,3]tiazino[3,2-a]indol-5-olis (6h)



Į 138 mg (0,75 mmol) 6-chlorindolin-2-tiono (**1b**) ir 164 mg (0,75 mmol) 4-chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbaldehido (**2g**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano sulašinama 105 µl (0,75 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 12 val., filtruojamas, nuosėdos plaunamos 3 × 10 ml tetrahidrofurano, filtratai sujungiami, tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje ir produktai atskiriami kolonelinės chromatografijos metodu (eliuentas – chloroformas). Atskirti du junginiai: 50 mg (18 %) junginio **6h** (r.f. 0,22) ir 18 mg (7 %) junginio **5h** (r.f. 0,15). Junginio **6h** lyd. t. 194 °C (iš benzeno). IR (KBr), cm⁻¹: 3244 (OH). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 2,55 (s, 3H, SCH₃), 4,07 (s, 3H, OCH₃), 6,69 (s, 1H, C(11)-H), 7,07 (d, J = 7,1 Hz, 1H, C(5)-H), 7,15 (dd, J₃ = 8,4 Hz, J₄ = 1,6 Hz 1H, C(9)-H), 7,24 (d, J = 7,1 Hz, 1H, OH), 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H, C(10)-H), 7,81 (d, J = 1,7 Hz, 1H C(7)-H). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 14,4, 55,4, 69,9, 101,2, 107,8, 111,2, 121,1, 121,9, 125,8, 126,8, 127,5, 137,0, 160,4, 165,6, 171,2.

4-etoksi-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5j)

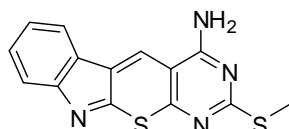


Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml 95 % etanolio pridėdama 70 mg (0,5 mmol)

bevandeniio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 48 val., išpilamas į 50 ml vandens, nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš etilacetato. Išeiga 60 mg (73 %), lyd. t. 227 °C (iš etilacetato). ¹H-BMR (CDCl₃) δ, m.d.: 1,60 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz CH₃), 2,68 (s, 3H, SCH₃), 4,71 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, OCH₂), 7,38 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, C(7)-H), 7,59 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz C(8)-H), 7,79 (d, 1H *J* = 7,9 Hz C(9)-H), 8,08 (d, 1H *J* = 7,5 Hz, C(6)-H), 8,61 (s, 1H, C(5)-H). ¹³C-BMR (75 MHz, CDCl₃) δ, m.d.: 14,6, 14,7, 64,6, 106,4, 119,3, 121,4, 123,3, 123,5, 126,4, 129,7, 130,3, 155,3, 161,6, 164,4, 165,5, 172,2.

HRMS apsk. (C₁₆H₁₃N₃OS₂): [M+H]⁺ = 328,0573, rasta 328,0567.

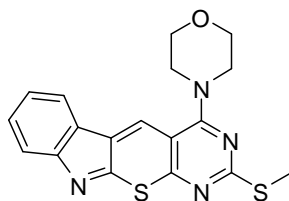
4-amino-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5k)



Į 100 mg (0,31 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano sulašinamas 1 ml 25 % amoniako tirpalo vandenyje. Reakcijos mišinys maišomas 24 val. kambario temperatūroje. Nuosėdos filtruojamos, plaunamos vandeniu 2 × 10 ml, acetonitrilu 3 × 10 ml ir džiovinamos. Išeiga 70 mg (75 %), lyd. t. > 250 °C. IR (KBr), cm⁻¹: 3322, 3160 (NH₂). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 2,54 (s, 3H, SCH₃), 7,36 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, C(7)-H), 7,51 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz C(8)-H), 7,66 (d, 1H *J* = 7,8 Hz C(9)-H), 8,01 (d, 1H *J* = 7,5 Hz, C(6)-H), 8,31 (s, 2H, NH₂), 9,09 (s, 1H, C(5)-H). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 14,3, 103,3, 119,0, 121,2, 123,4, 126,8, 126,9, 127,8, 129,2, 154,6, 160,1, 161,7, 163,6, 171,8.

HRMS apsk. C₁₄H₁₀N₄S₂: [M+H]⁺ = 299,0420, rasta 299,0416.

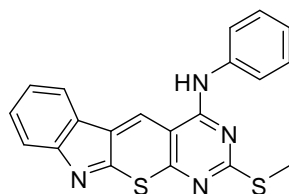
2-metiltio-4-morfolinopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5l)



Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml terahidrofurano sulašinama 22 μ l (0,25 mmol) morfolino ir pridedama 70 mg (0,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 18 val. kambario temperatūroje ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš acetono. Išeiga 40 mg (45%), lyd. t. 185 °C. ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 2,65 (s, 3H, SCH_3), 3,80 – 3,96 (m, 8H, morfolil-), 7,36 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, C(7)-H), 7,57 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz C(8)-H), 7,78(d, 1H $J = 7,5$ Hz C(9)-H), 7,99 (d, 1H $J = 7,5$ Hz, C(6)-H), 8,24 (s, 1H, C(5)-H). ^{13}C -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 14,7, 51,0, 66,9, 94,9, 119,4, 120,5, 123,2, 124,9, 126,2, 126,5, 129,7, 154,7, 162,5, 163,3, 165,8, 172,1.

HRMS apsk. ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}_2$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 369,0838$, rasta 369,0833.

4-fenilamino-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5m)

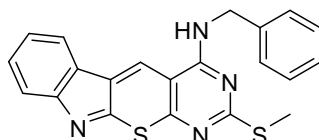


Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**8**) tirpalą 10 ml terahidrofurano sulašinama 23 μ l (0,25 mmol) anilino ir pridedama 70 mg (0,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 48 val. kambario temperatūroje ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš chloroformo. Išeiga 60 mg (64 %), lyd. t. 142 °C (iš chloroformo). IR (KBr), cm^{-1} : 3436 (NH). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 2,50 (s, 3H, SCH_3), 7,25 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, C(Ph-4)-H), 7,43 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, C(7)-H), 7,48 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz C(Ph-3,5)-H), 7,57 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz C(8)-H), 7,70 (d, 1H $J = 7,4$ Hz

C(9)-H), 7,73 (d, 2H $J = 7,5$ Hz C(Ph-2,6)-H), 8,14 (d, 1H $J = 7,4$ Hz, C(6)-H), 9,48 (s, 1H, C(5)-H), 10,33 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,4, 104,3, 119,1, 121,3, 123,3, 124,0, 125,5, 125,6, 126,8, 128,4, 129,2, 129,3, 138,7, 154,9, 157,5, 159,8, 165,8, 171,3.

HRMS apsk. ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}_2$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 375,0733$, rasta 375,0728.

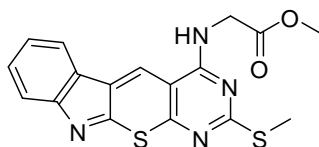
4-benzilamino-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolas (5n)



Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml terahidrofurano sulašinama 54 μL (0,5 mmol) benzilamino. Reakcijos mišinys maišomas 6 val. kambario temperatūroje ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir gryninamos kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas n-heksanas su 15 ÷ 60 % etilacetato). Išeiga 50 mg (52 %), lyd. t. > 230 °C (skyla). IR (KBr), cm^{-1} : 3240 (NH). ^1H -BMR (DMSO- d_6) δ , m.d.: 2,46 (s, 3H, SCH_3), 4,81 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz, CH_2), 7,26-7,47 (m, 6H, 6CH), 7,50 (td, 1H, $J_3 = 7,9$ Hz, $J_4 = 0,9$ Hz, C(8)-H), 7,64 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, C(9)-H), 8,00 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, C(6)-H), 9,13 (s, 1H, C(5)-H), 9,23 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- d_6) δ , m.d.: 14,4, 44,9, 103,8, 119,1, 120,7, 121,2, 123,3, 125,9, 126,9, 127,8, 128,0, 128,3, 129,2, 129,2, 139,4, 154,9, 159,1, 163,2, 171,5. UV, λ , nm (lg ϵ): 286 (4,51), 409 (4,29), 428 (4,32).

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}_2$): C, 64,92; H, 4,15. Rasta: C, 65,07; H, 4,18.

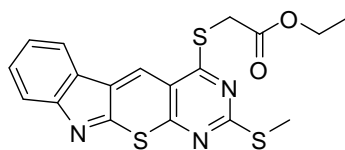
Metil[(2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indol-4-il)amino]acetatas (5o)



Į 160 mg (0,5 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 20 ml tetrahidrofurano pridedama 63 mg (0,5 mmol) aminoacto rūgšties metilesterio hidroklorido ir 140 mg (1 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 96 val. kambario temperatūroje, išpilamas į 100 ml vandens, filtruojamas, nuosėdos džiovinamos, produktas kristalinamas iš benzeno. Išeiga 100 mg (55 %), lyd. t. 201–202 °C (iš benzeno). IR (nujole), cm^{-1} : 3520 (NH); 1746 CO. ^1H BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 2,48 (s, 3H, SCH_3), 3,71 (s, 3H, OCH_3), 4,31 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz, CH_2), 7,38 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, C(7)-H), 7,52 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, C(8)-H), 7,66 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, C(9)-H), 8,01 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, C(6)-H), 9,08 (s, 1H, C(5)-H), 9,22 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NH). ^{13}C BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 14,2, 43,5, 52,7, 103,7, 119,2, 121,2, 123,5, 125,4, 126,8, 128,3, 129,4, 155,0, 159,3, 160,0, 163,1, 170,8, 171,4.

HRMS apsk. $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 371,0907631$, rasta 371,0625.

Etil[(2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indol-4-il)tio]acetatas (5p)

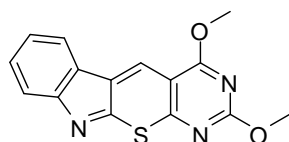


Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml terahidrofurano sulašinama 27 μl (0,25 mmol) merkptoacto rūgšties etilesterio ir pridedama 70 mg (0,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 48 valandas kambario temperatūroje inertinėje atmosferoje ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš

etilacetato. Išeiga 60 mg (60 %), lyd. t. 193–194 °C (iš etilacetato). IR (KBr), cm^{-1} : 1732 (CO). ^1H BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 1,36 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3), 2,36 (s, 3H, SCH_3), 4,13 (s, 2H, SCH_2), 4,29 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, OCH_2), 7,35 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, C(7)-H), 7,55 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz C(8)-H), 7,72 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz C(9)-H), 7,99 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, C(6)-H), 8,33 (s, 1H, C(5)-H. ^{13}C BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 14,5, 14,7, 32,9, 62,5, 114,5, 119,4, 121,4, 122,8, 123,6, 125,6, 130,3, 130,9, 155,4, 161,0, 162,8, 168,4, 170,7.

HRMS apsk. ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_3$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 402,0399$, rasta 402,0393.

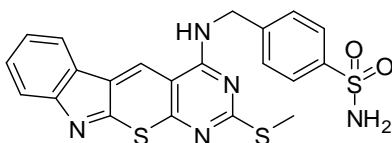
2,4-dimetoksimirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolas (5r)



Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo (5a) tirpalą 10 ml metanolio pridedama 70 mg (0,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys virinamas 24 val. ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir gryninamos kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas *n*-heksanas su 10 ÷ 90 % etilacetato). Išeiga 30 mg (40 %). Lyd. t. > 200 °C (skyla) (iš tolueno). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 4,15 (s, 3H, OCH_3), 4,25 (s, 3H, OCH_3), 7,36 (td, 1H, $J_3 = 7,6$ Hz, $J_4 = 1,1$ Hz, C(7)-H), 7,57 (td, 1H, $J_3 = 7,6$ Hz, $J_4 = 1,6$ Hz, C(8)-H), 7,77 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, C(9)-H), 8,02 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, C(6)-H), 8,57 (s, 1H, C(5)-H). ^{13}C -BMR (DMSO-d_6) δ , m.d.: 55,5, 56,1, 105,4, 119,3, 120,9, 123,3, 123,4, 126,2, 129,6, 129,6, 155,2, 161,4, 163,7, 166,3, 169,1. UV (CHCl_3), λ , nm (lg ϵ): 289 (4,42), 363 (4,06), 377 (4,18), 397 (4,11).

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{SO}_2$): C, 60,59; H, 3,73. Rasta: C, 60,66; H, 3,68.

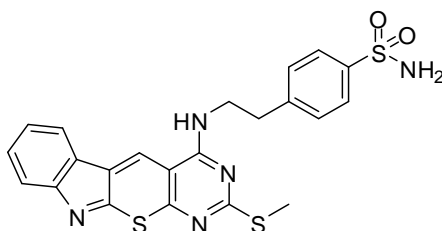
4-N-[[2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indol-4-il)amino]metil}benzensulfonamidas (5s)



Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano pridedama 56 mg (0,25 mmol) 4-aminometilbenzensulfonamido (**9b**) hidroklorido ir 76 mg (0,55 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 24 val. kambario temperatūroje ir išpilamas į 50 ml vandens. Nuosėdos filtruojamos, plaunamos 2 × 10 ml vandens ir džiovinamos 90 °C. Išėiga 88 mg (75 %), lyd. t. 255–257 °C. IR, cm⁻¹: 3386 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-d₆ + TFA) δ, m.d.: 2,51 (s, 3H, SCH₃), 4,96 (d, 2H, CH₂, J = 5,1 Hz), 7,38 (s (platus), 2H, NH₂), 7,58-7,72 (m, 5H, 5CH), 7,84 (d, 2H, 2CH, J = 8,2 Hz), 8,20 (d, 1H, 1CH, J = 7,5 Hz), 9,93 (s, 1H, CH), 10,09 (t, 1H, NH, J = 5,1 Hz). ¹³C-BMR (DMSO-d₆) δ, m.d.: 14,4, 44,6, 103,6, 119,2, 120,7, 121,2, 123,4, 125,9, 126,5, 126,8, 128,1, 128,4, 129,3, 143,6, 154,9, 159,2, 159,9, 163,2, 171,5.

HRMS apsk. (C₂₁H₁₇N₅O₂S₃): [M+H]⁺ = 468,0617, rasta 468,0609.

4-N-{2-[(2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indol-4il)amino]etil}benzensulfonamidas (5t)



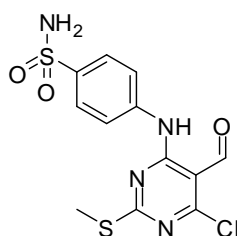
Į 80 mg (0,25 mmol) 4-chlor-2-metiltiopirimido[4',5':5,6]tiopirano[2,3-b]indolo (**5a**) ir 50 mg (0,25 mmol) 4-aminoetilbenzensulfonamido (**9b**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano pridedama 40 mg (0,29 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 6 val., filtruojamas, nuosėdos plaunamos 3 × 20 ml tetrahidrofurano, filtratai surenkami, koncentruojami, produktas užnešamas ant silikagelio ir gryninamas

kolonēlinēs chromatografijas metodu (eliuentas eteris su tetrahidrofurānu 3:1). Išēiga 50 mg (42 %), lyd. t. 270–273 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3388 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-d₆) δ , m.d.: 2,60 (s, 3H, SCH₃), 3,11 (t, 2H, CH₂, $J = 7,3$ Hz), 3,81 – 3,88 (m, 2H, CH₂), 7,32 (s (platus), 2H, NH₂), 7,39 (t, 1H, CH, $J = 7,5$ Hz), 7,51 (d, 2H, 2CH, $J = 7,5$ Hz), 7,53 (t, 1H, CH, $J = 7,5$ Hz), 7,67 (d, 2H, 2CH, $J = 7,5$ Hz), 7,79 (d, 2H, 2CH, $J = 8,2$ Hz), 8,04 (d, 1H, 1CH, $J = 7,5$ Hz), 8,89 (t, 1H, NH, $J = 5,7$ Hz), 9,09 (s, 1H, CH).

HRMS apsk. (C₂₂H₁₉N₅O₂S₃): [M+H]⁺ = 482,0744, rasta 482,0771.

4-[N-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidas

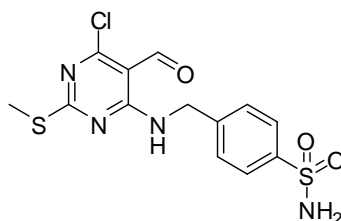
(8a)



Ī 223 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) ir 170 mg (1 mmol) 4-aminobenzensulfonamido (**9a**) tirpalā 10 ml tetrahidrofurāno sulašināma 278 μl (2 mmol) trietilamīno. Reakcijas mišinys virināmas 36 val., atāušināmas, tirpiklis nugarināmas sumažintame slēgyje ir likutis grynināmas kolonēlinēs chromatografijas metodu (eliuentas – eteris). Išēiga 108 mg (30 %), lyd. t. 227 °C (iš metanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3318, 3236 (NH, NH₂), 1638 (CHO). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 2,57 (s, 3H, SCH₃), 7,38 (s, 2H, NH₂), 7,84-7,92 (m, 4H, Ar-H), 10,25 (s, 1H, NH), 11,26 (s, 1H, CHO). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 14,9, 105,9, 115,8, 123,2, 127,3, 140,4, 140,9, 158,4, 164,5, 191,6.

Elementinē sudētis. Apsk. (C₁₂H₁₁ClN₄O₃S₂): C, 40,17; H, 3,09. Rasta: C, 40,27; H, 3,16.

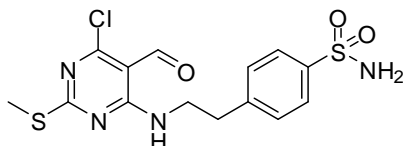
4- $\{[N-(6\text{-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]metil\}$ benzensulfonamidas (8b)



Į 223 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) tirpalą 8 ml tetrahidrofurano pridedama 220 mg (1 mmol) 4-aminometilbenzensulfonamido (**9b**) hidroklorido ir 280 mg (2,1 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys virinamas 10 val., ataušinamas iki kambario temperatūros ir išpilamas į 50 ml vandens. Susidariusios nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš 2-propanolio. Išeiga 260 mg (70 %), lyd. t. 195 °C (iš 2-propanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3480, 3276 (NH, NH_2), 1648 (CO). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 2,39 (s, 3H, SCH_3), 4,83 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH_2), 7,33 (s, 2H, NH_2), 7,50 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, Ar-H), 9,82 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H, NH), 10,18 (s, 1H, CHO). ^{13}C -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 14,6, 44,5, 105,3, 126,5, 128,3, 143,3, 143,5, 160,1, 164,1, 176,1, 190,5.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}_2$): C, 41,88; H, 3,51. Rasta: C, 41,87; H 3,58.

4- $\{2-[N-(6\text{-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]etil\}$ benzensulfonamidas (8c)

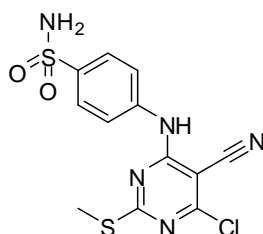


Junginys **8c** sintetinamas iš 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbaldehido (**2b**) ir 4-(2-aminoetil)benzensulfonamido (**2c**) pagal 4- $\{[N-(6\text{-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]metil\}$ benzensulfonamido (**8b**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 3 val., išeiga 61 %, lyd. t. 182 °C (iš 2-

propanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3256 (NH, NH_2), 1646 (CO). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 2,56 (s, 3H, SCH_3), 3,01 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2), 3,79-3,86 (m, 2H, CH_2), 7,34 (s, 2H, NH_2), 7,46 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 9,38 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, NH), 10,13 (s, 1H, CH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,6, 35,0, 42,4, 105,0, 126,5, 129,9, 143,0, 143,8, 160,1, 164,2, 176,2, 190,7.

HRMS apsk. ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{S}_2$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 387,0347$, rasta 387,0340.

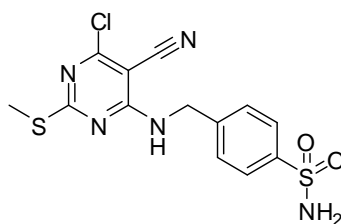
4-[N-(6-chlor-5-ciano-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidas (12a)



Junginys **12a** sintetinamas iš 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbonitrilo (**10a**) ir 4-aminobenzensulfonamido (**9a**) pagal 4-[N-(6-chlor-5-formil-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido (**8a**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 24 val. Išeiga (84 %), lyd. t. 217 °C (sk.) IR (KBr), cm^{-1} : 3326, 3272 (NH, NH_2), 2222 (CN). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 2,47 (s, 3H, SCH_3), 7,36 (s, 2H, NH_2), 7,75-7,85 (m, 4H, Ar-H), 10,44 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 14,6, 87,6, 114,3, 124,1, 126,8, 140,9, 141,0, 160,2, 162,1, 175,5.

HRMS apsk. ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}_2$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 356,0037$, rasta: 356,0033.

4-[[N-(6-chlor-5-ciano-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]metil]benzensulfonamidas (12b)

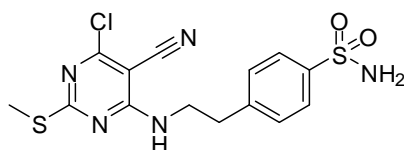


Į 220 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbonitrilo (**10a**)

tirpalą 8 ml tetrahidrofurano pridedama 220 mg (1 mmol) 4-aminometilbensulfonamido (**9b**) hidrochlorido ir 280 mg (2 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 1 val. kambario temperatūroje, išpilamas į 50 ml vandens. Nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ir kristalinamos iš metanolio. Išeiga 140 mg (38 %), lyd. t. 140 °C (iš metanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3340, 3250 (NH, NH_2), 2222 (CN). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 2,37 (s, 3H, SCH_3), 4,69 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, CH_2), 7,35 (s, 2H, NH_2), 7,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Ar-H), 9,13 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 14,5, 44,9, 85,7, 114,6, 126,4, 128,3, 143,2, 149,5, 161,1, 161,4, 175,3.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}_2$): C, 42,22; H, 3,27. Rasta: C, 42,43; H, 3,42.

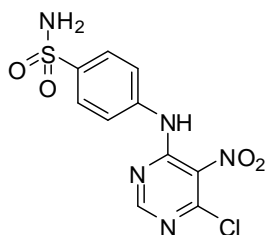
4-{2-[N-(6-chlor-5-ciano-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]etil}bensulfonamidas (12c**)**



Į 220 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbonitrilo (**10a**) ir 200 mg (1 mmol) 4-(2-aminoetil)bensulfonamido (**9c**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano pridedama 144 mg (1,04 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys virinamas 3 val., ataušinamas iki kambario temperatūros ir išpilamas į 70 ml vandens. Nuosėdos filtruojamos, džiovinamos ore ir kristalinamos iš metanolio. Išeiga 280 mg (73 %), lyd. t. 213 °C (iš metanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3366, 3264 (NH, NH_2), 2218 (CN). ^1H -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 2,53 (s, 3H, SCH_3), 2,97 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 3,65 – 3,72 (m, 2H, CH_2), 7,33 (s, 2H, NH_2), 7,43 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 8,61 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO-D_6) δ , m.d.: 14,6, 34,8 43,0, 85,3, 114,6, 126,5, 129,9, 142,9, 143,9, 161,1, 161,3, 175,3.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}_2$): C, 43,80; H, 3,68. Rasta: C, 44,12; H, 3,59.

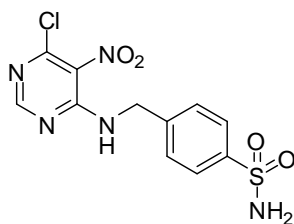
4-[N-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidas (13a)



Į 200 mg (1,03 mmol) 4,6-dichlor-5-nitropirimidino (**11a**) ir 180 mg (1,03 mmol) 4-aminobenzensulfonamido (**9a**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano sulašinama 278 μ l (2 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys virinamas 16 val., tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje ir likutis gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas etilacetatas su n-heksanu 1:1). Išeiga 240 mg (71 %), lyd. t. 200 °C (sk.). IR (KBr), cm^{-1} : 3375; 3340; 3270 (NH). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 7,38 (s, 2H, NH_2), 7,72-7,85 (m, 4H, Ar-H), 8,61 (s, 1H, CH), 10,36 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- d_6) δ , m.d.: 117,9, 125,8, 126,8, 140,8 141,5, 152,6, 155,5, 156,7.

HRMS apsk ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClN}_5\text{O}_4\text{S}$): $[\text{M}-\text{H}]^- = 327,9913$, rasta 327,9912.

4-[[N-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil]benzensulfonamidas (13b)

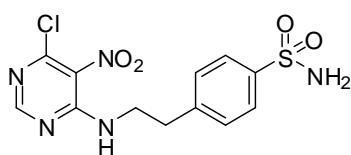


Į 291 mg (1,5 mmol) 4,6-dichlor-5-nitropirimidino (**11a**) tirpalą 15 ml tetrahidrofurano pridedama 335 mg (1,5 mmol) 4-aminometilbenzensulfonamido (**9b**) hidroklorido ir 345 mg (2,5 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 8 val., nufiltruojamas, filtratas nugarinamas sumažintame slėgyje ir likutis gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas etilacetatas su n-heksanu 1:1). Išeiga 394 mg (76 %), lyd. t. 166 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3294 (NH), 3370 (NH). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 4,76 (d, $J = 5,9$

Hz, 2H, CH₂), 7,34 (s, 2H, NH₂), 7,50 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, Ar-H), 8,46 (s, 1H, CH), 9,11 (t, 1H, NH, *J* = 5,9 Hz). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 44,7, 126,5, 128,1, 128,9, 142,9, 143,5, 151,7, 155,1, 158,9.

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₁H₁₀ClN₅O₄S): C, 38,43; H, 2,93. Rasta: C, 38,54; H, 2,86.

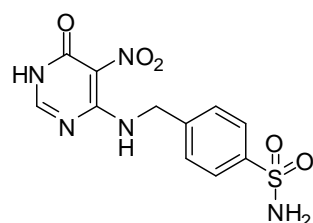
**4-{2-[*N*-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]etil}benzensulfonamidas
(13c)**



Junginys **13c** sintetinamas iš 4,6-dichlor-5-nitropirimidino (**11a**) ir 4-(2-aminoetil)benzensulfonamido (**9c**) pagal 4-{{*N*-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino}metil}benzensulfonamido (**13b**) sintezės metodiką. Išeiga 64 %, lyd. t. 189 °C. IR (KBr), cm⁻¹: 3267, 3349, 3396 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 2,97 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂) 3,69-3,76 (m, 2H, CH₂), 7,33 (s, 2H, NH₂), 7,43 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, Ar-H), 7,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, Ar-H), 8,49 (s, 1H, CH), 8,57 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ, m.d.: 34,7, 43,0, 126,4, 128,8, 129,9, 143,0, 143,8, 151,5, 154,9, 158,9.

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₂H₁₂ClN₅O₄S): C, 40,28; H, 3,38. Rasta: C, 40,46; H, 3,59.

4-{{*N*-(5-nitro-6-okso-1,6-dihidro-4-pirimidinil)amino}metil}benzensulfonamidas (15b)



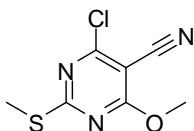
Į 160 mg (0,466 mmol) 4-{{*N*-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino}metil}benzensulfonamido tirpalą 5 ml tetrahidrofurano sulašinama 150 μl vandens. Mišinys paliekamas kambario temperatūroje 3 dienoms.

Susidariusios nuosėdos filtruojamos, plaunamos 3 x 5 ml tetrahydrofurano ir džiovinamos. Išeiga 125 mg (83 %), lyd. t. >300 °C (sk.). IR (KBr), cm^{-1} : 1676 (CO), 3066, 3191, 3274, 3324 (NH, NH_2). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 4,86 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH_2), 7,33 (s, 2H, NH_2), 7,49 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 8,09 (s, 1H, CH), 10,0 (t, 1H, NH, $J = 6,2$ Hz), 12,47 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 45,1, 116,3, 126,4, 128,1, 143,4, 143,5, 152,7, 155,6, 158,9.

HRMS apsk. ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 326,0554$, rasta 326,0554.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$): C, 40,61; H, 3,41. Rasta: C, 40,94; H, 3,64.

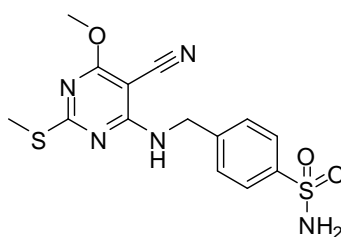
4-Chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbonitrilas (10b)



Į 2,5 g (11,35 mmol) 4,6-dichlor-2-metiltiopirimidin-5-karbonitrilo (**10a**) suspensiją 40 ml metanolio sulašinama 1,3 g (12,87 mmol) trietilamino. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 2 val. ir išpilamas į vandenį. Nuosėdos filtruojamos ir kristalinamos. Išeiga 2,22 g (91 %), lyd. t. 123–124,5 °C (metanolio ir vandens mišinys). IR (KBr), cm^{-1} : 2229 (CN). ^1H -BMR (CDCl_3) δ , m.d.: 2,60 (s, 3H, SCH_3), 4,13 (s, 3H, OCH_3).

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_7\text{H}_6\text{ClN}_3\text{OS}$): C, 38,99; H, 2,80; N, 19,48. Rasta: C, 39,15; H, 2,68; N, 19,28.

4- $\{[N$ -(5-cian-2-metiltio-6-metoksipirimidin-4-il)amino]metil}benzenesulfonamidas (16)

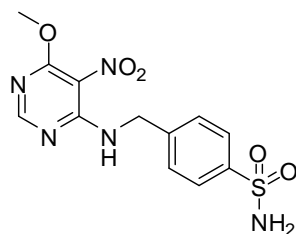


Junginys **16** sintetinamas iš 4-chlor-2-metiltio-6-metoksipirimidin-5-karbonitrilo (**10b**) ir 4-aminometilbenzenesulfonamido (**9b**) hidroklorido pagal

4- $\{[N-(6\text{-chlor-5-ciano-2-metiltiopirimidin-4-il)amino}]etil\}$ benzensulfonamido (**12b**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 20 val., išeiga 63 %, lyd. t. 135 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3344, 3316, 3250 (NH, NH₂), 2218 (CN). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 2,37 (s, 3H, SCH₃), 3,93 (s, 3H, OCH₃), 4,66 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH₂), 7,32 (s, 2H, NH₂), 7,48 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, Ar-H), 8,65 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 14,4, 44,6, 55,4, 69,9, 115,0, 126,4, 128,2, 143,3, 144,0, 162,7, 170,2, 174,9.

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₄H₁₅N₅O₃S₂): C, 46,01; H, 4,14. Rasta: C, 46,29; H, 3,89.

**4- $\{[N-(6\text{-metoksi-5-nitropirimidin-4-il)amino}]metil\}$ benzensulfonamidas
(17b)**

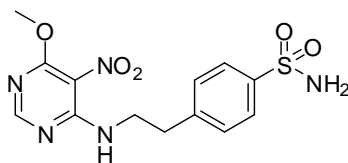


Į 194 mg (1 mmol) 4,6-dichlor-5-nitropirimidino (**11a**) tirpalą 10 ml tetrahidrofurano pridedama 223 mg (1 mmol) 4-aminometilbenzensulfonamido (**9b**) hidrochlorido ir 290 mg (2,1 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 8 val., filtruojamas, filtratas praplaunamas 5 ml tetrahidrofurano, filtratai surenkami ir tirpiklis nugarinamas sumažintame slėgyje. Gautas likutis užpilamas 20 ml metanolio, virinamas 30 min. ir paliekamas lėtai ataušti iki kambario temperatūros. Susidarę kristalai filtruojami ir džiovinami ore. Išeiga 200 mg (57 %), lyd. t. 174 °C (iš metanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3270, 3374 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 4,00 (s, 3H, OCH₃), 4,80 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH₂), 7,33 (s, 2H, NH₂), 7,50 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Ar-H), 8,31 (s, 1H, CH), 9,14 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 44,8, 55,9, 116,7, 126,4, 128,0, 143,3, 143,8, 156,6, 159,3, 163,8.

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₂H₁₃N₅O₅S): C, 42,47; H, 3,86. Rasta: C, 42,29; H, 4,01.

4-{2-[N-(6-metoksi-5-nitropirimidin-4-il)amino]etil}benzensulfonamidas

(17c)

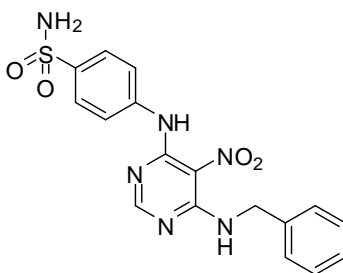


Junginys **17c** sintetinamas iš 4,6-dichlor-5-nitropirimidino (**11a**) ir 4-(2-aminoetil)benzensulfonamido (**9c**) bei metanolio pagal 4-{[N-(6-metoksi-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}benzensulfonamido (**17b**) sintezės metodiką. Išeiga 47 %, lyd. t. 208 °C (iš metanolio). IR (KBr), cm^{-1} : 3256, 3358 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 2,98 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH₂), 3,75-3,81 (m, 2H, CH₂), 4,00 (s, 3H, OCH₃), 7,33 (s, 2H, NH₂), 7,45 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 8,38 (s, 1H, CH), 8,63 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 35,2, 42,9, 55,8, 120,7, 126,5, 129,9, 142,9, 144,0, 156,5, 159,4, 163,8.

Elementinė sudėtis. Apsk. (C₁₃H₁₅N₅O₅S): C, 44,19; H, 4,28. Rasta: C, 44,25; H, 4,38.

4-[N-(6-benzilamino-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidas

(19a)

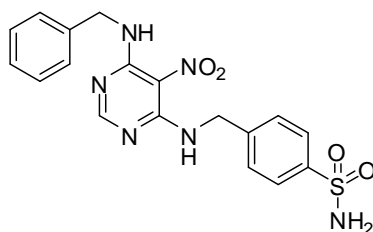


Į 120 mg (0,364 mmol) 4-[N-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]benzensulfonamido (**13a**) tirpalą 5 ml dimetilformamido sulašinama 40 μl (0,364 mmol) benzilamino ir pridedama 55 mg (0,4 mmol) bevandenio kalio karbonato. Reakcijos mišinys maišomas 100 °C temperatūroje 12 val., ataušinamas iki kambario temperatūros ir išpilamas į 50 ml vandens. Gautos nuosėdos filtruojamos, plaunamos vandeniu, džiovinamos ir gryninamos kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas etilacetatas su n-heksanu 1:1).

Išėiga 88 mg (60 %), lyd. t. 195 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3347 (NH). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 4,84 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH_2), 7,25-7,37 (m, 7H, NH_2 , Ph), 7,83 (s, 4H, Ar-H), 8,18 (s, 1H, CH), 9,91 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, NH), 11,03 (s, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 45,0, 113,7, 124,8, 126,9, 127,6, 128,0, 129,0, 139,4, 140,9, 141,2, 156,1, 157,2, 159,9.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$): C, 50,99; H, 4,03. Rasta: C, 50,94; H, 4,23.

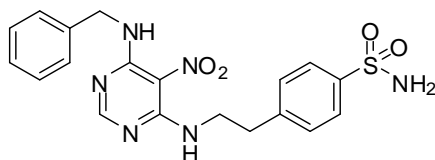
4- $\{[N$ -(6-benzilamino-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}benzensulfonamidas (19b)



Junginys **19b** sintetinamas iš 4- $\{[N$ -(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]metil}benzensulfonamido (**13b**) ir benzilamino pagal 4- $[N$ -(6-benzilamino-5-nitro-4-il)amino]benzensulfonamido (**13a**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 3 val., išėiga 34 %, lyd. t. 162 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3339, 3273 (NH, NH_2). ^1H -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 4,80 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_2), 4,85 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH_2), 7,23 – 7,37 (m, 7H, Ph, NH_2), 7,51 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 7,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar=H), 8,04 (s, 1H, CH), 9,88 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, NH), 9,96 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, NH). ^{13}C -BMR (DMSO- D_6) δ , m.d.: 44,6, 44,9, 113,1, 126,4, 127,6, 128,0, 128,1, 129,0, 139,5, 143,2, 143,8, 157,4, 157,5, 160,0.

Elementinė sudėtis. Apsk. ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$): C, 52,17; H, 4,38. Rasta: C, 52,43; H, 4,59.

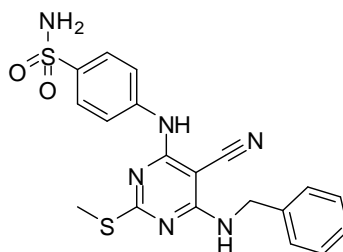
4- $\{2$ - $[N$ -(6-benzilamino-5-nitropirimidin-4-il)amino]etil}benzensulfonamidas (19c)



Junginys **19c** sintetinamas iš 4-{2-[N-(6-chlor-5-nitropirimidin-4-il)amino]etil}benzensulfonamido (**13c**) ir benzilamino pagal 4-[N-(6-benzilamino-5-nitro-4-il)amino]benzensulfonamido (**19a**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 3 val., išeiga 35 %, lyd. t. 211 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3274, 3335 (NH, NH₂). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 3,00 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH₂), 3,79-3,86 (m, 2H, CH₂), 4,80 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H, CH₂), 7,22 – 7,35 (m, 7H, Ph, NH₂), 7,46 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar-H), 8,12 (s, 1H, CH), 9,49 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, NH), 9,86 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, NH). ¹³C-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 35,1, 42,8, 44,9, 112,9, 126,5, 127,6, 128,0, 129,0, 129,9, 139,5, 142,9, 144,0, 157,4, 157,5, 160,2.

HRMS apsk. (C₁₉H₂₀N₆O₄S): [M+H]⁺ = 429,1340, rasta 429,1339.

4-[N-(6-benzilamino-5-cian-2-metiltiopirimidin-4-il)amino]benzensulfonamidas (18a)



Junginys **18a** sintetinamas iš 4-(6-chlor-5-ciano-5-metiltiopirimidin-4-ilamino)benzensulfonamido (**12a**) ir benzilamino pagal 4-[N-(6-benzilamino-5-nitro-4-il)amino]benzensulfonamido (**13a**) sintezės metodiką. Reakcijos trukmė 12 val., junginys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu (eliuentas eteris). Išeiga 54 %, lyd. t. 194 °C. IR (KBr), cm^{-1} : 3417 (NH, NH₂), 2198 (CN). ¹H-BMR (DMSO-D₆) δ , m.d.: 2,34 (s, 3H, SCH₃), 4,59 (s, 2H, CH₂), 7,24-7,34 (m, 7H, 2NH, Ph), 7,66 (m, 4H, Ar-H), 8,10 (s, 1H, NH).

HRMS apsk. (C₁₉H₁₈N₆O₂S₂): [M+H]⁺ = 427,1005, rasta 427,1011.

Literatūros sąrašas

1. Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. *Chem rev* **2008**, *108*, 946–1051.
2. Barrese, A. A.; Genis, C.; Fisher, S. Z.; Orwenyo, J. N.; Kumara, M. T.; Dutta, S. K.; Phillips, E.; Kiddle, J. J.; Tu, C.; Silverman, D. N.; Govindasamy, L.; Agbandje-McKenna, M.; McKenna, R.; Tripp, B. C. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3174–3184.
3. Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S.-A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; T. Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3057–3062.
4. Supuran, C. T. *Nature reviews, Drug discovery* **2008**, *7*, 1–15.
5. Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3467–3474.
6. Mann, T.; Keilin, D. *Nature* **1940**, *146*, 164–165.
7. Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4336–4350.
8. Chegwidde, W. R., Carter, N. D., Edwards, Y. H., Eds. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*; Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 2000.
9. Liang, J. Y.; Lipscomb, W. N. *PNAS* **1990**, *87*, 3675–3679.
10. Krebs, J. F.; Fierke, C. A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 948–954.
11. Steiner, H.; Jonsson, B. H.; Lindskog, S. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *59*, 253–259.
12. Silverman, D. N.; Lindskog, S. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 30.
13. Snider, M. G.; Temple, B. S.; Wolfenden, R. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 586–591.
14. Innocenti, A.; Firnges, M. A.; Antel, J.; Wurl, M.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5769–5773.
15. Briganti, F.; Pierattelli, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 1001–1010.

16. Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 567–571.
17. Krebs, H. A. *Biochem. J.* **1948**, *43*, 525–528.
18. Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1855–1857.
19. Nishimori, I.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6742–6747.
20. Temperini, C.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2795–2801.
21. Vullo, D.; Ruusuvoori, E.; Kaila, K.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3139–3143.
22. Maren, T. H.; Conroy, C. W. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26233–26239.
23. Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2241–2246.
24. Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4316–4320.
25. Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Casey, J. R.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 573–578.
26. Winum, J. Y.; Innocenti, A.; Gagnard, V.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1683–1686.
27. Temperini, C.; Innocenti, A.; Guerri, A.; Scozzafava, A.; Rusconi, S.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2210–2215.
28. Massah, A. R.; Adibi, H.; Khodarahmi, R.; Abiri, R.; Majnooni, M. B.; Shahidi, S.; Asadi, B.; Mehrabi, M.; Zolfigol, M. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5465–5472.
29. Ghorab, M. M.; Ragab, F. A.; M., H. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4211–4217.
30. Kohler, K.; Hillebrecht, A.; Wischeler, J. S.; Innocenti, A.; Heine, A.; Supuran, C. T.; Klebe, G. *Angewandte Int. Ed.* **2007**, *46*, 7697–7699.
31. Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3677–3687.

32. Mincione, F.; Menabuoni, L.; Briganti, F.; Mincione, G.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Enz. Inhib.* **1998**, *13*, 267–284.
33. Fenesan, I.; Popescu, R.; Scozzafava, A.; Crucin, V.; Mateiciuc, E.; Bauer, R.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Enz. Inhib.* **2000**, *15*, 297–309.
34. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Briganti, F. *J. Enz. Inhib.* **1999**, *14*, 289–306.
35. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 146–189.
36. Casini, A.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 837–840.
37. Winum, J.-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T. *Medicinal Research Reviews* **2006**, *26*, 767–792.
38. Gitto, R.; Agnello, S.; Ferro, S.; De Luca, L.; Vullo, D.; Brynda, J.; Mader, P.; Supuran, C. T.; Chimirri, A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2401–2408.
39. Leese, M. P.; Leblond, B.; Smith, A.; Newman, S. P.; Di Fiore, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7683–7696.
40. Vitale, R. M.; Alterio, V.; Innocenti, A.; Winum, J. Y.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5990–5998.
41. Lloyd, M. D.; Thiyagarajan, N.; Ho, Y. T.; Woo, L. W. L.; Sutcliffe, O. B.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Acharya, K. R.; Potter, B. V. L. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6858–6866.
42. Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schafer, S.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 841–845.
43. Winum, J. Y.; Innocenti, A.; Nasr, J.; Montero, J. L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2005**, *15*, 2353–2358.
44. Di Fiore, A.; Monti, S. M.; Innocenti, A.; Winum, J. Y.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3601–3605.

45. Lopez, M.; Paul, B.; Hofmann, A.; Morizzi, J.; Wu, Q. C.; Charman, S. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6421–6432.
46. Smaine, F. Z.; Pacchiano, F.; Rami, M.; Barragan-Montero, V.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6332–6335.
47. Winum, J. Y.; Cecchi, A.; Montero, J. L.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3302–3306.
48. Scolnick, A. M., L. R. and Clements; Liao, J.; Crenshaw, L.; Hellberg, M.; May, J.; Dean, T. R.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 850–851.
49. Nuti, E.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Rossello, A.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2298–2311.
50. Rusconi, S.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5763–5767.
51. Winum, J. Y.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; T. Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3649–3652.
52. Almajan, G. L.; Innocenti, A.; Puccetti, L.; Manole, S., G. Barbuceanu; Saramet, I.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2347–2352.
53. Abdel-Hamid, M. K.; Abdel-Hafez, A. A.; El-Koussi, N. A.; Mahfouz, N. M.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6975–6984.
54. Innocenti, A.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3938–3941.
55. Wike-Hooley, J. L.; Haveman, J.; Reinhold, H. S. *Radio. Oncol.* **1984**, *2*, 343–366.
56. Wike-Hooley, J. L.; Van Den Berg, A. P.; Van Der Zee, J.; Reinhold, H. S. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1985**, *21*, 785–791.
57. King, R. W.; Burgen, V., A. S *Proc. R. Soc. Lond. B.* **1976**, *193*, 107–125.

58. Krishnamurthy, V. M.; Bohall, B. R.; Kim, D. T., C. Y. Moustakas; Christianson, D. W.; Whitesides, G. M. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 94–105.
59. Kernohan, J. C. *Biochem. J.* **1970**, *120*, 26P.
60. Hartman, G. D.; Haltczenko, W.; Smith, R. L.; Sugrue, M. F.; Mallorga, P. J.; Michelson, S. R.; Randall, W. C.; Schwam, H.; Sondey, J. M. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3822–3831.
61. Sippel, K. H.; Robbins, A. H.; Domsic, J.; Genis, C.; Agbandje-McKenna, M.; McKenna, R. *Acta Cryst. F* **2009**, *65*, 992–995.
62. Vullo, D.; Franchi, M.; Gallori, E.; Antel, J.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1272–1279.
63. D'Ambrosio, K.; Vitale, R. M.; Dogne, J. M.; Masereel, B.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3230–3237.
64. Temperini, C.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1214–1221.
65. Drescher, D. G. *Anal. Biochem.* **1978**, *90*, 349–358.
66. Fierke, C. A.; Thompson, R. B.; Maliwal, B. P. *Annal. Chem.* **1998**, *70*, 1749–1754.
67. Graham, S. L.; Hoffman, J. M.; Gautheron, P.; Michelson, S. R.; Scholz, T. H.; Schwam, H.; Shepard, K. L.; Smith, A. M.; Smith, R. L.; Sondey, J. M.; Sugrue, M. F. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 749–754.
68. Guzel, O.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Salman, A.; Parkkila, S.; Hivo, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9113–9120.
69. Guzel, O.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Salman, A.; Balaban, A. T.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2931–2934.
70. Graham, S. L. et al. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2548–2554.
71. Woltersdorf Jr., O. W. et al. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2486–2492.
72. De Simone, G.; Di Fiore, A.; Menchise, V.; Pedone, C.; Antel, J.; Scozzafava, A.; Wurl, M.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2315–2320.

73. Prugh, J. D.; Hartman, G. D.; Mallorga, P. J.; McKeever, B. M.; Michelson, S. R.; Murcko, M. A.; Schwam, H.; Smith, R. L.; Sondey, J. M.; Springer, J. P.; Sugrue, M. F. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1805–1818.
74. Ponticello, G. S.; Freedman, M. B.; Habecker, C. N.; Lyle, P. A.; Schwam, H.; Varga, S. L.; Christy, M. E.; Randall, W. C.; Baldwin, J. J. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 591–597.
75. Baldwin, J. J.; Ponticello, G. S.; Anderson, P. S.; Christy, M. E.; Murcko, M. A.; Randall, W. C.; Schwam, H.; Sugrue, M. F.; Springer, J. P.; Gautheron, P.; Grove, J.; Mallorga, P.; Viader, M. P.; McKeever, B. M.; Navia, M. A. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2510–2513.
76. Boriack-Sjodin, P. A.; Zeitlin, S.; Chen, H. H.; Crenshaw, L.; Gross, S.; Dantanarayana, A.; Delgado, P.; May, J. A.; Dean, T.; Christianson, D. W. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2483–2489.
77. Dudutiene, V.; Baranauskiene, L.; Matulis, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3335–3338.
78. Boyle, N. A.; Cheggwiden, W. R.; Blackburn, G. M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 222–224.
79. Cecchi, A.; Taylor, S. D.; Liu, Y.; Hill, B.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5192–5196.
80. Franz, R. G. *AAPS Pharmsci.* **2001**, *3*, article10.
81. Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11205–11209.
82. Klinger, A. L.; McComsey, D. F.; Smith-Swintosky, V.; Shank, R. P.; Maryanoff, B. E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3496–3500.
83. Hivo, M.; Innocenti, A.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Supuran, C. T.; Parkkila, S. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 672–678.
84. Brzozowski, Z.; Slawinski, J.; Saczewski, F.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2396–2404.
85. Brzozowski, Z.; Slawinski, J.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3656–3661.

86. Supuran, C. T.; Briganti, F.; Tilli, S.; Cheggwiden, W. R.; Scozzafava, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 703–714.
87. Gao, J.; Qiao, S.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2292–2301.
88. Menchise, V.; De Simone, G.; Alterio, V.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5721–5727.
89. Kim, C. Y.; Chang, J. S.; Doyon, J. B.; Baird Jr, T. T.; Fierke, C. A.; Jain, A.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12125–12134.
90. Menchise, V.; De Simone, G.; Di Fiore, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6402–6408.
91. De Simone, G.; Vitale, R. M.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5544–5551.
92. Temperini, C.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2567–2573.
93. Boriack, P. A.; Christianson, D. W.; Kingery-Wood, J.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2286–2291.
94. Kim, C. Y.; Whittington, D. A.; Chang, J. S.; Liao, J.; May, J. A.; Christianson, D. W. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 888–893.
95. Abbate, F.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2357–2361.
96. Temperini, C.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4866–4872.
97. Smith, G. M.; Alexander, R. S.; Christianson, D. W.; McKeever, B. M.; Ponticello, G. S.; Springer, J. P.; Randall, W. C.; Baldwin, J. J.; Habecker, C. N. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 118–125.
98. Mincione, F.; Starnotti, M.; Masini, E.; Bacciottini, L.; Scrivanti, C.; Casini, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3821–3827.
99. Srivastava, D. K.; Jude, K. M.; Banerjee, A. L.; Haldar, M.; Manokaran, S.; Kooren, J.; Mallik, S.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5528–5537.

100. Roy, B. C.; Banerjee, A. L.; Swanson, N.; Jia, X. G.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13206–13207.
101. Jude, K. M.; Banerjee, A. L.; Haldar, M. K.; Manokaran, S.; Roy, B.; Mallik, S.; Srivastava, D. K.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3011–3018.
102. Vomasta, D.; Innocenti, A.; Konig, B.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1283–1286.
103. Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1117–1120.
104. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Briganti, F.; Mincione, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 799–808.
105. Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Briganti, F.; Mincione, G.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2641–2650.
106. Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1466–1476.
107. Mincione, G.; Menabuoni, L.; Briganti, F.; Mincione, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, *9*, 185–199.
108. Casini, A.; Scozzafava, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4884–4892.
109. Scozzafava, A.; Briganti, F.; Mincione, G.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; T., S. C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3690–3700.
110. Andersson, T.; Lundquist, M.; Dolphin, G. T.; Enander, K.; Jonsson, B. H.; Nilsson, J. W.; Baltzer, L. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1245–1252.
111. Di Fiore, A.; Scozzafava, A.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Pedone, C.; Supuran, C. T.; De Simone, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1726–1731.
112. Winum, J. Y.; Thiry, A.; El Cheikh, K.; Dogne, J. M.; Montero, J. L.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Masereel, B.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2685–2691.

113. Smaine, F.-Z.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Regainia, Z.; Vullo, D.; Scozzafava, C. T., A. *Supuranc Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5096–5100.
114. Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1651–1657.
115. Wilkinson, B. L.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1945–1953.
116. May, J. A.; Namil, A.; Chen, H. H.; Dantanarayana, A. P.; Dupre, B.; Liao, J. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2052–2059.
117. Pastorekova, S.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 869–873.
118. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Ilies, M. A.; Iorga, B.; Cristea, T.; Briganti, F.; Chiraleu, F.; Banciu, M. D. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 577–594.
119. Casey, J. R.; Morgan, P. E.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2337–2347.
120. Scozzafava, A.; Briganti, F.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 292–300.
121. Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Briganti, F.; Mincione, G.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4542–4551.
122. De Leval, X.; Ilies, M.; Casini, A.; Dogne, J. M.; Scozzafava, A.; Masini, E.; Mincione, F.; Starnotti, M.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2796–2804.
123. Kehayova, P. D.; Bokinsky, G. E.; Huber, J. D.; Jain, A. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 187–188.
124. Steele, R. M.; Benedini, F.; Biondi, S.; Borghi, V.; Carzaniga, L.; Impagnatiello, F.; Miglietta, D.; Chong, W. K. M.; Rajapaske, R.; Cecchi, A.; Temperini, C.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6565–6570.

125. Cecchi, A.; Hulikova, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Scozzafava, A.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4834–4841.
126. Alerio, V.; Vitale, R. M.; Monte, S. M.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Cecchi, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8329–8335.
127. Simonsson, I.; Jonsson, B. I.; Lindskog, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 1406–1412.
128. Nair, S. K.; Ludwig, P. A.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3659–3660.
129. Senturk, M.; Gulcin, I.; Dastan, A.; Kufrevioglu, O. I.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3207–3211.
130. Innocenti, A.; Gulcin, I.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5050–5053.
131. Davis, R. A.; Innocenti, A.; Poulsen, S. A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 14–18.
132. Carta, F.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5511–5522.
133. Vu, H.; Pham, N. B.; Quinn, R. J. *J. Biomol. Screen.* **2008**, *13*, 265–276.
134. Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 335–344.
135. Maresca, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4511–4514.
136. Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Supuran, C. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 850–854.
137. Innocenti, A.; Durdagi, S.; Doostdar, N.; Strom, T. A.; Barron, A. R.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2822–2828.
138. Warren, G. L.; Webster Andrews, C.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. *J. Med. Chem.* **2005**, *49*, 5912–5931.

139. eHiTS 6.03. <http://simbiosys.ca/index.html>.
140. Kerwin, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8899–8900.
141. Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127–8134.
142. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209–220.
143. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; F., H. E.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902 – 3909.
144. Garaj, V.; Puccetti, L.; Fasolis, G.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; A., I.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5427–433.
145. Garaj, V.; Puccetti, L.; Fasolis, G.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; A., I.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3102–3108.
146. Thompson, A. M.; Boyd, M.; Denny, W. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1835–1837.
147. Olgen, S.; Gotz, C.; Jose, J. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 715–718.
148. Olgen, S. *Arch Pharm Res* **2006**, *29*, 1006–1017.
149. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
150. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5653.
151. Tumkevicius, S.; Dailide, M. *J. Heterocyclic Chem.* **2005**, *42*, 1305–1310.
152. Kraulis, P. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 946–950.
153. Merritt, E. A.; Bacon, D. J. *Methods Enzymol* **1997**, *277*, 505–524.
154. Esnouf, R. M. *Acta Cryst. D* **1999**, *55*, 938–840.
155. Guex, N.; Peitsch, M. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714–2723.
156. Frisch, M. J. et al. Gaussian 03, Revision C.01. 2003.
157. Ditchfield, R. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *15*, 203–206.
158. Pedras, M. S. C.; Jha, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1828–1834.
159. Santilli, A. A.; Kim, D. H.; Wanser, S. V. *J. Heterocyclic Chem.* **1971**, 445–453.
160. Boon, W. R.; Jones, G. M.; Ramage, G. R. *J. Chem. Soc.* **1951**, 96–99.

161. Caton, M. P. L.; Grant, M. S.; Pain, D. L.; Slack, R. *J. Chem. Soc.* **1965**, 5467–5473.
162. Klotzer, W.; Herberz, M. *Monatshefte fuer Chemie* **1965**, 96, 1573–1578.
163. Brukstus, A.; Melamedaitė, D.; Tumkevicius, S. *Synthetic Communications* **2000**, 30, 3719–3730.

Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas

Straipsniai ISI sąrašo žurnaluose:

1. J. Sudzius, S. Tumkevičius. Synthesis of a Novel Heterocyclic System – Pyrimido[5',4':5,6]thiopyrano[2,3-*b*]indole. *Letters in Organic Chemistry*, **2009**, 6, 526–528
2. J. Sudzius, L. Baranauskiene, D. Golovenko, J. Matuliene, V. Michailoviene, J. Torresan, J. Jachno, R. Sukackaite, E. Manakova, S. Grazulis, S. Tumkevičius, D. Matulis. 4-[N-(Substituted 4-pyrimidinyl)amino]benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase isozymes I, II, VII, and XIII. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 7413–7421.

Tarptautinių konferencijų pranešimų medžiaga:

1. Lina Baranauskienė, Jurgis Sūdžius, Vilma Michailovienė, Jurgita Matulienė, Sigitas Tumkevičius, Daumantas Matulis. Carbonic anhydrase ligand binding by thermal shift assay and isothermal titration calorimetry. *The 8th international conference on the carbonic anhydrases*. September 16-19, **2009** - "Villa La Stella", Firenze, p. 43
2. Jurgis Sudzius, Sigitas Tumkevičius. Reaction of Indoline-2-thiones with 4-Chloropyrimidine-5-carbaldehydes: Condensation versus Alkylation. *BOS 2010 International Conference on Organic Synthesis*, June 27-30, **2010**, Riga, Latvia. Program and abstracts, p. 196.

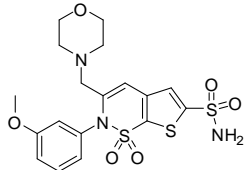
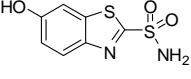
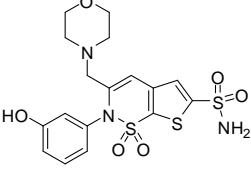
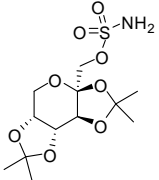
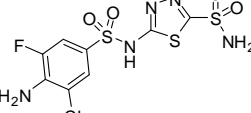
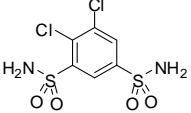
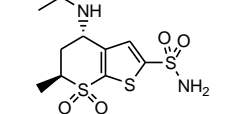
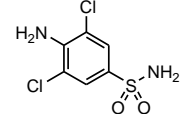
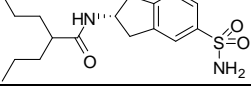
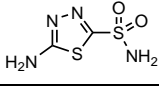
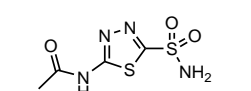
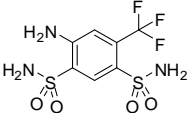
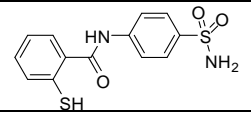
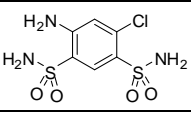
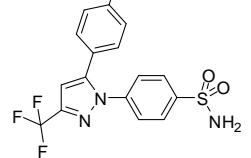
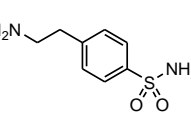
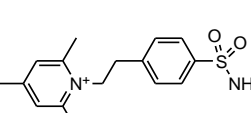
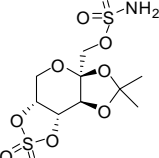
Nacionalinių konferencijų pranešimų medžiaga:

1. J. Sūdžius, S. Tumkevičius. 4-(4-pirimidinilamino)benzensulfonamidų sintezė. Moksl. konf. "Organinė chemija" pranešimų medžiaga. - Kaunas: Technologija, **2008**, p. 27-28.
2. J. Sūdžius, S. Tumkevičius. Pirimido[5',4':5,6]tiopirano[2,3-*b*]indolo darinių sintezė. Moksl. konf. "Organinė chemija" pranešimų medžiaga. - Kaunas: Technologija, **2009**, p. 57-59.
3. J. Sudzius, D. Račkauskaitė, L. Baranauskienė, D. Matulis, S. Tumkevičius. Synthesis of *N*-(4-pyrimidinyl)aminobenzenesulfonamides and their

carbonic anhydrase inhibitory activity. 9-oji Lietuvos chemikų konferencija „Chemija 2009“ konferencijos pranešimų medžiaga, Spalio 16, 2009, Vilnius, p. 111.

Priedas

Lentelė A. Junginių rinkinys 1.

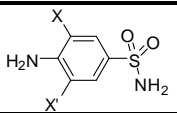
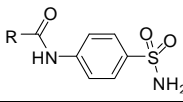







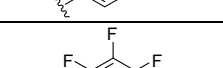

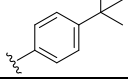
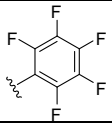
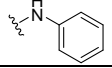
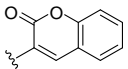
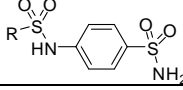
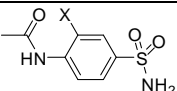

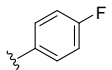
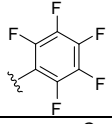
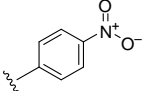
Nr.	Junginys	Nr.	Junginys
1		10	
2		11	
3		12	
4		13	
5		14	
6		15	
7		16	
8		17	
9		18	

Lentelė B. Junginių rinkinys 2.

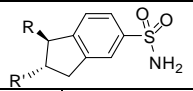
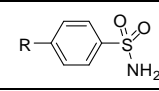
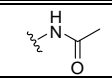
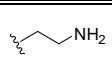
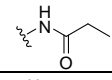

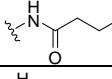
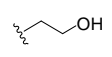
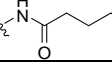

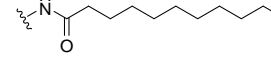
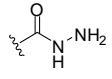
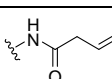
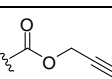
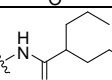
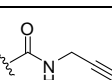
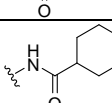
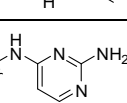
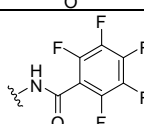
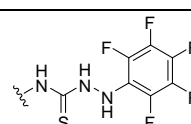
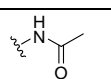
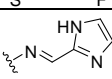
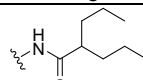

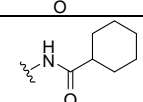
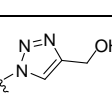
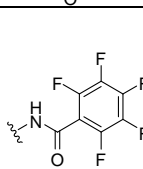
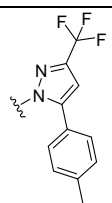
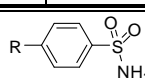
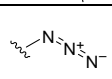


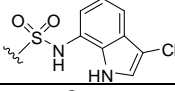

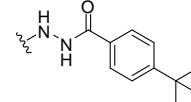
Nr	Junginys		Nr	Junginys	
	R	R'		R	R'
1			20 ^{F2}		
2			21 ^{F3}		
3			22 ^{F4}		
4			23 ^{F4}		
5			24 ^{F2}		
6			25 ^{F2}		
7			26 ^{F1}		
8			27 ^{F1}		
9			28 ^{F3}		
10			29	H	
11			30	H	
12			31	H	
13			32 ^{F1}	H	
14			33 ^{F3}	H	
15			34		
16 ^{F1,*}			35		
17 ^{F1}			36		
18 ^{F1}			37		
19 ^{F3}			38		

* F1 – junginys priklauso junginių rinkiniui 2F1, F2 – junginių rinkinams 2F1 ir 2F2, F3 – junginių rinkiniams 2F1 – 2F3, F4 – junginių rinkiniams 2F1 – 2F4, F5 – junginių rinkiniams 2F1 – 2F5

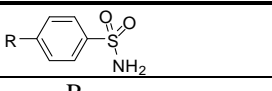
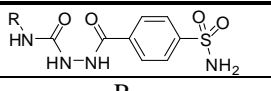
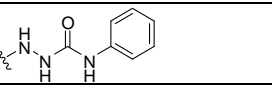
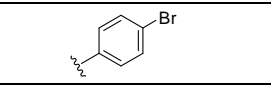
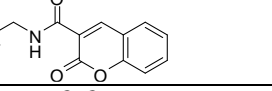
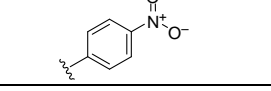
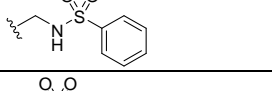
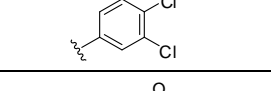
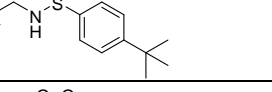
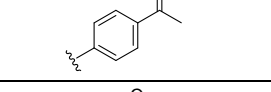
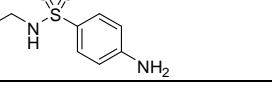
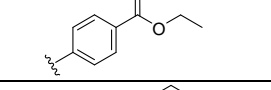
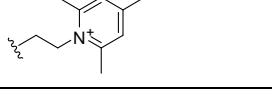
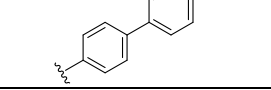
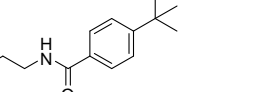
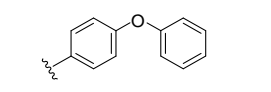
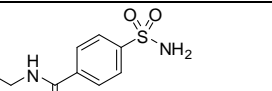
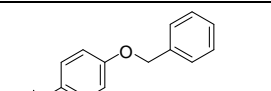
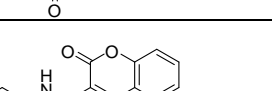
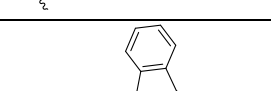
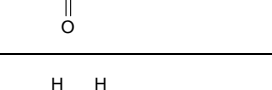
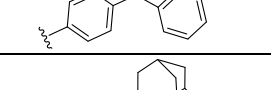
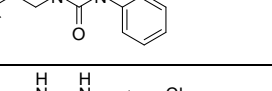
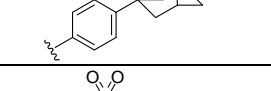
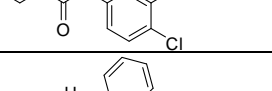
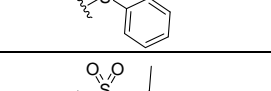
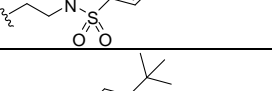
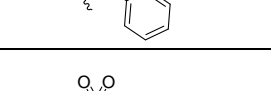
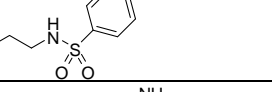
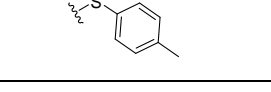
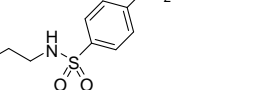
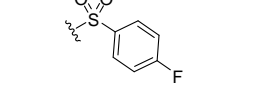
Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys		Nr	Junginys
				
	X	X'		R
39 ^{F5}	H	H	58 ^{F5}	
40 ^{F5}	H	F	59 ^{F4}	
41 ^{F5}	H	Cl	60 ^{F5}	
42 ^{F5}	H	Br	61 ^{F3}	
43 ^{F5}	H	I	62 ^{F5}	
44 ^{F5}	F	Cl	63 ^{F3}	
45 ^{F5}	F	Br	64 ^{F5}	
46 ^{F5}	F	I	65 ^{F1}	
47 ^{F5}	Cl	Cl	66 ^{F5}	
48 ^{F5}	Cl	Br	67 ^{F4}	
49 ^{F5}	Cl	I	68 ^{F5}	
50 ^{F5}	Br	Br	69 ^{F4}	
51 ^{F5}	Br	I	70 ^{F5}	
52 ^{F5}	I	I		
				R
	X		71 ^{F5}	
53 ^{F5}	H		72 ^{F5}	
54 ^{F5}	F		73 ^{F5}	
55 ^{F5}	Cl		74 ^{F4}	
56 ^{F5}	Br			
57 ^{F5}	I			

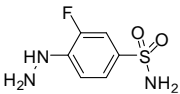
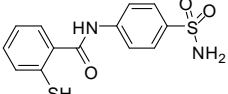
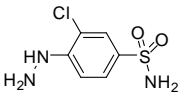
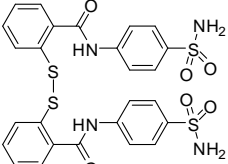
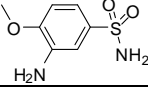
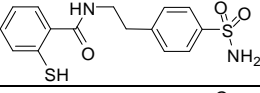
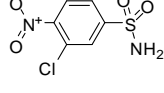
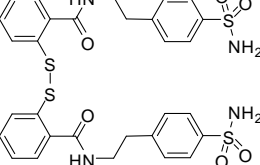
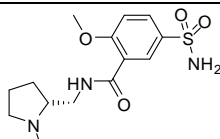
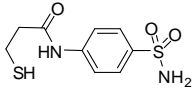
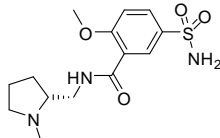
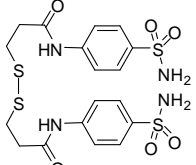
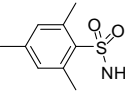
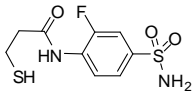
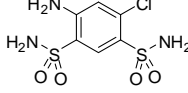
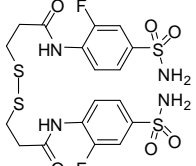
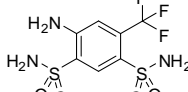
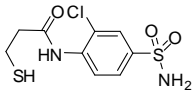
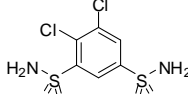
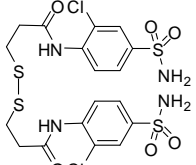
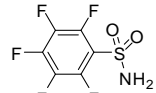
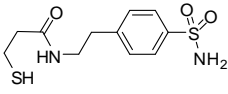
Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys		Nr	Junginys
				
	R	R'		R
75	H		90 ^{F5}	
76	H		91 ^{F5}	
77	H		92 ^{F5}	
78	H		93 ^{F5}	
79	H		94 ^{F5}	
80	H		95 ^{F5}	
81	H		96 ^{F5}	
82	H		97 ^{F5}	
83	H		98 ^{F3}	
84		H	99 ^{F5}	
85		H	100 ^{F5}	
86		H	101 ^{F5}	
87		H	102 ^{F5}	
			103 ^{F5}	
	R		104 ^{F5}	
88 ^{F5}			105 ^{F5}	
89 ^{F5}			106 ^{F3}	

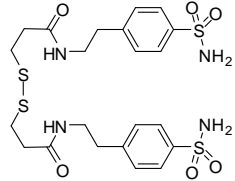
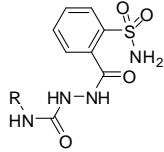
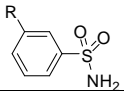

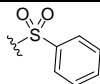
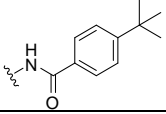
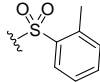
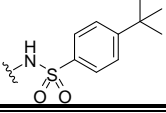
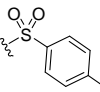
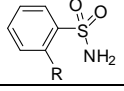
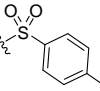

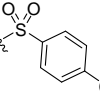

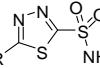

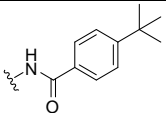

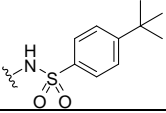






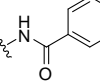
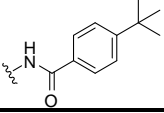
Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
			
	R		R
107 ^{F3}		122 ^{F3}	
108 ^{F4}		123 ^{F2}	
109 ^{F4}		124 ^{F3}	
110 ^{F3}		125 ^{F2}	
111 ^{F4}		126 ^{F1}	
112 ^{F5}		127 ^{F2}	
113 ^{F3}		128 ^{F2}	
114 ^{F3}		129 ^{F1}	
115 ^{F3}		130 ^{F2}	
116 ^{F3}		131 ^{F2}	
117 ^{F3}		132 ^{F2}	
118 ^{F3}		133 ^{F2}	
119 ^{F3}		134 ^{F2}	
120 ^{F3}		135 ^{F2}	
121 ^{F2}		136 ^{F2}	

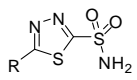
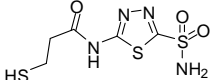
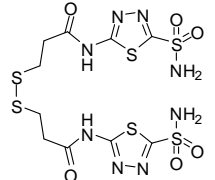
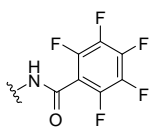
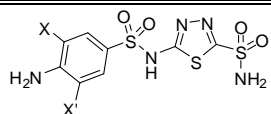
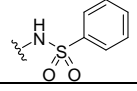
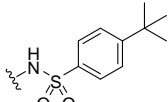
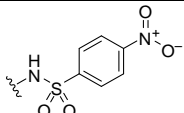
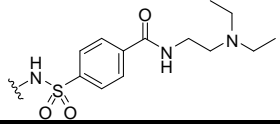
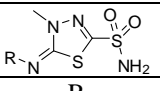

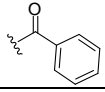
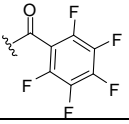
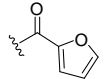
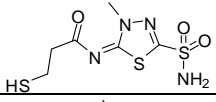
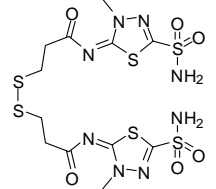
Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
137 ^{F5}		148 ^{F5}	
138 ^{F5}		149 ^{F1}	
139 ^{F5}		150 ^{F3}	
140 ^{F5}		151 ^{F1}	
141		152 ^{F4}	
142		153 ^{F1}	
143 ^{F5}		154 ^{F4}	
144 ^{F5}		155 ^{F1}	
145 ^{F5}		156 ^{F4}	
146 ^{F5}		157 ^{F1}	
147 ^{F5}		158 ^{F3}	

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
159 ^{F1}			
			R
160 ^{F5}		171 ^{F2}	
161 ^{F4}		172 ^{F2}	
162 ^{F4}		173 ^{F2}	
		174 ^{F2}	
163 ^{F5}		175 ^{F2}	
164 ^{F5}			
165 ^{F5}			R
166 ^{F4}		176 ^{F5}	
167 ^{F4}		177 ^{F5}	
168 ^{F5}		178 ^{F5}	
169 ^{F5}		179 ^{F5}	
170 ^{F5}		180 ^{F5}	
		181 ^{F4}	

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys	
	 R	194 ^{F4}		
		195 ^{F1}		
182 ^{F5}				
183 ^{F5}			X	X'
184 ^{F4}		196 ^{F5}	H	H
185 ^{F4}		197 ^{F5}	H	F
186 ^{F1}		198 ^{F5}	H	Cl
	 R	199 ^{F5}	H	Br
187 ^{F5}	H	200 ^{F5}	H	I
188 ^{F5}		201 ^{F5}	F	Cl
189 ^{F5}		202 ^{F5}	F	Br
190 ^{F5}		203 ^{F5}	F	I
191 ^{F5}		204 ^{F5}	Cl	Cl
192 ^{F5}		205 ^{F5}	Cl	Br
193 ^{F1}		206 ^{F5}	Cl	I
		207 ^{F5}	Br	Br
		208 ^{F5}	Br	I
		209 ^{F5}	I	I

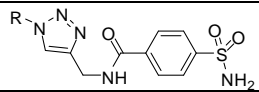
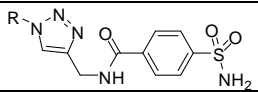
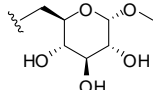
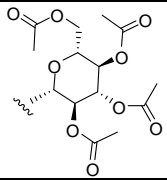
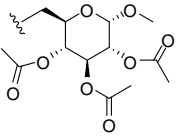
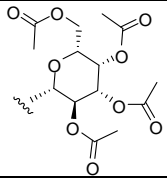
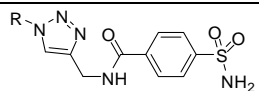
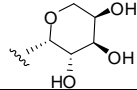
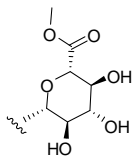
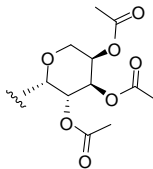
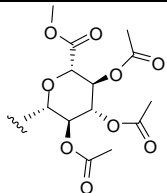
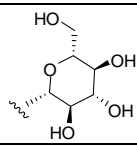
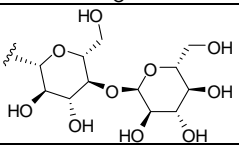
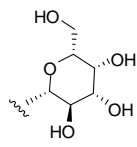
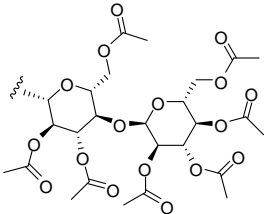
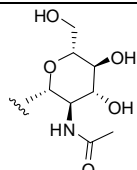
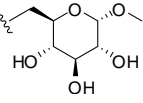
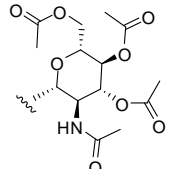
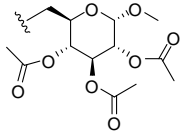
Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys				Nr	Junginys			
	X					R	R'	R''	R'''
210 ^{F3}	H				229 ^{F2}		H		
211 ^{F3}	F				230 ^{F2}		H		
212 ^{F3}	Cl				231 ^{F2}		H		
213 ^{F3}	Br				232 ^{F1}		H		
214 ^{F3}	I				234 ^{F3}		H	H	
					235 ^{F2}		H		
	R	R'	R''	R'''					
215 ^{F4}		H				R			
216 ^{F4}									
217 ^{F3}		H							
218 ^{F3}					236				
219 ^{F3}		H			237				
220 ^{F3}		H			238				
221 ^{F3}		H			239				
222 ^{F3}		H			240				
223 ^{F2}		H			241				
224 ^{F2}		H							

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
	R		R
242		250	
243		251	
244		252	
245		253	
	R	254	
246		255	
247		256	
248		257	
249			

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
	 <p style="text-align: center;">R</p>		 <p style="text-align: center;">R</p>
258		266	
259		267	
	 <p style="text-align: center;">R</p>		
260		268	
261		269	
262		270	
263		271	
264		272	
265		273	

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys	Nr	Junginys
274			
			R
275		290 ^{F5}	
276		291 ^{F5}	
277		292 ^{F5}	
278 ^{F5}		293 ^{F5}	
279 ^{F5}		294 ^{F5}	
280 ^{F5}		295 ^{F5}	
		296 ^{F3}	
	R	297 ^{F1}	
281 ^{F5}	H	298 ^{F5}	
282 ^{F5}	F		
283 ^{F5}	Cl		R
284 ^{F5}	Br		R'
285 ^{F5}	I		R''
286 ^{F5}		299 ^{F2}	
287 ^{F5}		300 ^{F2}	
288 ^{F5}		301 ^{F2}	
289 ^{F5}		302 ^{F1}	

Lentelė B (tęsinys). Junginių rinkinys 2.

Nr	Junginys			Nr	Junginys		
	R	R'	R''		R	R'	R''
303 ^{F1}			H	316 ^{F1}			
304 ^{F1}				317 ^{F2}			H
305 ^{F1}				318 ^{F4}		H	H
306 ^{F1}				319 ^{F4}		H	
307 ^{F1}			H	320 ^{F3}		H	
308 ^{F1}			H	321 ^{F3}		H	
309 ^{F3}		H	H	322 ^{F3}			H
310 ^{F3}		H		323 ^{F3}			
311 ^{F3}		H		324 ^{F2}			
312 ^{F2}		H		325 ^{F2}			
313 ^{F2}			H	326 ^{F2}			H
314 ^{F2}				327 ^{F2}			
315 ^{F2}				328 ^{F2}			H

Lentelė C. Junginių rinkinys 3.

Nr	Junginys				Nr	Junginys			
	R	R'	R''	n		R	R'	R''	n
1		Cl		0	23				1
2				0	24				1
3				0	25		Cl	H	0
4		Cl		1	26			H	0
5				1	27			H	0
6				1	28		Cl	H	1
7		Cl		0	28			H	1
8				0	30			H	1
9				0					
10		Cl		1					
11				1					
12				1	31		Cl		
13		Cl		0	32				
14				0	33				
15				0	34		Cl		
16		Cl		1	35				
17				1	36				
18				1	37		Cl		
19		Cl		0	38				
20				0	39				
21				0	40		Cl		
22		Cl		1	41				

Lentelė C (tęsinys). Junginių rinkinys 3.

Nr	Junginys			Nr	Junginys	
	R	R'	R''		R	
42				50	Cl	
43		Cl	H	51		
44			H			
45			H		X	n
				52	S	0
	R	n		53	S	1
46	Cl	0		54	SO ₂	0
47	Cl	0		55	SO ₂	1
48		1		56		
49		1				