

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MEDICINOS FAKULTETAS

Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Potencialių šaperono Hsp90 slopiklių, 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolių, sintezė
ir struktūros identifikavimas

Farmacijos studijų programa

Studentė: Urtė Milerytė

V kursas, 2 grupė

Darbo vadovas: doc. dr. Algirdas Brukštus

(parašas)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovė: doc. dr. Kristina Garuolienė

(parašas)

Biomedicinos mokslų instituto direktorius: prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas

(parašas)

Darbo įteikimo data: 2023-05-14

Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas: urte.mileryte@mf.stud.vu.lt

2023 m.

TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY.....	6
SANTRUMPOS.....	9
ĮVADAS	11
DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI	13
1 LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Šiluminio šoko baltymai ir jų funkcijos ląstelėse	14
1.1.1. Šiluminio šoko reakcija ir jos reikšmė	15
1.2. Hsp90 struktūra ir funkcijos organizmo ląstelėse	16
1.2.1. Hsp90 struktūra ir izoformos.....	16
1.2.2. Hsp90 šaperoninis ciklas	17
1.3. Hsp90 ir onkologinės ligos.....	20
1.3.1. „Priklausomybė nuo molekulinų šaperonų“	20
1.4. Hsp90 slopikliai	21
1.4.1. N galo domeno slopikliai.....	22
1.4.1.1. Pirmos kartos slopikliai: geldanamycinai ir jo analogai	23
1.4.1.2. Antros kartos slopiklių pradininkas – radisikolis ir jo dariniai.....	25
1.4.1.3. Antros kartos slopikliai – rezorcino analogai	26
1.4.1.4. Antros kartos slopikliai – purino analogai	28
1.4.1.5. Antros kartos slopikliai – benzamidai	30
1.5. Hsp90 slopiklių perspektyvos	31
2 EKSPERIMENTINĖ DALIS	32
2.1. Tyrimo objektas	32
2.2. Diarilketonų (2,4-dihidroksifenil)(fenil)metanonų sintezė	33
2.3. 4-benzilbenzen-1,3-diolių sintezė	36
2.4. 4,4'-metilenbis(benzen-1,3-diolio) sintezė	39
2.5. 1-(5-benzil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono sintezė	40
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	43
3.1. Sintezės metu naudoti tirpikliai ir reagentai.....	43
3.2. Naudoti gryninimo metodai	43
3.3. Naudota aparatūra	43
3.4. Junginių struktūrinė analizė	44
3.4.1. Branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija	44

3.4.2. Infraraudonųjų spindulių spektroskopija.....	47
3.5. Redukcijos sąlygų optimizavimas.....	48
3.6. Junginių sintezės bendrosios metodikos	51
4 IŠVADOS	57
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS	59
PRIEDAI.....	68

SANTRAUKA

Urtės Milerytės magistro baigiamasis darbas „Potencialių šaperono Hsp90 slopiklių, 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolių, sintezė ir struktūros identifikavimas”. Mokslinis vadovas – doc. dr. Algirdas Brukštus. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras. Vilnius, 2023.

Darbo tikslas: susintetinti naujus 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolius, kurie pasižymėtų šaperoną Hsp90 slopinančiu poveikiu.

Darbo uždaviniai: 1) Surinkti ir išanalizuoti susijusią su darbo tikslu literatūrą; 2) Susintetinti naujus 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolius; 3) Spektroskopiniais analizės metodais identifikuoti susintetintų junginių struktūras ir nustatyti jų fizikochemines savybes; 4) Optimizuoti reakcijų sąlygas; 5) Nustatyti susintetintų 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolių šaperoną Hsp90 slopinantį aktyvumą ir gautus rezultatus palyginti su literatūroje pateiktais duomenimis.

Tyrimo objektas ir metodai. Magistrinio darbo objektas – naujų 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolių, kurie pasižymėtų šiluminio šoko baltymą 90 slopinančiu aktyvumu, sintezė. Cheminių reakcijų eiga stebėta taikant plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodą. Naujų junginių struktūros įrodytos branduolių magnetinio rezonanso (BMR), infraraudonųjų spindulių (IR) ir didelės skyros masių spektrometrijos (HRMS) metodais. Taip pat buvo nustatytos susintetintų junginių lydymosi temperatūros.

Rezultatai ir išvados. Magistrinio darbo metu buvo atlikta prieinamų literatūros šaltinių analizė apie susintetintus N domeno Hsp90 slopiklius ir jų chemines ypatybes. Literatūros apžvalgoje jie suskirstyti pagal tai, koks fragmentas sudaro jų struktūros pagrindą: ansamicinas, rezorcinolis, purinas ar benzamidas.

Tyrimo metu, siekiant gauti tikslius 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolius, buvo susintetinti septyni tarpiniai junginiai. Pastebėta, kad kiekvienam junginiui reakcijos sąlygos turi būti optimizuojamos individualiai dėl skirtingų pakaitų ir jų įtakos aromatinei sistemai. Taip pat išsiaiškinta, kad diarilketonų struktūroje esančią karbonilo grupę dėl apsunkintos nukleofilinės atakos sunku suredukuoti taikant standartinę redukciją su natrio cianoborohidridu. Toliau vykdant pakopinę sintezę nustatyta, kad atliekant *para*-selektyvią fenolių acilinimo reakciją, įvyksta 4-benzilbenzen-1,3-diolių *C*-debenzilinimas. Vietoje *C*-acilintų produktų, susidaro benzilo fragmento netekęs

analogas 1-(2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanonas. Dėl stebimo 4-benzilbenzen-1,3-diolių debenzilinimo, tolimesnė tikslių junginių sintezė dėl laiko stokos negalėjo būti vykdoma.

Praktinės rekomendacijos. Benzilo pakaitą į junginių struktūrą siūloma bandyti įvesti sintezės pabaigoje. Numatomas sintezės kelias – 1) rezorcinolio acilinimas 4-metoksifenilacto rūgštimi, naudojant BF_3OEt_2 ; 2) karboksilato sintezė iš *C*-acilinto produkto 1-(2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono ir etilkarbazato; 3) karboksilato ciklizacija taikant Hurd-Mori reakciją; 4) 4-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolio jodinimas ir 5) 4-jod-6-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolio paveikiamas benzilboronio rūgšties analogais.

SUMMARY

The topic of the Master thesis by Urtė Milerytė is “Synthesis and structure elucidation of 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols as potential Hsp90 chaperone inhibitors”. The supervisor of MSc thesis – Doc. Dr. Algirdas Brukštus. Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Pharmacy and Pharmacology Center. Vilnius, 2023.

Aim of the research. Synthesis of novel 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols as potential Hsp90 chaperone inhibitors.

Objectives of the research. 1) Gather and analyze literature relevant to the work's aim; 2) Synthesize novel 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols; 3) Use spectroscopic analysis methods to elucidate the structures of the synthesized compounds and determine their physicochemical properties; 4) Optimize reaction conditions; 5) Assess the inhibitory activity of the synthesized 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols on the Hsp90 chaperone and compare the acquired results with the data published in the literature.

Object and methodology of the research. The object of this master's thesis is to synthesize novel 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols with heat shock protein 90 inhibitory action. The thin-layer chromatography (TLC) method was used to evaluate the progress of chemical reactions. Nuclear magnetic resonance (NMR), infrared (IR), and high-resolution mass spectrometry (HRMS) methods were used to elucidate the structures of the novel compounds. The melting points of the synthesized compounds were also determined.

Results and conclusions. During the research process of the master's thesis, an analysis of accessible literature sources on the synthesized N-domain Hsp90 inhibitors and their chemical properties was conducted. The literature review categorizes them based on which segment serves as the foundation of their structure: ansamycin, resorcinol, purine, or benzamide.

During the experiment, seven intermediates were synthesized in order to obtain the desired 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols. It was discovered that reaction conditions must be optimized individually for each compound due to different substituents and their effects on the aromatic system. Due to the hindered nucleophilic attack, the carbonyl group in the structure of diaryl ketones was shown to be difficult to reduce by conventional reduction using sodium cyanoborohydride. Further stepwise synthesis revealed that the *C*-debenzylation of 4-benzylbenzene-1,3-diols happens during the *para*-selective acylation reaction of phenols. Instead of *C*-acylated

products, the debenzylated analog 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethanone is produced. The observed debenylation of 4-benzylbenzene-1,3-diols precluded further synthesis of the target compounds due to time constraints.

Practical recommendations. It is suggested to introduce the benzyl substituent into the structure of the compounds at the end of the synthesis. Anticipated synthesis pathway: 1) acylation of resorcinol with 4-methoxyphenylacetic acid using BF_3OEt_2 ; 2) carboxylate synthesis from the C-acylated product 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethanone and ethyl carbazate; 3) cyclization of the carboxylate using the Hurd-Mori reaction; 4) Iodination of 4-(5-(4-methoxyphenyl)-1,2,3-thiadiazol-4-yl)benzene-1,3-diol and 5) 4-iodo-6-(5-(4-methoxyphenyl)-1,2,3-thiadiazol-4-yl)benzene-1,3-diol exposure to benzylboronic acid analogs.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovui doc. dr. Algirdui Brukštui už suteiktą galimybę dirbti ir rašyti magistro baigiamąjį darbą Organinės chemijos katedros 113 laboratorijoje, už suteiktą pagalbą atliekant eksperimentus ir palaikymą. Taip pat noriu nuoširdžiai padėkoti visam laboratorijos kolektyvui už jaukios aplinkos kūrimą, kasdieninius patarimus ir pagalbą viso darbo metu.

SANTRUMPOS

17-AAG – 17-alilamino-17-demetoksi geldanamicinas

17-DMAG – 17-dimetilamino-etilamino-17-demetoksi geldanamicinas

ADP – adenoizino difosfatas

Aha1 – 90 kDa šiluminio šoko baltymo ATPazės homologo 1 aktyvatorius

ATP – adenoizino trifosfatas

BF₃OEt₂ – boro trifluorido eteratas

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

CD – C galo domenai

c-MET – tirozino-baltymų kinazė Met

c-Src – proto-onkogeninė tirozino-baltymų kinazė

DCM – dichlormetanas

DMSO-*d6* – deuteruotas dimetilsulfoksidas

EA – etilacetatas

EtOH – etanolis

GA – geldanamicinas

HCl – druskos rūgštis

HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriai

HF – vandenilio fluorida rūgštis

HOP – Hsp70 – Hsp90 organizacinis baltymas

HRMS – didelės skyros masių spektrometrija

HSE – šiluminio šoko elementas (angl. *Heat shock sequence Element*)

HSF – šiluminio šoko faktorius (angl. *Heat shock factor*)

Hsps – šiluminio šoko baltymai

Hsp90 – šiluminio šoko baltymas, kurio molekulinė masė 90 kDa (angl. *Heat shock protein 90*)

HSR – šiluminio šoko reakcija (angl. *Heat shock response*)

HUGO – Žmogaus genomo organizacija (angl. *Human Genome Organisation*)

IC₅₀ – slopiklio koncentracija, kuriai esant taikinio aktyvumas yra užslopinamas 50 proc.

IR – infraraudonieji spinduliai

K_D – disociacijos konstanta

MD – vidurio domenas

MeOH – metanolis

NaBH₃CN – natrio cianoborohidridas

ND – N galo domenas

NK – natūralioji žudikė

NaOAc – natrio acetatas

Pd/C – paladis ant aktyvintos anglies

PP5 – baltymų fosfatazė 5

p53 – navikų supresijos baltymas

RD – radisikolis

SOCl₂ – tionilo chloridas

TFA – trifluoroacto rūgštis

TLC – plonasluoksnė chromatografija (angl. *Thin Layer Chromatography*)

Tol – toluenas

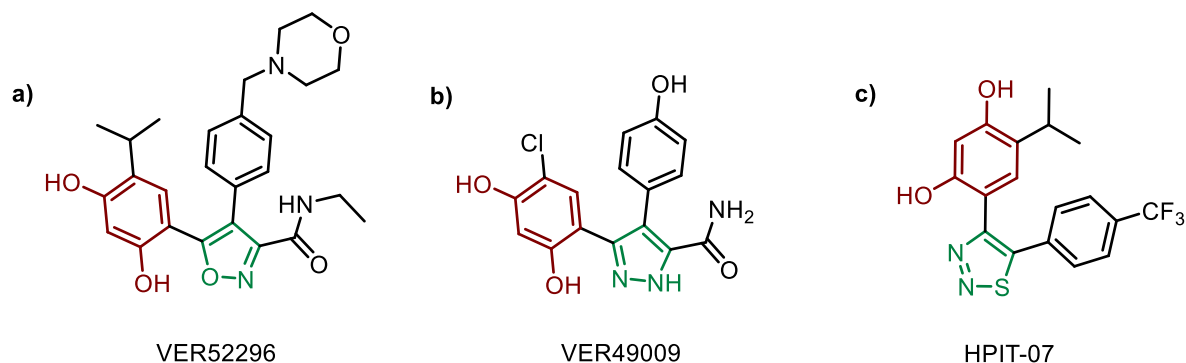
ĮVADAS

Hsp90 – tai šiluminio šoko baltymas, kurio masė yra 90 kDa. Jis priklauso šaperoninių baltymų klasei ir yra svarbus ląstelės homeostazės palaikymui. Pagrindinė funkcija – stabilizuoti klientinių baltymų struktūras ir apsaugoti jas nuo proteosomų inicijuojamo suskaidymo, kai ląstelė patiria stresą [1, 2].

Fiziologinėmis sąlygomis Hsp90 yra ekspresuojamas konstitutyviai, tačiau jo raišką, iki dešimties kartų [1], padidina įvairūs patologiniai procesai – virusinės ir pirmuonių infekcijos, neurodegeneracinės ligos. Ypač ryškus šio baltymo koncentracijos padidėjimas yra stebimas onkologiniuose susirgimuose, tokiuose kaip plaučių, krūties, skrandžio ir žarnyno karcinomos dėl organizme susidarančių nestabilių onkogeninių baltymų, reikalaujančių padidintos stabilizacijos iš šio šaperono [3, 4]. Dėl minėtų priežasčių, Hsp90 tapo patraukliu molekulinio taikiniu vaistų kūrime. Šiuo metu su trimis Hsp90 slopikliais, XL888, AT13387 ir PU-H71, yra vykdomi 4 aktyvūs klinikiniai tyrimai onkologinėms indikacijoms [5].

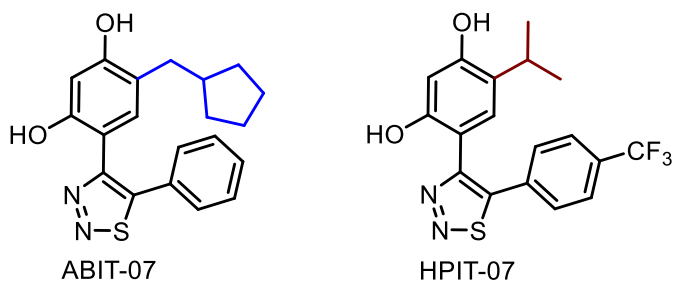
Hsp90 struktūrą sudaro trys konservatyvūs domenai: ATP surišantis N galo domenai, vidurio domenai ir C galo dimerizacijos domenai [6]. N domenai yra vienas iš svarbiausių taikinių kuriant Hsp90 slopiklius dėl jo kritinio vaidmens šaperono veikimui – jame aptinkama nukleotidus surišanti kišenė, reikalinga ATP hidrolizei. Užblokovus ATP surišimą, tuo pačiu ir jo katalizinį skilimą, yra apribojamas nestabilių klientinių baltymų, pvz., onkobaltymų, struktūros palaikymas.

Hsp90 N domeno slopiklius galima suskirstyti pagal tai, koks fragmentas sudaro jų struktūros pagrindą: 1) ansamicinas, 2) rezorcinolis, 3) purinas ar 4) benzamidai. Rezorcinolio fragmentą turintys junginiai (1 pav.) sudaro didžiausią Hsp90 slopiklių klasę.



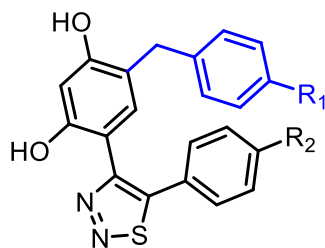
1 pav. Rezorcinolio analogai. Raudona spalva pažymėtas rezorcinolio fragmentas, žalia spalva pažymėti heterocikliniai žiedai: izoksazolas (a), pirazolas (b) ir tiadiazolas (c)

Vilniaus Universiteto Chemijos ir geomokslų fakulteto Organinės chemijos katedros 113 laboratorijoje yra susintetinta eilė rezorcinolio analogų su imidazolo ir tiadiazolo žiedais, kuriuos ištyrus buvo nustatyta, jog jie pasižymi šaperoną Hsp90 destabilizuojančiu aktyvumu. Tyrimų metu pastebėta, kad geriausiu Hsp90 slopinančiu poveikiu pasižymėjo junginiai, rezorcinolio fragmento 4 padėtyje turintys izopropilo ar ciklopentano grupes (2 pav.) [7].



2 pav. Hsp90 slopikliai ABIT-07 ir HPIT-07. Ciklopentano grupė pažymėta mėlyna spalva, izopropilo – raudona

Literatūroje rezorcinolio fragmentą ir tiadiazolo žiedą turinčių junginių, kurie savo struktūroje prie farmakoforo taip pat turėtų ir benzilo pakaitą, šiuo metu aprašyta nėra. Dėl šios priežasties, magistrinio darbo tikslas yra susintetinti naujus 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolius (3 pav.) bei patikrinti, kokią įtaką turi benzilo pakaitas slopiklių sąveikai su Hsp90.



3 pav. Bendrinė 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolių struktūra

DARBO TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: susintetinti naujus 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolius, kurie pasižymėtų šaperoną Hsp90 slopinančiu poveikiu.

Darbo uždaviniai:

1. Surinkti ir išanalizuoti susijusią su darbo tikslu literatūrą;
2. Susintetinti naujus 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolius;
3. Spektroskopiniais analizės metodais identifikuoti susintetintų junginių struktūras ir nustatyti jų fizikochemines savybes;
4. Optimizuoti reakcijų sąlygas;
5. Nustatyti susintetintų 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-diolių šaperoną Hsp90 slopinantį aktyvumą ir gautus rezultatus palyginti su literatūroje pateiktais duomenimis.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje bus apžvelgiama moksliniuose šaltiniuose bei duomenų bazėse pateikiama informacija apie šiluminio šoko baltymus ir jų reikšmę ląstelėse. Didelis dėmesys skiriamas šaperonui Hsp90, jo vaidmeniui onkogenozės procese bei įtakai klientinių baltymų stabilumui. Aptariami Hsp90 slopikliai, kurie skirstomi pagal tai, kurią baltymo molekulinę struktūrą – N, vidurio ar C domeną – jie slopina. Tačiau, plačiau bus analizuojami tik N domeno slopikliai.

Literatūros šaltinių paieškai naudotasi PubMed, Elsevier, Google Scholar paieškų sistemomis. Informacija apie atliktus ir vykdomus šaperono Hsp90 slopiklių klinikinius tyrimus gauta iš internetinio puslapio ClinicalTrials.gov.

1.1. Šiluminio šoko baltymai ir jų funkcijos ląstelėse

Šiluminio šoko baltymai – tai gausiai ląstelėse paplitusių konservatyvių baltymų klasė, kurių dydžiai svyruoja nuo 10 iki 150 kDa. Dauguma šiluminio šoko baltymų žinomi kaip molekuliniai šaperonai dėl jų apsauginio ir fiziologinio vaidmens ląstelėse. Jų funkcija – reguliuoti polipeptidinių grandinių susilankstymą ir konformacinius pokyčius klientais vadinamų baltymų molekulėse, slopinti jų denatūraciją ir išsivyniojimą, kai ląstelė patiria stresą – sutrikdoma jos homeostazė. Homeostazę gali trikdyti deguonies koncentracijos ir pH pokyčiai, ekstremalūs terminiai svyravimai, į organizmą patekusios vaistinės ir cheminės medžiagos, įvairūs toksinai [8, 9, 10, 11, 12].

Šie baltymai yra klasifikuojami pagal jų molekulinę masę – dauguma jų priklauso šešioms baltymų grupėms: mažiesiems šiluminio šoko baltymams, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ir didiesiems šiluminio šoko baltymams [8, 13]. Visi šaperonai, išskyrus mažuosius šiluminio šoko baltymus, yra nuo adenozin 5' trifosfato (ATP) priklausomi baltymai, pasižymintys ATPaziniu – ATP skaidančiu – aktyvumu. Svarbu paminėti, jog skirtingai nei nuo ATP priklausomų šaperonų, mažieji šiluminio šoko baltymai neturi perlankstymo savybių ir atlieka nesulankstytų baltymų saugyklos vaidmenį [14].

Didėjantis atrastų šaperoninių baltymų skaičius ir jų nomenklatūros nepastovumas lėmė gairių sukūrimą, davusią pradžią naujai jų klasifikacijai. Naujosios gairės yra paremtos HUGO (angl. *Human Genome Organisation*, Žmogaus genomo organizacijos) genų nomenklatūros komiteto siūlymu baltymus klasifikuoti pagal juos koduojančius genus. Pagal HUGO pasiūlytą nomenklatūrą, žmogaus šiluminio šoko baltymai skirstomi į penkis pagrindinius pogrupius: 1) HSPB (mažieji Hsp), 2) DNAJ

(Hsp40), 3) HSPA (Hsp70), 4) Hsp90 ir 5) žmogaus šaperoninai – HspD/E (Hsp60/Hsp10) ir CCT (TRiC) [15, 16].

1.1.1. Šiluminio šoko reakcija ir jos reikšmė

Normaliomis ląstelės augimo sąlygomis, šiluminio šoko baltymai yra ekspresuojami pastoviai (sudaro 5 – 10 proc. visų organizmo baltymų) ir yra aptinkami visuose organizmuose – nuo prokariotų iki eukariotų. Tačiau padidintą jų raišką (iki 15 proc.) indukuoja įvairūs aplinkos, patologiniai ar fiziologiniai dirgikliai [17, 18].

Padidėjusi Hsps ekspresija, sukelta reaguojant į stresinius veiksnius, vadinama šiluminio šoko reakcija (HSR). Pasikeitus ląstelės redokso būsenai, HSR veikia kaip konservatyvus ląstelės apsauginis mechanizmas, stabilizuojantis baltymų struktūras ir inicijuojantis pažeistų ląstelių apoptotinius procesus [19]. Šį atsaką pagrinde reguliuoja šiluminio šoko faktoriai (HSF), iš kurių svarbiausias yra HSF1. Egzogeninių ir endogeninių stimulų poveikyje, aktyvuotas HSF1 patenka į ląstelės branduolį ir jungiasi prie šiluminio šoko sekos elementų (HSE), tokiu būdu išprovokuodamas staigią ir perdėtą šaperoninių baltymų raišką. Galutinis rezultatas – slopinamas polipeptidinių grandinių išsivyniojimas arba indukuojamas trapios struktūros baltymų skaidymas (4 pav.) [20, 21, 22].



4 pav. Šiluminio šoko baltymų funkcija

Be šaperoninių funkcijų stresinėmis sąlygomis, šiluminio šoko baltymai taip pat dalyvauja imuninės sistemos atsako moduliavime – priklausomai nuo aplinkybių, jie slopina arba stimuliuoja humoralinį bei ląstelinį imunitetą. Pavyzdžiui, į organizmą patekus išoriniam patogenui, šiluminio šoko baltymai suaktyvina pirmąją gynybos liniją – įgimtą imunitetą – sąveikaudami su dendritinių ir NK ląstelių paviršiniaisiais receptoriais CD40, TLR2 ir TLR4. Dėl tokio tarpininkavimo imuniniame atsake, šaperonai Hsp60, Hsp70 ir Hsp90 tapo vieni iš pagrindinių terapinių taikinių infekciniuose, autoimuniniuose, neurodegeneraciniuose ir vėžiniuose susirgimuose. Ypač didelis dėmesys yra skiriamas Hsp90, kaip molekuliniam taikiniui, dėl jo vaidmens onkologinėse ligose [23].

1.2. Hsp90 struktūra ir funkcijos organizmo ląstelėse

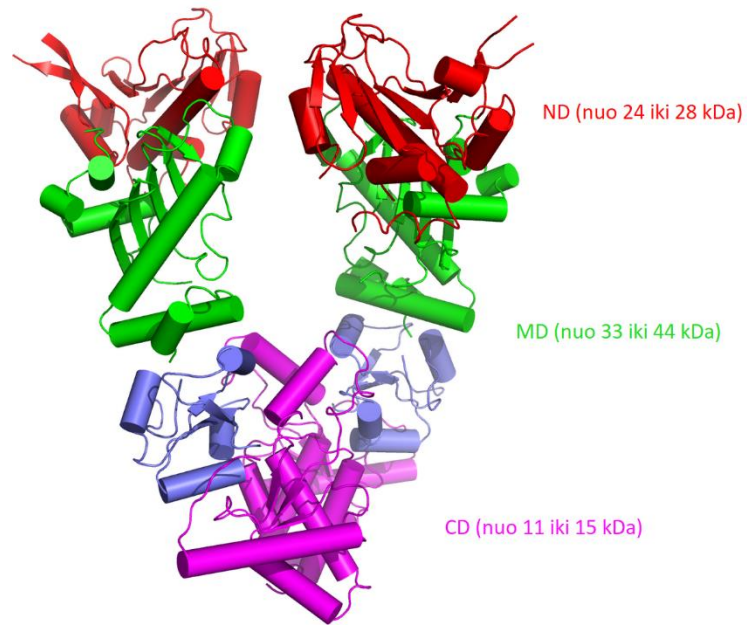
1.2.1. Hsp90 struktūra ir izoformos

Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90) – tai hidrofobinis, molekulių šaperonų klasei priklausantis baltymas, kurio masė yra 90 kDa. Jis pasižymi aukštu struktūriniu konservatyvumu ir yra aptinkamas visuose organizmuose, nuo bakterijų iki žinduolių, išskyrus archėjas dėl jų koduojančių genų stokos. Normaliomis sąlygomis, Hsp90 sudaro 1 – 2 proc. visų organizmo baltymų, tačiau jo koncentracija išauga 2 – 10 proc. išorinių dirgiklių poveikyje [1, 2, 6, 24, 25].

Šis baltymas turi penkias izoformas: Hsp90 α (indukuojama forma) ir Hsp90 β (konstitucinė forma) aptinkamos citoplazmoje, TRAP1 lokalizuojasi mitochondrijų matrikse, GRP94 randamas endoplazminiame tinkle ir Hsp90-N egzistuoja ląstelės membranoje [26, 27]. Pagrindinės citoplazmos formos, Hsp90 α ir Hsp90 β , yra struktūriškai labai panašios – sekos tapatumas siekia 85 proc., tačiau nedidelės variacijos baltymų sekos regionuose lemia nevienodas jų funkcijas. Esminiai šių izoformų skirtumai – dimerizacija ir ekspresija stresinėmis sąlygomis. Hsp90 α dalyvauja ląstelių apsauginiuose procesuose, todėl jis yra linkęs dimerizuotis greičiau ir dažniau, lyginant su Hsp90 β , taip pat Hsp90 α formos koncentracija padidėja tik sutrikus fiziologinėms organizmo sąlygoms. Tuo tarpu, Hsp90 β ekspresuojamas pastoviai, todėl į stresorius reaguoja lėčiau ir atlieka pagrindinį vaidmenį ląstelių prisitaikymo procesuose [28].

Hsp90 homologai ląstelėse egzistuoja homodimero pavidalu. Kiekvienas monomeras susideda iš trijų konservatyvių domenų (5 pav.): N galo ATP surišančio domeno (ND), vidurio domeno (MD) ir C galo dimerizacijos domeno (CD) [6]. Kai kurie šaltiniai išskiria dar ir ketvirtą domeną – neigiamai

įkrautą jungtuko regioną, sudarytą iš krūvį turinčių aminorūgščių, kuris jungia ND su MD. Manoma, kad šis regionas prisideda prie šaperono dinamiškumo bei lankstumo [6, 26].



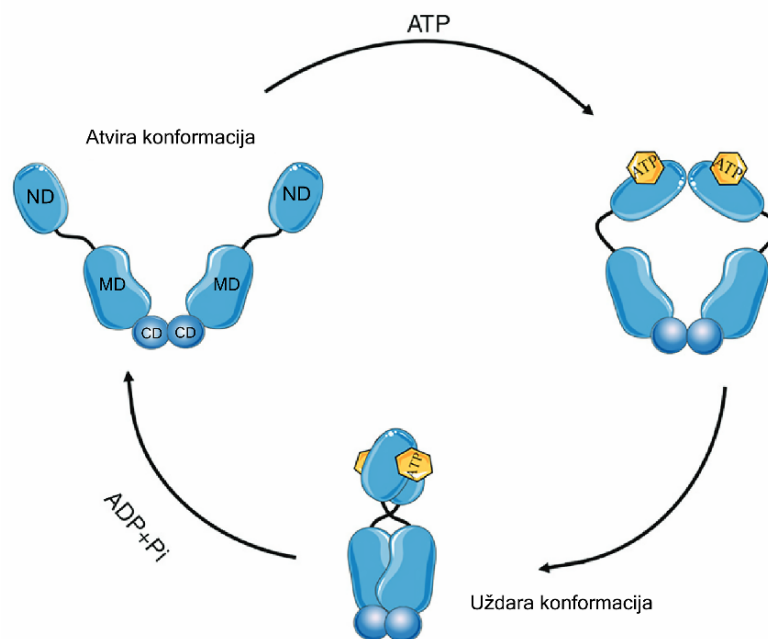
5 pav. Hsp90 struktūra: N domenas (ND), vidurio domenas (MD) ir C domenas (CD) [29]

ND turi charakteristinę Bergerato raukšlę, kuri yra GHKL ATPazių superšeimios bruožas. Šioje raukšlėje yra unikalus struktūrinis adenino nukleotidus surišantis domenas, prie kurio jungiasi ATP/ADP, reikalingi šio baltymo aktyvacijai. Dėl ATP surišimo ir skaidymo galimybės, ND veikia kaip baltymų klientų modifikacijos variklis [26, 30]. Vidurio domenas yra svarbus tuo, kad jis užtikrina Hsp90 sąveiką su klientiniais baltymais ir tam tikrais košaperonais, taip pat jame yra aptinkamos katalizinės liekanos, reguliuojančios šaperono ATPazinį aktyvumą [30]. Paskutinis struktūrinis elementas, C domenas, yra atsakingas už dimerizaciją, kuri yra Hsp90 veikimo pagrindas. Jame taip pat yra antra ATP surišimo kišenė, kuri aktyvinama tik tada, kai nukleotidas yra užėmęs N domeną. Čia dar galima rasti kalmodulino jungimosi vietą bei MEEVD motyvą, per kurį baltymas sąveikauja su TPR domenus turinčiais košaperonais Hsp90 šaperoninio ciklo metu [26, 31, 32].

1.2.2. Hsp90 šaperoninis ciklas

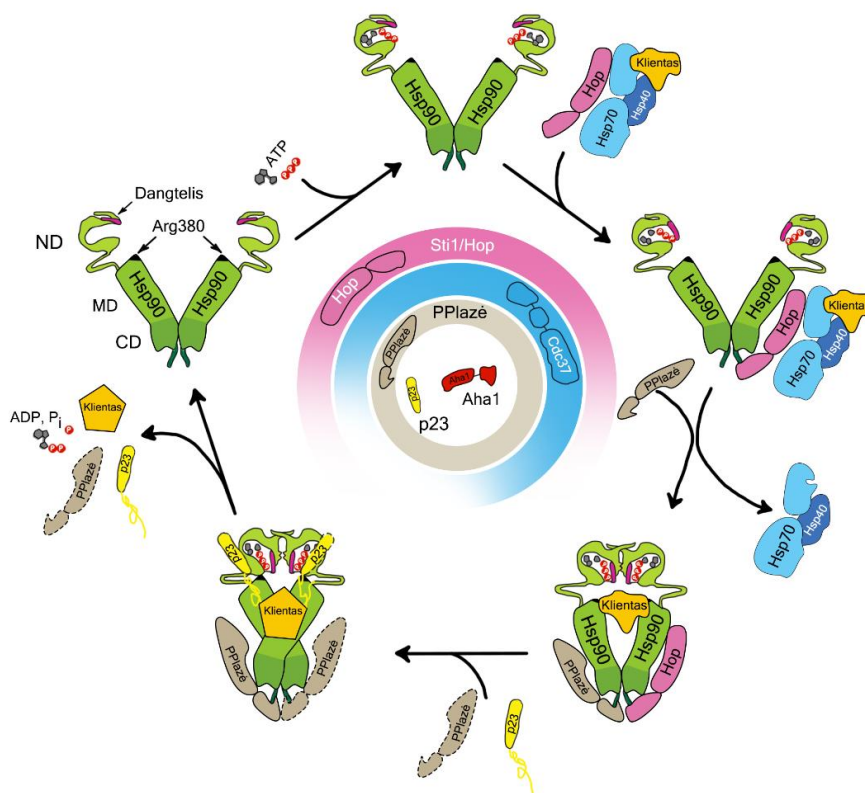
Hsp90 konformacinis mechanizmas yra cikliškas ir jis yra pagrįstas ATP skaidymu (6 pav.). Hsp90 savo ciklą pradeda nuo aktyvios, V formos konformacijos. Prisijungus ATP, įvyksta N galo

dimerizacija, kurios metu pasikeičia M domeno padėtis – jis pradeda sąveikauti su N galo dimeru ir yra suformuojama kataliziškai aktyvi uždara konformacija. Esant šiai baltymo konformacijai, prasideda ATP hidrolizė – nuskeliama γ -fosfatinė grupė nuo nukleotido molekulės ir yra išprovokuojama N domeno disociacija. ADP ir neorganiniam fosfatui (Pi) atsipalaidavus iš N galo, Hsp90 grįžta į pradinę, V formos konformaciją ir ciklas kartojasi iš naujo [30].



6 pav. Hsp90 konformacinis ciklas [33]

Svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog baltymo konformaciniam kintamumui įtakos turi ne tik nukleotidai, bet ir įvairūs pagalbiniai baltymai košaperonai (1 lentelė). Jie atlieka reguliacinį Hsp90 vaidmenį bei suteikia papildomą katalizinį aktyvumą. Kartu su jais, Hsp90 suformuoja makromolekulinį kompleksą (7 pav.), kuris veikia kaip peptidinių grandinių lankstymo aparatas [30, 31, 32, 34]. Šaperoninio ciklo metu, košaperonas Hsp70 yra atsakingas už dalinai sulankstytų substratų identifikavimą, kurie per HOP prijungiami prie M domeno. Substratui užėmus vidurio domeną, Aha1 suaktyvina nukleotidų surišimo kišenę bei HOP/Hsp70 atpalaidavimą, tokiu būdu uždarydamas N galą. Šią uždarą konformaciją stabilizuoja mažos molekulinės masės baltymas p23, kuris nukleotidų skilimo metu yra atskiriamas nuo Hsp90. Paskutinis šio ciklo etapas yra ATP defosforilinimas, kurį katalizuoja N domene esantis fermentas PP5. Šiame etape, įvyksta substrato sulankstymas, t.y. klientas subręsta, bei šaperono paruošimas kitam ciklui – atkuriamą pradinę V formos konformaciją ir atpalaiduojamas subrendęs baltymas [30, 31, 34].



7 pav. Hsp90 šaperoninis ciklas ir jame dalyvaujantys košaperonai [2]

1 lentelė. Košaperonai ir jų funkcijos.

Košaperonas	Prisijungimo prie Hsp90 vieta	Funkcijos
p23	ND ir MD	Stabilizuoja uždarą N domeno konformaciją; slopina ATPazinį aktyvumą
PP5	CD MEEVD motyvas	Kinazių brendimas; Hsp90 defosforilinimas (t.y. ATP hidrolizė)
Aha1	ND ir MD	ATPazinio aktyvumo indukcija
HOP	MD ir CD; pagrinde sąveikauja su CD motyvu MEEVD	Kliento pernaša nuo Hsp70 ant Hsp90; atviros konformacijos stabilizacija

1 lentelė. Duomenys paremti [31] šaltiniu.

Šis šaperonas yra atsakingas už klientinių baltymų, kurių yra virš 300, sulankstymą, aktyvaciją bei stabilizaciją. Jis taip pat dalyvauja tarpląsteliniame transporte, genomo stabilumo palaikyme bei padeda ląstelėms apsisaugoti nuo įvairių egzogeninių stresorių [6]. Pavyzdžiui, kinetoplastidų ir apikompleksanų karalystėms priklausantiems obligatiniams pirmuonims, tokiems kaip *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, Hsp90 (žinomas kaip Hsp83) yra reikalingas adaptacijai skirtingose jų gyvenimo ciklo fazėse ir apsisaugojant nuo aplinkos temperatūros svyravimų šeimininko – nešiotjo keitimo metu [27, 35]. Tačiau, reikšmingiausias šio baltymo vaidmuo adaptaciniuose procesuose yra stebimas piktybinėse ląstelėse, kuriose Hsp90 ekspresija yra 2 – 10 kartų didesnė nei normaliose. Toks neįprastas šio baltymo koncentracijos padidėjimas yra per pastaruosius du dešimtmečius išpopuliarėjusios „priklausomybė nuo šaperonų“ teorijos priežastis, kurios pagalba aiškinamas ryšys tarp Hsp90 padidėjimo ir onkologinių ligų [36, 37].

1.3. Hsp90 ir onkologinės ligos

1.3.1. „Priklausomybė nuo molekulinį šaperonų“

Onkogenezėje ir piktybiniame progresavime, vėžinės ląstelės yra neatsiejamos nuo šaperonų, ypač Hsp90, dėl jų buferinio poveikio navikinių ląstelių išgyvenamumui ir dauginimuisi. Be to, jie moduliuoja vėžinių ląstelių molekulinis bei metabolinius mechanizmus – proliferacinio signalizavimo palaikymą, neoangiogenezės sukėlimą, invazijos ir metastazinių procesų aktyvinimą per matriksio metaloproteinazes bei imuninės tolerancijos indukciją.

Dar vienas elementas, turintis įtakos navikinių ląstelių priklausomybei nuo šiluminio šoko baltymų, yra onkogeniniai baltymai. Supiktybėjusios ląstelės vystosi genetiškai nestabilioje rūgštinėje ir hipoksiniėje aplinkoje, kas lemia įvairias baltymų mutacijas bei pažaidas. Dėl patirtų mutacijų, dauguma kancerogeninių baltymų turi lanksčias bei trapias struktūras. Kadangi šaperoniniai baltymai veikia stochiometrinio pagrindu, dažnai sudarant ilgalaikius baltyminius kompleksus su nestabiliais klientais, efektyvus trapios onkobaltymų struktūros palaikymas ir apsisaugojimas nuo suskaidymo reikalauja padidintos Hsps koncentracijos. Koncentracijos padidėjimą onkogeniniai baltymai išprovokuoja per šiluminio šoko reakciją, kurios metu suintensyvėja nuo HSF1 priklausoma Hsps genų transkripcija. Galutinis rezultatas – padidėjusi intraceliulinė Hsps, ypač Hsp90, ekspresija, užtikrinanti piktybinio fenotipo išsaugojimą ir apsauganti vėžines ląsteles nuo spontaninės bei terapijos inicijuojamos apoptozės. Dėl savo tokio vaidmens onkogenezėje, šiluminio šoko baltymai

dabar yra naudojami kaip diagnostikos, prognozės ir gydymo efektyvumo biologiniai markeriai [12, 21, 38 – 41].

Vieni iš geriausiai žinomų Hsp90 baltymų klientų (2 lentelė), dalyvaujančių piktybiniuose procesuose, yra p53, HER2, c-MET ir c-Src [42]. Šie baltymai dalyvauja transdukcijos, ląstelių ciklo, apoptozės keliuose, kas įtakoja jų svarbą piktybinių požymių įsitvirtinime ir vėžio gyvybingumo palaikyme. Pavyzdžiui, p53 fiziologinėmis sąlygomis yra naviko supresorius, inicijuojantis ląstelių, su pažeista DNR, mirtį, taip užkirsdamas kelią tolimesnei tumorogenezei. Tačiau, šiam baltymui mutavus bei įgijus naujas molekulinės funkcijas, yra slopinama vėžinių ląstelių savaiminė žūtis ir yra palaikomas auglio neoplastinis augimas su invaziniais procesais [43, 44, 45].

2 lentelė. Hsp90 reikšmė vėžinėms ląstelėms.

Vėžio skiriamasis požymis	Hsp90 klientinis baltymas
Angiogenezė	Hif-1 α , AKT, FAK
Nestabdoma proliferacija	Telomerazė
Apoptozės slopinimas	Mutantinis p53, RIP
Nejautrumas augimo slopinimo signalams	CDK4, CDK6
Augimo signalo palaikymas	HER2, AKT, Raf-1
In vazija ir metastazės	c-MET

2 lentelė. Lentelės duomenys paremti [42] šaltiniu.

1.4. Hsp90 slopikliai

Per pastaruosius du dešimtmečius, dėl pastebimo Hsp90 dalyvavimo onkogeninių baltymų struktūros ir funkcijos palaikyme, šis šaperonas tapo patraukliu molekulinio taikinio vėžinių ligų terapijoje ir paskatino potencialių priešvėžinių vaistų – Hsp90 slopiklių – paiešką [45, 46].

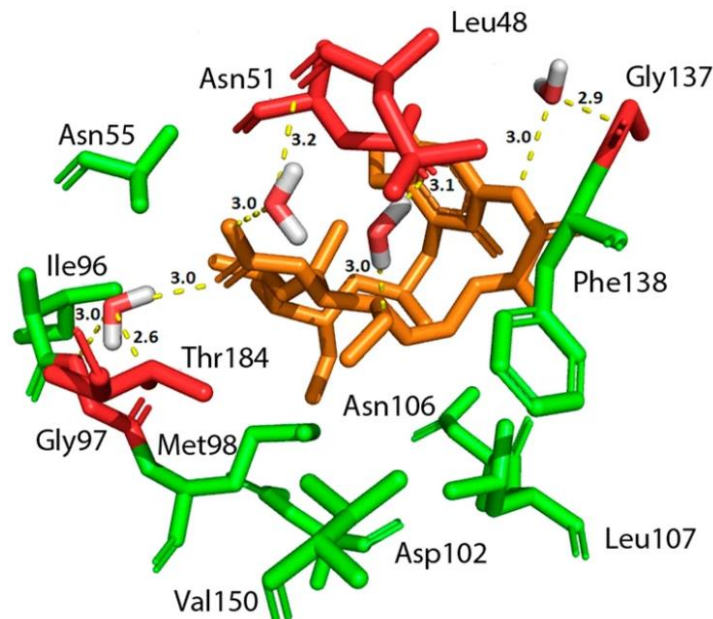
Šio baltymo kaip taikinio panaudojimas onkologinėse ligose grindžiamas tuo, kad Hsp90 slopinimas sukelia proteosomų inicijuotą onkobaltymų suirimą, kuris tuo pačiu užkerta kelią keliems vėžio signalizavimo keliams: slopinama angiogenezė, ląstelių proliferacija, mažinamas piktybinių

ląstelių invaziškumas [41, 47]. Taip pat, dėl savo unikalaus veikimo į tikslinį taikinį, šie naujoviški mažamolekuliniai junginiai pasižymi didesniu selektyvumu neoplastinėms ląstelėms nei tradiciniai chemoterapiniai vaistai – vėžinėse ląstelėse, Hsp90 koncentracija yra 10 kartų didesnė nei normaliose [48].

Hsp90 šaperoninio ciklo sudėtingumas suteikia pakankamai daug galimybių, kaip galima moduluoti Hsp90 funkcijas ir aktyvumą įvairių struktūrų slopikliais. Dėl to Hsp90 slopinantys junginiai yra suskirstyti į tris pagrindines klases: N domeno slopikliai, vidurio domeno slopikliai (Hsp90/košaperonų sąveikos trikdytojai) ir C domeno slopikliai. Didžiausią slopiklių klasę sudaro N domeno slopikliai dėl ND kritinio vaidmens klientinių baltymų brendime.

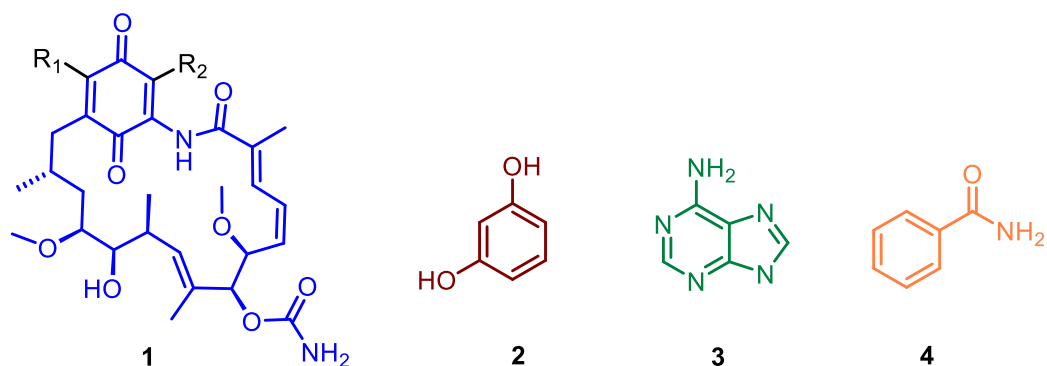
1.4.1. N galo domeno slopikliai

ND slopiklių veikimo mechanizmas yra pagrįstas konkurenciniu slopinimu. Šie slopikliai, imituodami ATP prisijungimą prie N galo domeno (8 pav.), selektyviai inhibuoja ATP molekulės surišimą Bergerato raukšlėje ir jos hidrolizę. Tokiu būdu, yra apribojamas Hsp90 šaperoninis ciklas – nebepalaikoma klientinių baltymų struktūra ir indukuojama onkogeninių baltymų degradacija [45].



8 pav. Hsp90 slopiklio geldanamicino sąveikos su ND ATP surišimo kišenės aminorūgštimis [49]

Hsp90 N domeno slopiklius galima suskirstyti į keturias klases pagal jų molekulės pagrindą: (1) ansamicino; (2) rezorcino; (3) purino ir (4) benzamido karkaso dariniai (9 pav).



9 pav. Hsp90 N domeno slopiklių klasės: benzochinono ansamicino (1), rezorcinoolio (2), purino (3) ir benzamido (4) dariniai

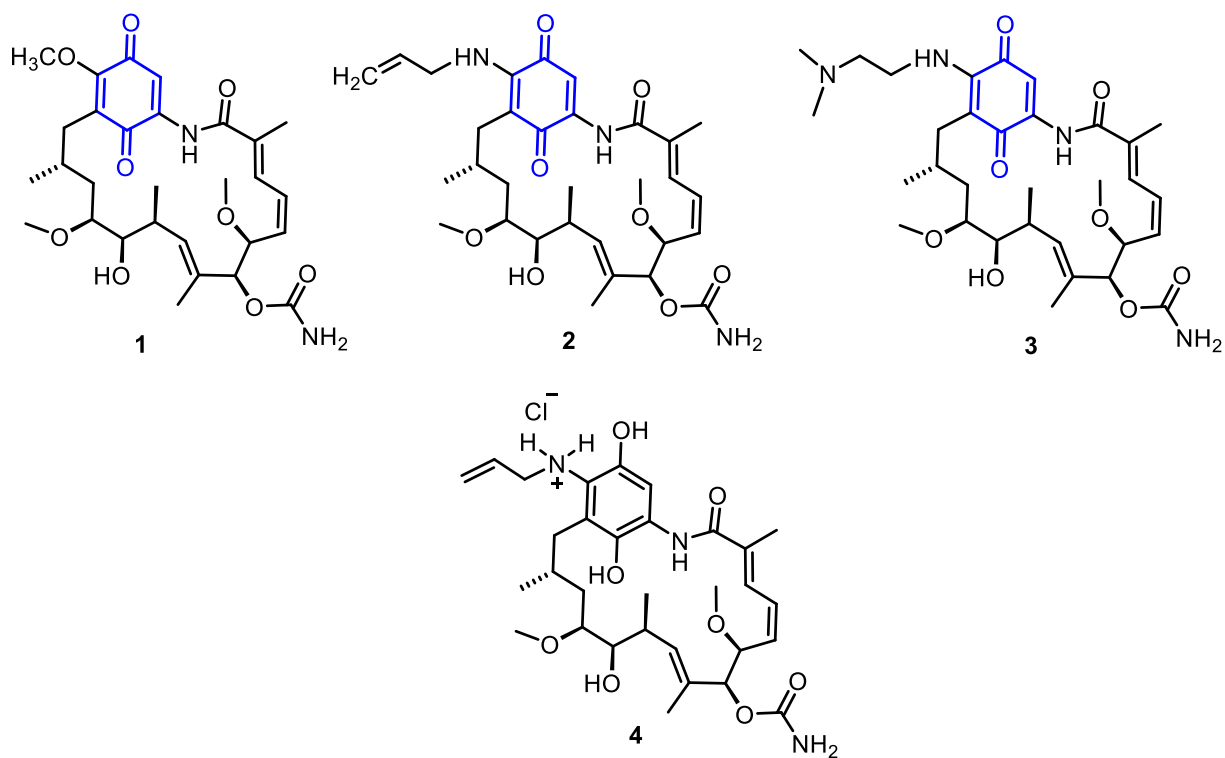
1.4.1.1. Pirmos kartos slopikliai: geldanamycinas ir jo analogai

Geldanamycinas (GA) (10 pav.) buvo pirmasis ištirtas junginys, gebantis destabilizuoti šaperono Hsp90 klientinius baltymus. Jis yra natūralus benzochinoninis ansamicino antibiotikas, kuris pirmą kartą išskirtas 1970 m. iš *Streptomyces hygroscopicus* bakterijų. 1994 m. Whitesell ir Neckers atliktuose molekulinuose tyrimuose nustatyta, jog GA turi priešnavikinį aktyvumą, kurį lemia Hsp90 slopinimas. Jis konkuruoja su ATP dėl prisijungimo prie N domene esančios nukleotidų surišimo kišenės, tokiu būdu slopindamas ATPazinį baltymo aktyvumą. Nors GA rodė gerą priešvėžinį poveikį *in vitro* ir *in vivo*, tačiau klinikinėje praktikoje jis pritaikytas nebuvo dėl metabolinio nestabilumo bei jam būdingo hepatotoksiškumo, kurį lemia struktūroje esantis chinono žiedas (10 pav.) [47, 50].

Pirmasis Hsp90 slopiklis, patekęs į klinikinius tyrimus su žmonėmis 1999 m., buvo GA analogas 17-alilamino-17-demetoksigeldanamycinas (17-AAG) (10 pav.). Tanespimicinas arba 17-AAG gautas modifikuojant GA chinono žiedo C17 padėtį, pakeičiant metoksi grupę į alilamino grupę. Šis struktūros pakeitimas ne tik išsaugojo priešnavikinį aktyvumą, bet ir sumažino junginio toksiškumą. *In vitro* tyrimų metu nustatyta, jog 17-AAG inhibuoja šaperono kompleksą su didesniu afiniškumu nei GA bei pasižymi selektyvesniu poveikiu navikinėms ląstelėms [47, 51]. Pagrindinis šio analogo trūkumas – benzochinono fragmentas, įtakojantis junginio hepatotoksiškumą. Be to, šis fragmentas, prieš jam jungiantis su Hsp90, turi būti suredukuotas NADPH chinono reduktazės (NQO1), kuri padidina chinono žiedą turinčių priešnavikinių agentų citotoksiškumą dėl bioredukcijos metu susidarantių hidrochinonų. Analogo galimas toksiškumas, mažas stabilumas, prastas tirpumas vandenyje, trumpas biologinis pusinės eliminacijos laikas apribojo šio junginio panaudojimą tolimesnėje praktikoje [51, 52, 53].

17-dimetilamino-etilamino-17-demetoksigeldanamicinas (17-DMAG) (10 pav.) buvo antrasis pusiau sintetinis geldanamicino analogas, patekęs į klinikinius tyrimus. 17-DMAG arba alvespimicinas gautas pakeitus GA struktūros C17 padėties metoksi grupę į N,N- dimetilamino grupę. Ši modifikacija suteikė geresnes farmakokinetines savybes, lyginant su GA ir 17-AAG – geresnis junginio tirpumas vandenyje, didesnis biologinis prieinamumas *per os* ir mažesnė priklausomybė nuo NQO1/DT-diaforazės metabolizmo kelio [50, 54]. *In vitro* tyrimai atskleidė, jog šis analogas yra selektyvesnis Hsp90 kompleksams piktybinėse ląstelėse, lyginant su sveikomis, tačiau klinikinis jo plėtojimas buvo nutrauktas 2008 m. dėl per mažo efektyvumo *in vivo* [41, 55].

Ankstesnių geldanamicino analogų terapinių apribojimų įveikimui, buvo sukurtas naujas slopiklis retaspimicinas arba IPI-504 (10 pav.). Jis yra tirpi hidrochinono hidrochlorido druska, gauta iš 17-AAG. *In vivo*, šio analogo hidrochinono grupė egzistuoja dinaminėje pusiausvyroje su chinono grupe, dėl ko jis yra linkęs oksiduotis mažiau ir sudaryti toksišką benzochinono fragmentą. Pats savaime šis junginys nėra aktyvus, tačiau metabolizmo per CYP3A4 metu susidaro aktyvus jo metabolitas 17-amino-17-demetoksigeldanamicinas (17-AG) [41, 55, 56]. Šis junginys buvo patekęs į klinikinius tyrimus ir sėkmingai užbaigė III fazę, tačiau tolimesnis jo likimas yra nežinomas.



10 pav. Geldanamicinas (1), 17-AAG (2), 17-DMAG (3) ir IPI-504 (4). Benzochinono žiedas pažymėtas mėlyna spalva

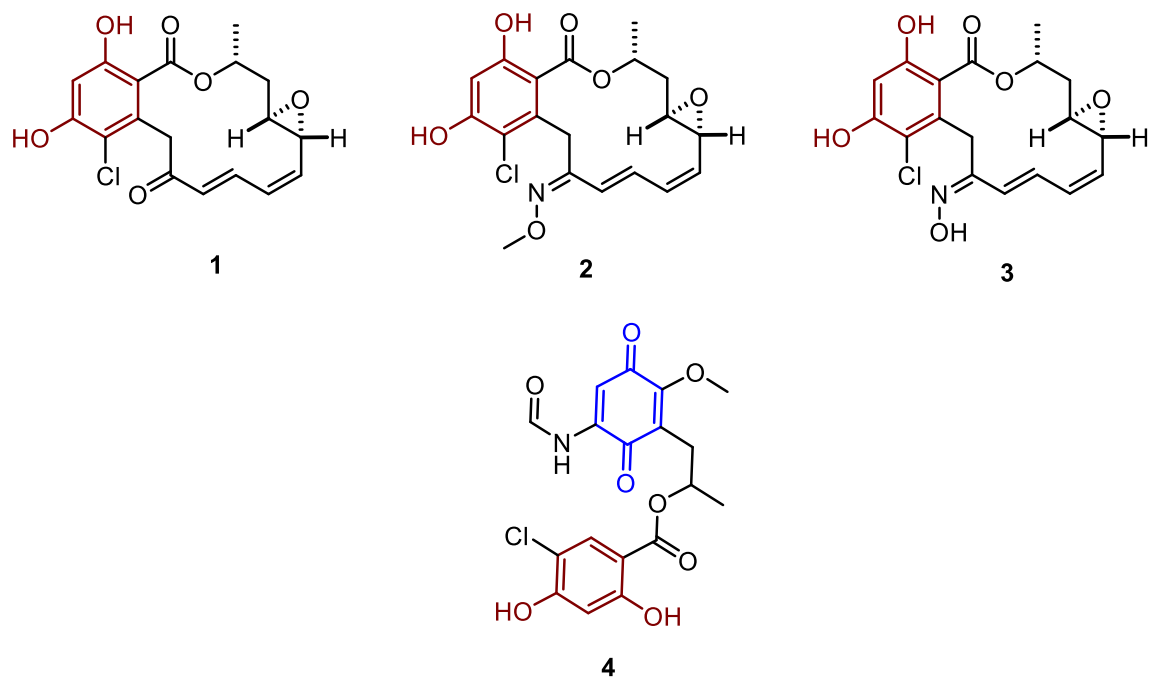
Nors GA dariniai pasižymi geru priešnavikiniu aktyvumu, jų panaudojimas terapinėje praktikoje yra ribotas – šiuo metu nėra tiriama nei vieno geldanamicino analogo klinikiniuose tyrimuose. Tačiau šie junginiai davė pradžią kitų Hsp90 slopiklių kūrimui ir plėtojimui.

1.4.1.2. Antros kartos slopiklių pradininkas – radisikolis ir jo dariniai

Radisikolis (RD) (11 pav.), dar žinomas kaip monordenas, tai natūralus, 14 narių makrolidas, priklausantis laktono grupės antibiotikams. Šis junginys pirmą kartą išgrynintas 1953 m. iš *Monosporium bonorden* ir *Monocillium nordinii* grybelių kultūros. Schulte 1998 m. vykdytuose tyrimuose nustatyta, kad RD, kaip ir GA, yra konkurencinis Hsp90 slopiklis. Jis pasižymi dideliu afiniškumu homodimeriniam Hsp90 ($K_d = 19 \text{ nM}$) *in vitro* bei nėra toksiškas *in vivo* dėl mažo redokso aktyvumo. Tačiau, dėl savo struktūros ypatumų, šis antibiotikas yra nestabilus kraujo plazmoje ir turi silpną priešvėžinį poveikį gyvame organizme. Tokį nestabilumą lemia nesoti α , β , γ , δ karbonilo grupė ir reaktyvus epoksido tiltelis, dalyvaujantys nukleofilinio prisijungimo reakcijose, kurių pasekmė – neaktyvūs metabolitai. Ši nepakankamo metabolinio stabilumo problema paskatino naujų RD darinių sintezę, į junginio struktūrą įvedant oksimo, halogenhidrinų, ciklopropano ir ciklopropilo grupes, taip siekiant pagerinti *in vivo* aktyvumą [57, 58].

Naujieji sintetiniai RD dariniai, pavyzdžiui, KF25706 ir KF2711 (11 pav.), yra atsparesni oksidaciniam metabolizmui ir pasižymi gana stipriu Hsp90 slopinančiu poveikiu. Šiuose analoguose, RD nesoti karbonilo grupė yra pakeista į oksimo. Tokio pakeitimo dėka yra sumažinamas Michaelio akceptorius, t.y. karbonilo, elektrofiliškumas ir padidinamas junginių stabilumas. Žmogaus auglio ksenografiniuose tyrimuose su pelėmis, šie junginiai demonstravo gerą priešvėžinį poveikį storosios žarnos ir krūtų karcinomos ląstelėms bei pasižymėjo mažu toksiškumu kepenims. Tačiau, nepaisant visų privalumų, jie nepateko į klinikinius tyrimus su žmonėmis dėl galimo ototoksiškumo [42, 59, 60, 61].

Dar vienas RD analogas, chimerinė molekulė radesteris (11 pav.), buvo susintetintas siekiant geriau išpildyti Hsp90 N domeno ATP surišimo kišenę. Šio hibrido struktūra susideda iš GA chinono žiedo, RD rezorcinolio fragmento ir izopropilo esterio. Radesteris pasižymi geru aktyvumu prieš MCF-7 krūties vėžio ląsteles ir skatina mutavusio Hsp90 klientinio baltymo HER2 degradaciją. Buvo manyta, jog šis RD darinys duos pradžią naujų Hsp90 slopiklių kūrimui, bet iki šios dienos nėra jokių duomenų apie vykdomus klinikinius tyrimus bei naujų chimelių sintezę [42, 62].



11 pav. Radisikolis (1), KF2711 (2), KF25706 (3), radesteris (4). Raudonai pažymėtas rezorcinoolio fragmentas, mėlynai – chinono žiedas

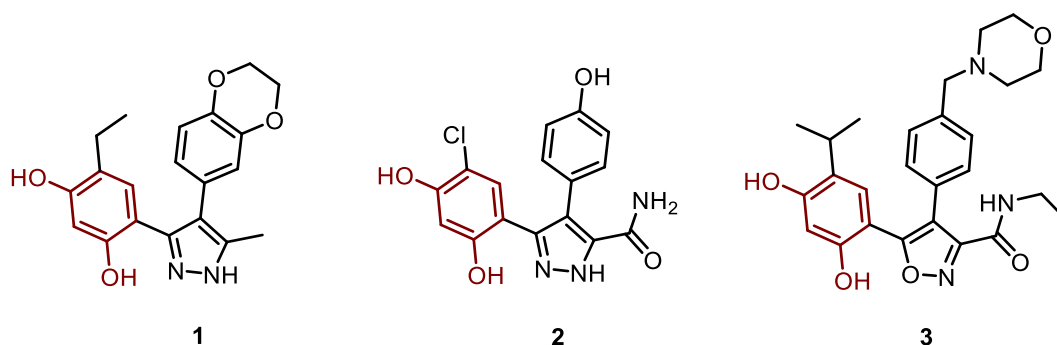
1.4.1.3. Antros kartos slopikliai – rezorcinoolio analogai

Tyrinėjant radisikolio ir mielių Hsp90 N domeno kompleksą rentgeno kristalografijos būdu, buvo nustatyta, kad už natūralaus makrolido didelį afinitetą ir sąveiką su šaperonu yra atsakingas jo struktūroje esantis rezorcinoolio fragmentas. Rezorcinoolis, imituodamas natūralaus ATP sąveikas, sudaro vandenilinius ryšius su Bergerato raukšlės aminorūgštimis Asp79 ir Leu34 per žiedo 1, 3 padėtyse esančius fenolinius hidroksilus, bei užkerta kelią nukleotido prisijungimui prie kišenės [57, 63]. Šis kristalografinis atradimas leido sukurti paprastesnės struktūros slopiklius, kurių farmakoforas – rezorcinoolio karkasas.

Didelio našumo atrankos metodo pagalba, ištyrus 60 tūkst. junginių biblioteką, buvo identifikuotas pirmasis potencialus slopiklis su rezorcinoolio fragmentu – 3,4-diarilpirazolas CCT018159 (12 pav.). Šis azolas, sąveikaudamas su N domeno nukleotidų jungimosi vieta, slopina baltymo ATPazinį aktyvumą, kai IC_{50} koncentracija yra 3,2 μ M. Panašiai kaip radisikolis, CCT018159 formuoja vandenilinius ryšius su kišenėje esančiomis aminorūgštimis per du fenolinius hidroksilus ir greta esantį pirazolo azoto atomą [64].

Tolimesnė diarilpirazolų paieška buvo vykdoma, siekiant pagerinti CCT018159 farmakologines savybes per struktūros optimizavimą. Pirmtako modifikacijos atliktos prie rezorcinolio C6 ir kito aromatinio žiedo C4 padėčių, į šias vietas įtraukiant įvairius pakaitus. Pokyčiai taip pat vykdyti ir penkianariame heterocikle, kuris tarpusavyje jungia du aromatinis žiedus. Šių modifikacijų dėka, buvo gautas pirmasis veiksmingas junginys – pirazolo amidas CCT0129397, dar vadinamas VER49009 (12 pav.), kurio *in vitro* aktyvumas prilygsta geldanamicino analogui 17-AAG. Jo išskirtinumas – jis yra linkęs formuoti papildomą vandenilinį ryšį su Gly97 per naują 3-etilamido pakaitą heterocikle ir hidrofobiškai sąveikauti su Met98 per aromatinį pirazolo žiedą. Tačiau, nepaisant gero analogo aktyvumo *in vitro*, VER49009 į klinikinius tyrimus nepateko dėl per mažo antiproliferacinio poveikio HCT116 gaubtinės žarnos vėžio ląstelių linijai. Kitas trūkumas – pirazolo žiedui būdinga tautomerinė izomerizacija, kuri neleidžia suformuoti pastovaus vandenilinių ryšių tinklo su kišene, o tai sumažina afinitetą baltymui [65].

Tolimesnis pirmtako molekulės struktūros optimizavimas davė eilę naujų izoksazolų analogų, gebančių formuoti apibrėžtą vandenilinių ryšių skaičių su taikiniu. Vienas iš jų – daug žadantis aukštos potencijos 3,4-diarilizoksazolas VER52296 (luminespibas) (12 pav.). Šis junginys, nuo 2007 metų, dalyvavo dvylikoje I fazės ir aštuoniolikoje II fazės klinikinių tyrimų. Jų metu nustatyta, kad *in vitro* VER52296 yra veiksmingas prieš įvairias vėžines žmogaus kilmės ląstelių linijas bei yra biologiškai efektyvus prieš auglio proliferacinius, invazinius ir metastazinius procesus *in vivo*. Vis dėlto, iki šios dienos, jokie *in silico* tyrimai iki galo nėra išnagrinėję dinaminių ir struktūrinių savybių, kuriomis grindžiamos VER52296 sąveikos su Hsp90 [5, 66].

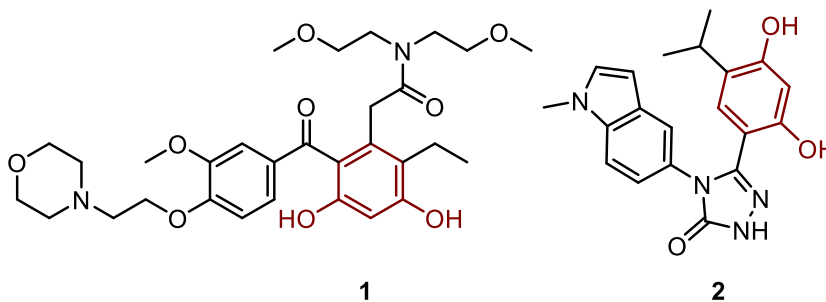


12 pav. Rezorcinolio analogai: CCT018159 (1), VER49009 (2), VER52296 (3)

Kitas aktyvus junginys, 1,2,4-triazol-3-olas STA-9090 (13 pav.), žinomas ganetespibo pavadinimu, buvo atrastas fragmentais pagrįstu vaistų kūrimo metu, tarpusavyje derinant du

analitinius metodus: rentgeno kristalografiją ir branduolių magnetinio rezonanso spektroskopiją. Ganetespibas, lyginant su luminespibu, prie Hsp90 jungiasi didesniu afiniškumu, dėl ko efektyviau slopina onkobaltymų ekspresiją bei su jais susijusius onkogeninius signalizacijos kelius. STA-9090 iš viso dalyvavo trisdešimt aštuoniuose klinikiniuose tyrimuose ir buvo pasiekęs III tyrimų fazę nesmulkių ląstelių plaučių vėžio indikacijai, tačiau galiausiai bandymai buvo nutraukti [5, 33].

Rezorcino analogas KW-2478 (13 pav.), kitaip nei ankstesni junginiai, savo struktūros C5 padėtyje turi papildomai įvestą pakaitą – N,N-bis(2-metoksietil)acetamidą, o rezorcino fragmentą su aromatinium žiedu jungia nebe penkianaris heterociklas, o karbonilo grupė. KW-2478 dalyvavo dviejuose klinikiniuose tyrimuose NCT00457782 ir NCT01063907, kuriuose tirtas junginio toksiškumas ir toleravimas [5, 33].



13 pav. Rezorcino analogai KW-2478 (1) ir STA-9090 (2)

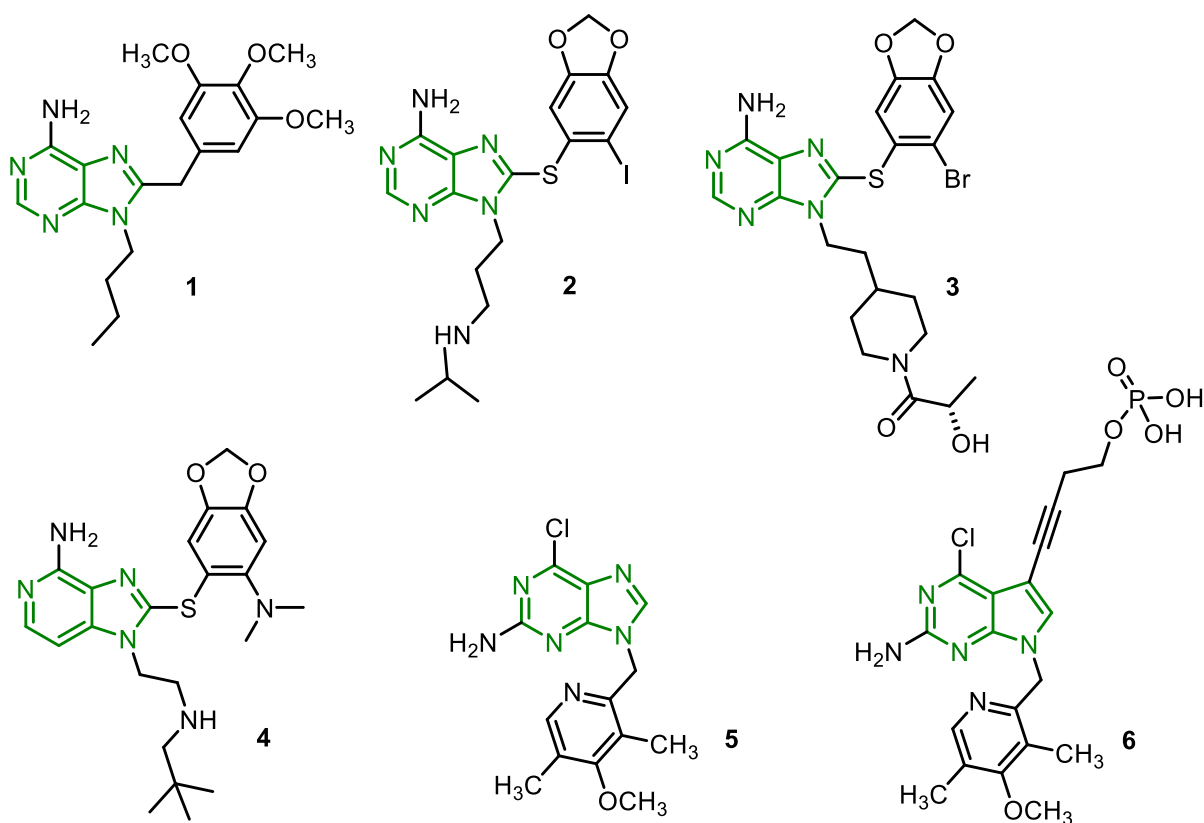
1.4.1.4. Antros kartos slopikliai – purino analogai

Purinų klasės slopiklių vystymas prasidėjo siekiant sukurti mažos molekulinės masės junginius, sąveikaujančius su Hsp90. Kūrimo metu pasinaudota unikalia, C formos ATP molekulinės konformacija, kurią ji įgauna išsistatydamą į Hsp90 N domeno nukleotidų surišimo kišenę. Todėl, šios klasės slopiklių struktūros pagrindas yra purino karkasas, padedantis imituoti ATP išsilankstymą [67].

PU3 (14 pav.) buvo pirmasis pilnai sintetinis Hsp90 slopiklis, priklausantis purino dariniams. Tyrimai su MCF-7 krūties vėžio ląstelių linija parodė, kad PU3 priešvėžinis poveikis yra panašus į GA: kai jo efektyvioji koncentracija yra 10 – 50 μM , PU3 sukelia onkogeninių baltymų, tokių kaip HER2 ir Raf-1 kinazė, degradaciją bei mažina migruojančio HER2 kaupimąsi audiniuose. Su šiuo junginiu taip pat buvo atlikti rentgeno kristalografiniai tyrimai, kurie įrodė junginio struktūros racionalumą – PU3 purino fragmentas jungiasi toje pačioje padėtyje, kaip ir ADP, suformuodamas

ryšį su Asp93 per C6-NH₂. Dėl šių priežasčių, šis slopiklis buvo naudojamas kaip prototipas naujų junginių kūrimo, siekiant pagerinti būsimų slopiklių fizikochemines savybes ir aktyvumą [48, 67].

Pirmtako struktūros optimizavimo etape, didelis dėmesys skirtas struktūros-aktyvumo ryšio tyrimams. Jų metu, tikslingai nagrinėtos dvi junginio dalys, iš kurių pirmoji – metileno tiltelis, jungiantis aromatinį žiedą prie purino fragmento C8 padėties. Modifikuojant metileno tiltelį, į jo vietą bandyta įtraukti įvairius atomus, tokius kaip azotas ir deguonis, tačiau šie pokyčiai turėjo priešingą efektą – nauji junginiai pasižymėjo mažu biologiniu aktyvumu. Veiksmingiausi purino analogai buvo 8-arilsulfaniladeninai, kurie, besijungdami su Hsp90, gebėjo išlaikyti tinkamą erdvinę konformaciją. Antroji tyrimų sritis buvo aromatinis žiedas ir alkilo grandinė prie N9 padėties. Šių tyrimų metu išsiaiškinta, jog pirmenybė aromatinio žiedo pakeitime turi būti skiriama 2',5' padėtimis, į jas įtraukiant jodo pakaitą ir metoksi grupę, o prie N9 prijungta alkilo grandinė turi būti sudaryta iš 4 anglies atomų [48].



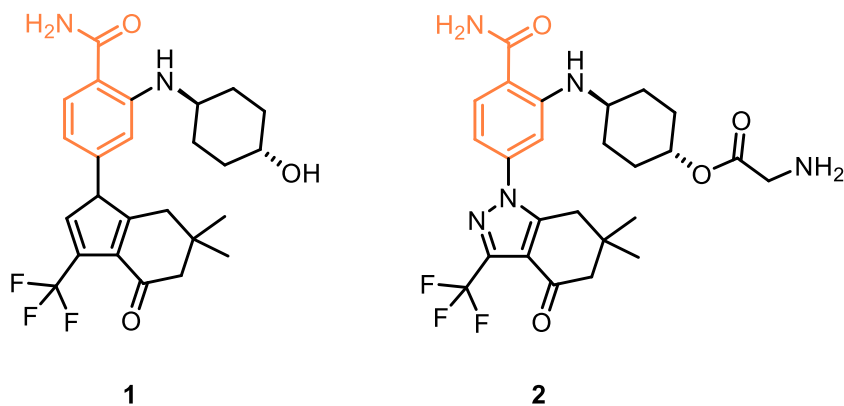
14 pav. Purino analogai: PU3 (1), PU-H71 (2), MPC-3100 (3), Debio093 (4), BIIB021 (5), BIIB028 (6)

Stiprinant purino cheminį karkasą, buvo gauti penki nauji junginiai: MPC-3100, PU-H71, Debio093, BIIB021 ir BIIB028 (14 pav.). Visi jie pasižymi geromis farmakokinetinėmis savybėmis, geru biologiniu prieinamumu bei mažu toksiškumu kepenims. Perspektyviausias ir daugiausiai vilčių žadantis junginys yra PU-H71 – eksperimentiniais tyrimais įrodyta, jog šis junginys sumažina proliferacijoje ir apoptozėje dalyvaujančių onkobaltymų raišką bei skatina jų skaidymą, nesukeldamas papildomo toksinio poveikio kepenims ir inkstams. PU-H71, šiuo metu, yra tiriamas dviejuose klinikiniuose tyrimuose su žmonėmis – NCT01269593 ir NCT01393509 [5, 48].

1.4.1.5. Antros kartos slopikliai – benzamidai

Benzamidų klasės ND junginius atrado kompanija Serenex, pasitelkusi unikalų chemoproteomikos metodą. Siekdama išskirti ATP surišančius baltymus, Serenex šiam tikslui pritaikė afiniškumo chromatografiją – imobilizuota purino pagrindo afiniškumo terpė pirmiausia buvo apdorota ląstelių lizatu, o vėliau panaudota nedidelė junginių biblioteka įvairių baltymų eliucijai iš kolonėlės. Šiuo būdu buvo atrastas 4-pakeistas benzamidas SNX-2122 (15 pav.), tačiau klinikinėje praktikoje jis pritaikytas nebuvo dėl polimorfinių kristalų formavimo ir nepastovaus bioprieinamumo [68, 69].

Naudojant SNX-2122 struktūros pagrindą, buvo sukurtas klinikinis kandidatas SNX-5422 (15 pav.). Jis yra SNX-2122 glicino esterio provaistas, pagerinantis junginio tirpumą. SNX-5422, nuo 2007 metų, buvo tiriamas daugelyje I ir I/II fazių klinikinių tyrimų, skirtų tiek leukemijos, tiek kitų organų piktybiniams navikams. Tačiau, tolimesni tyrimai buvo nutraukti dėl pranešimų apie negrįžtamus pažeidimus akių tinklainei [68 – 70].



15 pav. Benzamidai SNX-2122 (**1**) ir SNX-5422 (**2**)

1.5. Hsp90 slopiklių perspektyvos

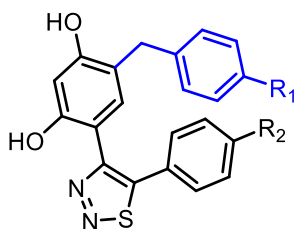
Nors ir yra susintetinta eilė N domeno Hsp90 slopiklių, demonstruojančių selektyvų poveikį baltyminiam taikiniui, tačiau šie naujoviški agentai vėžio monoterapijoje, kol kas, nėra taikomi. Klinikinį jų pritaikymą pagrįsde riboja trys veiksniai: vidutinis efektyvumas, toksiškumas ir, svarbiausia, potencialus vėžinių ląstelių atsparumas Hsp90 slopikliams [33]. Už šį atsparumą yra atsakinga šiluminio šoko reakcija, sukianti mutavusių klientinių baltymų chemoprotekcinį poveikį. Dėl šio kompensacinio mechanizmo yra paleidžiamos antiapoptotinės kaskados per šaperonų, tokių kaip Hsp90, Hsp27 bei Hsp70, koncentracijos padidėjimą, o tai skatina rezistentiškumo vaistams vystymąsi [71]. Kitas svarbus elementas, galintis turėti įtakos vėžinių ląstelių atsparumui ND slopikliams, ypač rezorcinolio pagrindo, yra per didelė UDP-gliukuroniltransferazės 1-1 ekspresija neoplastinėse ląstelėse, katalizuojanti metabolinę lipofilinių vaistų inaktyvaciją [72]. Nepaisant to, su ND slopikliais toliau yra vykdomi klinikiniai tyrimai onkologinių ligų indikacijoms gydyti dėl stebimo sinergizmo su kitais priešvėžiniais vaistais.

Kadangi ND Hsp90 slopiklių monoterapijoje taikyti neįmanoma, vis daugiau dėmesio yra skiriama alternatyviems mechanizmom, tokiems kaip selektyvus Hsp90 β izoformos slopinimas, alosterinis Hsp90 C domeno slopinimas ir tikslinis baltymų – baltymų sąveikos tarp Hsp90 ir jo košaperonų sutrikdymas [73].

2 EKSPERIMENTINĖ DALIS

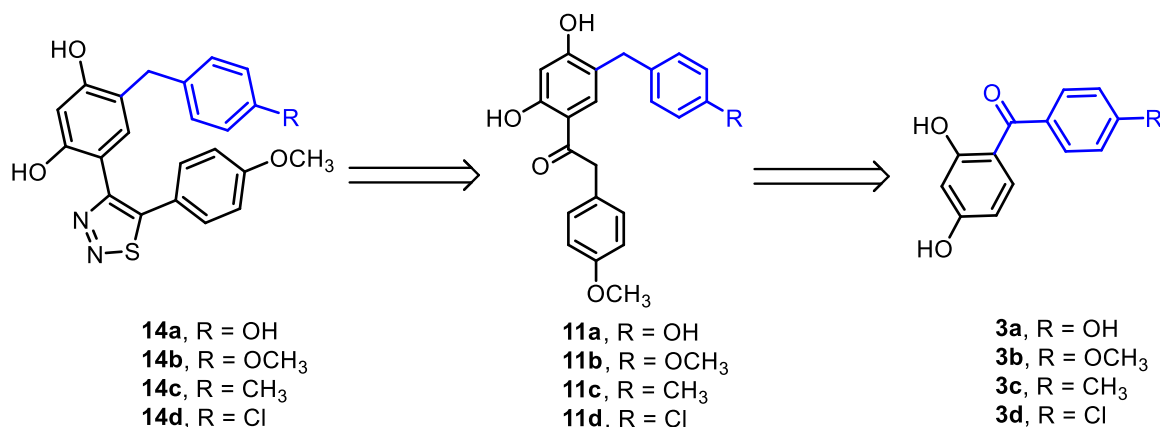
2.1. Tyrimo objektas

Magistrinio darbo metu nutarta sintetinti junginius, kurių struktūroje esantis rezorcinolio fragmentas 4 padėtyje turėtų benzilo pakaitą, o 6 padėtyje būtų tiadiazolo žiedas, jungiantis rezorcinolį su kitu, *para*-pakeistu aromatinio žiedu. Tokios struktūros junginiai sintetinami siekiant išnaudoti Hsp90 N domene esančios Bergerato raukšlės S2 subkišenę, taip padidinant junginių afiniškumą šiam baltymui.



1 pav. Bendra 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolių struktūra

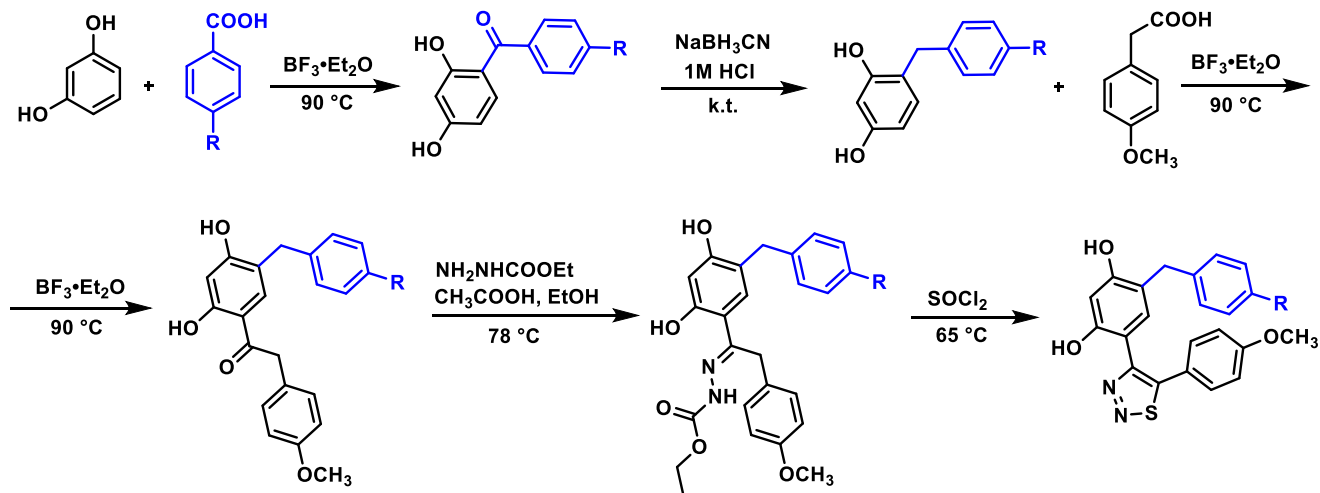
Tokius 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolių analogus būtų galima susintetinti iš *C*-acilintų junginių **11a**, **11b**, **11c** ir **11d**, o šiuos – iš diarilketonų **3a**, **3b**, **3c** ir **3d** (1 schema).



1 schema. 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolių retrosintezės kelias

Remiantis retrosintezės keliu, tikslinius junginius būtų galima susintetinti per penkis etapus (2 schema), taikant literatūroje prieinamas metodikas [7, 74, 75] – 1) selektyvi fenolių acilinimo reakcija, kurios metu rezorcinolis veikiamas benzenkarboksirūgšties analogais, kaip Luiso rūgštį naudojant boro trifluoridą, 2) acilinimo metu susidariusio ketono karbonilo grupės redukcija taikant

NaBH₃CN/rūgštis porą, 3) po redukcijos gauto 4-benzilbenzen-1,3-diolio acilinimas 4-metoksifenilacto rūgštimi, 4) karboksilato sintezė iš etilkarbazato ir C-acilinto produkto 1-(5-benzil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono ir 5) tiadiazolo žiedo formavimas iš karboksilato taikant Hurd-Mori ciklizacijos reakciją.

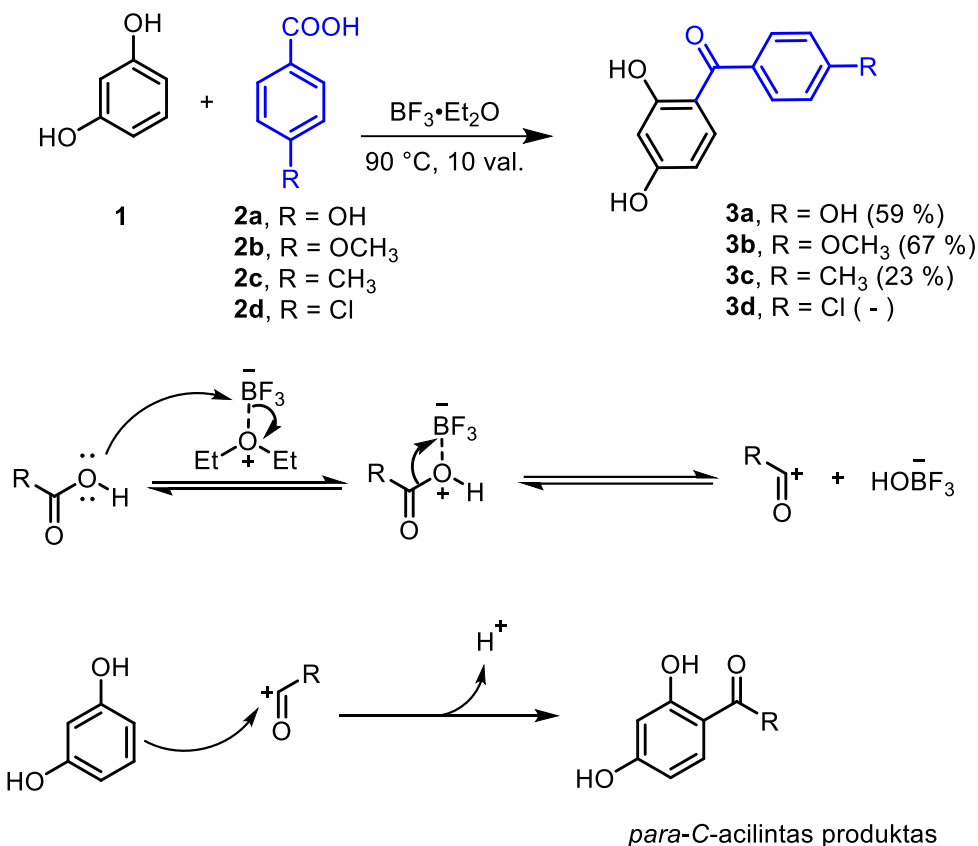


2 schema. Siūloma tikslinių junginių pakopinė sintezė

2.2. Diarilketonų (2,4-dihidroksifenil)(fenil)metanonų sintezė

Siekiant gauti 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolų sintezei reikalingus tarpinius produktus **11a-d**, pirmiausia buvo atlikta diarilketonų **3a-d** sintezė iš komerciškai prieinamų reagentų ir tirpiklių. Diarilketonai **3a-c** gauti vykdant *para*-selektyvią fenolių acilinimo reakciją (3 schema), kurios metu rezorcinolis buvo veikiamas įvairiomis benzenkarboksirūgštimis. Acilinimas buvo atliktas Luiso rūgštyje – boro trifluorido eterate (toliau – BF₃OEt₂). Reakcija vykdyta 10 valandų 90 °C temperatūroje. Po 10 val., reakcijos mišinys neutralizuotas vandeniniu natrio acetato (toliau – NaOAc) tirpalu (10 %) ir paliktas maišytis dar 1 val. kambario temperatūroje.

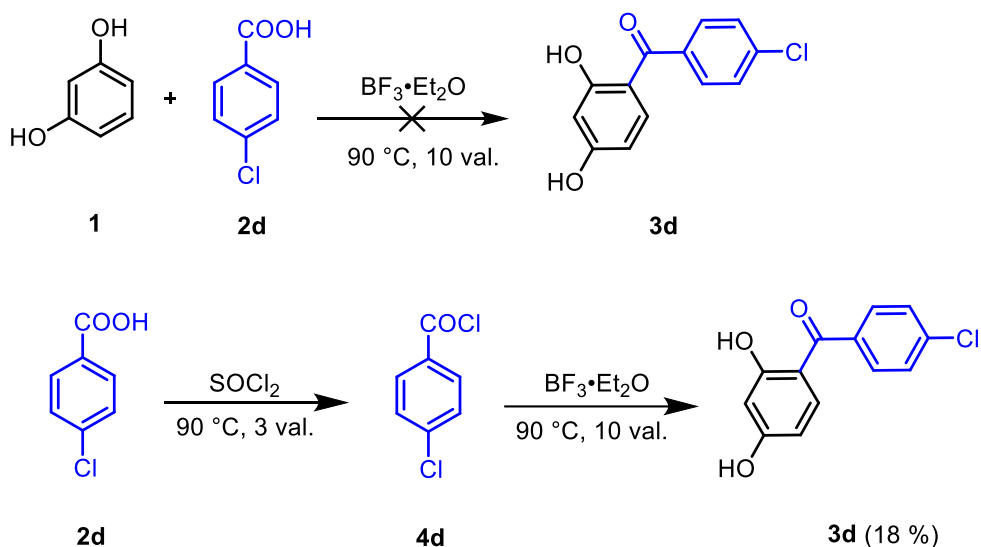
Dalis reakcijos metu susidariusių šalutinių produktų nuo tikslinių junginių pašalinta ekstrakcijos būdu su etilacetatu (toliau – EA). Ekstrakcijos metu surinkta organinė fazė džiovinta bevandeniu Na₂SO₄ ir koncentruota rotaciniu garintuvu. Iš išdžiovintos liekanos diarilketonai buvo išskirti kristalizacijos būdu, naudojant tolueną (toliau – Tol), arba kolonėlinės chromatografijos būdu, taikant gradientinę eliuciją skirtingo santykio Tol:EA mišiniais (20: 1, 10:1, 8:1, 6:1 ir 3:1). Gauti *para*-C-acilinti produktai **3a**, **3b**, **3c** atitinkamai 59 %, 67 % ir 23 % išeigomis.



3 schema. *para*-selektyvi fenolių acilinimo reakcija ir jos numanomas mechanizmas, paremtas [76] šaltiniu

Nepavykus gauti diarilketono **3d** acilinimo būdu, buvo nuspręsta junginį susintetinti atliekant benzenkarboksirūgšties modifikaciją (4 schema). Modifikacijos metu buvo suformuotas tarpinis junginys 4-chlorobenzoilchloridas **4d**, kuris dėl savo stiprių elektrofilinių savybių lengviau dalyvauja acilinimo reakcijose.

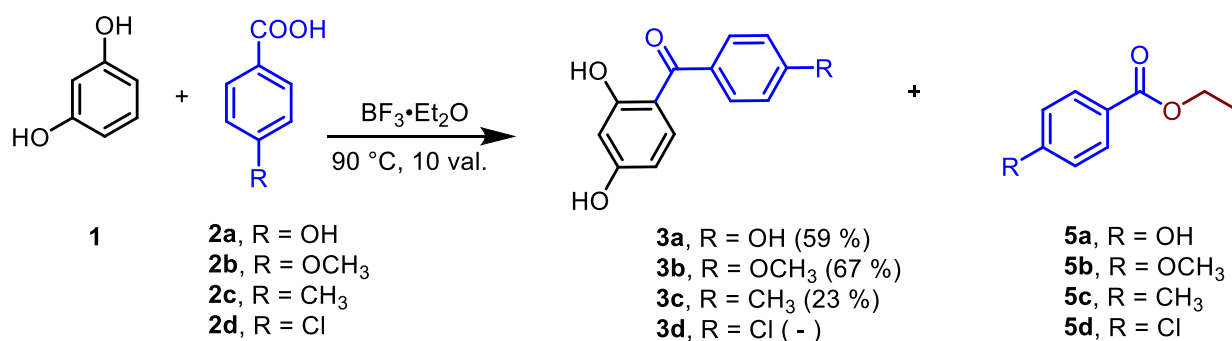
Acilchloridas **4d** gautas 4-chlorobenzenkarboksirūgšties kristalus paveikus tionilo chloridu (toliau – SOCl₂). Reakcija buvo vykdyta 3 val. 90 °C temperatūroje, kol mišinys tapo skaidrus. Tirpalui išskaidrėjus, SOCl₂ perteklius nudistiliuotas vakuumu. Susidaręs tarpinis junginys **4d** buvo negrynintas ir paveiktas rezorcinoliu bei BF₃OEt₂. Susintetinto junginio **3d** išeiga siekė 18 %.



4 schema. Diarilketono **3d** modifikuota sintezė

Diarilketonų sintezės metu taip buvo stebėtas šalutinių produktų **5a-d** susidarymas (5 schema). Šių junginių susiformavimą lemia šalutinė esterifikacijos reakcija, kurios metu prie benzenkarboksirūgšties yra prijungiamas nuo BF_3OEt_2 atskilęs dietilo fragmentas dėl rūgštinių acilinimo sąlygų. Žymus etilbenzenkarboksilato **5c** susidarymas buvo stebėtas sintetinant junginį **3c** – po reakcijos mišinio ekstrakcijos, medžiaga liko skysta ir turėjo specifinį kvapą. Esterį nuo tikslinio diarilketono buvo bandyta atskirti išplaunant tolueno ir petrolio eterio mišiniu. Po plovimo buvo taikyta kristalizacija ir išskirtas nešvarus junginys **3c**, kuris vėliau grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu.

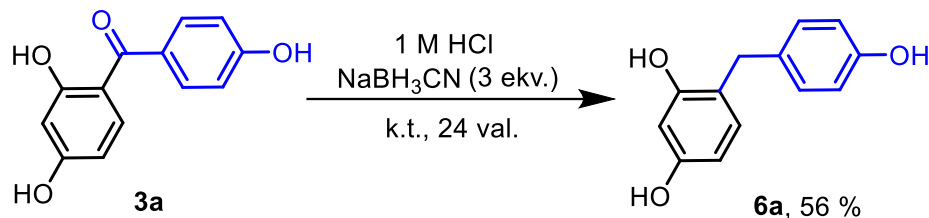
Ši šalutinė esterifikacijos reakcija galėjo būti viena iš priežasčių, nulėmusių mažą produkto **3c** išeią (23%). Ta pati problema buvo matoma ir su junginiu **3d**.



5 schema. Šalutinių produktų **5a-d** susidarymas acilinimo metu

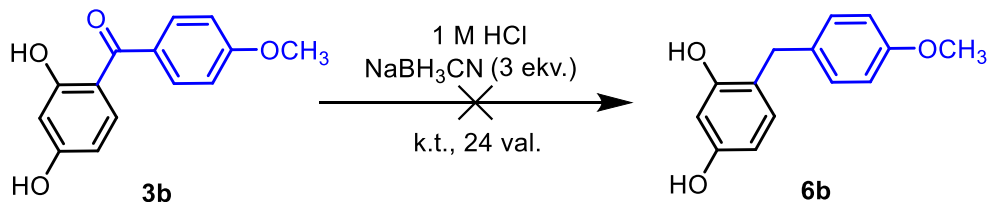
2.3. 4-benzilbenzen-1,3-diolių sintezė

Toliau vykdant pakopinę tikslinių junginių sintezę, buvo atlikta **3a-d** junginių redukcija, kurios metu diarilketonų struktūroje esanti karbonilo grupė buvo suredukuota iki metileno tiltelio. Atliekant redukcijos reakciją su **3a** junginiu (6 schema), reduktoriumi buvo pasirinktas natrio cianoborohidridas (toliau – NaBH₃CN). Reakcija vykdyta 24 val., kambario temperatūroje, lašinant 1 M HCl tirpalą į **3a**, metanolio (toliau – MeOH) ir NaBH₃CN mišinį tokiu greičiu, kad būtų palaikoma pastovi rūgštinė terpė. Naudotas indikatorius – metiloranžas, rūgštinėje aplinkoje nudažantis tirpalą raudona spalva. Po 24 val., mišinys ekstrahuotas su EA, o surinkta organinė fazė koncentruota rotaciniu garintuvu. Tikslinis produktas **6a** išgrynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, kaip mobiliąją fazę naudojant Tol:EA mišinius santykiais 6:1 ir 3:1. Gautas junginys **6a** su 56 % išeiga.



6 schema. Diarilketono **3a** redukcija

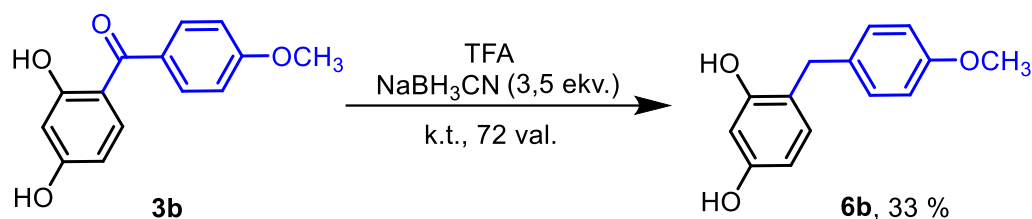
Redukcija su reduktoriumi NaBH₃CN taip pat buvo taikyta junginiams **3b** ir **3c**. Reakcija su diarilketonu **3b** buvo vykdyta identiškomis **3a** junginio redukcijos sąlygomis. Po 24 val., taikant TLC metodą, buvo stebimas šalutinių produktų susidarymas, bet ne junginio **3b** konversija į **6b** (7 schema).



7 schema. Diarilketono **3b** redukcija

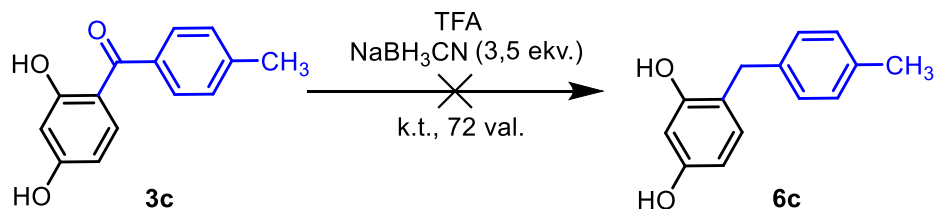
Negavus tikslinio 4-benzilbenzen-1,3-diolio **6b**, buvo bandoma optimizuoti reakcijos sąlygas padidinant reduktoriaus kiekį ir prailginant reakcijos laiką iki 48 val. Redukcija buvo atlikta vienodomis sąlygomis, tačiau po 24 val. į reakcijos mišinį buvo papildomai įdėta pusė ekvivalento NaBH_3CN . Po reduktoriaus pridėjimo, mišinys buvo paliktas maišytis dar 24 val. Praėjus 48 val. ir atlikus TLC buvo stebima tik dalinė **3b** junginio konversija į **6b**.

Siekiant padidinti produkto išeigą, buvo modifikuojamas dar vienas reakcijos parametras – rūgštis. Nuspręsta HCl pakeisti į organinę trifluoroacto rūgštį (toliau – TFA). Reakcija su junginiu **3b** vykdyta kambario temperatūroje, po 24 val. papildomai pridedant pusę ekvivalento reduktoriaus. Po NaBH_3CN pridėjimo, mišinys buvo paliktas maišytis dar 48 val. Iš viso redukcija vykdyta 72 val. Mišinys ekstrahuotas su EA, organinė fazė koncentruota rotaciniu garintuvu. Susidarę kristalai gryninti kristalizacijos būdu naudojant Tol. Gautas 4-benzilbenzen-1,3-diolis **6b** su atitinkama 33 % išeiga (8 schema).



8 schema. Optimizuota **3b** redukcijos reakcija

Optimizuota karbonilo grupės redukcija buvo vykdyta ir su junginiu **3c** (9 schema). Reakcija atlikta kambario temperatūroje, kaip rūgštį naudojant TFA. Naudotas reduktorius ir jo kiekis – NaBH_3CN , 3,5 ekvivalento. Redukcija vykdyta 72 val., reakcijos mišinys ekstrahuotas su EA, surinkta organinė fazė koncentruota rotaciniu garintuvu. Gauta alyva gryninta kolonėlinės chromatografijos būdu, gradientiškai eliuuojant skirtingo santykio Tol:EA mišiniais: 10:1, 6:1 ir 3:1. Užrašius išgryninto junginio ^1H BMR spektrą buvo matoma, kad tikslinis junginys **6c** nebuvo gautas.

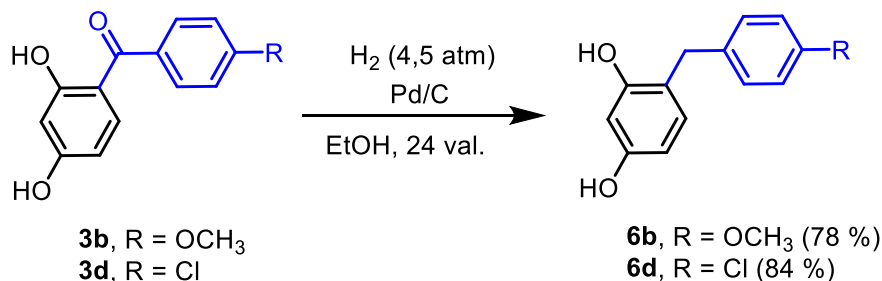


9 schema. Dيارilketono **3c** redukcija

1 lentelė. Diarilketonų redukcijos sąlygų optimizavimas.

Nr.	Ketonas	NaBH ₃ CN	Rūgštis	Temp.	Tirpiklis	Redukcijos trukmė	Produktas	Išeiga
1	3a	3 ekv.	HCl	k.t.	MeOH	24 val.	6a	56 %
2	3b	3 ekv.	HCl	k.t.	MeOH	24 val.	–	–
3	3b	3,5 ekv.	HCl	k.t.	MeOH	48 val.	–	–
4	3b	3,5 ekv.	TFA	k.t.	MeOH	72 val.	6b	33 %
5	3c	3,5 ekv.	TFA	k.t.	MeOH	72 val.	–	–

Dėl mažų produktų išeigų, buvo nuspręsta taikyti kitą redukcijos metodiką. Su junginiais **3b** ir **3d** buvo atliktas katalizinis karbonilo grupės hidrinimas vandenilio dujomis, kaip katalizatorių naudojant paladį ant aktyvintos anglies (toliau – Pd/C) (10 schema). Redukcija vykdyta kambario temperatūroje 24 val., 4,5 atm slėgyje. Reakcijai naudotas tirpiklis – etanolis (toliau – EtOH). Po 24 val., taikant TLC, buvo stebima nepilna junginių **3b** ir **3d** konversija į tikslinius produktus. Dėl šios priežasties, reakcija buvo vykdyta dar 24 val. Praėjus 48 val., reakcijos tirpalas nuo Pd/C atskirtas filtracijos būdu, Pd/C praplauant distiliuotu EtOH. Surinktas filtratas koncentruotas rotaciniu garintuvu. Tikslinis junginys **6b** iš susiformavusių kristalų išskirtas kristalizacijos būdu, naudojant Tol, o **6d** – išgrynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, taikant gradientinę eliuciją skirtingo santykio Tol:EA mišiniais (8:1, 6:1 ir 3:1). Gauti tiksliniai produktai **6b** ir **6d** su atitinkamomis 78 % ir 84 % išeigomis.

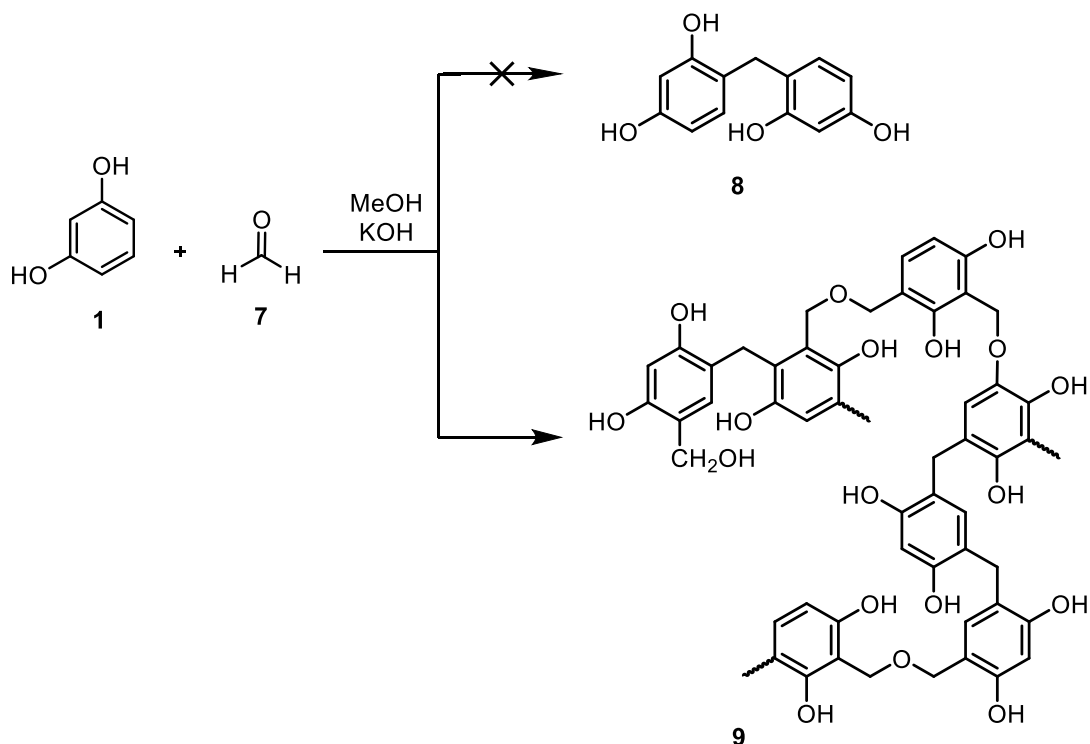


10 schema. Junginių **3b** ir **3d** katalizinis hidrinimas

2.4. 4,4'-metilenbis(benzen-1,3-diolio) sintezė

Dėl sudėtingos **3a-d** junginių redukcijos, buvo bandoma susintetinti simetrinį 4,4'-metilenbis(benzen-1,3-diolį) remiantis literatūroje nurodyta metodika [77]. Pagal metodiką, rezorcinolis yra veikiamas MeOH, KOH ir formalinu (40%) azoto dujų aplinkoje, nenaudojant benzenkarboksirūgščių analogų. Taikant šią reakciją, metileno tiltelis tarp dviejų aromatinių žiedų yra įvedamas iš karto, netaikant papildomos karbonilo grupės redukcijos.

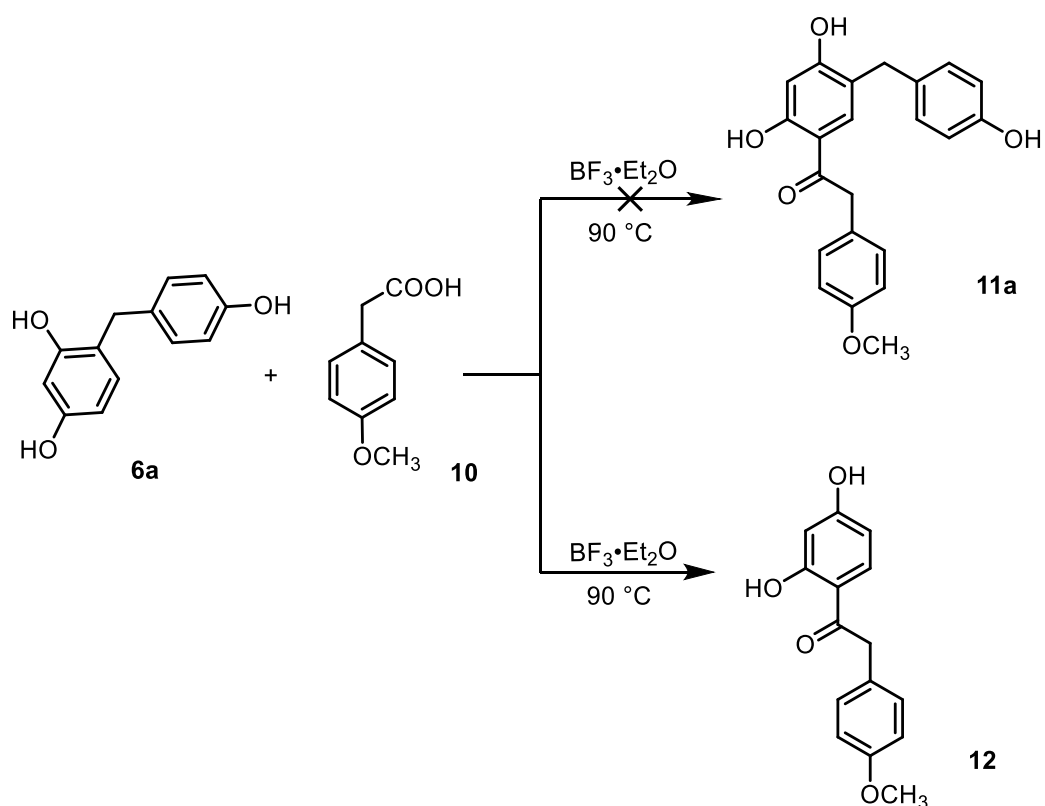
Rezorcinolis (25 mmol) ir kristalinis KOH (55 mmol) buvo tirpinti MeOH (15 mL), kolbutę įstačius į smėlio vonelę. Tačiau, pilant formalino tirpalą (7,5 mL) į reakcijos mišinį, jis staigiai užvirė ir susidarė tamsiai raudonos nuosėdos (11 schema). Numanoma nuosėdų kilmė – rezorcinolio ir formaldehido suformuotas polimeras **9** dėl bazinių reakcijos sąlygų. Dėl vykstančios polimerizacijos, reakcija daugiau nebuvo kartota.



11 schema. Simetrinio 4,4'-metilenbis(benzen-1,3-diolio) sintezė iš rezorcinolio ir numanomo polimero susidarymas

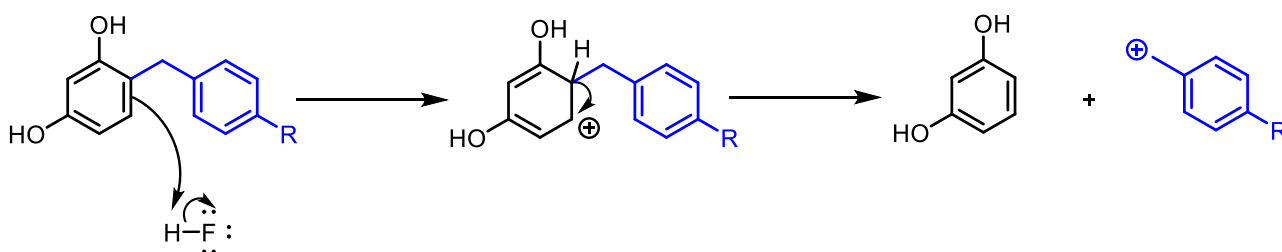
2.5. 1-(5-benzil-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono sintezė

Siekiant gauti tarpinius junginius **11a**, **11b** ir **11d** toliau buvo atliktas redukcijos metu gautų 4-benzilbenzen-1,3-diolių **6a**, **6b** ir **6d** acilinimas. Šios reakcijos tikslas – į **6**-tų junginių struktūroje esantį rezorcinolį įvesti 4-metoksifenilacto rūgšties fragmentą, iš kurios vėliau būtų formuojamas tiadiazolo žiedas taikant Hurd-Mori ciklizaciją. Reakcija pirmiausia vykdyta su junginiu **6a**, ją paveikus 4-metoksifenilacto rūgštimi. Reakcijai naudotas katalizatorius – BF_3OEt_2 . Acilinimas vykdytas 10 val. 90°C temperatūroje. Po 10 val. reakcijos mišinys neutralizuotas vandeniniu NaOAc tirpalu (10 %) ir maišytas dar 2 val. kambario temperatūroje. Mišinys ekstrahuotas su EA, surinkta organinė fazė koncentruota rotaciniu garintuvu. Susidariusi alyva gryninta kolonėlinės chromatografijos būdu, kaip mobiliąją fazę naudojant Tol:EA mišinius, santykiais 8:1, 6:1 ir 3:1. Užrašius išgryninto junginio ^1H bei ^{13}C BMR spektrus buvo nustatyta, kad gautas junginys **12** nėra tikslinis reakcijos produktas, o benzilo fragmento netekęs analogas (12 schema).



12 schema. Debenzilinto analogo **12** susidarymas

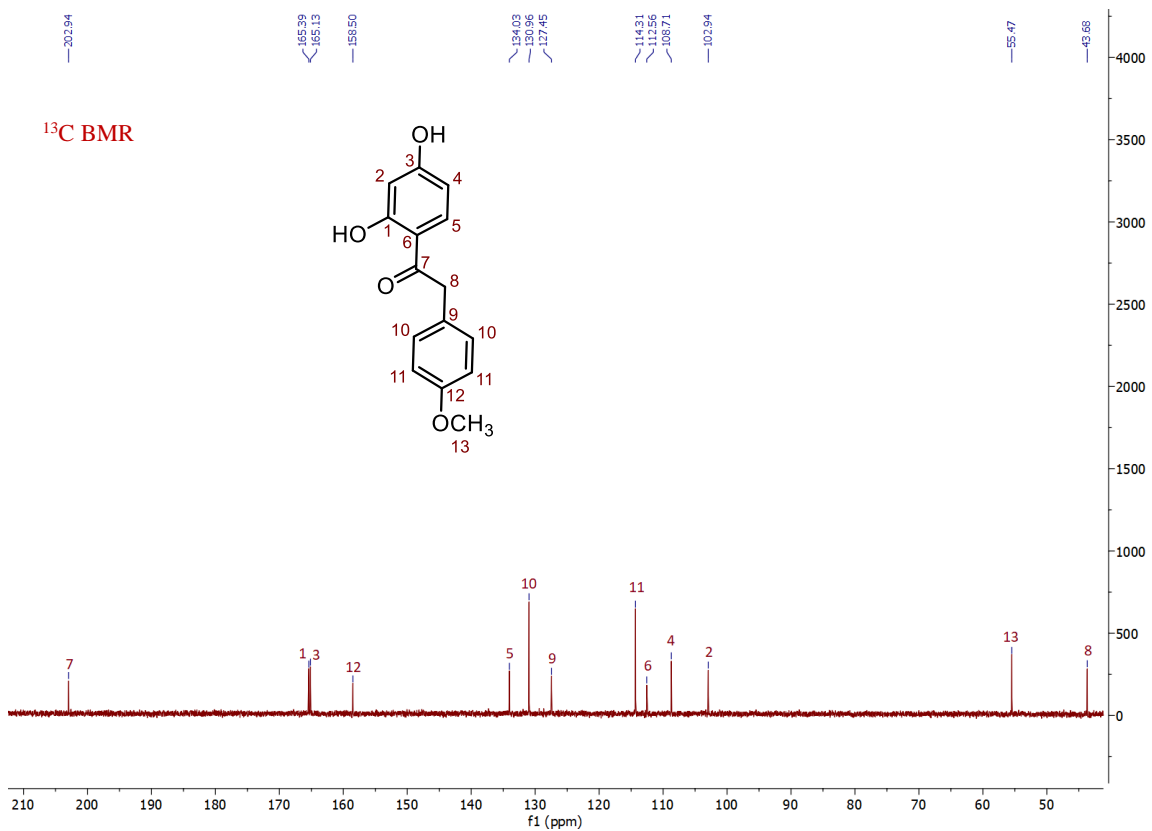
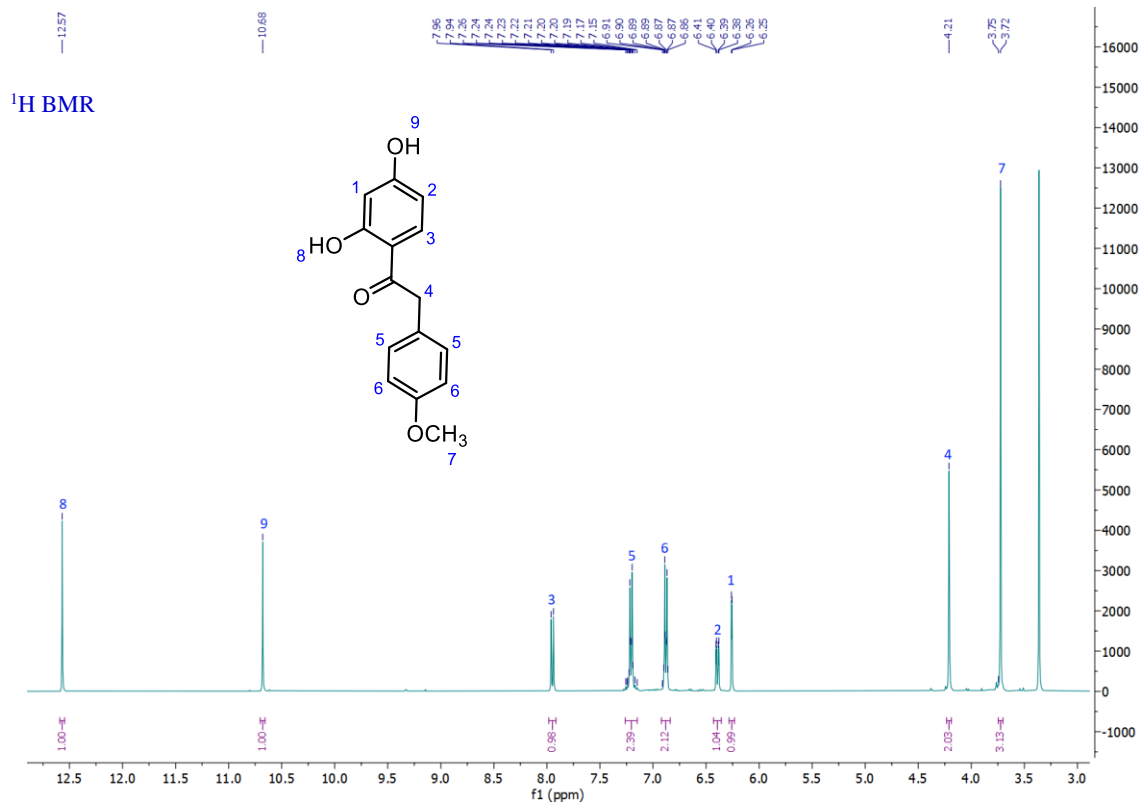
Vykdamt antrą acilinimo reakciją, nebuvo įvertinta, kad junginių struktūroje esanti benzilo grupė gali nuskilti. Dėl šios priežasties, literatūroje buvo ieškoma informacija, susijusi su C-debenzilinimu, tačiau buvo aptikti tik O-, S- ir N-debenzilinimo mechanizmai. Neradus duomenų, susijusių su šiuo reiškiniu, buvo iškelta hipotezė, kad tokį reakcijos produkto susidarymą galėjo lemti atvirkštinis Friedel-Crafts alkilimas, aprašytas šaltinyje [78]. Remiantis šaltiniu manoma, kad benzilo grupė pašalinama iš aromatinio žiedo dėl aukštos temperatūros ir protonų šaltinio, t.y. reakcijoje naudojamos Luiso rūgšties. Acilinimo metu, dėl vykstančios Luiso rūgšties hidrolizės susiformuoja HF, kuri yra protonų (H⁺) donoras. Atsiradus protonų šaltiniui, rezorcinolio žiede esantis π-ryšys elgiasi kaip nukleofilas, atakuojantis HF protoną. Įvykus protono prisijungimui prie aromatinio žiedo, nutrūksta anglies-anglies ryšys ir rezorcinolis elgiasi kaip nueinanti grupė (13 schema).



13 schema. Numanomas 4-benzilbenzen-1,3-diolio debenzilinimo mechanizmas

Nuskilus benzilo grupei, toliau vyksta BF₃OEt₂ katalizuojamas aromatinio žiedo elektrofilinis pakeitimas, kurio metu į rezorcinolio *para* padėtį yra įvedama 4-metoksifenilacto rūgštis, tokiu būdu gaunant 1-(2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanoną **12**.

Iškeltos hipotezės patvirtinimui, reakcija analogiškomis sąlygomis buvo atlikta su junginiais **6b** ir **6d**. Po acilinimo išgryninus gautus produktus, iš jų ¹H bei ¹³C BMR spektrų (2 pav.) nustatyta, kad reakcijos metu vėl susidarė analogas **12**. Dėl stebimo debenzilinto junginio **12** susiformavimo vietoje C-acilintų produktų **11a**, **11b** ir **11d** antroje acilinimo reakcijoje, taip pat dėl laiko stokos, tolimesnė tikslinių junginių sintezė negalėjo būti vykdoma.



2 pav. Debenzilinto analogo 12 ¹H ir ¹³C BMR spektrai

3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Sintezės metu naudoti tirpikliai ir reagentai

Junginių sintezėms naudoti reagentai įsigyti iš Honeywell Fluka™ (Vokietija), Fluorochem (Didžioji Britanija) ir Sigma – Aldrich (Vokietija).

Įvairiose reakcijose naudoti tirpikliai: toluenas, etilacetatas, metanolis, etanolis, boro trifluorido eteratas buvo įsigyti iš Eurochemicals (Lietuva) ir Honeywell Riedelde-Haen™ (Vokietija).

3.2. Naudoti gryninimo metodai

Atliekant junginių sintezę, pirminis jų tapatumas ir cheminių reakcijų progresas vertintas taikant plonasluoksnės chromatografijos metodą. Naudotos TLC Silica gel 60 F254 Merck aliuminio plokštelės, kurios buvo stebimos ultravioletinėje (UV, $\lambda=254$ arba 365 nm) šviesoje arba ryškinamos vanilino ryškiklio pagalba.

Junginių atskyrimui nuo šalutinių reakcijos produktų buvo taikyta skysčių – skysčių ekstrakcija, kuri pagrįsta medžiagos pasiskirstymu tarp dviejų tarpusavyje nesimaišančių skysčių. Paprastai, viena fazė yra vanduo, kita – organinis tirpiklis, pvz., EA, DCM. Po ekstrakcijos gautos medžiagos grynintos dviem metodais: **A** ir **B**.

Metodas A: kolonėlinės chromatografijos būdas, taikant gradientinę eliuciją skirtingų santykių Tol:EA mišiniais (20:1, 10:1, 8:1, 6:1 ir 3:1). Kolonėlės buvo pildomos Silica gel 60 A (0,035–0,070 mm), taikant tiek sausą, tiek šlapią užpildymą.

Metodas B: kristalizacijos būdas, kristalus tirpinat karštame Tol ir jį atšaldant ledo vonelėje.

3.3. Naudota aparatūra

Junginių struktūros nustatymui ir savybių vertinimui taikyta branduolių magnetinio rezonanso (BMR) ir infraraudonųjų spindulių (IR) spektroskopija bei nustatyta junginių lydymosi temperatūra. BMR spektroskopijos metu buvo rašomi ^1H ir ^{13}C spektrai BRUKER ASCEND spektrometru. Mėginiai ruošti tirpinant analizuojamą medžiagą (10,0 – 20,0 mg) 4,5 mL deuteruotame dimetilsulfoksido (DMSO-*d*₆) cilindro formos ampulšėse. ^1H spektrai užrašyti 400 MHz dažnyje, o ^{13}C spektrai užrašyti 100 MHz dažnyje vidiniu standartu naudojant deuteruotų tirpiklių likutines vertes

(DMSO-*d*₆). BMR ¹H ir ¹³C spektrų aprašymuose cheminiai poslinkiai yra pateikti milijoninėmis dalimis δ skalėje. Naudojami žymėjimai: s – singletas, d – dubletas, dd – dubletų dubletas, dt – dubletų tripletas, t – tripletas ir m – multipletas.

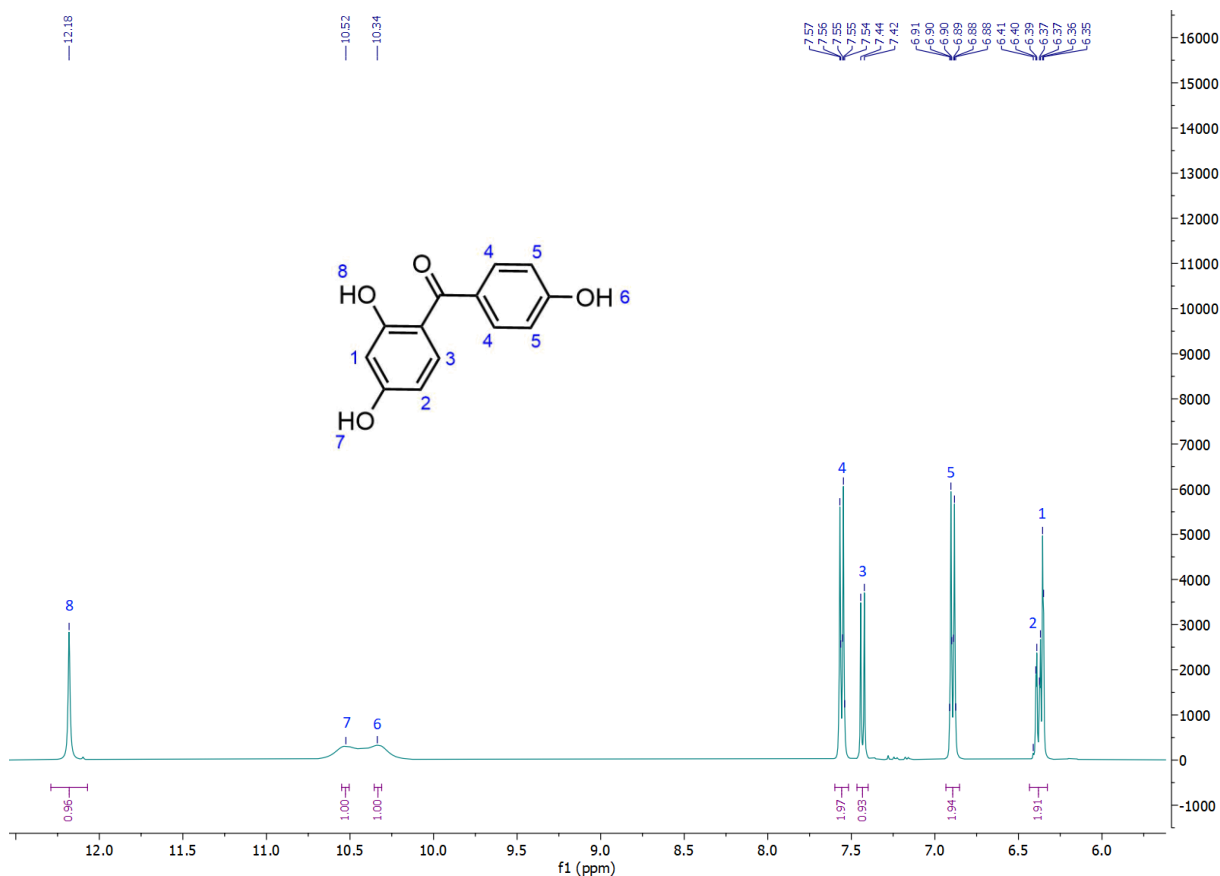
IR spektrai užrašyti naudojant PERKIN-ELMER 1000 spektrometrą su UATR priedu, mėginį užnešus ant prietaiso deimantinės akutės. Naudojamas dydis – bangos skaičius ν (cm⁻¹), kuris yra proporcingas bangos dažniui. Masių spektrai užrašyti Agilent LC/MSD TOF skrydžio laiko spektrometru. Junginių lydymosi temperatūros nustatytos atviruose kapiliaruose prietaisu Stuart SMP10.

3.4. Junginių struktūrinė analizė

3.4.1. Branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija

Susintetintų junginių organinės struktūros po atliktų reakcijų buvo nustatytos taikant ¹H BMR spektroskopijos metodą, kuris yra pagrįstas BMR aktyviųjų branduolių (pvz., ¹H arba ¹³C) elektromagnetinės spinduliuotės sugertimi izotopui būdingu dažniu. ¹H BMR analizėje, branduolių rezonavimas sukiamas veikiant 400 MHz magnetiniam laukui. Užregistruotame ¹H spektre, yra stebimos charakteringų funkcinių grupių, prie kurių yra rezonuojantis protonas, smailės su jiemis būdingais cheminiais poslinkiais. Taip pat yra stebimas protonų generuojamų signalų skilimas, kuris atsiranda dėl šalia esančių kaimyninių branduolių sukinių sąveikos. Šiame spektre yra registruojami visi junginyje esantys protonai, tačiau svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad ekvivalentiški vandenilio atomai duoda tik vieną signalą, kurio intensyvumas priklauso nuo jų generuojančių branduolių skaičiaus.

Žemiau pavaizduotame ¹H spektre (3 pav.) yra išanalizuotas susintetintas junginys **3a**, kuriame yra užfiksuoti visi šios molekulės struktūrai galimi protonų virpesiai: δ 12.18 (s, 1H, OH), 10.52 (s, 1H, OH), 10.34 (s, 1H, OH), 7.60 – 7.52 (m, 2H, ArH), 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 6.93 – 6.85 (m, 2H, ArH), 6.43 – 6.33 (m, 2H, ArH).



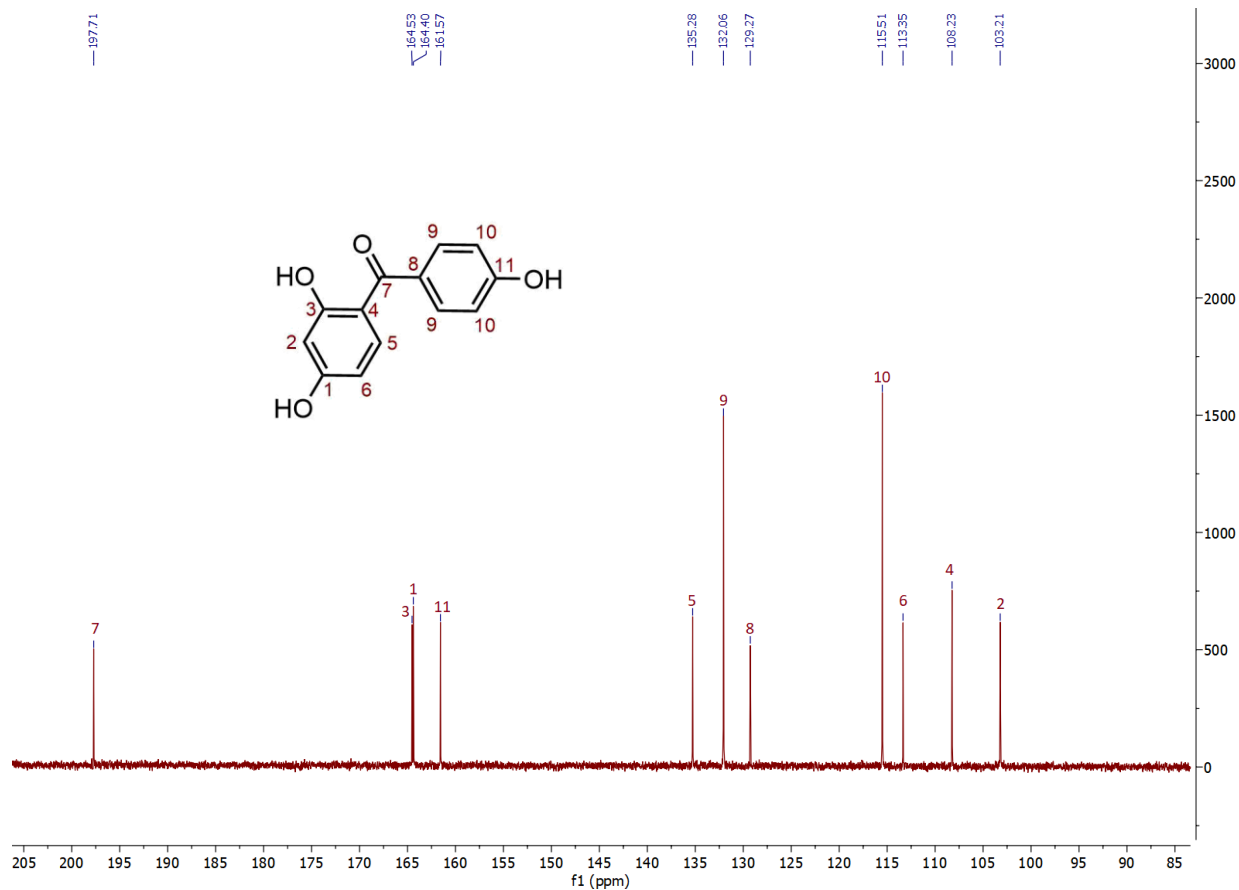
3 pav. Diarilketono **3a** ^1H BMR spektras

Pavyzdžiui, suintegravus protonų signalus matoma, kad junginio struktūroje yra fiksuojami trijų hidroksilinių grupių vandenilio atomai, tačiau visi jie turi skirtingus cheminius poslinkius. Tokius poslinkių skirtumus lemia nevienoda protonų cheminė aplinka – OH grupės vandenilio, pažymėto 8 numeriu, poslinkis stebimas ties 12,18 ppm dėl jo sąveikavimo su netoliese esančiu karbonilinės grupės O atomu per vandenilinį ryšį. Kitos dvi hidroksilinės grupės turi beveik vienodus poslinkius dėl panašios cheminės aplinkos. Spektre taip pat yra stebimi signalų skilimai, pavyzdžiui, protono, pažymėto 3 numeriu, signalas skyla į dubletą, kadangi šalia yra kaimyninis vandenilis, skaldantis signalą pagal N+1 taisyklę.

Susintetintų junginių struktūros nustatymui, kaip pagalbinė priemonė, taip pat buvo taikyta ^{13}C BMR. ^{13}C BMR analizėje, yra detektuojamas tik ^{13}C izotopas ir jo rezonavimas yra sukliamas mėginį paveikiant 100 MHz magnetiniu lauku. Šis spektroskopinis metodas yra naudojamas informacijos gavimui apie organiniame junginyje esantį anglies atomų skeletą, todėl spektruose

galima stebėti funkcines grupes, kurios neregistruojamos ^1H BMR analizėje dėl protonų trūkumo. Kadangi spektruose fiksuojamos tik nevienodos anglis, stebimų signalų skaičių spektre lemia organinio junginio skeleto simetrija.

Žemiau pavaizduotame ^{13}C spektre (4 pav.) yra išanalizuotas susintetintas junginys **3a**, kuriame stebimos visos šio diarilketono struktūroje esančios nesimetrinės anglis: δ 197.71, 164.53, 164.40, 161.57, 135.28, 132.06, 129.27, 115.51, 113.35, 108.23, 103.21.



4 pav. Diarilketono **3a** ^{13}C BMR spektras

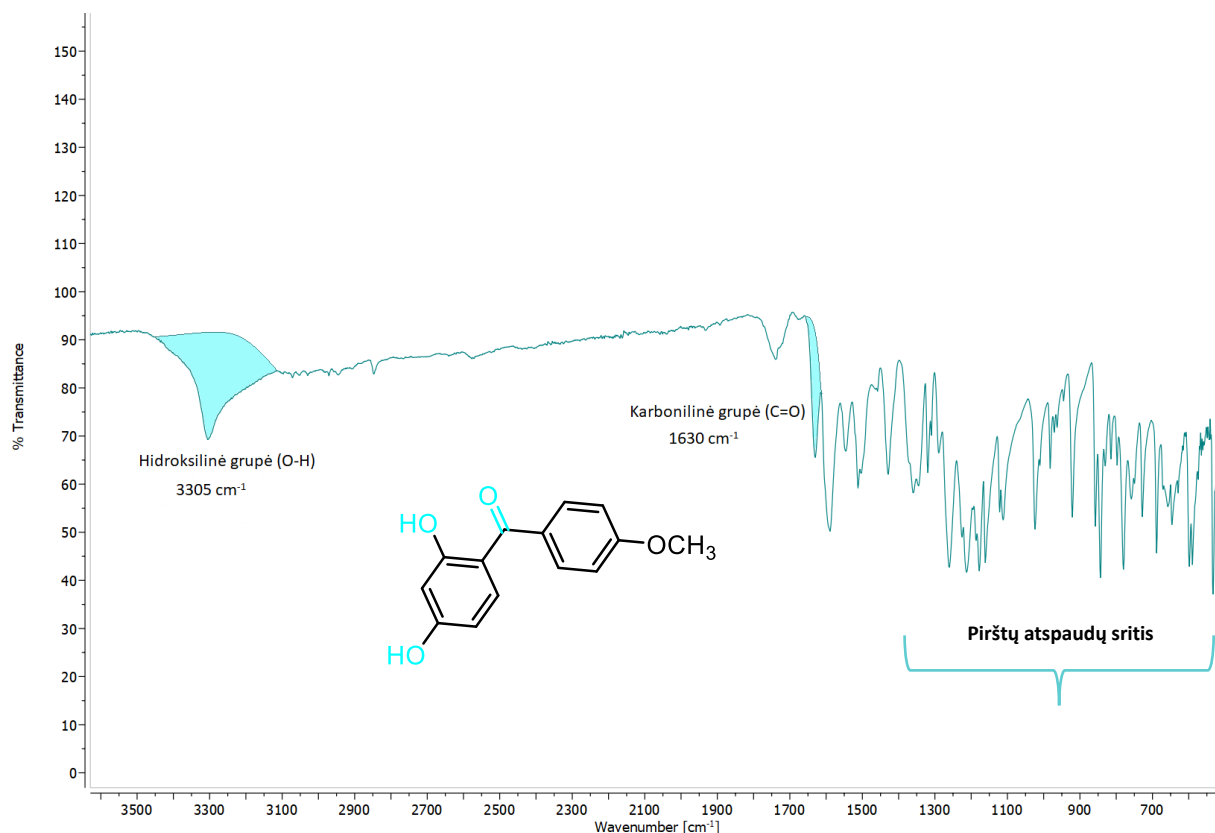
Pavyzdžiui, ^{13}C spektre matoma **3a** junginio struktūroje esanti karbonilo grupė ties 197,71 ppm, kuri nefiksuojama ^1H BMR analizėje, ir stebima 11 anglių vietoje 13 dėl *para*-pakeisto aromatinio žiedo simetrijos. Taikant ^1H ir ^{13}C BMR spektrų kombinaciją, kurie vienas kitą papildo, buvo nustatytos visų susintetintų junginių struktūros.

3.4.2. Infraraudonųjų spindulių spektroskopija

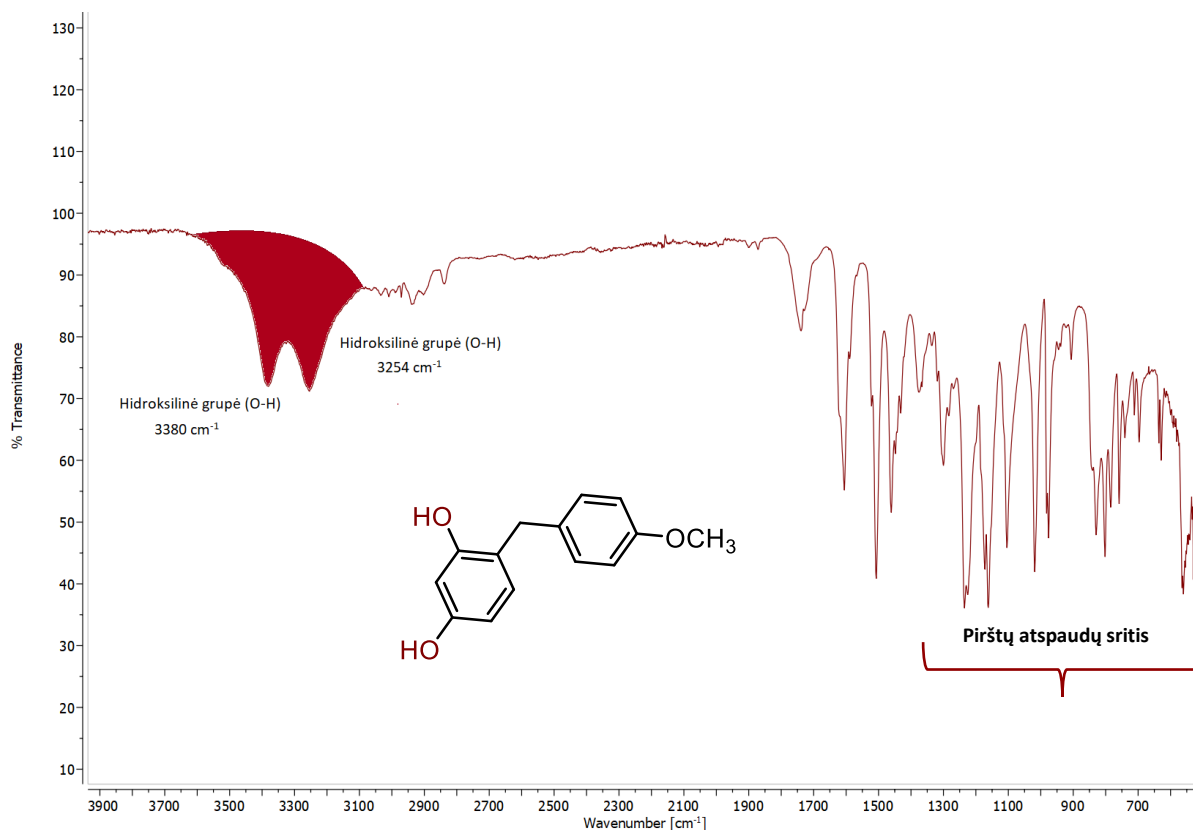
Susintetintų junginių struktūrinis tapatumas buvo įrodytas taikant infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodą. IR spektroskopija yra paremta elektromagnetine spinduliuote, kuri gali pakeisti junginių struktūroje esančių kovalentinių ryšių vibracines savybes. Dėl šios priežasties, spektruose stebimos smailės gaunamos registruojant molekulės vibracinius, t.y. dipolio momento, pokyčius.

Užrašytą IR spektrą galima suskirstyti į dvi pagrindines zonas: funkcinių grupių sritį (4000 – 1500 cm^{-1}), kurioje funkcinės grupės, nesvarbu kokios rūšies molekulėje jos yra, sugeria tam tikro dažnio spinduliuotę ir pirštų atspaudų sritį (1450 – 500 cm^{-1}). Paprastai, pirštų atspaudų srityje susidaro įvairių atomų ir grupių sugerties juostų persidengimas, kas apsunkina individualių smailių nustatymą, tačiau ši sritis yra unikali molekulės savybė, padedanti ją atskirti nuo kitų organinių junginių [79].

Žemiau pavaizduoti junginių diarilketono **3b** (5 pav.) ir 4-benzilbenzen-1,3-diolio **6b** (6 pav.) IR spektrai, kuriuose matomi jų struktūroje esančių funkcinių grupių charakteringos smailės.



5 pav. Junginio **3b** IR spektras



6 pav. Junginio **6b** IR spektras

Iš pateiktų spektrų matoma, kad abu junginiai savo struktūroje turi hidroksilines grupes, kurių valentiniai virpesiai vyksta dalyvaujant O-H protonui ir yra fiksuojami 3254 – 3380 cm^{-1} srityje (**3b** OH, 3305 cm^{-1} , 69,184 proc. T; **6b** OH, 3380 cm^{-1} , 72,026 proc. T, OH, 3254 cm^{-1} , 71,336 proc. T). Tačiau, junginio **3b** spektre taip pat matoma charakteringa karbonilinės grupės C=O ryšio smailė (1630 cm^{-1} , 65,095 proc., T), kuri nebefiksuojama metileno tiltelį turinčio 4-benzilbenzen-1,3-diolio **6b** spektre. Remiantis tokiu analizės principu, buvo nustatytos kitų susintetintų junginių struktūroje esančios funkcinės grupės.

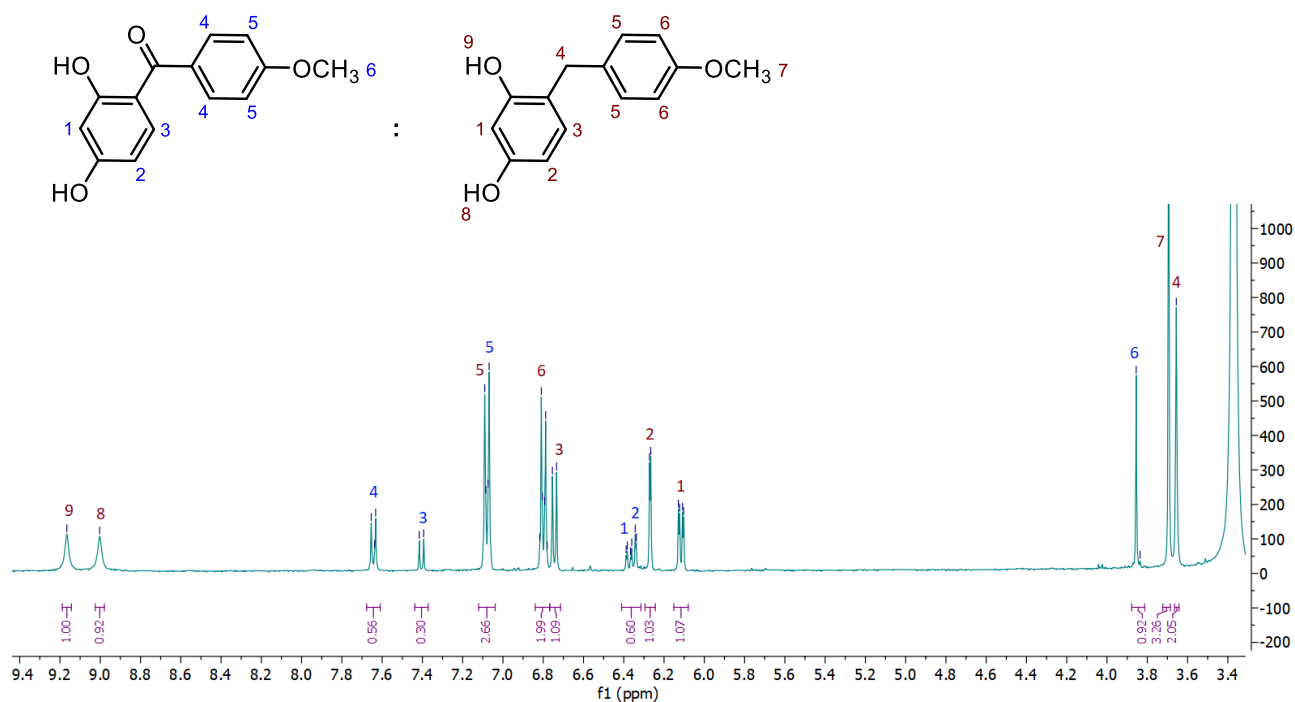
3.5. Redukcijos sąlygų optimizavimas

Po atliktos **3a-d** junginių sintezės taikant *para*-selektyvią fenolių acilinimo reakciją, buvo bandyta atlikti gautų ketonų redukciją remiantis Gribble diarilketonų redukcijos metodika [80].

Šaltinyje nurodoma, kad tikslinių redukcijos produktų išeiga siekė 73 – 94%, kai buvo naudojama NaBH₃CN/rūgštis pora ir reakcija buvo vykdoma kambario temperatūroje.

Taikant šią metodiką, buvo gautas 4-benzilbenzen-1,3-diolis **6a** su atitinkama 56 % išeiga, tačiau vykdant reakciją su junginiu **3b** analogiškomis sąlygomis, nebuvo stebima diarilketono konversija į tikslinį junginį **6b**. Dėl šios priežasties, buvo bandoma optimizuoti redukcijos sąlygas keičiant reduktoriaus kiekį, naudojamą rūgštį, reakcijos vykdymo trukmę.

Reakcijos optimizavimo metu buvo pastebėta, kad junginio **3b** karbonilo grupės redukcija geriausiai vyko šiomis sąlygomis: 1) kambario temperatūroje, 2) reakciją vykdant 72 val., 3) naudojant TFA vietoj HCl ir 4) pridėjus 3,5 ekvivalento NaBH₃CN. Tačiau, po sąlygų optimizavimo, vis tiek buvo stebėta maža junginio **3b** konversija į produktą **6b** (išeiga 33 %), kurio nepavyko pilnai išgryninti – ¹H BMR spektruose buvo matomi pradinio junginio pėdsakai (7 pav.). Optimizuota Gribble diarilketonų redukcija taip pat buvo atlikta su junginiu **3c**, tačiau nebuvo gautas tikslinis junginys **6c**.

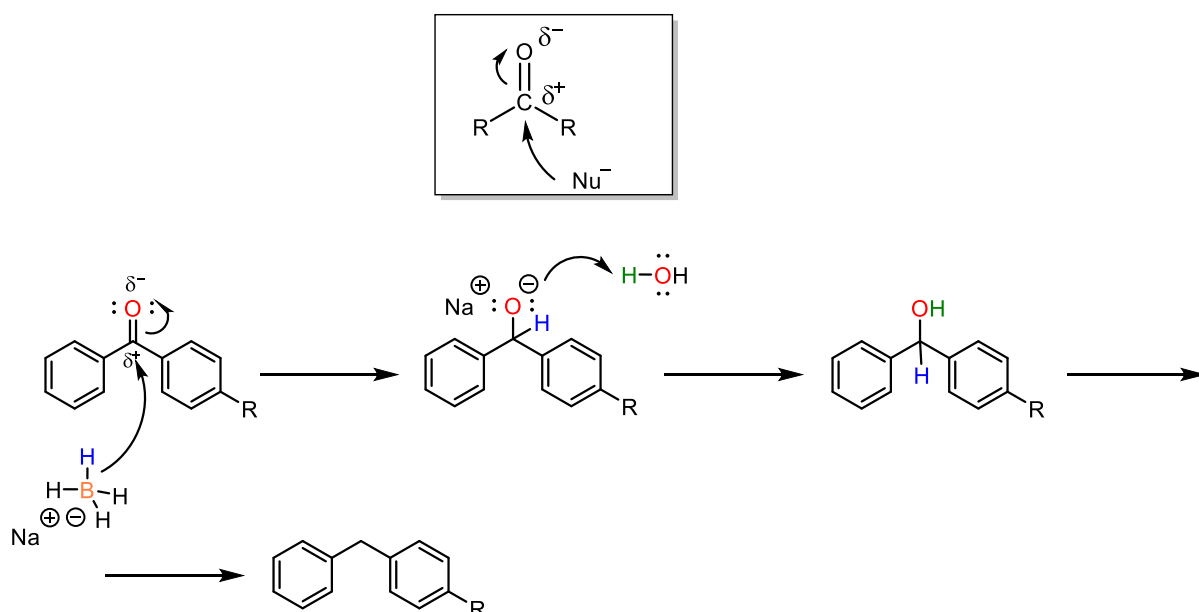


7 pav. Junginių **3b** ir **6b** mišinio ¹H BMR spektras

Apsunkintą diarilketonų redukciją, taikant NaBH₃CN/rūgštis porą, būtų galima paaiškinti per nukleofilinio prijungimo mechanizmą. Gribble redukcijos reakcijoje, nukleofilo šaltinis yra NaBH₃CN – iš jo susidaro nukleofilinėmis savybėmis pasižymintis hidridas (H⁻).

Ketonų struktūroje esančios karbonilinės grupės π -ryšys yra stipriai poliarizuotas dėl skirtingo C ir O atomų elektroneigiamumo. Dėl šios priežasties, karbonilo anglies atomas įgyja dalinai teigiamą krūvį δ^+ , t.y. atsiranda elektronų deficitas, o deguonies atomas – dalinai neigiamą krūvį δ^- (14 schema). Dalinai teigiamą krūvį ant C atomo gali padidinti reakcijoje naudojama rūgštis, kuri protonuoja deguonies atomą. Protoną prisijungusi deguonis įgyja teigiamą krūvį, dėl ko stipriau pradeda link savęs traukti π -ryšio elektronus, tokiu būdu padidindama dalinai teigiamą krūvį ant anglies atomo. Kadangi C atomas turi elektronų deficitą, jis tampa jautrus nukleofilo atakai, kurios lengvumas priklauso nuo dviejų pagrindinių faktorių: 1) erdvinų trukdžių ir 2) C atomo dalinio teigiamo krūvio dydžio.

Diarilketonuose, nukleofilui yra sunkiau atakuoti karbonilo grupės anglį, dėl ją supančių dviejų aromatinių žiedų. Ataką taip pat gali apsunkinti ir junginių struktūroje esantys donoriniai pakaitai. Donoriniai pakaitai, tokie kaip -CH₃, -OH, -OCH₃ aktyvuoja benzeno žiedą, į jį paduodami elektronų porą, kuri migruoja tarp žiedų per rezonansinį efektą, taip sumažindami dalinai teigiamą krūvį ant karbonilinio C atomo. Dėl šios priežasties, sunkiau susidaro tarpinis alkoksidas, reikalingas karbonilo grupės redukcijai, o tai lemia mažas produktų išeigas.



14 schema. Karbonilinės grupės π -ryšio poliarizacija ir numanomas Gribble diarilketonų, su vienu donoriniu pakaitu, redukcijos mechanizmas

Negavus tikslių 4-benzilbenzen-1,3-diolių, remiantis [81] šaltiniu, toliau buvo vykdytas karbonilo grupės hidrinimas H₂ dujomis, kaip katalizatorių naudojant Pd/C. Šaltinyje nurodyta, kad panašios struktūros produktų išeigos siekė 99 %. Taikant šį metodą, buvo gauti du 4-benzilbenzen-1,3-dioliai **6b** ir **6d**, su atitinkamomis 78 % ir 84 % išeigomis. Didesnes produktų išeigas galima paaiškinti tuo, kad karbonilinės grupės redukcijai nereikalinga nukleofilinio prijungimo reakcija – taikant hidrinimą, protonų pora prijungiama prie karbonilo katalizatoriaus pagalba. Dėl to, diarilketonams, savo struktūroje turintiems kelis donorinius pakaitus, geriau taikyti katalizinį hidrinimą, o ne Gribble diarilketonų redukciją su NaBH₃CN/TFA.

3.6. Junginių sintezės bendrosios metodikos

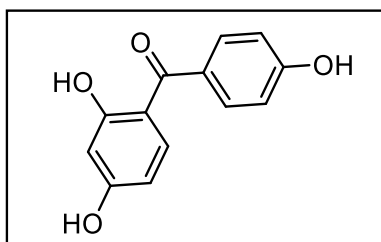
(2,4-dihidroksifenil)(fenil)metanonai (**3a**, **3b**, **3c**)

Į BF₃OEt₂ (9 mL) suberiamas komerciškai prieinamas rezorcinolis (1 ekv., 27 mmol) ir atitinkamas benzenkarboksirūgšties analogas (1 ekv., **2a-c**, 27 mmol). Reakcijos mišinys maišomas 90 °C temperatūroje 10 val., uždengus kolbutę deflegmatoriumi ir įstačius į alyvos vonelę. Po to, į atšaldytą iki kambario temperatūros mišinį, supilamas 10 % vandeninis NaOAc tirpalas (30 mL) ir paliekama maišytis dar 2 val. Mišinys ekstrahuojamas su EA (3x15 mL) ir neutralizuojamas sočiu NaHCO₃ tirpalu (3x30 mL). Organinė fazė džiovinama bevandeniu Na₂SO₄ ir koncentruojama rotaciniu garintuvu. Liekana gryninama A arba B metodu.

Metodas A: kolonėlinės chromatografijos būdas, taikant gradientinę eliuciją skirtingų santykių Tol:EA mišiniais (20:1, 10:1, 8:1, 6:1 ir 3:1).

Metodas B: kristalizacijos būdas, kristalus ištirpinus karštame Tol.

(2,4-dihidroksifenil)(4-hidroksifenil)metanonas (**3a**)



Išskirta metodu A.

Šviesiai geltoni kristalai (3,5 g, 59 %), lyd. t. 198-200 °C.

¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.18 (s, 1H, OH), 10.52 (s, 1H, OH), 10.34 (s, 1H, OH), 7.60 – 7.52 (m, 2H, ArH), 7.43 (d, *J*

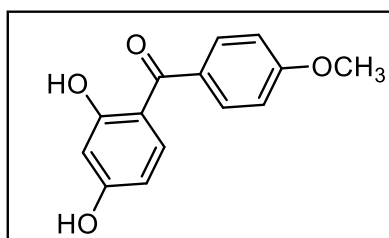
= 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.93 – 6.85 (m, 2H, ArH), 6.43 – 6.33 (m, 2H, ArH).

¹³C BMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.71, 164.53, 164.40, 161.57, 135.28, 132.06, 129.27, 115.51, 113.35, 108.23, 103.21.

IR spektras: ν_{\max} = 3291 cm⁻¹ (OH); 1626 cm⁻¹ (C=O)

HRMS (ESI): C₁₃H₁₀O₄ apskaičiuota 231,0652, rasta 231,0647 [M+H]

(2,4-dihidroksifenil)(4-metoksifenil)metanonas (3b)



Išskirta metodu B.

Geltoni kristalai (4,42 g, 67 %), lyd. t. 160-162 °C.

¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.09 (s, 1H, OH), 10.62 (s, 1H, OH), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH),

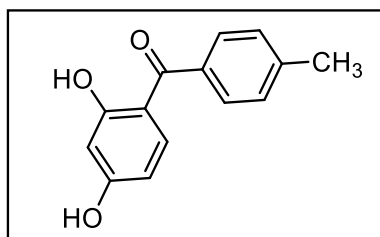
7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, ArH), 6.42 – 6.33 (m, 2H, ArH), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.70, 164.70, 164.34, 162.65, 135.30, 131.72, 130.82, 114.18, 113.41, 108.38, 103.22, 55.96.

IR spektras: ν_{\max} = 3305 cm⁻¹ (OH); 1630 cm⁻¹ (C=O)

HRMS (ESI): C₁₄H₁₂O₄ apskaičiuota 245,0808, rasta 245,0807 [M+H]

(2,4-dihidroksifenil)(*p*-tolil)metanonas (3c)



Išskirta metodu A.

Šviesiai rudi kristalai (1,42 g, 23 %), lyd. t. 120-122 °C.

¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.20 (s, 1H, OH), 10.71 (s, 1H, OH), 7.59 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.37 (dd, *J* = 15.2, 8.3 Hz, 3H, ArH),

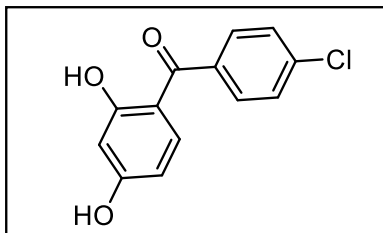
6.44 – 6.33 (m, 2H, ArH), 2.40 (s, 3H, CH₃).

¹³C BMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 198.92, 165.11, 164.79, 142.31, 135.75, 135.65, 129.37 (d, *J* = 2.1 Hz), 113.12, 108.55, 103.20, 21.56.

IR spektrai: ν_{\max} = 3286 cm⁻¹ (OH); 1627 cm⁻¹ (C=O)

HRMS (ESI): C₁₄H₁₂O₃ apskaičiuota 229,0859, rasta 229,0856 [M+H]

(4-chlorofenil)(2,4-dihidroksifenil)metanonas (3d)



Į SOCl₂ (15 mL) suberiami 4-chlorbenzenkarboksirūgšties kristalai (1 ekv., **2d** 27 mmol). Reakcijos mišinys maišomas 90 °C temperatūroje 3 val., kolbutę uždengus kondensatoriumi iki mišinio išskaidrėjimo. Gavus skaidrą mišinį, SOCl₂ perteklius nudistiliuojamas vakuumu.

Į gauto anhidrido mišinį suberiamas rezorcinolis (1 ekv., 27 mmol) ir sušvirksčiamas BF₃OEt₂ (15 mL). Reakcijos mišinys maišomas 90 °C temperatūroje 10 val., kolbutę su deflegmatoriumi įstačius į alyvos vonelę. Po to, į atšaldytą iki kambario temperatūros mišinį, supilamas 10 % vandeninis NaOAc tirpalas (23 mL) ir paliekama maišytis dar 2 val. Mišinys ekstrahuojamas su EA (3x15 mL). Organinė fazė džiovinama bevandeniu Na₂SO₄ ir koncentruojama rotaciniu garintuvu. Liekana gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu, taikant gradientinę eliuciją (Tol:EA 49:1, 20:1). Gauta 1,6 g (18 %) baltų kristalų, kurių lyd. t. 148-150 °C.

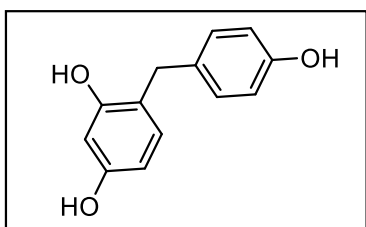
¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.92 (s, 1H, OH), 10.74 (s, 1H, OH), 7.69 – 7.57 (m, 4H, ArH), 7.36 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 6.44 – 6.34 (m, 2H, ArH).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.58, 165.31, 164.42, 137.29, 136.88, 135.49, 131.05, 128.95, 113.26, 108.77, 103.22.

IR spektrai: ν_{max} = 3285 cm⁻¹ (OH); 1628 cm⁻¹ (C=O)

HRMS (ESI): C₁₃H₉ClO₃ apskaičiuota 249,0313, rasta 249,0309 [M+H]

4-(4-hidroksibenzil)benzen-1,3-diolis (6a)



Į diarilketono (1 ekv., **3a** 16,5 mmol) MeOH (40 mL) tirpalą suberiamas reduktorius NaBH₃CN (3 ekv.) ir indikatorius metiloranžas (10 mg). Į reakcijos mišinį, lašintuvo pagalba, sulašinamas 1M vandeninis HCl tirpalas (70 mL) tokiu greičiu, kad būtų palaikoma pastovi rūgštinė terpė. Reakcija paliekama maišytis 24 val., kambario temperatūroje. Po to, mišinys skiedžiamas distiliuotu H₂O (40 mL) ir ekstrahuojamas EA (3x15 mL). Organinė fazė džiovinama bevandeniu Na₂SO₄ ir koncentruojama rotaciniu garintuvu. Gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu, taikant gradientinę eliuciją (Tol:EA 6:1 ir 3:1). Gauta 2,34 g (56 %) šviesiai geltonų kristalų, kurių lyd. t. 133-135 °C.

¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (s, 1H, OH), 8.98 (s, 1H, OH), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, ArH), 6.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.67 – 6.60 (m, 2H, ArH), 6.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.13 (dt, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, ArH), 3.62 (s, 2H, CH₂).

¹³C BMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.83, 155.97, 155.56, 132.57, 130.90, 129.85, 119.12, 115.29, 106.45, 102.84, 34.20.

IR spektrai: ν_{max} = 3291 cm⁻¹ (OH)

HRMS (ESI): C₁₃H₁₂O₃ apskaičiuota 217,0859, rasta 217,0857 [M+H]

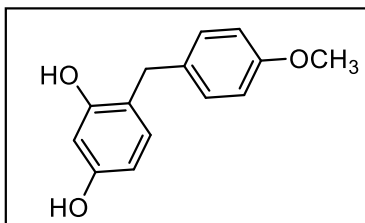
4-benzilbenzen-1,3-dioliai (6b, 6d)

Į diarilketonų (1 ekv., **3b** 4 mmol, **3d** 2,8 mmol) EtOH (20 mL) tirpalą suberiamas katalizatorius Pd/C (100 mg). Reakcijos mišinys statomas į metalinį reaktorių, kuris užpildomas H₂ dujomis iki 4,5 atm. Mišinys paliekamas maišytis kambario temperatūroje 24 val., palaikant pastovų dujų slėgį. Po 24 val., tirpalas atskiriamas nuo Pd/C filtracijos būdu, katalizatorių praplaunant distiliuotu EtOH (2x10 mL). Filtratas koncentruojamas rotaciniu garintuvu. Gauta liekana gryninama A arba B metodu.

Metodas A: kolonėlinės chromatografijos būdas, taikant gradientinę eliuciją skirtingų santykių Tol:EA mišiniais (20:1, 10:1, 8:1, 6:1 ir 3:1).

Metodas B: kristalizacijos būdas, kristalus ištirpinus karštame Tol.

4-(4-metoksibenzil)benzen-1,3-diolis (6b)



Išskirta metodu B.

Tamsiai geltoni kristalai (1,31 g, 78 %), lyd. t. 124-126 °C.

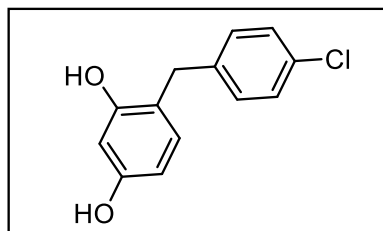
¹H BMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.15 (s, 1H, OH), 8.99 (s, 1H, OH), 7.11 – 7.04 (m, 2H, ArH), 6.84 – 6.71 (m, 3H, ArH), 6.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.12 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.69 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 2H, CH₂).

¹³C BMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.67, 156.91, 155.99, 134.39, 130.90, 129.89, 118.86, 113.96, 106.46, 102.85, 55.42, 34.19.

IR spektrai: ν_{max} = 3380 cm⁻¹ (OH); 3254 cm⁻¹ (OH)

HRMS (ESI): C₁₄H₁₄O₃ apskaičiuota 231,1016, rasta 231,1013 [M+H]

4-(4-chlorobenzil)benzen-1,3-diolis (6d)



Išskirta metodu A.

Tamsiai ruda alyva (0,6 g, 84 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.18 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, OH), 9.04 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, OH), 7.40 – 7.28 (m, 2H, ArH), 7.18 – 7.04 (m, 2H, ArH), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 6.35 – 6.27 (m, 1H, ArH), 6.20 – 6.10 (m, 1H, ArH), 3.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H, CH₂).

¹³C BMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.04, 156.08, 142.52, 131.08, 128.89 (d, *J* = 5.8 Hz), 128.50, 125.83 (d, *J* = 4.8 Hz), 118.36, 106.52, 102.92 (d, *J* = 6.6 Hz), 35.15 (d, *J* = 7.8 Hz).

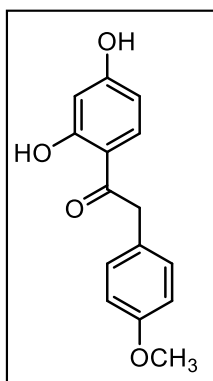
IR spektrai: ν_{max} = 3362 cm⁻¹ (OH); 3028 cm⁻¹ (OH)

HRMS (ESI): C₁₃H₁₁ClO₂ apskaičiuota 235,0520, rasta 235,0516 [M+H]

1-(5-benzil-2,4-dihidoksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanonas

Į BF_3OEt_2 (5 mL) suberiamas 4-benzilbenzen-1,3-diolis (1 ekv., **6a** 4,6 mmol, **6b** 4,7 mmol, **6d** 2,5 mmol) ir 4-metoksifenilacto rūgštis (1 ekv.). Reakcijos mišinys maišomas 90°C temperatūroje 10 val., kolbutę uždengus deflegmatoriumi. Po to, į atšaldytą iki kambario temperatūros mišinį, supilamas 10 % vandeninis NaOAc tirpalas (23 mL) ir paliekama maišytis dar 2 val. Mišinys ekstrahuojamas su EA (3x15 mL) ir neutralizuojamas sočiu NaHCO_3 tirpalu (3x30 mL). Organinė fazė džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 ir koncentruojama rotaciniu garintuvu. Liekana gryninama kolonėlinės chromatografijos būdu, taikant gradientinę eliuciją (Tol:EA 10:1, 6:1 ir 3:1).

1-(2,4-dihidoksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanonas (**12**)



Išskirta metodu A.

Tamsiai ruda alyva (0,3 g, 31 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.57 (s, 1H, OH), 10.68 (s, 1H, OH), 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, ArH), 7.26 – 7.15 (m, 2H, ArH), 6.92 – 6.84 (m, 2H, ArH), 6.39 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, ArH), 6.26 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 4.21 (s, 2H, CH_2), 3.72 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 202.94, 165.39, 165.13, 158.50, 134.03, 130.96, 127.45, 114.31, 112.56, 108.71, 102.94, 55.47, 43.68.

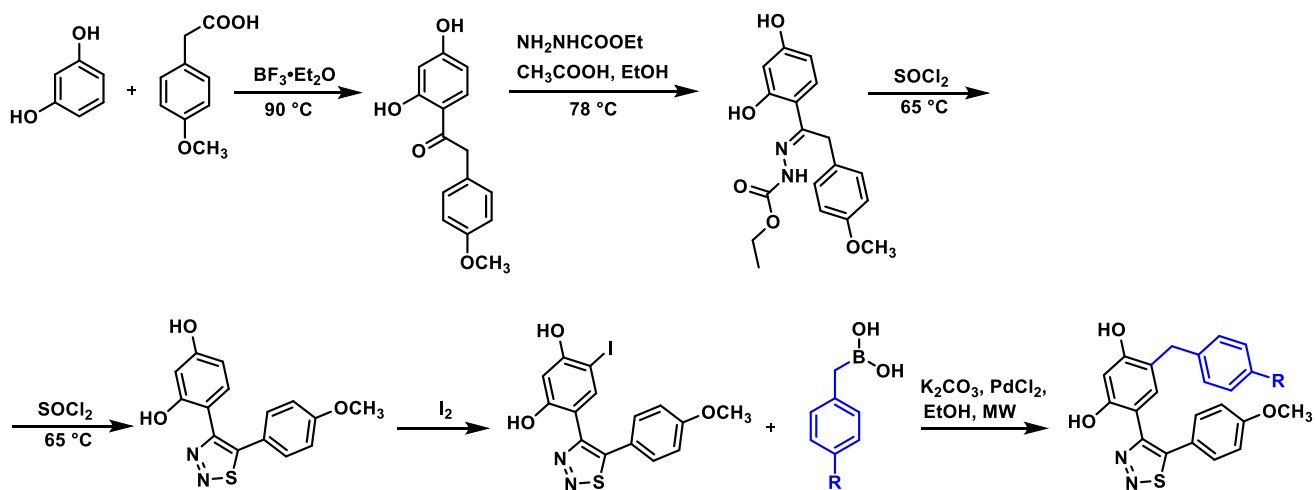
4 IŠVADOS

1. Atlikta literatūros šaltinių analizė apie junginius, pasižyminčius šaperoną Hsp90 slopinančiu aktyvumu. Analizės metu didelis dėmesys skirtas N domeno slopiklių klasei priklausantiems junginiams, jų struktūrinėms ypatybėms ir cheminėms modifikacijoms. Apžvelgti junginiai, kurie pateko į klinikinius tyrimus ir išvardintos pagrindinės priežastys, dėl kurių N domeno slopikliai negali būti taikomi monoterapijoje.
2. Atlikta mokslinės literatūros analizė apie sintezės metu taikytų reakcijų metodikas, kuriomis buvo pagrįsti vykdytų reakcijų mechanizmai.
3. Susintetinti septyni nauji, literatūroje dar neaprašyti tarpiniai junginiai – (2,4-dihidroksifenil)(4-hidroksifenil)metanonas (**3a**), (2,4-dihidroksifenil)(4-metoksifenil)metanonas (**3b**), (2,4-dihidroksifenil)(p-tolil)metanonas (**3c**), (4-chlorofenil)(2,4-dihidroksifenil)metanonas (**3d**), 4-(4-hidroksibenzil)benzen-1,3-diolis (**6a**), 4-(4-metoksibenzil)benzen-1,3-diolis (**6b**), 4-(4-chlorobenzil)benzen-1,3-diolis (**6d**). Gautų diarilketonų **3a-d** išeigos siekė 18 – 67 %, 4-benzilbenzen-1,3-diolių **6a**, **6b** ir **6d** – 56 – 84 %.
4. Parodyta, kad dėl skirtingų pakaitų ir jų įtakos aromatiniam žiedui, kiekvieno junginio sintezės sąlygos turi būti optimizuojamos individualiai.
5. Parodyta, kad *para*-selektyvaus fenolių acilinimo metu gautiems diarilketonams **3a-c** negali būti taikoma standartinė Gribble diarilketonų redukcija su NaBH₃CN/rūgštis pora dėl aromatinuose žieduose esančių donorinių pakaitų, apsunkinančių karbonilinės grupės nukleofilinę ataką. Dėl šios priežasties, diarilketonams, turintiems kelis donorinius pakaitus, siūloma taikyti katalizinį hidrinimą.
6. Parodyta, kad 4-benzilbenzen-1,3-diolių acilinimas Luiso rūgštyje negali būti atliktas dėl vykstančio debenzilinimo.
7. Patikrinta, kad taikant pasiūlytą sintezės kelią, 6-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arilbenzen-1,3-dioliai negali būti susintetinti.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Tikslinių 6-(5-aryl-1,2,3-tiadiazol-4-il)-4-arylbenzen-1,3-diolų, taikant pasiūlytą sintezės kelią, negalima gauti dėl acilinimo reakcijos metu stebimo debenzilinimo proceso ir junginio **12** susidarymo. Dėl šios priežasties, benzilo grupę, į tikslinių junginių struktūrą, siūloma įvesti paskutiniame sintezės etape.

Peržiūrėjus literatūrą, siūlomas kitas sintezės kelias – 1) rezorcinolio acilinimas 4-metoksifenilacto rūgštimi, naudojant $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$; 2) karboksilato sintezė iš *C*-acilinto produkto 1-(2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etanono ir etilkarbazato; 3) karboksilato ciklizacija taikant Hurd-Mori reakciją; 4) 4-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolio jodinimas ir 5) 4-jod-6-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolio paveikiamas benzilboronio rūgšties analogais.



LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Johnson J, Brown C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress and Chaperones*. 2009 m.; 83-94, 14(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18636345/>
2. Biebl M, Buchner J. Structure, function, and regulation of the hsp90 machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019 m.; 11(9). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30745292/>
3. Porter J, Fritz C, Depew K. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010 m.; 412-420, 14(3). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20409745/>
4. Basso A, Solit D, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N. Akt Forms an Intracellular Complex with Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and Is Destabilized by Inhibitors of Hsp90 Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 m.; 39858-39866, 277(42) Gauta: <http://www.jbc.org/content/277/42/39858.short>
5. ClinicalTrials.gov. [Internetinė prieiga]. Gauta: <https://clinicaltrials.gov/>
6. Hoter A, El-Sabban M, Naim H. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 m.; 19(9). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30158430/>
7. Kazlauskas E, Brukštus A, Petrikas H, Petrikaitė V, Čikotienė I, Matulis D. Improving the Hsp90 Inhibitors Containing 4-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazole Scaffold: Synthesis, Affinity and Effect on Cancer Cells. 2017 m.; 1–11. Gauta: https://www.researchgate.net/publication/313950742_Improving_the_Hsp90_Inhibitors_Containing_4-24-Dihydroxyphenyl-123_thiadiazole_Scaffold_Synthesis_Affinity_and_Effect_on_Cancer_Cells
8. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017 m.; 226-256, 38(3). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28012700/>
9. Junho C, Azevedo C, da Cunha R, de Yurre A, Medei E, Stinghen A, Carneiro-Ramos M. Heat shock proteins: Connectors between heart and kidney. 2021 m.; 10(8):1939. Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34440708/>
10. Szyller J, Bil-Lula. Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury and Benefits from Physical Exercises: A Review to the Current Knowledge. *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity. 2021 m.; vol. 2021. Gauta: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2021/6678457/>
11. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, Mei H, Liu J, Wang W, Liu Q. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*. 2022 m.; 3(3). Gauta: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mco2.161>
 12. Rappa F, Farina F, Zummo G, David S, Campanella C, Carini F, Tomasello G, Damiani P, Cappello F, Conway de Macario E, Macario J.L. A. HSP-Molecular Chaperones in Cancer Biogenesis and Tumor Therapy: An Overview. *Anticancer Research*. 2012 m.; 32: 5139-5150. Gauta: <https://ar.iijournals.org/content/32/12/5139>
 13. Pérez-Hernández M. Mechanisms of Cell Death Induced by Optical Hyperthermia. *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*. 2018 m.; 201-228. Gauta: https://www.researchgate.net/publication/329528399_Mechanisms_of_Cell_Death_Induced_by_Optical_Hyperthermia
 14. Bepperling A, Alte F, Kriehuber T, Braun N, Weinkauff S, Groll M, Haslbeck M, Buchner J. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 m.; 20407-20412, 109(50). Gauta: https://www.researchgate.net/publication/233775158_Alternative_bacterial_two_component_small_heat_shock_protein_systems
 15. Kampinga H, Hageman J, Vos M, Kubota H, Tanguay R, Bruford E, Cheetham M, Chen B, Hightower L. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*. 2009 m.; 105-111, 14(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18663603/>
 16. Home - HGNC. Internetinè prieiga: <https://www.genenames.org/>
 17. Amita D, Prajapati K.S., Madhu S, Pachauri V. Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet World*. 2015 m.; 8(1): 46–51. Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777810/>
 18. Ikwegbue P, Masamba P, Oyinloye B, Kappo A. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. *Pharmaceuticals*. 2018 m.; 11(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29295496/>
 19. Lang B, Guerrero M, Prince T, Okusha Y, Bonorino C, Calderwood S. The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. *Archives of Toxicology*. 2021 m.; 1943-1970, 95(6). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34003342/>

20. Yang S, Xiao H, Cao L. Recent advances in heat shock proteins in cancer diagnosis, prognosis, metabolism and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021 m.; 142. Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34426258/>
21. Dai C. The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: From proteomic stability to oncogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018 m.; 373(1738). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29203710/>
22. Barna J, Csermely P, Vellai T. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018 m.; 2897-2916, 75(16). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29774376/>
23. Kaul G, Thippeswamy H. Role of Heat Shock Proteins in Diseases and Their Therapeutic Potential. *Indian Journal of Microbiology*. 2011 m.; 124-131, 51(2). Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209880/>
24. Large A, Goldberg M, Lund P. Chaperones and protein folding in the archaea. *Biochemical Society Transactions*. 2009 m.; 46-51, 37(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19143600/>
25. Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Current Pharmaceutical Design*. 2013 m.; 19, 347-365. Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22920906/>
26. Ren X, Li T, Zhang W, Yang X. Targeting Heat-Shock Protein 90 in Cancer: An Update on Combination Therapy. *Cells*. 2022 m.; 11(16): 2556. Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9406578/>
27. Tassone G, Mazzorana M, Pozzi C. Structural Basis of Parasitic HSP90 ATPase Inhibition by Small Molecules. *Pharmaceuticals*. 2022 m.; 15(11). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36355513/>
28. Sreedhar A, Kalmár É, Csermely P, Shen Y. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*. 2004 m.; 11-15, 562(1-3). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15069952/>
29. Maharaj K, Que N, Hong F, Huck J, Gill S, Wu S, Li Z, Gewirth D. Exploring the functional complementation between Grp94 and Hsp90. *PLoS ONE*. 2016 m.; 11(11). Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5100913/>
30. Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. *Biomedical Journal*. 2013 m.; 106-117, 36(3). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23806880/>
31. Schopf F, Biebl M, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017 m.; 345-360, 18(6). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28429788/>

32. Birbo B, Madu E. E, Madu O. C, Jain A, Lu Y. Role of HSP90 in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 m.; 22(19): 10317. Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8508648/>
33. Li Z, Luo Y. HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncology reports.* 2023 m.; 49(1). Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9685368/>
34. Li L, Wang L, You Q, Xu X. Heat Shock Protein 90 Inhibitors: An Update on Achievements, Challenges, and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2020 m.; 1798-1822, 63(5). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31663736/>
35. Booth M. *Climate Change and the Neglected Tropical Diseases.* Academic Press. 2018 m.; 39-126, 100. Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29753342/>
36. Ciocca D, Arrigo A, Calderwood S. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: An update. *Archives of Toxicology.* 2013 m.;19-48, 87(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22885793/>
37. Solárová Z, Mojžiš J, Solár P. Hsp90 inhibitor as a sensitizer of cancer cells to different therapies (review). *International Journal of Oncology.* 2015 m.; 907-926, 46(3). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25501619/>
38. Calderwood S. Heat shock proteins and cancer: Intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2018 m.; 373(1738). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29203709/>
39. Ciocca D, Calderwood S. Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones.* 2005 m.; 86-103, 10(2). Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1176476/>
40. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl F, Moarefi I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell.* 2000 m.; 101(2):199-210. Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10786835/>
41. Butler L, Ferraldeschi R, Armstrong H, Centenera M, Workman P. Maximizing the therapeutic potential of HSP90 inhibitors. *Molecular Cancer Research.* 2015 m;1445-1451, 13(11). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219697/>
42. Khandelwal A, Crowley V, Blagg B. Natural Product Inspired N-Terminal Hsp90 Inhibitors: From Bench to Bedside? *Medicinal Research Reviews.* 2016 m.; 92-118, 36(1). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26010985/>
43. MedlinePlus [Internetinè prieiga]. Gauta: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/tp53/>

44. Goh A, Coffill C, Lane D. The role of mutant p53 in human cancer. *Journal of Pathology*. 2011 m.;116-126, 223(2). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21125670/>
45. Gilardini Montani M, Cecere N, Granato M, Romeo M, Falcinelli L, Ciciarelli U, D'orazi G, Faggioni A, Cirone M. Mutant P53, stabilized by its interplay with HSP90, activates a positive feed-back loop between NRF2 and P62 that induces chemo-resistance to apigenin in pancreatic cancer cells. *Cancers*. 2019 m.; 11(5). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31121848/>
46. Buttacavoli M, Di Cara G, D'amico C, Geraci F, Pucci-Minafra I, Feo S, Cancemi P. Prognostic and functional significant of heat shock proteins (Hsps) in breast cancer unveiled by multi-omics approaches. *Biology*. 2021 m.; 10(3). Gauth: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8004706/>
47. Jhaveri K, Modi S. HSP90 Inhibitors for Cancer Therapy and Overcoming Drug Resistance. *Advances in Pharmacology*. 2012 m.; 65:471-517. Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22959035/>
48. Taldone T, Chiosis G. Purine-Scaffold Hsp90 Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2009 m.; 1436-1446. Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19860732/>
49. Palma L, Ferreira L, Petersen A, Dias B, Menezes J, Moreira D, Hernandez M, Veras P. A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or Leishmania Hsp90. *Scientific Reports*. 2019 m.; 9(1). Gauth: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-51239-0>
50. Mellatyar H, Talaei S, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Barzegar A, Akbarzadeh A, Shahabi A, Barekati-Mowahed M, Zarghami N. Targeted cancer therapy through 17-DMAG as an Hsp90 inhibitor: Overview and current state of the art. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 m.; 608-617, 102. Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29602128/>
51. Hong D, Banerji U, Tavana B, George G, Aaron J, Kurzrock R. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): Lessons learned and future directions. *Cancer Treatment Reviews*. 2013 m.; 375-387, 39(4). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23199899/>
52. Talaei S, Mellatyar H, Asadi A, Akbarzadeh A, Sheervalilou R, Zarghami N. Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment. *Chemical Biology and Drug Design*. 2019 m.; 760-786, 93(5). Gauth: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cbdd.13486?casa_token=targpTDlqsMAAAA%3AII0K6dMS7GBJpDj0QYmV-zG5-BsZ23Rl6TepQcziXICssCFQA0HZYWnEy3XmUvDd2DWmRLe3T0kv9A

53. Guo W, Reigan P, Siegel D, Zirrolli J, Gustafson D, Ross D. Formation of 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG) hydroquinone by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: Role of 17-AAG hydroquinone in heat shock protein 90 inhibition. *Cancer Research*. 2005 m.; 10006-10015, 65(21). Gauth: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/65/21/10006/657460/Formation-of-17-Allylamino-Demethoxygeldanamycin>
54. Siegel D, Shieh B, Yan C, Kepa J, Ross D. Role for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and manganese-dependent superoxide dismutase in 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin-induced heat shock protein 90 inhibition in pancreatic cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011 m.; 874-880, 336(3). Gauth: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3061536/>
55. Gorska M, Popowska U, Sielicka-Dudzin A, Kuban-Jankowska A, Sawczuk W, Knap N, Cicero G, Bucchieri F, Wozniak M. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Frontiers in Bioscience*. 2012 m.; 2269-2277. Gauth: <https://www.semanticscholar.org/paper/Geldanamycin-and-its-derivatives-as-Hsp90-Gorska-Popowska/7a042c3802498def1b8de3b288c519d09ff85814>
56. Wagner A, Chugh R, Rosen L, Morgan J, George S, Gordon M, Dunbar J, Normant E, Grayzel D, Demetri G. A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas. *Clinical Cancer Research*. 2013 m.; 19(21) 6020-6029. Gauth: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/19/21/6020/78203/A-Phase-I-Study-of-the-HSP90-Inhibitor>
57. Hadden M, Lubbers D, Blagg B. Geldanamycin, Radicicol, and Chimeric Inhibitors of the Hsp90 N-Terminal ATP Binding Site. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2006 m.; 1173-1182. Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16842154/>
58. Magwenyane A, Ugbaja S, Amoako D, Somboro A, Khan R, Kumalo H. Heat Shock Protein 90 (HSP90) Inhibitors as Anticancer Medicines: A Review on the Computer-Aided Drug Discovery Approaches over the Past Five Years. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2022 m.; 2147763. Gauth: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9173959/>
59. Sharp S, Jones K, Workman P. HSP90 inhibitors: targeting the cancer chaperone for combinatorial blockade of oncogenic pathways. *Cancer Drug Design and Discovery*. 2008 m. Gauth: <https://www.semanticscholar.org/paper/HSP90-inhibitors%3A-targeting-the-cancer-chaperone-of-Sharp-Jones/9481dd0b9fd704c09b7680e198853df5b8a6f317>

60. Ardestani M, Khorsandi Z, Keshavarzipour F, Iravani S, Sadeghi-Aliabadi H, Varma R. Heterocyclic Compounds as Hsp90 Inhibitors: A Perspective on Anticancer Applications. *Pharmaceutics*. 2022 m.; 14(10). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36297655/>
61. Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2014 m.; 9, 1-20. Gauth: https://www.researchgate.net/publication/234121204_HSP90_Inhibitors_Current_Development_and_Potential_in_Cancer_Therapy
62. Shen G, Blagg B. Radester, a novel inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. *Organic Letters*. 2005 m.; 2157-2160, 7(11). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15901158/>
63. Roe S, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury J, Piper P, Pearl L. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999 m.; 260-266, 42(2). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9925731/>
64. Messaoudi S, Peyrat J, Brion J, Alami M. Heat-shock protein 90 inhibitors as antitumor agents: A survey of the literature from 2005 to 2010. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2011 m.; 1501-1542, 21(10). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689065/>
65. Sgobba M, Rastelli G. Structure-based and in silico design of Hsp90 inhibitors. *ChemMedChem*. 2009 m.; 1399-1409, 4(9). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19685544/>
66. Magwenyane A, Mhlongo N, Lawal M, Amoako D, Somboro A, Sosibo S, Shunmugam L, Khan R, Kumalo H. Understanding the Hsp90 N-terminal dynamics: Structural and molecular insights into the therapeutic activities of anticancer inhibitors radicicol (RD) and radicicol derivative (NVP-YUA922). *Molecules*. 2020 m.; 25(8). Gauth: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7221724/>
67. Chiosis GKang YSun W. Discovery and development of purine-scaffold Hsp90 inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2008 m.; 99-114, 3(1). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23480142/>
68. Pasqua A, Wilding B, Cheeseman M, Jones K. Targeting Protein Synthesis, Folding, and Degradation Pathways in Cancer. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. 2017 m.; 202-280, 5-8. Gauth: https://www.researchgate.net/publication/313225018_Targeting_Protein_Synthesis_Folding_and_Degradation_Pathways_in_Cancer
69. Biamonte M, Van De Water R, Arndt J, Scannevin R, Perret D, Lee W. Heat shock protein 90: Inhibitors in clinical trials. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010 m.; 3-17, 53(1). Gauth: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20055425/>

70. Infante J, Weiss G, Jones S, Tibes R, Bauer T, Bendell J, Hinson J, Von Hoff D, Burris H, Orlemans E, Ramanathan R. Phase I dose-escalation studies of SNX-5422, an orally bioavailable heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory solid tumours. *European Journal of Cancer*. 2014 m.; 2897-2904, 50(17). Gauta: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959804914008697>
71. Goode K, Petrov D, Vickman R, Crist S, Pascuzzi P, Ratliff T, Davisson V, Hazbun T. Targeting the Hsp90 C-terminal domain to induce allosteric inhibition and selective client downregulation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2017 m.; 1992-2006, 1861(8). Gauta: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28495207/>
72. Allain E, Rouleau M, Lévesque E, Guillemette C. Emerging roles for UDP-glucuronosyltransferases in drug resistance and cancer progression. *British Journal of Cancer*. 2020 m.; 1277-1287, 122(9). Gauta: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7188667/>
73. Tomašič T, Durcik M, Keegan B, Skledar D, Zajec Ž, Blagg B, Bryant S. Discovery of novel HSP90 c-terminal inhibitors using 3D-pharmacophores derived from molecular dynamics simulations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 m.; 1-22, 21(18). Gauta: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6898>
74. Cikotiene I, Kazlauskas E, Matuliene J, Michailoviene V, Torresan J, Jachno J, et al. 5-Aryl-4-(5-substituted-2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90 chaperone. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2009 m.; 19(4):1089–92.
75. Kazlauskas E. Aryl-dihydroxyphenyl-thiadiazole binding to recombinant human Hsp90 [daktaro disertacija]. Vilnius [LT]: Vilniaus Universitetas; 2016.
76. Xiao Z, Wei W, Huang S, Lin X, Peng B, Wang X, Zhang L. Selective acylation of phenols in boron trifluoride diethyl etherate solution and the mechanistic implication. *Asian Journal of Chemistry*. 2014 m.; 8039-8042, 26(23). Gauta: https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=26_25_36
77. Gattermann L, Wieland T, Sucrow W. *Die Praxis des organischen Chemikers*. 1982 m.; 763.
78. Big Chemical Encyclopedia [Internetinė prieiga]. Gauta: <https://chempedia.info/page/185113214034119071253104184241221089032234010226/>
79. Tyner T, Francis J. *Infrared Spectroscopy*. 2017 m.; Gauta: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsreagents.2008>
80. Wicha J. Synthesis by Reduction without C-C Bond Cleavage Reduction of Carbonic or Carboxylic Acids, Aldehydes, Ketones, or Derivatives. *Science of Synthesis*. 2009 m.; 48.

81. Zhou X, Chen X. Recyclable Pd/C catalyzed one-step reduction of carbonyls to hydrocarbons under simple conditions without extra base. *Tetrahedron Letters*. 2020 m.; 61(5).

1 priedas. Urtė Milerytė, Algirdas Brukštus, Ieva Žutautė; Introduction of benzyl substituents to resorcinol moiety in search for N-domain HSP90 inhibitors. Tarptautinės konferencijos, skirtos prof. Edvardo Ramanausko 100 metų jubiliejui paminėti „Chemistry and Chemical technology 2023” stendinio pranešimo medžiaga, 2023. Prisegama pristatyto pranešimo tezės kopija iš oficialaus konferencijos leidinio.

CCT-2023, March 10th Vilnius, Lithuania

P 052

Introduction of Benzyl Substituents to Resorcinol Moiety in Search for N-Domain HSP90 Inhibitors

U. Milerytė^{1*}, A. Brukštus², I. Žutautė²

¹Faculty of Medicine, Vilnius University, M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101, Vilnius, Lithuania

²Faculty of Chemistry and Geosciences, Vilnius University, Naugarduko g. 24, LT-03225, Vilnius, Lithuania
urte.mileryte@mf.stud.vu.lt

Resorcinol-based compounds comprise one subgroup of second-generation HSP90 inhibitors. [1] It is important to note that compounds in this class are typically more active in contrast to other structure chaperone inhibitors. However, for this activity and the binding to the ATP pocket of the HSP90 N-terminal domain, a second, correctly spaced aromatic ring is required. As a result, a wide range of heterocycles can be found in these analogs, which provide that distance between the rings and ensure suitable spatial conformations. [2]

Thus far, a selection of second-generation HSP90-inhibiting compounds with various heterocyclic rings and functional groups in positions 6 and 5 of the resorcinol moiety have been synthesized. However, there is not a single derivative documented in the literature that has 4-substituted resorcinol with a benzyl functional group. As a result, this research aims to synthesize new analogs, 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols, bearing a para-substituted aromatic ring at the 4-position of the resorcinol fragment. These compounds are synthesized with the idea of utilizing the S2 subpocket of the HSP90 to boost their affinity and selectivity.

The target compounds are obtained in five steps: in the first stage, an aryl group is added to the resorcinol fragment to produce the starting materials, which are para-substituted 2,4-dihydroxybenzophenones **1**. The reduction of the acquired ketones is carried out in the second phase, which gives 4-benzylbenzene-1,3-diols **2**. In the third step, for the creation of the thiazole framework, p-phenylacetic acid is added to the 6-position of the reduced compounds, yielding 1-(5-benzyl-2,4-dihydroxyphenyl)-2-phenylethan-1-ones **3**. Intermediate products **4**, which are needed for the Hurd-Mori cyclization reaction, are formed in the fourth stage by exposing **3** compounds' p-phenylacetic acid fragments to the NH₂NHCO₂Et. The Hurd-Mori cyclization and formation of the thiazole rings is carried out in the last reaction, in which final products – 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols **5** – are obtained.

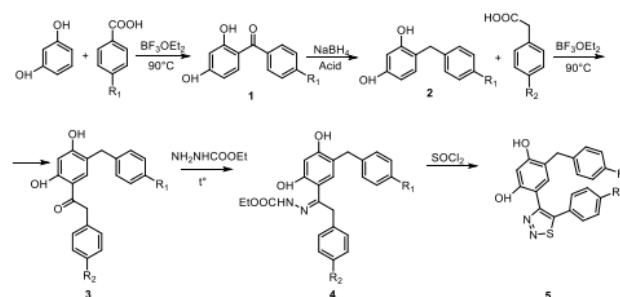


Fig. 1. General scheme of reactions

References

1. Park S, Oh Y, Park S, Oh Y, Lho Y, Jeong J, Liu K, Song J, Kim S, Ha E, Seo Y, Seo Y. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of resorcinol-based N-benzyl benzamide derivatives as potent Hsp90 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018) 143 390-401.
2. Sanchez J, Carter TR, Cohen MS, Blagg BS. Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone HHS Public Access. *Curr Cancer Drug Targets*. 2020 m.;20(4):253-70.

2 priedas. Urtė Milerytė, Algirdas Brukštus, Ieva Žutautė; Synthesis of novel 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols in search for potential Hsp90 chaperone inhibitors. Tarptautinės studentų mokslinės konferencijos „Open readings 2023” stendinio pranešimo medžiaga, 2023. Prisegama pranešimui pateikta tezės kopija.

SYNTHESIS OF NOVEL 6-(5-ARYL-1,2,3-THIADIAZOL-4-YL)-4-ARYLBENZENE-1,3-DIOLS IN SEARCH FOR POTENTIAL HSP90 CHAPERONE INHIBITORS

Urtė Milerytė¹, Algirdas Brukštus², Ieva Žutautė²

¹Faculty of Medicine, Vilnius University, M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101, Vilnius, Lithuania

²Faculty of Chemistry and Geosciences, Vilnius University, Naugarduko g. 24, LT-03225, Vilnius, Lithuania
urte.mileryte@mf.stud.vu.lt

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the leading cause of mortality globally. This illness claimed the lives of around 10 million individuals in 2020.[1] Studies on the etiology of cancer indicate that its causes are diverse: they include genetic mutations (e.g., somatic mutations) as well as epimutations (e.g., tumor suppressor gene silencing through hypermethylation).[2] It is important to note that cancer illnesses share one trait in common, despite their diverse etiologies. That trait is oncogenic proteins with brittle and flexible structures. Because these proteins are unstable, they require aid from molecular chaperones for efficient structure maintenance.

One of the most significant chaperones involved in oncogenesis is a heat shock protein 90 (HSP90). Due to this protein's role in the stability of oncoproteins and signaling pathways, malignant cells typically have elevated HSP90 levels in contrast to normal cells. These characteristics have made this heat shock protein an appealing molecular target for cancer treatment, leading to the creation of new inhibitors with an alternative mechanism of action. [3, 4] Novel anticancer agents, HSP90 inhibitors, are classified based on which molecular structure of the chaperone they affect: N-terminal domain, middle domain, or C-terminal domain. As a result, three classes of HSP90 inhibitors exist.

For this research, it was decided to synthesize resorcinol-based inhibitors of the N-domain's nucleotide-binding pocket. The activity of these compounds requires a second aromatic ring with an appropriate spatial configuration, which is provided by the 5-membered heterocyclic ring that connects them. To this day, a variety of HSP90 inhibitory analogs with imidazole and thiadiazole rings have been synthesized, with varying substitutes at the 6-position of the resorcinol fragment and the 4-position of the phenyl group. However, there is not a single compound documented in the literature that has an aryl group connected to the 4-position of the resorcinol structure. Therefore, the purpose of this work is to synthesize novel 6-(5-aryl-1,2,3-thiadiazol-4-yl)-4-arylbenzene-1,3-diols bearing an aryl group at the 4-position of the resorcinol fragment in the hopes of increasing their selectivity for the HSP90 N domain's nucleotide-binding pocket. The overall synthesis consists of 5 stages, which challenges will be discussed during the presentation. More details about HSP90, its involvement in oncogenesis, and inhibitor classes, will also be covered.

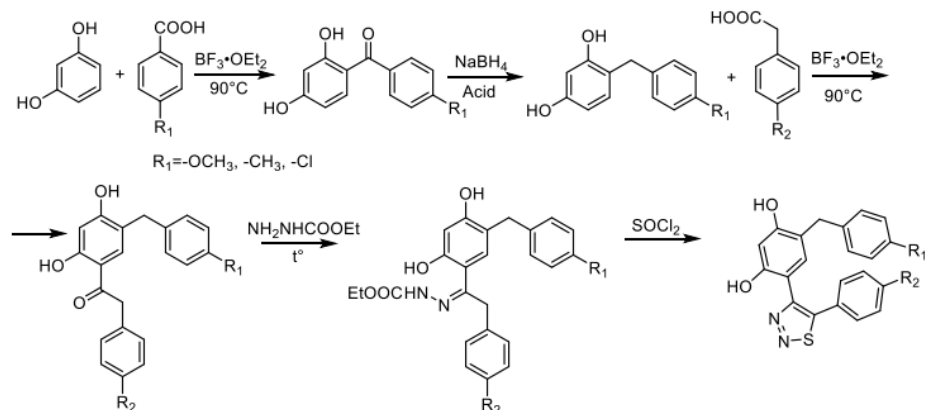


Fig. 1. General scheme of reactions

[1] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

[2] Diori I.K., Sanlier S.H. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. Journal of the Egyptian National Cancer Institute volume 33, Article number: 32 (2021).

[3] Rappa F., Farina F., Zummo G., David S., Campanella C., Carini F., Tomasello G., Damiani P., Cappello F., Conway de Macario E., Macario A. HSP-Molecular Chaperones in Cancer Biogenesis and Tumor Therapy: An Overview. ANTICANCER RESEARCH 32: 5139-5150 (2012).

[4] Birbo B., Madu E.E., Madu C.O., Jain A., Lu Y. Role of HSP90 in Cancer. Int J Mol Sci. 2021 m. spalio 1 d.;22(19):10317.