VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
ORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA

Virginijus Ruibys
Pagrindinių studijų programa Chemija – 4 kursas

Žmogaus karboanhidrazių slopiklių - pakeistų 2-chlorbenzensulfonamidų sintezė

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas: j.m.d Audrius Zakšauskas

Vilnius, 2016

Bakalauro darbas

Žmogaus karboanhidrazių slopiklių - pakeistų 2-chlorbenzensulfonamidų sintezė

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Virginijus Ruibys _____

Darbo vadovas:
j.m.d. Audrius Zakšauskas _____

Vilnius, 2016

Turinys

1. Naudoti trumpiniai....4
2. Įvadas....5
3. Literatūros apžvalga....7
4. Rezultatų aptarimas....13
5. Eksperimentinė dalis....23
6. Išvados....40
7. Summary....41
8. Literatūros sąrašas....42

1. Naudoti trumpiniai

AcOH – acto rūgštis

ASMS – aukštos skiriamosios gebos masių spektroskopija

DCM – dichlormetanas

DMSO – dimetilsulfoksidas

DMF – dimetilformamidas

EDCI – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidas

EtOH – etanolis

HASR – hidroksilamino-O-sulfon rūgštis

MeOH – metanolis

Py – piridinas

Et_3N – trietilaminas

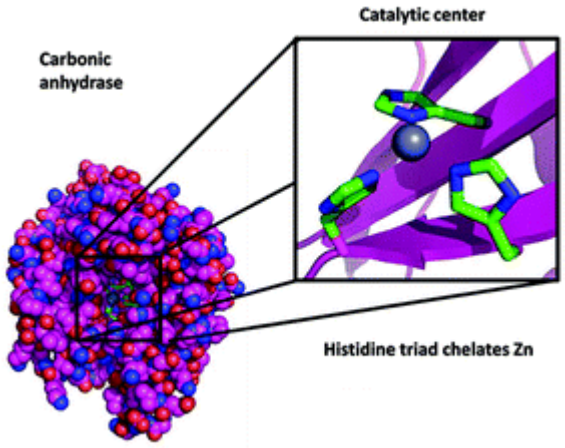
THF – tetrahidrofuranas

2. Įvadas

Karboanhidrazės (CA) yra cinko metalofermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$).

Dėl didelės savo katalizuojamos reakcijos svarbos metabolizme, šie fermentai labai paplitę gyvojoje gamtoje ir yra skirstomi į penkias šeimas (α, β, γ, δ, ζ ir η), kurios yra evoliuciškai nesusijusios. Gyvūnų karalystėje aptinkamos karboanhidrazės priskiriamos α-šeimai, kuri savo ruožtu yra sudaryta iš 13 katalitiškai aktyvių ir 3 neaktyvių izoformų, nevienodai pasiskirsčiusių audiniuose bei ląstelių organelėse. Karboanhidrazių galima aptikti citozolyje (CA I, CA II, CA III, CAVII), membranoje (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), mitochondrijose (CA VA ir CA VB) bei kaikuriuose sekretuojamuose skysčiuose (CA VI)[1].

Karboanhidrazės aktyviojo centro pagrindą sudaro cinko katijonas koordinuotas trijų histidino liekanų bei prie savęs prisijungęs hidroksido anijoną. Būtent šis anijonas atakuoja anglies dioksidą susidarant hidrokarbonato anijonui, kurį vanduo išstumia iš fermento aktyviojo centro. Karboanhidrazės pasižymi ypač dideliu efektyvumu – savo katalizuojamos reakcijos greičio konstantą padidina nuo $0,15s^{-1}$ iki 10^6 s^{-1}, tad pagrindiniu veiksniu ribojančiu reakcijos greitį tampa reagentų difuzija į baltymą bei produkto pašalinimas iš aktyviojo centro [2].



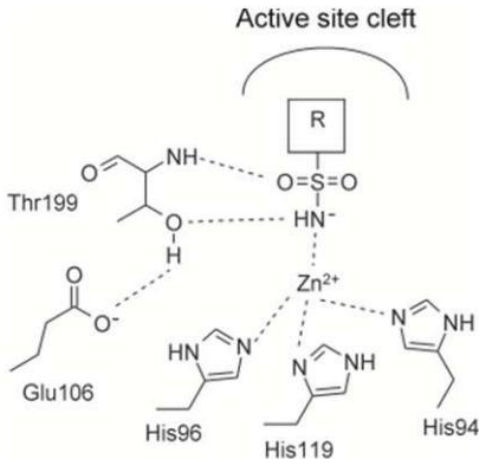
Karboanhidrazės aktyvusis centras [3].

Žmogaus organizme karboanhidrazės yra susijusios su svarbiais fiziologiniais procesais: kvėpavimu, terpės pH palaikymu, įvairių junginių biosinteze, elektrolitų apykaita. Tam tikri šių fermentų aktyvumo pakitimai susiję su sveikatos sutrikimais, o karboanhidrazių inhibitoriai savo ruožtu naudojami gydyti įvairioms ligoms: epilepsijai [4], glaukomai, retinalinei ir cerebralinei edemai [5], aukštumų ligai [6], nutukimui [7] osteoporozei [8]. Taip pat pastebėta, kad karboanhidrazes slopinantys junginiai pasižymi antimaliariniu poveikiu [9], lėtina melanomos bei prostatos vėžinių ląstelių vystymąsi [10, 11]. Dėl padidintos CA IX ekspresijos vėžinėse ląstelėse, pastarosios karboanhidrazės inhibitoriai taip pat tyrinėjami kaip vėžinių audinių atpažinimo ir vaizdinimo agentai, sujungiant juos su radioaktyviais pozitronus spinduliuojančiais atomais arba fluorescenciniais fragmentais [12,13].

Karboanhidrazių slopikliai bei jų veikimo mechanizmai yra gerai ištirti. Karboanhidrazes šiek tiek slopina cinką kompleksuojantys anijonai (NC^-, HS^-, SCN^-, CNO^-, N_3^-) bei Cu^{2+} ir Hg^{2+} katijonai, kurie jungiasi prie baltymo veikimui būtinos protonų šaudyklės His-64 (CA II baltyme) [14]. Bet

daugiausia yra organinių junginių slopinančių karboanhidrazes, didžioji dalis jų yra sulfonamidų, sulfamatų, boronio rūgščių, hidroksamatų dariniai [15, 16].

Aromatiniai sulfonamidai yra plačiausiai ištirta inhibitorių grupė. Keičiant prie žiedo prijungtus pakaitus galima keisti inhibitoriaus jungimosi stiprumą bei selektyvumą specifinei karbanhidrazės izoformai. Šie inhibitoriai prie cinko jungiasi deprotonizuotoje formoje (RSO_2NH^-), tad sulfonamidinės grupės rūgštingumas yra vienas iš jungimosi stiprumą apsprendžiančių faktorių [17].



Sulfonamidinių inhibitorių jungimasis prie baltymo aktyviojo centro [17]

Mūsų laboratorijoje susintetintas junginys 5-(1*H*-benzimidazol-1-il)-2-chlorbenzensulfonamidas (**1**), kuris stipriai ir selektyviai jungiasi su CA VA. Vienas iš šio darbo tikslų yra susintetinti į jį panašios struktūros junginių ir ištirti jų jungimąsi su karboanhidrazėmis.

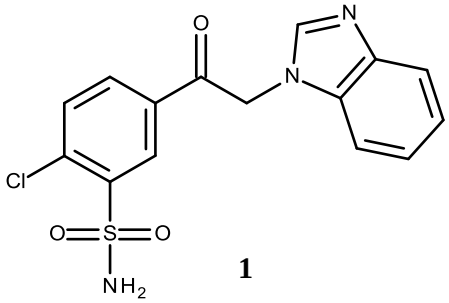
Kitas darbo tikslas yra susintetinti fluorescencinį fragmentą turinčius IX karboanhidrazei atrankius slopikius.

3. Literatūros apžvalga

Šioje dalyje apžvelgiamos trys temos: pakeistų 2-(1*H*-imidazol-1-il)-1-feniletanono darinių sintezė, 2,4-dihalo-5-sulfamoil-benzoinės rūgšties darinių halogenų pakeitimo reakcijos, 5-aminofluoresceino modifikavimo metodų apžvalga.

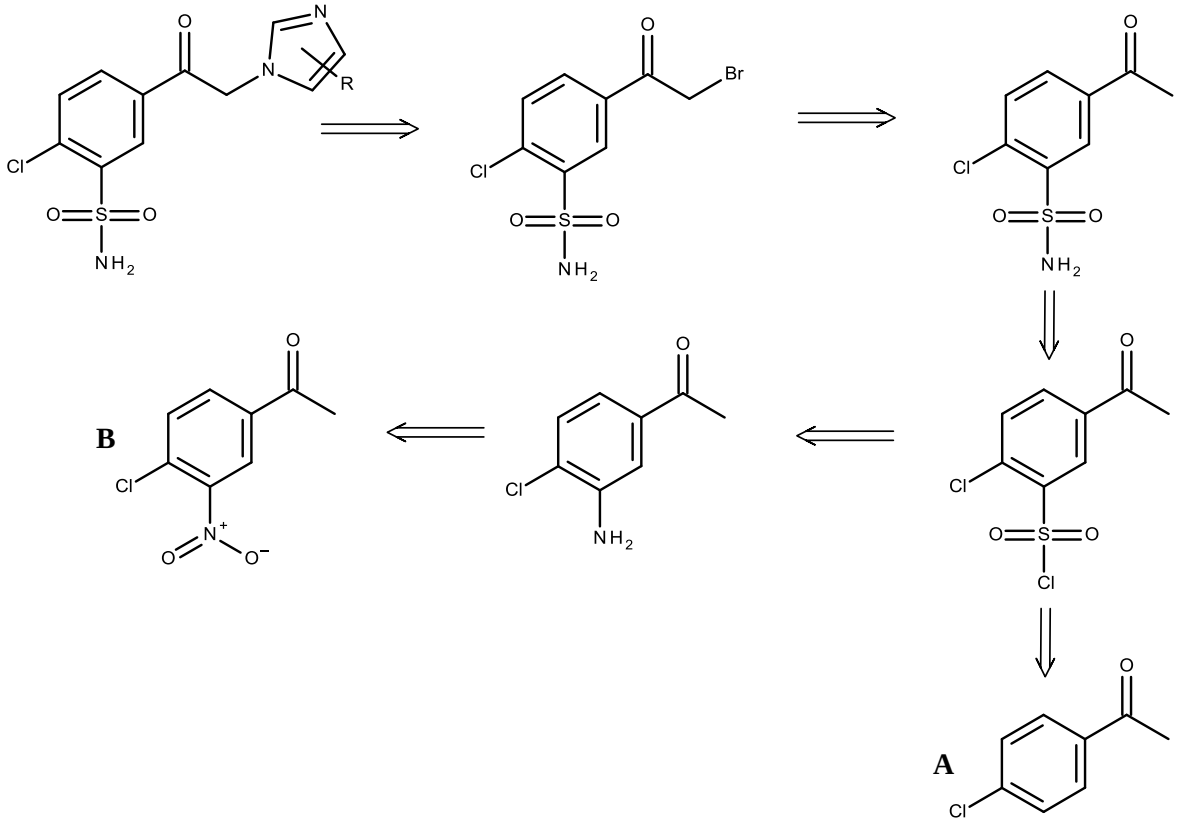
3.1 Pakeistų 2-(1*H*-imidazol-1-il)-1-feniletanono darinių sintezė

Vienas iš šio darbo tikslų buvo susintetinti junginius panašius į mūsų laboratorijoje anksčiau gautą junginį **1**:



1

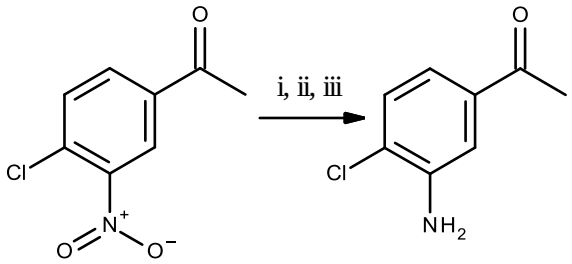
Buvo atlikta retrosintetinė analizė, kurios metu nustatyta, kad sintezę galima atlikti dviem keliais:



Analizuojant kelią **A** rasta tik viena nuoroda į šaltinį, kuriame pateikiama 5-acetil-2-chlor-benzensulfonilchlorido sintezė iš 4-chloracetofenono naudojant chlorsulfoninę rūgštį, bet prieigos prie literatūros šaltinio nepavyko gauti [18], todėl pasirinktas aplinkinis kelias.

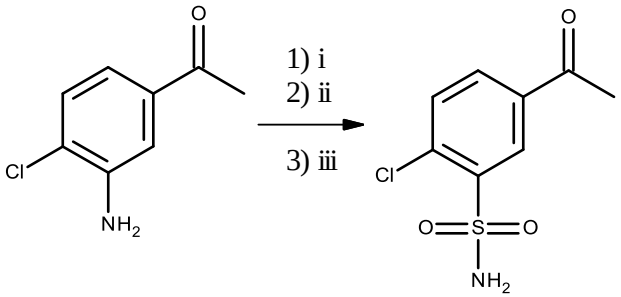
Kelio **B** apžvalga:

1-(4-chlor-3-nitro-fenil)etanono redukciją galima atlikti įvairiais būdais - pavyzdžiui naudojant geležį ir vandeninę acto rūgštį [19], platinos oksidą ir vandenilį [19], alavo dichloridą ir druskos rūgštį [20].



i = Fe, AcOH, H_2O; ii = PtO_2, H_2, EtOH; iii = $SnCl_2$, HCl, H_2O;

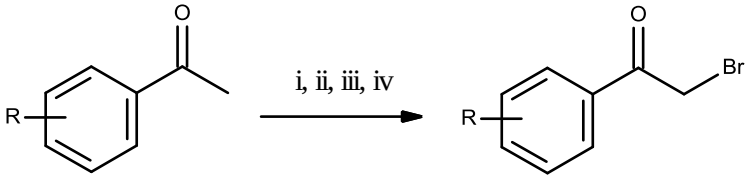
Literatūroje yra aprašyta aminodarinio modifikacijos į sulfamoildarinį metodika - pateikiama trijų stadijų sintezė, neizoliuojant tarpinių produktų - iš pradžių amino darinys diazotinamas, po to diazonio druska veikiama sieros dioksidu ir vario (II) chloridu, o susidaręs sulfonilchloridas veikiamas amoniako tirpalu [21].



i = $NaNO_2$, AcOH, HCl; ii = $CuCl_2$, SO_2, AcOH; iii = NH_4OH, THF.

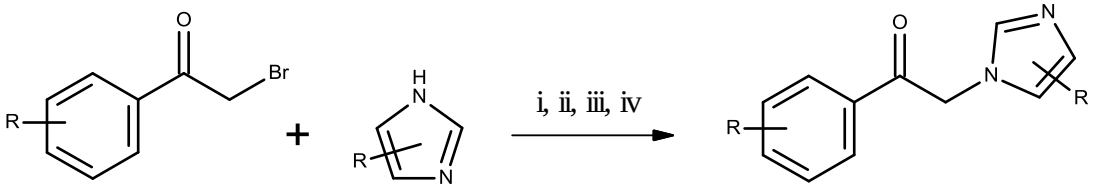
Tokio tipo aromatinių anilinų reakcijose kaip diazotinantį agentą taip pat galima naudoti tret-butilnitritą [22], o sieros dioksido tirpalas gali būti gaunamas lašinant tionilo chloridą į vandeninį tirpalą [23].

Yra platus asortimentas reagentų tinkamų acetofenonų brominimui α-padėtyje – tam tinka amonio arba vandenilio bromidas ir perokso junginiai [24], N-bromsukcinimdas su p-toluensulfonrūgštimi [25] arba bromas [26].



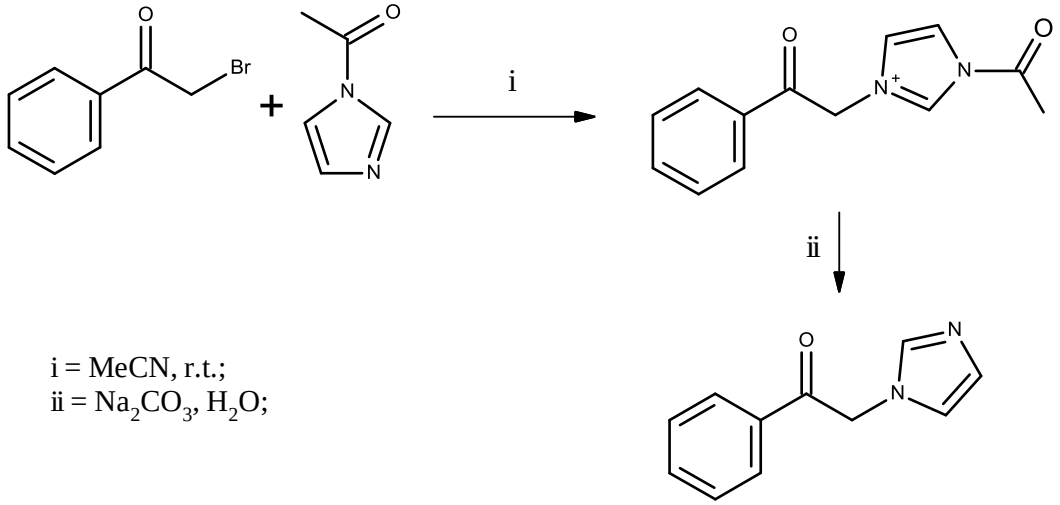
i = NH_4Br, $KHSO_5$, MeOH, k.t.; ii = HBr, H_2O_2, H_2O, 1,4-dioksanas, virinant;
iii =NBS, p-toluensulfon r., 50°C; iv = AcOH, Br_2, 40°C;

Imidazolus alkilinti α-bromacetofenonais galima įvairiomis sąlygomis[27-30]:



i = NaOAc, THF, k.t.; ii = Et_3N, acetonas, virinant;
iii = K_2CO_3, DMF, k.t.; iv = 2ekv. Imidazolo, DCM, k.t.

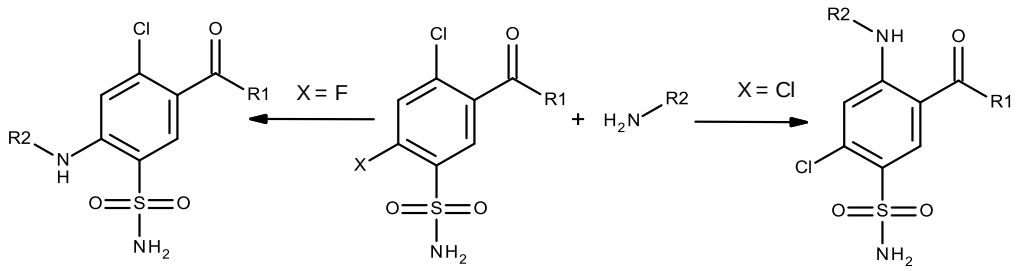
Kitas būdas alkilintų imidazolų sintezei – 1-acetilimidazolo alkilinimas ir gautos acetilimidazolo ketvirtinės druskos hidrolizė [31]. Šio sintezės būdo privalumas yra tas, kad kaip pašaliniai produktai negaunamos ketvirtinės dialkilimidazolo druskos.



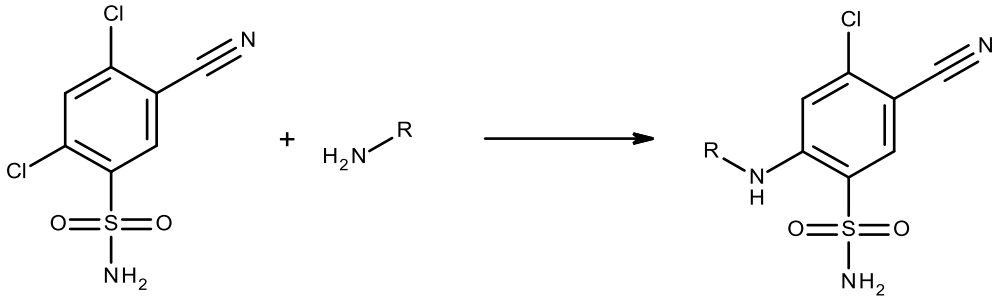
i = MeCN, r.t.;
ii = Na_2CO_3, H_2O;

3.2 2,4-Dihalo-5-sulfamoil-benzoinės rūgšties darinių halogenų pakeitimo reakcijos

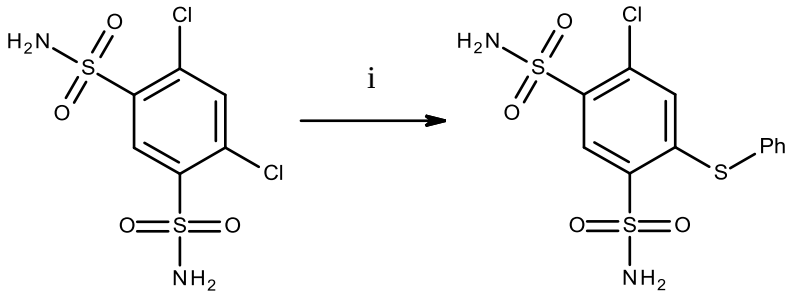
Įvairių 2,4-dihalo-5-sulfamoil-benzoinės rūgšties darinių sintezės bei gautų junginių halogeno atomų pakeitimas aminais gana išsamiai aptartas Sturm et. al. [32] straipsnyje. 2,4-Dichlordariniuose nukleofiliniame pakeitime dalyvauja 2-os padėties chloro atomas, o reakcijos temperatūra priklauso nuo amino baziškumo – chlorą pakeisti pirolidinu reikalinga 100 °C temperatūra, o analogiškai reakcijai su anilinu jau 200 °C temperatūra. Be to aptariamas halogenų reaktingumas pakeitimo reakcijoje – teigima, kad reaktyvumas kinta tokia seka: F>Br≈Cl. Fluorui pakeisti reikalinga 40 °C mažesnė temperatūra nei chlorui analogiškuose junginiuose. Būtent skirtingu halogenų reaktingumu pasinaudojama norint susintetinti 4-pakeistus 2-chlor-5-sulfamoil-benzoildarinius – reakcijos atliekamos 2-chlor-4-fluor-5-sulfamoil-benzoildarinius veikiant aminais [32]:



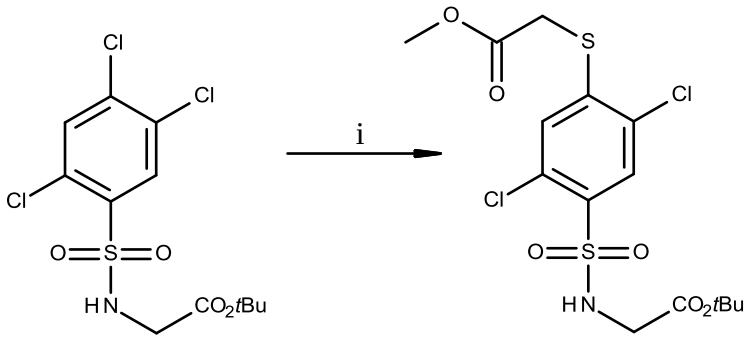
Kitas būdas prie sulfonamido pakeisti halogeno atomą – atlikti nukleofilinį aromatinį pakeitimą su 2,4-dichlor-5-ciano-benzensulfonamidu. Šiame junginyje karbonitrilo grupė orientuoja pakeitimą kita kryptimi nei analogiškuose esterinę, amidinę ar karboksigrupę turinčiuose junginiuose [33].



Nors nukleofilinis aromatinis pakeitimas 2,4-dihalobenzensulfonamiduose naudojant tiolius mažiau ištyrinėtas nei aminodarinių reakcijos, pagal literatūroje pateiktus duomenis matyti, kad reakcijos vyksta lengviau – tokiuose poliniuose protoniniuose tirpikliuose kaip EtOH virinant, o poliniuose aprotoniniuose tirpikiuose pakeitimas vyksta jau kambario temperatūroje [34, 35].



i = PhSH, K_2CO_3, EtOH, virinant

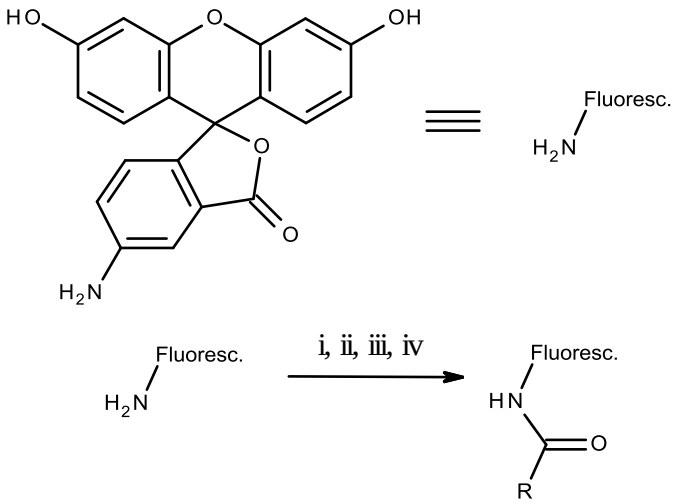


i = $NaSCH_2CO_2CH_3$, DMF, k.t.

3.3 5-Aminofluoresceino modifikavimo metodai

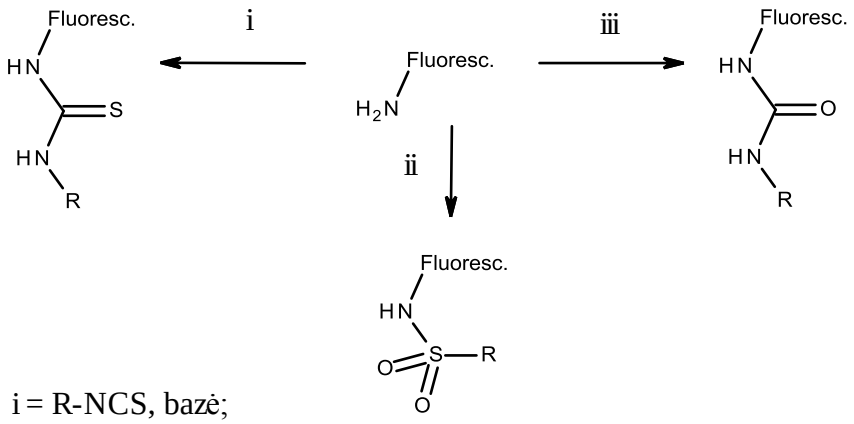
Fluoresceino dariniai vieni iš plačiausiai naudojamų fluoroforų skirtų biologinių sistemų vaizdinimui ir tyrimams. Toliau apžvegsiu vieno iš šių darinių – 5-aminofluoresceino modifikavimo sudarant kovalentinius ryšius metodus.

Aminofluoresceinas acilinamas karboksirūgščių anhidridais [36], chloranhidridais [37] ir kitais reaktyviais karboksirūgščių dariniais, tokiais kaip sukcinimidyl-esteriai [38]. Reaktyvius karboksirūgščių darinius galima generuoti ir *in situ* naudojant karbodiimidus, pvz.: diizopropilkarbodiimidą [39], 1-etil-(3-(3-dimetilamino)propil)-karbodiimido hidrochloridą [40].



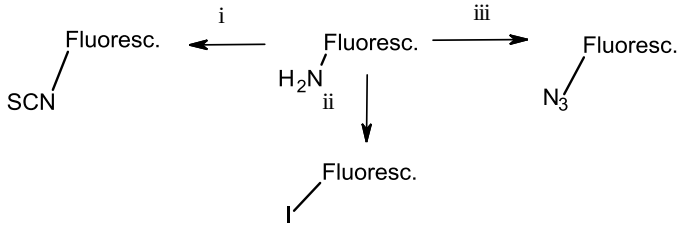
i = $(RCO)_2O$; ii =RCOCl; iii =RCOOH, karbodiimidai; iv =RCOOR'.

Sulfoninimas atliekamas veikiant sulfonchloridais [41]. Karbamido bei tiokarbamido darinių sintezė atliekama veikiant atitinkamai karbamatais [42] ir izotiocianatais [43].



i = R-NCS, bazė;
ii = R-SO_2-Cl, DCM, Py, k.t.;
iii = R-NH-CO-OR arba R-NCO, Py, 70°C;

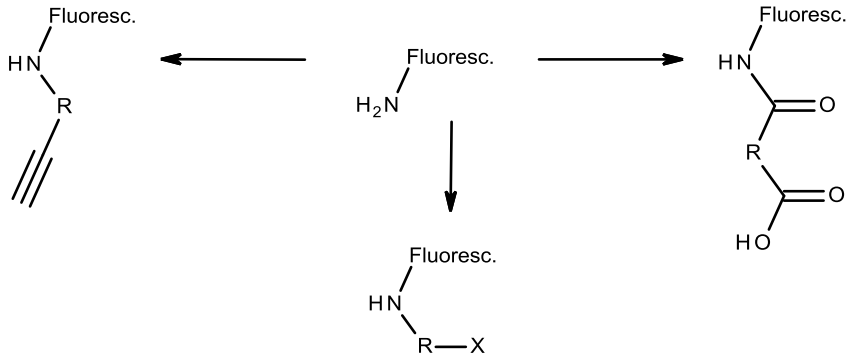
Jeigu norima prijungti substratą, kuris nereaguoja su amino grupe, galima ją transformuoti į kitas funkcines grupes - izotiocianatą [44], jodo atomą [45] arba azidą [46].



i = tiofosgenas, $CaCO_3$, acetonas, k.t. ii = 1) $NaNO_2$, HCl, H_2O, 0°C; 2) KI, H_2O, 0°C

iii = 1) $NaNO_2$, AcOH, H_2O, 0°C; 2) NaN_3

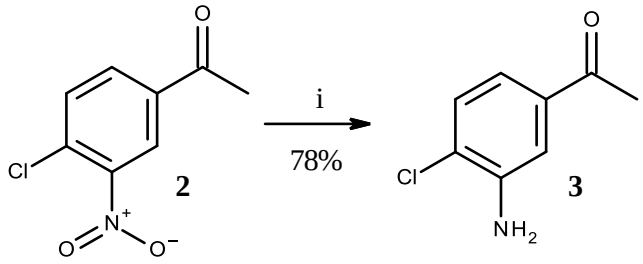
Taip pat verta paminėti aminofluoresceino jungimo su substratais per tam tikrą jungtuką metodus. Vienas jungtuko galas prijungiamas prie aminofluoresceino naudojant aukščiau išvardytus metodus, o kitas galas turi laisvą funkcinę grupę, kuri suteikia platesnę substrato prijungimo metodų įvairovę. Pastaruoju metu išpopuliarėjo jungtukai turintys alkino fragmentą. Jie suteikia galimybę atlikti vario katalizuojamą „click“ tipo reakciją su organiniais azidais [38]. Kita jungtukų klasė – reaktyvų halogeno atomą turintys junginiai [47, 48, 49], leidžiantys sujungti aminofluoresceiną su įvairiais nukleofilais. Kaip jungtukus galima naudoti ir dikarboksirūgščių darinius [50].



4. Rezultatų aptarimas

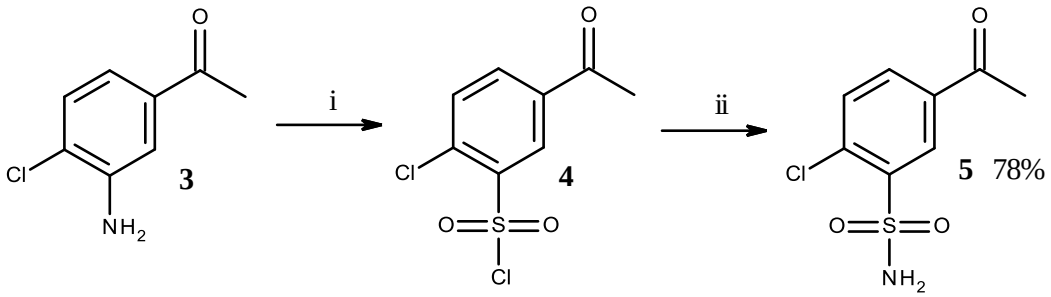
4.1 Pakeistų 2-(1*H*-imidazol-1-il)-1-feniletanono darinių sintezė

Pradiniu junginiu pasirinktas komerciškai prieinamas 1-(4-chlor-3-nitro-fenil)etanonas (**2**). Jo redukcija atlikta naudojant alavo dichloridą, natrio chloridą ir druskos rūgštį pagal literatūroje aprašytą metodiką [20].



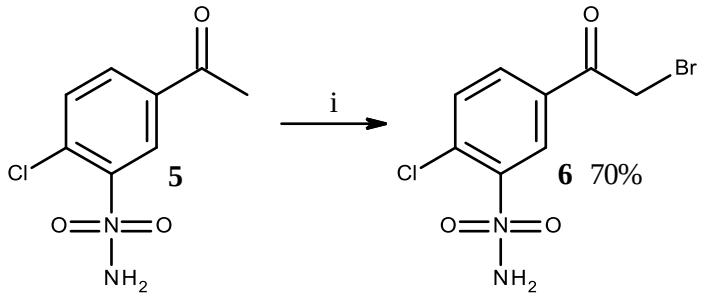
i = $SnCl_2$, HCl, NaCl, H_2O, 70°C

Amino darinys **3** diazotintas natrio nitritu, veiktas sieros dioksido bei vario (II) chlorido mišiniu, o susidaręs sulfonchloridas **4** veiktas amoniako tirpalu. Sintezė atlikta pagal žinomą metodiką [21].



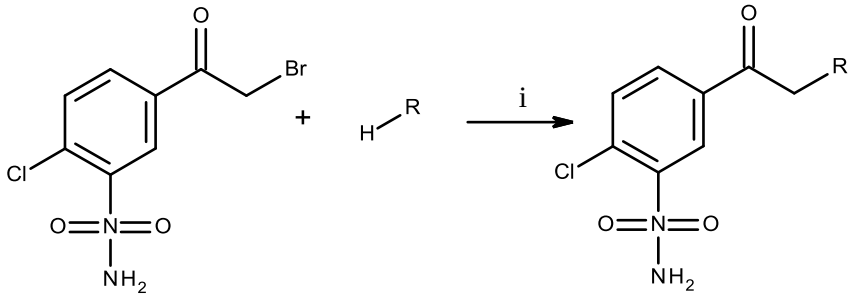
i = 1) $NaNO_2$, HCl, AcOH, H_2O, 5°C; 2) SO_2, $CuCl_2$, AcOH, 0°C; ii = NH_4OH, THF, 10°C

Susintetintas acetofenonas **5** bromintas α-padėtyje. Sintezei pasirinktas klasikinis brominimo metodas bromu acto rūgštyje. Nors reakcija buvo atliekama pagal aprašytą metodiką [26], ji iš pradžių nevyko – sulašinus į reakciją nedidelę dalį bromo jo spalva nebluko, o plonasluoksnė chromatografija irgi nerodė naujų taškų susidarymo. Siekiant paspartinti reakciją buvo paimtas nedidelis reakcijos mėginys ir pakaitintas aukštesnėje temperatūroje, o kai bromo spalva išbluko, supiltas atgal į reakcijos mišinį. Tai atlikus pradėjo blukti spalva – reakcija prasidėjo.



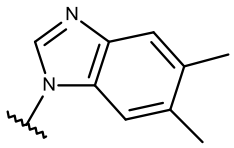
i = AcOH, Br_2, 40°C

Sintetinant junginio **1** analogus (**7** – **12**) imidazolo alkilinimas atliktas naudojant bevandenį natrio acetatą tetrahidrofurane ir imidazolo perteklių (1,5 ekv.). Reikia pastebėti, kad išeigos nebuvo didelės (41 % - 28 %) – netgi naudojant imidazolo perteklių susidarydavo dialkilintų imidazolo druskų. Atliekant reakciją su 5–metoksibenzimidazolu ir imidazolo-4 karboksirūgšties etilo esteriu susidarė produktų mišiniai **11a** ir **11b**, **12a** ir **12b**, kurių nepavyko atskirti. Taip pat bandyta šiuo metodu alkilinti indolą, tačiau reakcija nevyko.

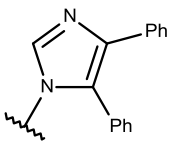


i = NaOAc, THF;

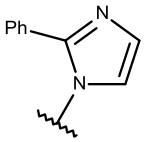
R =



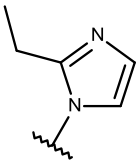
7



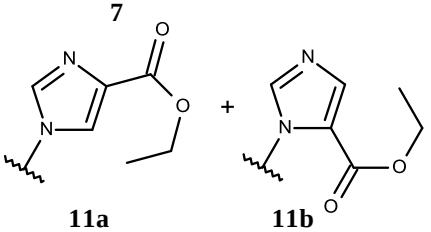
8



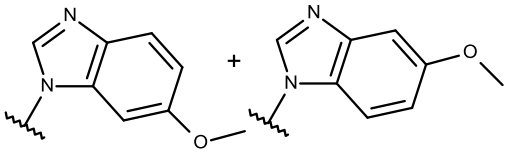
9



10



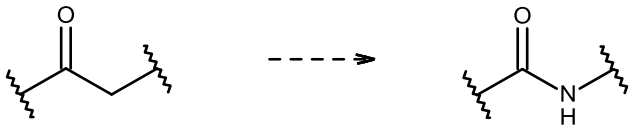
11a **11b**



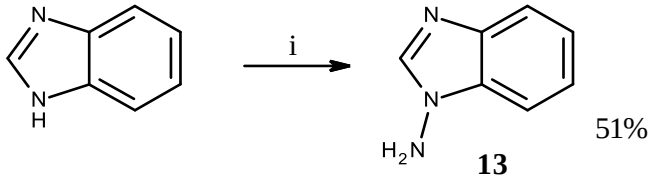
12a **12b**

4.2 N-(benzimidazol-1-il)benzamidų sintezė

Norint įvertinti koką įtaką inhibitorių jungimuisi su baltymu turi acetofenono α-metilen grupės pakeitimas amidine grupe, susintetinti trys į junginį **1** panašūs junginiai, vietoje metileno grupės turntys NH grupę.



Pradinis junginys N-aminobenzimidazolas (**13**) susintetintas atliekant benzimidazolo elektrofilinį amininimą hidroksilamino-o-sulfonrūgštimi (HASR) pagal aprašytą metodiką [51]. Reakcijos metu pastebėta, kad atliekant plonasluoksnę chromatografiją produktas ir pradinis reagentas neatsiskiria, tad reakcijos eiga sekta GC-FID prietaisu (Shimadzu GC-2010).

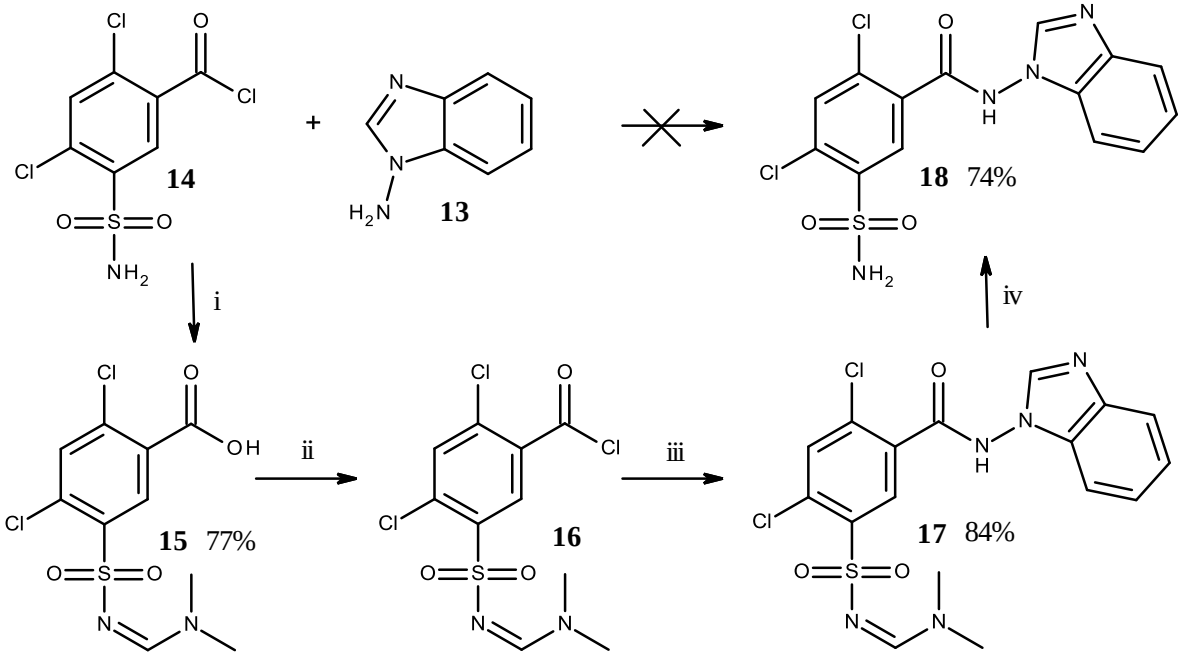


51%

13

i = KOH, HASR, H_2O, 50°C

Buvo bandyta acilinti N-aminobenzimidazolą su 2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzoinės rūgšties chloranhidridu (**14**), bet plonasluoksnė chromatografija rodė reakcijos mišinyje esant daug produktų, tad nuspręsta reakciją atlikti prieš tai užblokuojant sulfamoilgrupę N,N-dimetilmetiliden bloku [52]. Atlikus keturias reakcijos stadijas gauta bendra 48% išeiga.

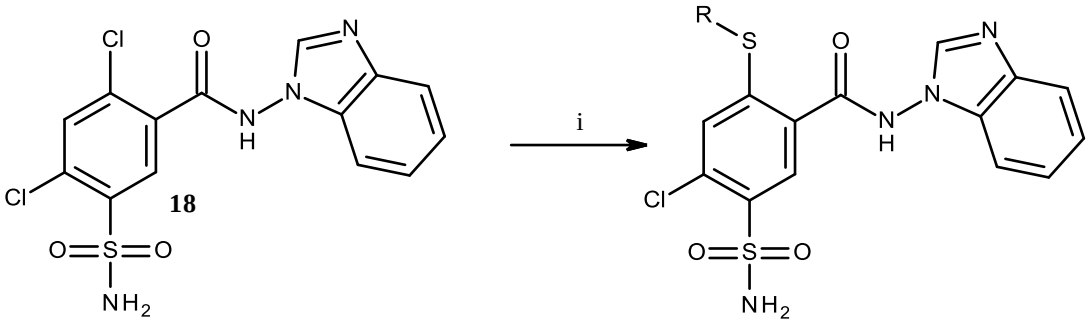


14 **13** **18** 74%

15 77% **16** **17** 84%

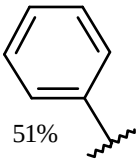
i = DMF, $SOCl_2$, -15°C; ii = $SOCl_2$, toluenas, virinant; iii = N-aminobenzimidazolas, piridinas, THF; iv = 2N NaOH, k.t.

Ištirtas junginio **18** chloro atomų nukleofilinis pakeitimas. Kaip ir tikėtasi naudojant tiolius poliniame aprotoniniame tirpiklyje dėl *orto*- ir *para*-padėtyse keičiamos grupės atžvilgiu esančių elektronoakceptorinių pakaitų reakcija vyko jau kambario temperatūroje ir buvo pakeistas reikiamas 2-os padėties chloras.

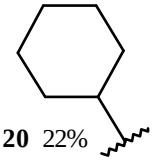


i = R-SH, Et_3N, DMSO, k.t.;

R =



19 51%

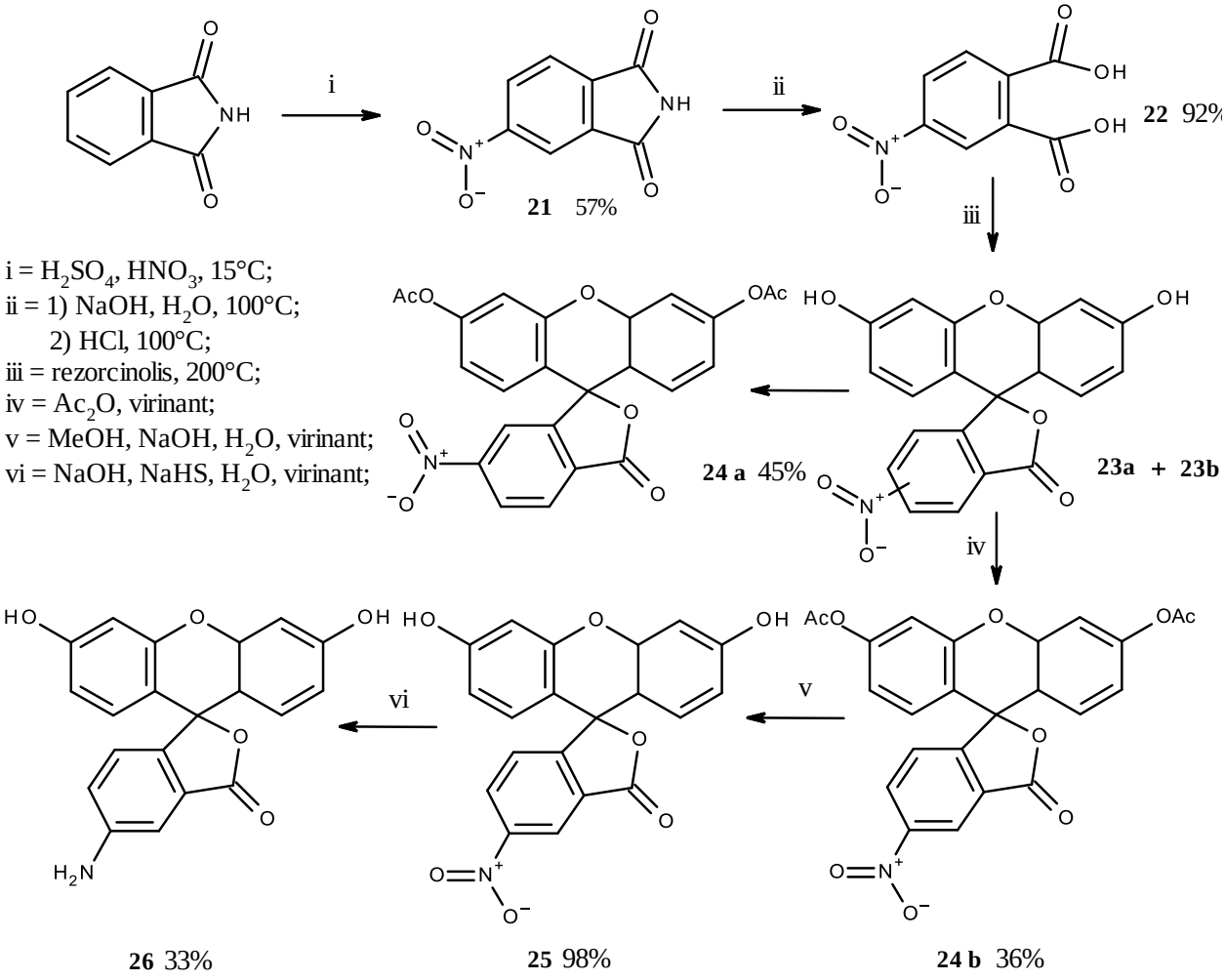


20 22%

4.3 Fluorescencinį fragmentą turinčių IX karboanhidrazės inhibitorių sintezė

Prieš pradedant darbą reikėjo pasirinkti tinkamiausią fluoroforą inhibitoriaus modifikavimui. Fluorescencinio fragmento pagrindu pasirinktas fluoresceinas, dėl savo gero tirpumo vandenyje, didelės fluorescencijos kvantinės išeigos [53], mažo solvatochrominio efekto (fluorescencijos priklausomybės nuo tirpiklio) [54]. Dėl plačių modifikavimo galimybių darbui atlikti pasirinktas fluoresceino darinys – 5-aminofluoresceinas.

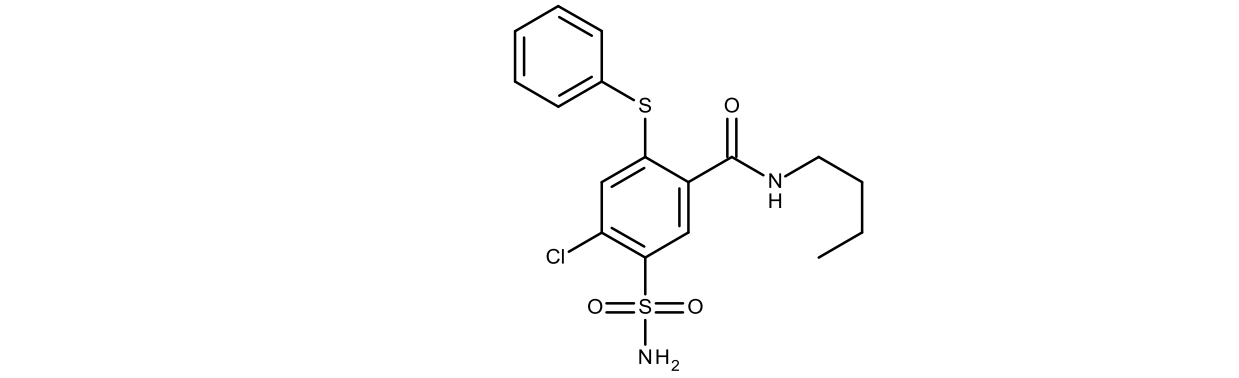
5-Aminofluoresceino sintezė atlikta pagal aprašytą metodiką [42].Sintezė pradėta nuo ftalimido nitrinimo, 4-nitroftalimidas hidrolizuotas ir gauta rūgštis sulydyta su rezorcinoliu. Susidarė 5 ir 6-nitrofluoresceino izomerų mišinys, kuris kristalinant neatsiskiria, todėl mišinys acetilintas ir izomerai atskirti kristalinant. Kadangi tolesnėms sintezėms reikėjo tik vieno izomero, acetil bloko nuėmimas bei redukcija natrio sulfidu atlikta tik su 5-nitrofluoresceino dariniu.



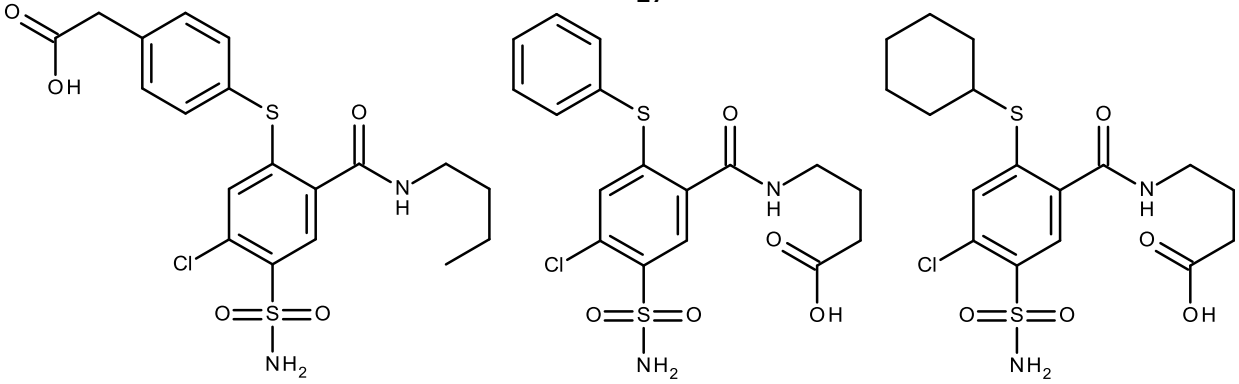
i = H_2SO_4, HNO_3, 15°C;
ii = 1) NaOH, H_2O, 100°C;
2) HCl, 100°C;
iii = rezorcinolis, 200°C;
iv = Ac_2O, virinant;
v = MeOH, NaOH, H_2O, virinant;
vi = NaOH, NaHS, H_2O, virinant;

Inhibitoriaus pagrindu pasirinktas mūsų laboratorijoje susintetintas junginys 5-sulfamoil *N*-butil-4-chlor-2-(feniltio)benzamidas **(27)**, stipriai slopinantis IX karboanhidrazę. Fluorescencinio fragmento prijungimo vietomis pasirinktos nuo benzensulfonamido fragmento nutolusios padėtys - amido alifatinės grandinės ω-anglis ir tiofenil-žiedo *para*- padėtis. Taip pasirinkta,

kad masyvus fluorescencinis fragmentas netrukdytų slopklio molekulei patekti į baltymo aktyvųjį centrą. Susintetintos trys sujungimui su aminofluoresceinu tinkančios rūgštys **28**-**30**.

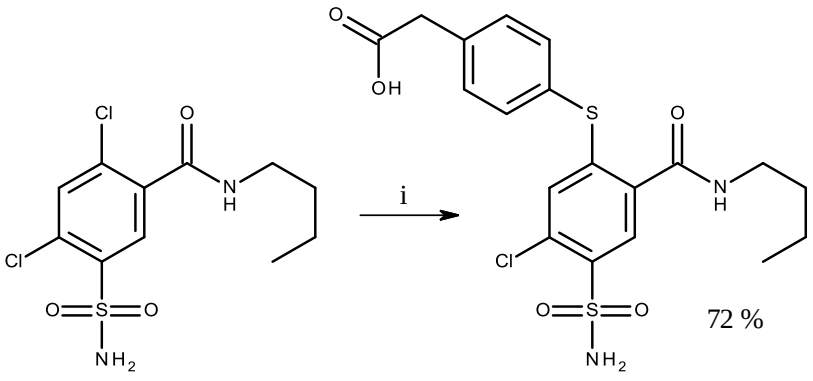


27



28 **29** **30**

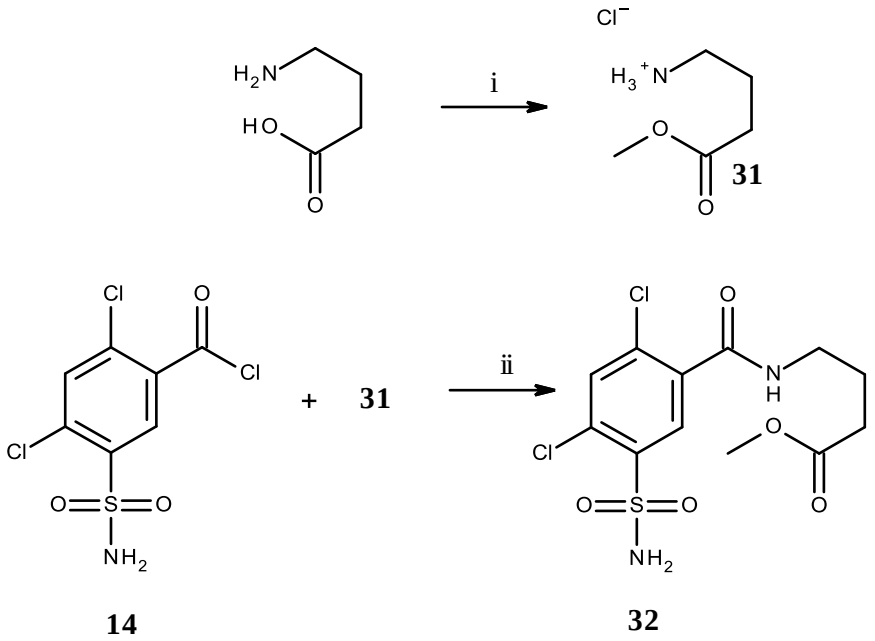
Junginys **28** susintetintas pakeitus junginio **27** 2-os padėties chlorą 4-merkaptofenilacto rūgštimi.



27 **28**

i = 4-merkaptofenilacto r., Et_3N, DMSO

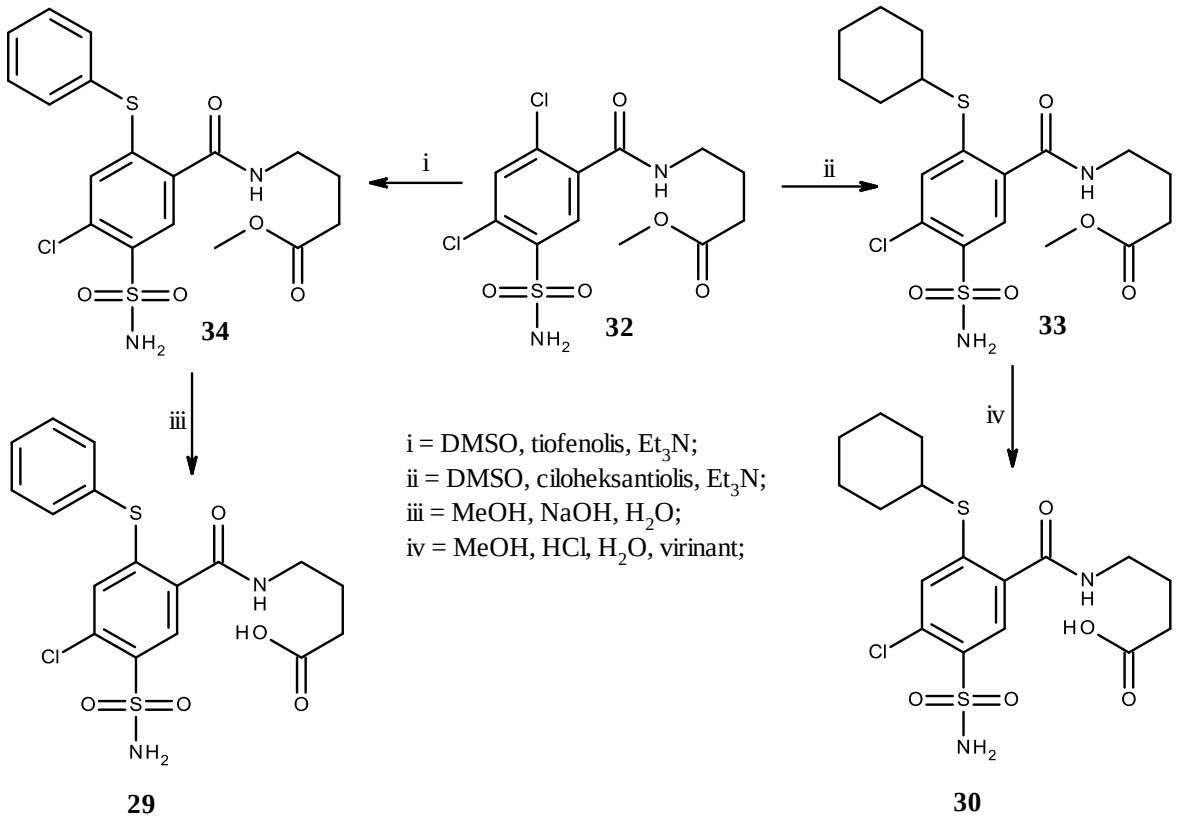
Junginių **29** ir **30** sintezė pradėta nuo γ-amino-sviesto rūgšties esterinimo, toliau aminoesterį **31** acilinant susintetintas junginys **32.**



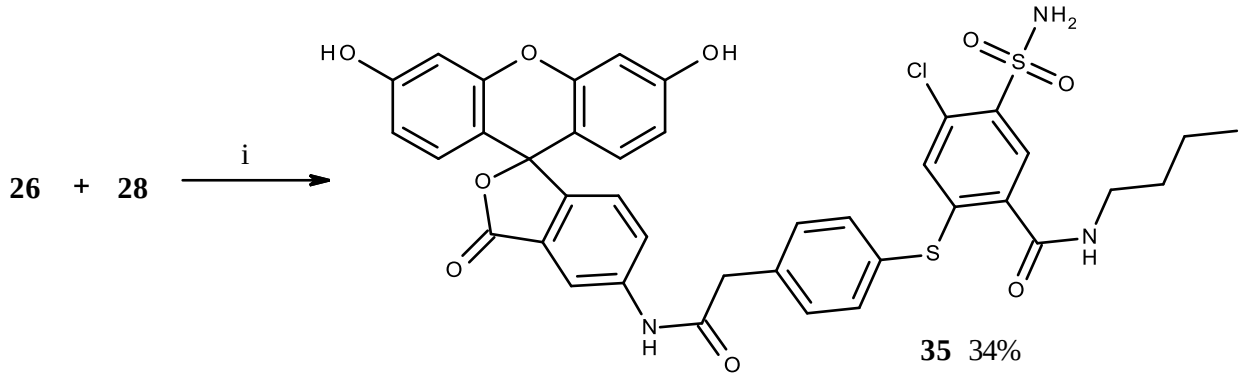
14 **32**

i = MeOH, $SOCl_2$, Et_3N, 0°C; ii = DCM, Et_3N;

Junginio 32 reakcija su tioliais, vyko kaip ir ankstesniame pavyzdyje - antros padėties chloras pakeistas tiofenoliu ir cikloheksantioliu. Susidarę esteriai **33** ir **34** hidrolizuoti. Hidrolizė atlikta dviem būdais – **33** hidrolizuotas rūgštinėmis sąlygomis, gauta išeiga 65 %, tačiau kartu vyko dalinė amidinio ryšio hidrolizė, o tai smarkiai apsunkino tikslinio produkto išskyrimą. Junginio **34** hidrolizė atlikta šarminėje terpėje bei žemesnėje temperatūroje, gauta geresnė išeiga nei rūgštinėmis sąlygomis – 81 %, be to nevyko amidinio ryšio hidrolizė.



5-Aminofluoresceinas sujungtas su rūgštimi **28** naudojant 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidą (EDCI). Šis karbodiimidas pasirinktas todėl, kad reakcijos metu iš EDCI susidaręs karbamido darinys yra tirpus rūgščiame vandenyje ir todėl lengvai pašalinamas. Darbo atlikimo metu sugedo BMR spektrometras, todėl junginio struktūros negalėjau įrodyti BMR spektrais, tačiau užrašytas medžiagos aukštos skiriamosios gebos masių spektras, kuris patvirtina junginio susidarymą.



i = Py, EDCI, k.t.

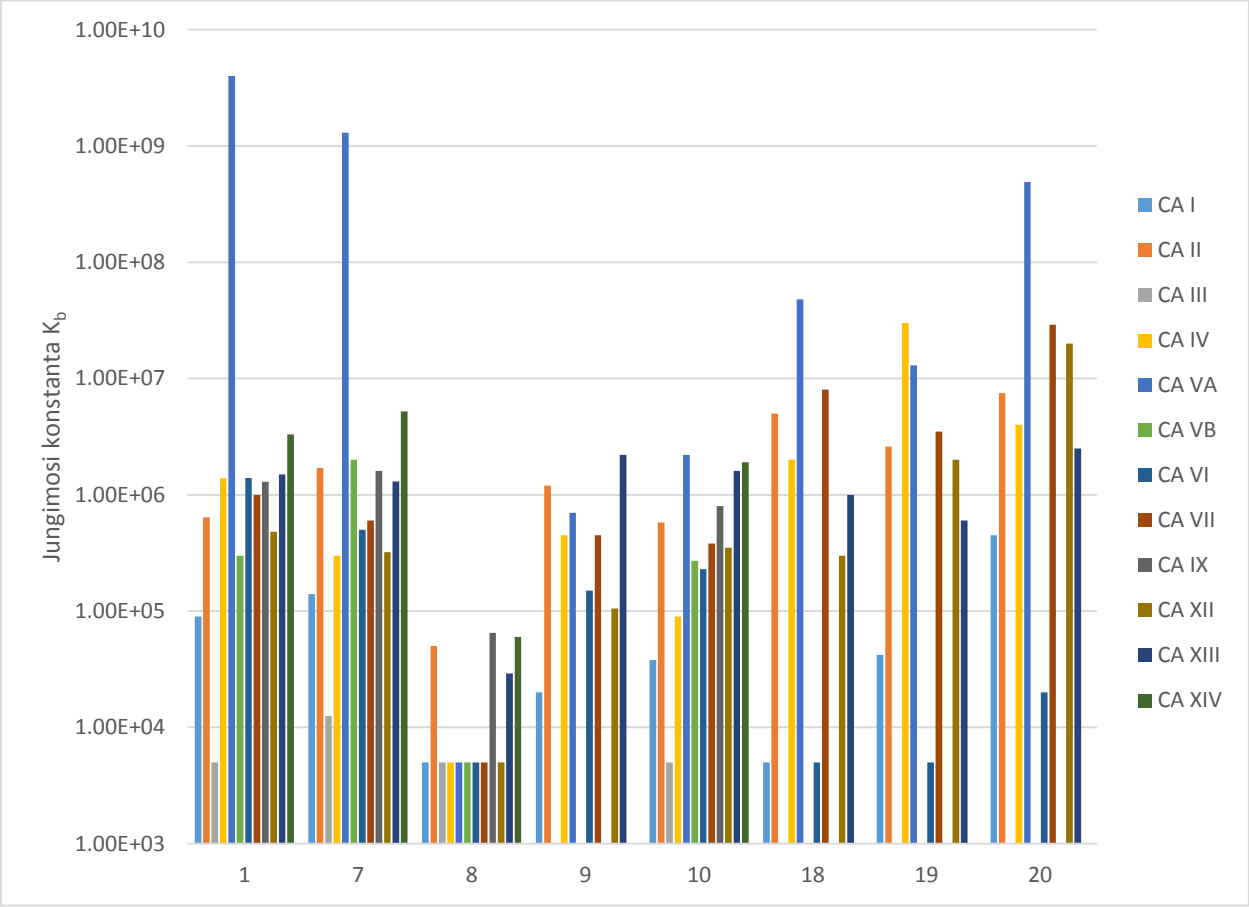
Kitų slopiklių su fluorescenciniais fragmentais sintezė bus atliekama tolimesniuose darbuose.

4.4 Inhibitorių ir baltymų saveikos tyrimas

Fluorescencinės terminio poslinkio analizės metodu išmatuotos šešių slopiklių (**7**, **8**, **10**, **18**, **19**, **20**) jungimosi su karboanhidrazėmis (CA I, CA II, CA IV, CA VA, CA VI, CA VII, CA XII, CA XIII) konstantos (K_b). Junginio **18** matavimus atlikau aš, kitų junginių matavimus atliko Vaida Morkūnaitė ir Vaida Paketurytė.

Kaip matome iš grafiko tik junginys **7** pasižymi panašia sąveika ir atrankumu su baltymais kaip ir slopiklis **1.** Kiti susintetinti junginiai nusileidžia inhibitoriui **1** tiek selektyvumu, tiek jungimosi prie CA VA stiprumu, o junginys **8** iš visos junginių grupės išsiskiria savo prastu gimiringumu karboanhidrazėms. Lyginant inhibitorius **9** ir **10** su **1** ir **7** matyti, kad pakeitus benzimidazolo fragmentą į imidazolo, jungimasis su CA VA ženkliai sumažėja.

Inhibitoriai **18**, **19** ir **20** dėl savo struktūrinio panašumo pasižymi tarpusavyje panašiu gimiringumu karboanhidrazėms, tačiau prie CA VA jungiasi silpniau ir ne taip atrankiai kaip pirmtakas **1**.



X Pav. Junginių 1, **7**, **8**, **10**, **18**, **18**, **20** jungimosi su CA I, CA II, CA IV, CA VA, CA VI, CA VII, CA XII, CA XIII sąveikos konstantų palyginimas

1 lentelė: Junginių 1, **7**, **8**, **10**, **18**, **18**, **20** jungimosi su CA I, CA II, CA IV, CA VA, CA VI, CA VII, CA XII, CA XIII sąveikos konstantos

Baltymas	Inhibitorius							
	1	**7**	**8**	**9**	**10**	**18**	**19**	**20**
CA I	9.0×10^4	1.4×10^5	5.0×10^3	2.0×10^4	3.8×10^4	5.0×10^3	4.2×10^4	4.5×10^5
CA II	6.4×10^5	1.7×10^6	5.0×10^4	1.2×10^6	5.8×10^5	5.0×10^6	2.6×10^6	7.5×10^6
CA III	5.0×10^3	1.3×10^4	5.0×10^3	-	5.0×10^3	-	-	
CA IV	1.4×10^6	3.0×10^5	5.0×10^3	4.5×10^5	9.0×10^4	2.0×10^6	3.0×10^7	4.0×10^6
CA VA	4.0×10^9	1.3×10^9	5.0×10^3	7.0×10^5	2.2×10^6	4.8×10^7	1.3×10^7	4.9×10^8
CA VB	3.0×10^5	2.0×10^6	5.0×10^3	-	2.7×10^5	-	-	-
CA VI	1.4×10^6	5.0×10^5	5.0×10^3	1.5×10^5	2.3×10^5	5.0×10^3	5.0×10^3	2.0×10^4
CA VII	1.0×10^6	6.0×10^5	5.0×10^3	4.5×10^5	3.8×10^5	8.0×10^6	3.5×10^6	2.9×10^7
CA IX	1.3×10^6	1.6×10^6	6.5×10^4	-	8.0×10^5	-	-	-
CA XII	4.8×10^5	3.2×10^5	5.0×10^3	1.1×10^5	3.5×10^5	3.0×10^5	2.0×10^6	2.0×10^7
CA XIII	1.5×10^6	1.3×10^6	2.9×10^4	2.2×10^6	1.6×10^6	1.0×10^6	6.0×10^5	2.5×10^6
CA XIV	3.3×10^6	5.2×10^6	6.0×10^4	-	1.9×10^6	-	-	-

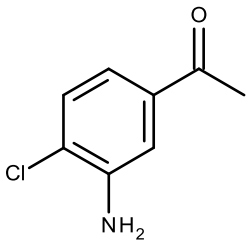
5. Eksperimentinė dalis

Reakcijos buvo sekamos plonasluoksnės chromatografijos metodu, naudojant TLC Silica gel 60 F254 (Merck) plokšteles. ^{1}H ir ^{13}C BMR spektrai užrašyti spektrometru Bruker (400 MHz ir 100 MHz atitinkamai) DMSO-D_6 tirpale, vietoj vidinio standarto naudojant likutinį tirpiklio signalą. Signalų cheminiai poslinkiai pateikti δ (TMS) skalėje (m.d.). Lydymosi temperatūros nustatytos Thermo scientific 9100 aparatu, atviruose kapiliaruose. Chromatografiniam gryninimui naudotas Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck). Aukštos skiriamosios gebos masės spektrai (ASMS) užrašyti Dual-ESI K-TOF 6520 masės spektrometru (Agilent Technologies).

Fluorescencinės terminio poslinkio analizės eksperimentų metodika

Fluorescencinės terminio poslinkio analizės eksperimentai atlikti naudojant detekcijos sistemą „Rotor – Gene 6000" (Qiagen). Matavimo eigoje temperatūra buvo keliama nuo 30 °C iki 99 °C, 1 °C per minutę greičiu. Sužadinimo bangos ilgis – 365 nm, emisijos – 460 nm. Slopiklio tirpalai eksperimentui ruošiami serijiniu dukartiniu skiedimu. Šie tirpalai vėliau skiedžiami 25 kartus 50 mM fosfato buferiniu tirpalu (pH 7), kuriame yra 100 mM NaCl. Galiausiai gaunami tokių koncentracijų tirpalai: 400, 200, 100, 50, 25, 13, 6, 0 μM. Paruošiamas 10 μM koncentracijos baltymo tirpalas, pradinį baltymo tirpalą skiedžiant tuo pačiu 50 mM fosfato buferiniu tirpalu, kuris naudotas ir ligando tirpalų ruošime. Į baltymo tirpalą pridedama 100 μM fluorescuojančio dažo 8-anilinonaftaleno-1-sulfonrūgšties. 10 μM koncentracijos baltymo tirpalas ir skirtingų koncentracijų ligando tirpalai lygiu santykiu yra supilami į mėgintuvėlius. Galutinė baltymo tirpalo koncentracija mėginyje yra 5 μM, o ligando koncentracijos 200, 100, 50, 25, 13, 6, 3, 0 μM.

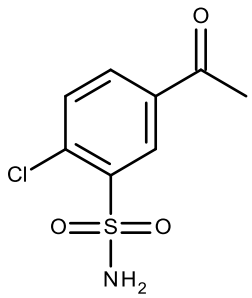
1-(3-Amino-4-chlorfenil)etanonas (3)



Į alavo (II) chlorido dihidrato (20,4 g, 90,0 mmol), koncentruotos druskos rūgšties (7,90 ml, 90,0 mmol), natrio chlorido (10,5 g, 180 mmol) ir vandens (21,60 ml) mišinį sudedamas 3-nitro-4-chloracetofenonas (**1**) (6,00 g, 30,0 mmol). Reakcijos mišinys pašildomas iki 50 °C ir prasidėjus egzoterminei reakcijai šaldomas, neleidžiant temperatūrai pakilti virš 70 °C, paskui 2 val. maišomas 60-70 °C temperatūroje, atvėsinamas iki kambario temp., įpilama tolueno (50 ml) ir šaldant ledo vonioje bei maišant lašinamas 30 % vandeninis natrio šarmo tirpalas kol pasiekiamas mišinio pH 12-13. Gautas tirpalas ekstrahuojamas dietilo eteriu. Ekstraktai sujungiami, praplaunami sūrymu, džiovinami bevadeniu kalio karbonatu. Tirpalas filtruojamas, tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, liekana kristalinama iš petrolio eterio - benzeno mišinio 1:1.

Išeiga: 4,00 g (78 %); lyd.t. 104-105 °C (Lit. 105-107 °C [20]).

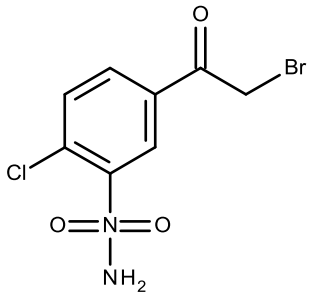
5-Acetil-2-chlorbenzensulfonamidas (5)



Į atšaldytą 1-(3-amino-4-chlorfenil)etanono (9,65 g, 57,0 mmol), acto rūgšties (28,5 ml) ir druskos rūgšties (28,5 ml) tirpalą, sulašinamas natrio nitrito tirpalas (5,86 g, 85,0 mmol ištirpinta 14,3 ml vandens) reakcijos temperatūrai neleidžiant pakilti virš 5 °C. Mišinys maišomas 30 min. 5 °C temperatūroje, po to į jį greitai supilamas iki -15 °C atšaldytas sieros dioksido (17,0 g, 266 mmol), acto rūgšties (42,7 ml), ir vario (II) chlorido dihidrato (2,80 g, 17,0 mmol) mišinys ir maišoma 0 °C temperatūroje 24 val. Reakcijos mišinys skiedžiamas vandeniu (140 ml) ir ekstrahuojamas toluenu (3 x 75 ml). Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu magnio sulfatu, filtruojamas, tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje. Gauta medžiaga ištirpinama tetrahidrofurane (57 ml) ir į tirpalą sulašinamas 25 % vandeninis amoniako tirpalas (50,0 ml) palaikant 5-10 °C temperatūrą. Reakcijos mišinys maišomas 24 val. kambario temperatūroje. Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, liekana suspenduojama vandenyje, gautos nuosėdos nufiltruojamos, plaunamos vandeniu, džiovinamos ir kristalinamos iš izopropanolio.

Išeiga: 10,4 g (78%); lyd.t. 155-156 °C (Lit.157-158 °C [21]).

5-(Bromacetil)-2-chlorbenzensulfonamidas (6)



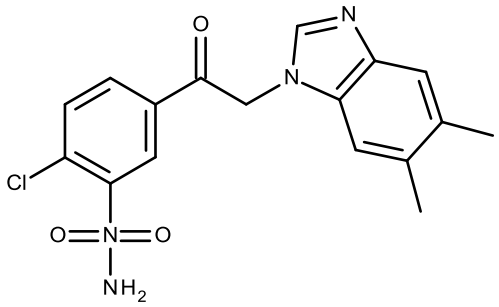
Į 5-acetil-2-chlorbenzensulfonamido (8,01 g, 34,3 mmol) suspensiją acto rūgštyje (69 ml), 40 °C temperatūroje sulašinamas bromas (1,77 ml, 34,3 mmol) ir reakcijos mišinys maišomas 1 val. Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, liekana suspenduojama dietilo eteryje, nuosėdos nufiltruojamos, plaunamos dietilo eteriu ir kristalinamos iš metanolio.

Išeiga: 7,51 g (70%); lyd. t. 164-165 °C (Lit. 167-170 °C [26]).

Imidazolo darinių alkilinimas 5-(bromacetil)-2-chlorbenzensulfonamidu

Bendra metodika: 5-(bromacetil)-2-chlorbenzensulfonamido (150 mg, 0,48 mmol), atitinkamo imidazolo arba benzimidazolo (0,72 mmol) ir bevandenio natrio acetato (42 mg, 0,58 mmol) mišinys tetrahidrofurane maišomas kambario temperatūroje, reakcijos eigą sekant plonasluoksnės chromatografijos būdu. Reakcijai pasibaigus reakcijos mišinys išpilamas į vandenį, iškritusios nuosėdos nufiltruojamos, praplaunamos vandeniu, išdžiovinamos ir gryninamos.

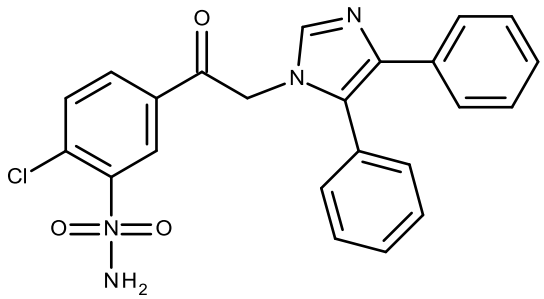
2-Chlor-5-[(5,6-dimetil-1H-benzimidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas (7)



Junginys gryninamas „flash“ chromatografijos būdu (eliuentas – EtOAc:MeOH 2:1, R_f = 0.80)
Išeiga: 71 mg (41%); lyd.t. 247-249 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 2,29 (3H, s, CH_3), 2,31 (3H, s, CH_3), 6,01 (2H, s, CH_2CO), 7,33 (1H, s, $C_{7'}$-H), 7,45 (1H, s, $C_{4'}$-H), 7,89 (2H, s, SO_2NH_2), 7,95 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, C_3-H), 8,03 (1H, s, $C_{2'}$-H), 8,35 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, C_4-H), 8,55 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, C_6-H). ^{13}C BMR δ, m.d.: 20,3, 20,5, 51,3, 111,1, 119,8, 128,6, 130,3, 131,4, 132,8, 133,2, 133,6, 133,8, 136,2, 142,1, 142,2, 144,4, 192,7. ASMS apsk. ($C_{17}H_{16}ClN_3O_3S$): [$(M+H)^+$]= 378,0674, rasta: 378,0679.

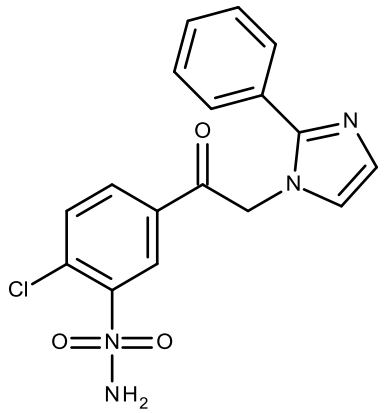
2-Chlor-5-[(4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas (8)



Junginys kristalinamas iš tolueno:MeOH 1:1.
Išeiga: 75 mg (36%); lyd.t. 111-112 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 5,96 (2H, s, CH_2CO), 7,37-7,53 (10H, m, C_{Ar}-H), 7,87 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, C_3-H), 7,89 (2H, s, SO_2NH_2), 8,17 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, C_4-H), 8,43 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, C_6-H), 8,36 (1H, s, $C_{2'}$-H). ^{13}C BMR δ, m.d.: 53,6, 126,0, 127,6, 127,7, 128,6, 129,4, 129,6, 129,9, 130,2, 130,5, 131,0, 131,3, 132,6, 132,9, 133,2, 137,0, 137,4, 142,3, 190,9. ASMS apsk. ($C_{23}H_{18}ClN_3O_3S$): [$(M+H)^+$] = 452,0830, rasta: 452,0836.

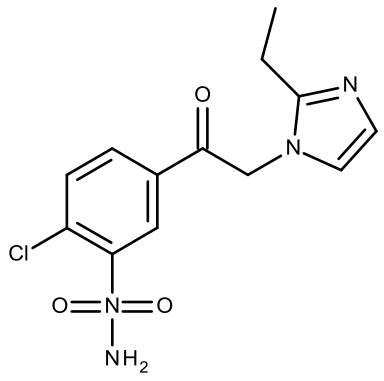
2-Chlor-5-[(2-fenil-1H-imidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas (9)



Junginys gryninamas „flash“ chromatografijos būdu (eliuentas – EtOAc, R_f = 0.39)
Išeiga: 48 mg (28%); lyd.t. 131-132 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 5,87 (2H, s, CH_2CO), 7,07 (1H, d, *J* = 0,8 Hz, $C_{4'}$-H), 7,28 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, $C_{5'}$-H), 7,37-7,44 (3H, m, Ph-H), 7,45-7,51 (2H, m, Ph-H), 7,85 (2H, s, SO_2NH_2), 7,89 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, C_3-H), 8,26 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, C_4-H), 8,48 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, C_6-H). ^{13}C BMR δ, m.d.: 54,0, 123,9, 128,2, 128,4(2C), 129,0, 129,1, 131,1, 132,8, 133,2, 133,4, 136,5, 142,2, 147,7, 192,8. ASMS apsk. ($C_{17}H_{14}ClN_3O_3S$): [$(M+H)^+$] = 376,0517, rasta: 376,0522.

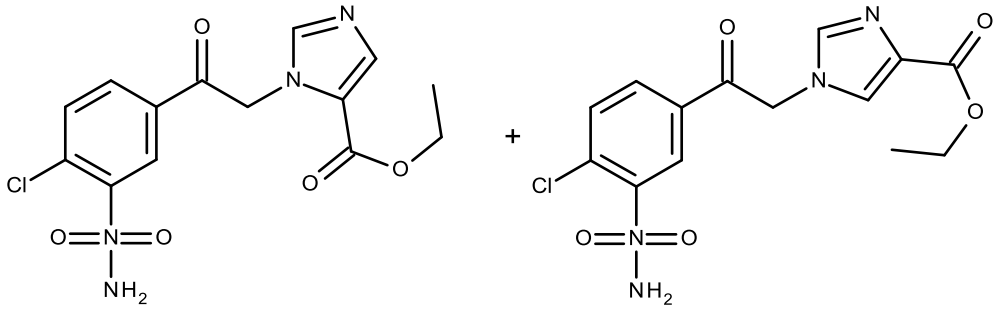
2-Chlor-5-[(2-etil-1H-imidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas (10)



Junginys gryninamas „flash“ chromatografijos būdu (eliuentas – EtOAc:MeOH 2:1, (2:1), R_f = 0.78) Išeiga: 51 mg (34%); lyd.t 223-225 °C.

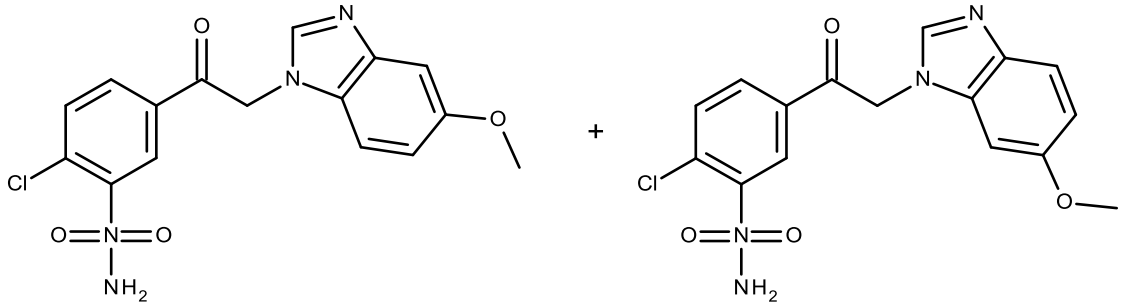
^{1}H BMR δ, m.d.: 1,14 (3H, d, *J* = 7,2 Hz, CH_3), 2,48-2,53 (2H, m, CH_2, persikloja su DMSO), 5,74 (2H, s, CH_2CO), 6,81 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, $C_{4'}$-H), 7,00 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, $C_{5'}$-H), 7,86 (2H, s, SO_2NH_2), 7,92 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, C_3-H), 8,29 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, C_4-H), 8,52 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, C_6-H). ^{13}C BMR δ, m.d.: 12,5, 19,5, 52,4, 121,4, 126,4, 128,5, 132,7, 133,2, 133,7, 136,2, 142,2, 149,8, 192,9. ASMS apsk. ($C_{13}H_{14}ClN_3O_3S$): [$(M+H)^+$]= 328,0517, rasta: 328,0518

Etil 1-{2-[3-(sulfamoil)-4-chlorfenil]-2-oksoetil}-1H-imidazolo-4-karboksilatas ir etil 1-{2-[3-(sulfamoil)-4-chlorfenil]-2-oksoetil}-1H-imidazolo-5-karboksilatas (11a ir 11b)



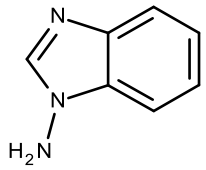
Junginių mišinys gryninamas „flash“ chromatografijos būdu (eliuentas – EtOAc:MeOH 2:1, (2:1), R_f = 0.79). Gaunamas izomerų mišinys, kurio atskirti nepavyko.
Bendra išeiga: 62 mg (37%).

2-Chlor-5-[(5-metoksi-1H-benzimidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas ir 2-chlor-5-[(6-metoksi-1H-benzimidazol-1-il)acetil]benzensulfonamidas (12a ir 12b)



Junginių mišinys gryninamas „flash“ chromatografijos būdu (eliuentas – EtOAc:MeOH 2:1, (2:1), R_f = 0.82). Gaunamas izomerų mišinys, kurio atskirti nepavyko.
Bendra išeiga: 54 mg (31%).

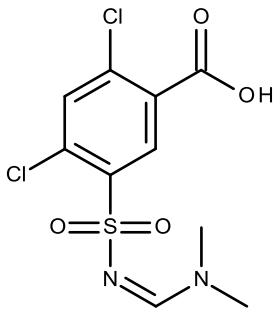
N-aminobenzimidazolas (13)



Į benzimidazolo (1,0 g 8,5 mmol) ir kalio hidroksido (1,7 g 30 mmol) tirpalą vandenyje (8,0 ml) pašildytą iki 45 °C porcijomis supilamas šviežiai paruoštas hidroksilamino-O-sulfonrūgšties natrio druskos (2,0 g, 18 mmol) tirpalas vandenyje (5,0 ml). Reakcijos mišinys 30 min maišomas 50°C temperatūroje ir atvėsinamas. Iškritę kristalai filtruojami, plaunami šaltu vandeniu iki neutralios terpės ir kristalinami iš vandens.

Išeiga: 0,57 g (51%); lyd.t. 154-155 °C (Lit. 156-157 °C [9]).

2,4-Dichlor-5-[dimetilaminometilenamino]sulfonil-benzoinė rūgštis (15)

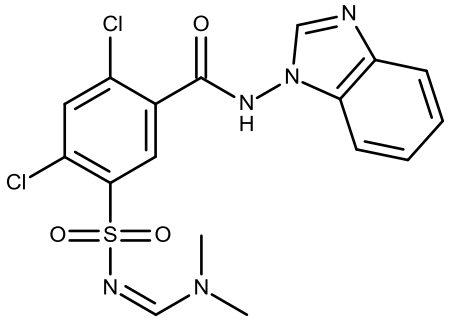


2,4-dichlor-5-sulfamoil benzoinė rūgštis (1,50 g 5,55 mmol) ištirpinama dimetilformamide (4,30 ml), tirpalas atšaldomas iki -15 °C, į jį sulašinamas tionilo chloridas (2,00 ml), temperatūrai neleidžiant pakilti virš -5 °C, ir maišoma 2 val. kambario temperatūroje. Reakcijos mišinys maišant išpilamas ant sugrūsto ledo, nufiltruojamas ir plaunamas vandeniu iki neutralios terpės.

Išeiga: 1,38 g (77%); lyd. t. 254-255 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 2,94 (3H, s, NCH_3), 3,19 (3H, s, NCH_3), 7,92 (1H, s, C_3-H), 8,27 (1H, s, C_6-H), 8,41 (1H, s, NCH), 13,89 (1H, pl. s, CO_2H).

N-(benzimidazol-1-il)-2,4-dichlor-5-[dimetilaminometilenamino]sulfonil-benzamidas (17)

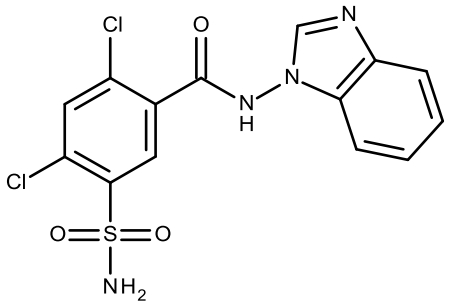


2,4-dichlor-5-[dimetilaminometilenamino]sulfonil-benzoinės rūgšties (325 mg, 1,00 mmol), tionilo chlorido (1,20 ml 16,5 mmol) ir tolueno (1 ml) mišinys virinamas 3 val., tionilo chloridas ir toluenas pašalinami sumažintame slėgyje, o likutis ištirpinamas priridino (1 ml) ir THF (1 ml) mišinyje. Gautas tirpalas atšaldomas iki 0 °C ir į jį sudedamas N-aminobenzimidazolas (134 mg 1,00 mmol). Reakcijos mišinys 3 val. maišomas 80 °C temperatūroje, po to paliekamas maišytis kambario temperatūroje per naktį. Į reakcijos mišinį supilama 15 ml vandens, iškritusi dervinga masė maišoma kol virsta milteliais. Produktas nufiltruojamas ir kristalinamas iš nitrometano.

Išeiga: 289 mg (76%); lyd. t. 157-158 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 2,97 (3H, s, NCH_3), 3,23 (3H, s, NCH_3), 7,31 (1H, t, *J* = 8 Hz, $C_{5'}$-H), 7,38 (1H, t, *J* = 8,4 Hz, $C_{6'}$-H), 7,51 (1H, d, *J* = 8 Hz, $C_{7'}$-H), 7,75 (1H, d, *J* = 8 Hz, $C_{4'}$-H), 8,08 (1H, s, C_3-H), 8,33 (1H, s, C_6-H), 8,44 (1H, s, NCH), 8,49 (1H, s, $C_{2'}$-H) 12,32 (1H, s, NH). ^{13}C BMR δ, m.d.: 35,5, 41,6, 109,8, 120,5, 122,9, 124,1, 130,5, 132,7, 133,1, 133,5, 134,2, 135,4, 139,5, 141,5, 144,3, 161,3, 164,5.

N-(benzimidazol-1-il)-2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzamidas (18)

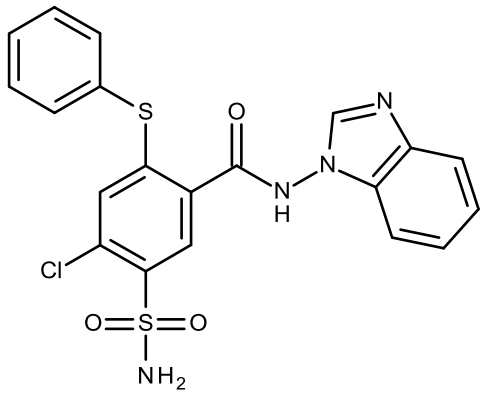


N-(benzimidazol-1-il)-2,4-dichlor-5-[dimetilaminometilenamino]sulfonil-benzamido (660 mg, 1,50 mmol) suspensija 2N NaOH (5 ml) maišoma kambario temperatūroje dvi paras. Reakcijos mišinys neutralizuojamas su 2N HCl, iškritusios nuosėdos nufiltruojamos, plaunamos vadeniu iki neutralaus pH, džiovinamos ir kristalinamos iš nitrometano.

Išeiga: 436 mg (76%); lyd.t. 258-259 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 7,31 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, $C_{5'}$-H), 7,38 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, $C_{6'}$-H), 7,51 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, $C_{7'}$-H), 7,75 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, $C_{4'}$-H), 7,92 (2H, s, NH_2SO_2), 8,14 (1H, s, C_3-H), 8,37 (1H, s, C_6-H), 8,49 (1H, s, $C_{2'}$-H), 12,36 (1H, s, NHCO). ^{13}C BMR δ, m.d.: 109,8, 120,5, 122,9, 124,1, 130,0, 133,0 133,1, 133,5, 133,8, 135,1, 140,8, 141,4, 144,2, 164,5. ASMS apsk. ($C_{14}H_{10}Cl_2N_4O_3S$) [$(M+H)^+$] = 384,9923, rasta: 384,9920.

N-(benzimidazol-1-il)-4-chlor-2-fenilsulfanil-5-sulfamoil-benzamidas (19)

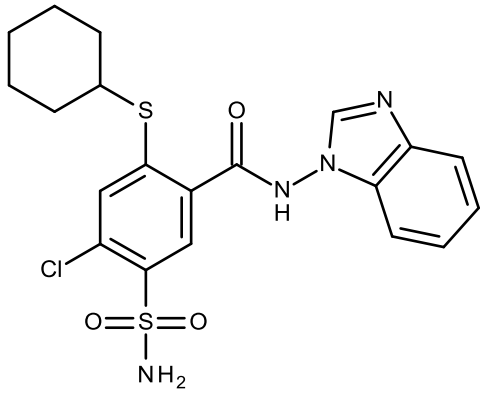


N-(benzimidazol-1-il)-2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzamidas (150 mg, 0,390 mmol), tiofenolis (50,0 µL, 0,490 mmol) ir trietilaminas (80,0 µL, 0,580 mmol) ištirpinami DMSO (2 ml) ir gautas tirpalas maišomas kambario temperatūroje dvi paras. Po to reakcijos mišinys išpilamas į etilacetatą, 2 kartus plaunamas sūrymu, po to vandeniu, organinis sluoksnis džiovinamas bevadeniu magnio sulfatu, filtruojamas, tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje ir atliekama gautos medžiagos flash chromatografija (eliuentas – $CHCl_3$:MeOH 10:1).

Išeiga 91 mg (51%); lyd. t. 272-274 °C.

^{1}H NMR δ m.d.: 6,98 (1H, s, C_3-H), 7,30 (1H, t, *J* = 7,2 Hz, $C_{5'}$-H), 7,36 (1H, t, *J* = 7,2 Hz, $C_{6'}$-H), 7,50 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, $C_{4'}$-H), 7,57-7,60 (3H, m, $C_{2'',4'',6''}$-H), 7,63-7,67 (2H, m, $C_{3'',5''}$-H), 7,75 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, $C_{7'}$-H), 7,78 (2H, s, SO_2NH_2), 8,44 (1H, s, C_6-H), 8,48 (1H, s, $C_{2'}$-H), 12,44 (1H, s, CONH). ^{13}C NMR δ m.d.: 109,9, 120,5, 122,9, 124,0, 129,5, 130,4, 130,6, 131,0 (2C), 133,6, 133,9, 135,1 (2C), 138,5, 144,3 (2C), 145,2, 165,6. ASMS apsk. ($C_{20}H_{15}ClN_4O_3S_2$) [$(M+H)^+$] = 459,0347, rasta: 459,0351.

N-(benzimidazol-1-il)-4-chlor-2-cikloheksilsulfanil-5-sulfamoil-benzamidas (20)

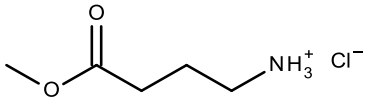


N-(benzimidazol-1-il)-2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzamidas (150mg, 390 mmol), cikloheksantiolis (76,0 μL, 0,610 mmol) ir trietilaminas (80,0 μL, 0,580 mmol) ištirpinami DMSO (2 ml) ir gautas tirpalas maišomas kambario temperatūroje dvi paras. Reakcijos mišinys išpilamas į etilacetatą, 2 kartus plaunamas sūrymu, po to vandeniu. Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu magnio sulfatu, filtruojamas, tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje ir atliekama gautos medžiagos flash chromatografija, ($CHCl_3$:MeOH 10:1).

Išeiga: 40 mg (22%); lyd.t. 231-233 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 1,25-1,34 (1H, m, C_{Cy}-H), 1,38-1,48 (4H, m, C_{Cy}-H), 1,59-1,62 (1H, m, C_{Cy}-H), 1,72-1,78 (2H, m, C_{Cy}-H), 1,96-2,00 (2H, m, C_{Cy}-H), 2,09 (1H, s, C_{Cy}-H), 3,71 (1H, br s, C_S-H), 7,31 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, $C_{5'}$-H), 7,37 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, $C_{6'}$-H), 7,55 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, $C_{7'}$-H), 7,76 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, $C_{4'}$-H), 7,77(2H, s, SO_2NH_2), 7,85 (1H, s, C_3-H), 8,25 (1H, s, C_6-H), 8,45(1H, s, $C_{2'}$-H), 12,20 (1H, s, CONH). ^{13}C BMR δ, m.d.: 25,5, 25,7, 31,2, 32,7, 45,0, 109,9, 120,5, 122,9, 123,9, 129,0, 131,6, 133,3, 133,5, 133,7, 138,4, 141,5, 141,9, 144,3, 166,0. ASMS apsk. ($C_{20}H_{21}ClN_4O_3S_2$) [$(M+H)^+$] = 465,0816, rasta: 465,0809.

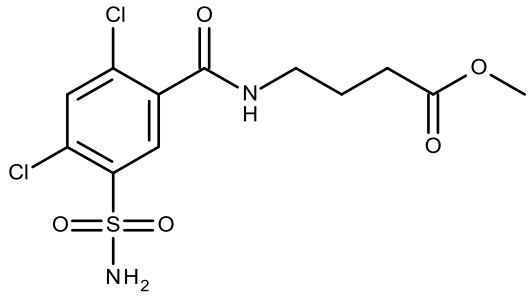
Metil-4-aminobutanoato hidrochloridas (31)



Į 4-aminobutano rūgšties (1.5g, 15mmol) suspensiją metanolyje (30 ml),atšaldytame iki 0 °C, sulašinamas tionilo chloridas (15 ml, 21 mmol), neleidžiant reakcijos temperatūrai pakilti virš 10 °C, po to reakcijos mišinys maišomas per naktį kambario temperatūroje. Tirpiklis ir tionilo chlorido perteklius pašalinami sumažintame slėgyje, produktas naudojamas be papildomo gryninimo.

Išeiga: 2,2 g (98 %); lyd. t. 103-104 °C (Lit. 104-107 °C [55]).

Metil 4-[(2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (32)

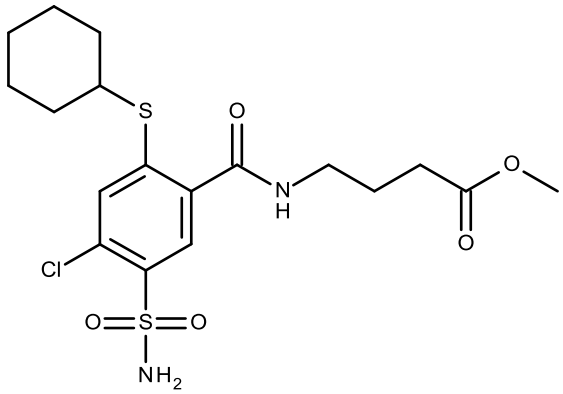


Trietilaminas (12,2 ml, 43,6 mmol) sulašinamas į iki 0 °C atšaldytą metil-4-aminobutanoato hidrochlorido (2,24 g, 14,6 mmol) ir dichlormetano (60 ml) mišinį. Tada į reakcijos mišinį porcijomis sudedama 2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzoil chlorido (3,20 g, 11,1 mmol) suspensija dichlormetane (30 ml), reakcijos temperatūrai neleidžiant pakilti aukščiau nei 5 °C ir reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje per naktį. Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, likusi masė ištirpinama etilacetate ir plaunama 1M HCl tirpalu (25 ml), sūrymu (25 ml) ir vandeniu (25 ml). Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje, liekana kristalinama iš etilacetato ir heptano mišinio.

Išeiga: 2,13 g (52%); lyd.t. 135-136 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 1,77 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, CH_2), 2,41 (2H, t, *J* = 7,6 Hz, $COCH_2$), 3,27 (2H, q, *J* = 6,8 Hz, $NHCH_2$), 3,61 (3H, m, Me),7,82 (2H, s, SO_2NH_2), 7,92 (1H, s, C_3-H), 7,95 (1H, s, C_6-H), 8,69 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, NH). ^{13}C BMR δ, m.d.: 24,7, 31,1, 38,9, 51,8, 129,2, 132,2, 132,5, 134,4, 136,3, 140,4, 165,0, 173,5. ASMS apsk. ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2O_5S$) [$(M+H)^+$]= 369,0073, rasta: 369,0074.

4-[(4-Chlor-2-cikloheksil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (33)



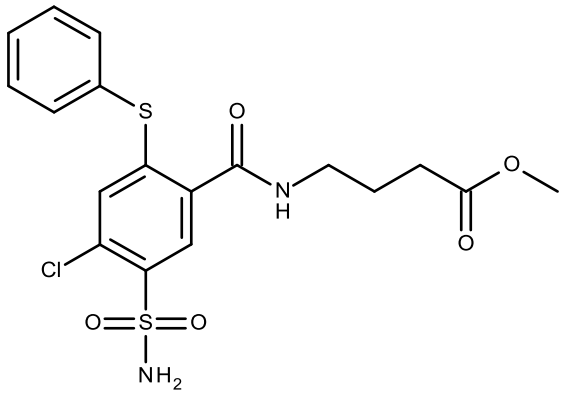
Metil 4-[(2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoato (370 mg, 1,00 mmol), cikloheksantiolio (128 mg, 1,10 mmol), bevandenio kalio karbonato (553 mg, 4,00 mmol) ir DMSO (2 ml) mišinys 3 val. maišomas 60 °C temperatūroje. Reakcijai pasibaigus reakcijos mišinys praskiedžiamas etilacetatu (30

ml), tirpalas 2 kartus plaunamas sūrymu (10 ml), po to vandeniu (10 ml). Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje.

Išeiga: 418 mg (93 %); lyd.t. 165-167 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 1,15-1,44 (5H, m, Cy-H), 1,57-1,60 (1H, m, Cy-H), 1,68-1,73 (2H, m, Cy-H), 1,77 (2H, quint, *J* = 7,2 Hz, CH_2), 1,89-1,92 (2H, m, Cy-H), 2,43 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, $COCH_2$), 3,24 (2H, q, *J* = 6.4 Hz, $NHCH_2$), 3,53-3,58 (1H, m, Cy-H), 3,61 (3H, s, Me), 7,65 (3H, s, C_3-H, SO_2NH_2), 7,81 (1H, s, C_6-H), 8,55 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, NH). ^{13}C NMR δ m.d.: 24,8, 25,5, 25,7, 31,1, 32,7, 38,7, 40,6, 51,8, 128,1, 130,8, 131,7, 136,9, 137,9, 141,2, 166,5, 173,6. ASMS apsk. ($C_{18}H_{25}ClN_2O_5S_2$) [$(M+H)^+$]= 449,0966, rasta: 449,0962.

4-[(4-Chlor-2-fenilsulfanil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (34)

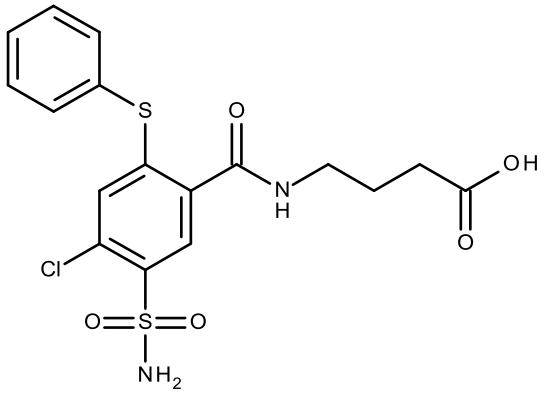


Metil 4-[(2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (600 mg, 1,63 mmol), tiofenolis (202 mg, 1,84 mmol) ir trietilaminas (310 mg, 2,15 mmol) ištirpinami DMSO (4 ml) ir maišomi kambario temperatūroje dvi paras. Reakcijai pasibaigus reakcijos mišinys praskiedžiamas etilacetatu (60 ml), medžiagos tirpalas 2 kartus plaunamas sūrymu (10 ml), po to vandeniu (10 ml). Tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje ir likutis kristalinamas iš etilacetato – heptano mišinio.

Išeiga: 553 mg (77 %); lyd.t. 136-137 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 1,80 (2H, p, *J* = 7,2 Hz, $NHCH_2CH_2$), 2,42 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH_2CO), 3,28 (2H, q, *J* = 6,8 Hz, $NHCH_2$), 3,60 (3H, s, CH_3), 6,81 (1H, s, C_3-H), 7,53-7,65 (5H, m, C_{Ar}-H), 7,65 (2H, s, NH_2), 7,99 (1H, s, C_6-H), 8,79 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, NH).

4-[(4-Chlor-2-fenilsulfanil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butano rūgštis (29)

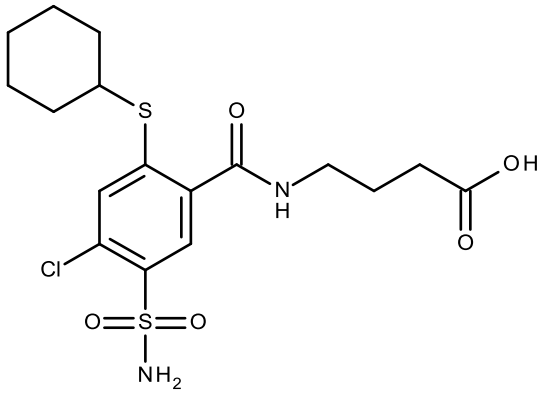


Metil 4-[(4-chlor-2-fenilsulfanil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (365 mg, 0,824 mmol) ištirpinamas metanolio (10 ml) bei 10% NaOH (1,2 ml, 3,0 mmol) mišinyje ir maišomas kambario temperatūroje 12 val. Reakcijos mišiniys parūgštinamas acto rūgštimi ir lakūs komponentai pašalinami sumažintame slėgyje. Likutis kristalinamas iš 0,1M HCl tirpalo.

Išeiga: 286 g (81 %); lyd.t. 176 -177 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 1,77 (2H, p, *J* = 7,2 Hz, NHCH$_2$CH$_2$), 2,33 (2H, t, *J* = 7,2Hz, CH$_2$CO), 3,29 (2H, q, *J* = 6,4 Hz, NHCH$_2$), 6,80 (1H, s, C$_3$-H), 7,53-7,59 (5H, m, C$_{Ar}$-H), 7,65 (2H, s, NH2), 8,00 (1H, s, C$_6$-H), 8,80 (1H, t, *J* = 5,2 Hz, NH), 12,12 (1H, s, COOH); ^{13}C BMR δ, m.d.: 24,9, 31,5, 113,6, 128,6, 129,6, 130,4, 130,8, 131,4, 132,3, 133,7, 136,2, 137,9, 144,5, 165,9, 174,6.

4-[(4-Chlor-2-cikloheksilsulfanil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butano rūgštis (30)

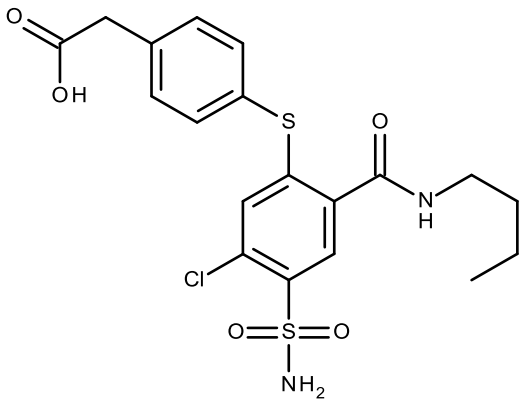


4-[(4-chlor-2-cikloheksil-5-sulfamoil-benzoil)amino]butanoatas (225 mg, 500 µmol) ištirpinamas metanolio (2 ml) ir konc. HCl (1 ml) mišinyje ir virinamas 20h. Reakcijos mišinys sausai nugarinamas sumažintame slėgyje ir liekana kristalinama iš vandens su natrio acetatu (20.6 mg, 251 µmol).

Išeiga: 142 mg (65 %); lyd. t. 163-165 °C.

^{1}H NMR δ m.d.: 1,18-1,45 (5H, m, Cy-H), 1,57-1,60 (1H, m, Cy-H), 1,69-1,71 (2H, m, Cy-H), 1,73 (2H, quint, *J* = 7,2 Hz, CH_2), 1,90-1,92 (2H, m, Cy-H), 2,32 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, $COCH_2$), 3,23 (2H, q, *J* = 6,4 Hz, $NHCH_2$), 3,53-3,58 (1H, m, Cy-H), 7,64 (1H, s, C_3-H), 7,66 (2H, br s, SO_2NH_2), 7,82 (1H, s, C_6-H), 8,56 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, NH), 12,17 (1H, br s, CO_2H). ^{13}C NMR δ m.d.: 24,9, 25,5, 25,7, 31,6, 32,7, 38,9, 44,3, 128,2, 130,7, 131,7, 136,9, 137,8, 141,2, 166,4, 174,7. ASMS apsk. ($C_{17}H_{23}ClN_2O_5S_2$)[$(M+H)^+$]= 435,0810, rasta: 435,0809.

2-[4-[2-(Butilkarbamoil)-5-chlor-4-sulfamoil-fenil]sulfanilfenil]acto rūgštis (28)

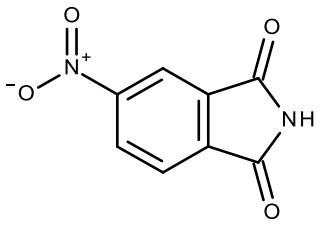


N-butil-2,4-dichlor-5-sulfamoil-benzamidas (438 mg, 1,35 mmol), 2-(4-sulfanilfenil)acto rūgštis (250 mg, 1,49 mmol) ir trietilaminas (500µL, 3,47 mmol) ištirpinami DMSO (5 ml) ir reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 48h. Reakcijai pasibaigus mišinys išpilamas į etilacetatą, plaunamas 0,5M HCl tirpalu ir vandeniu, džiovinamas bevandeniu $MgSO_4$, tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje.Gauta medžiaga kristalinama iš tolueno ir acto r. mišinio.

Išeiga: 443 mg (72 %); lyd. t. 187-188 °C.

^{1}H BMR δ, m.d.: 0,92 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, CH_3), 1,37 (2H, sekst., *J* = 7,2 Hz, CH_2CH_3), 1,53 (2H, pent, *J* = 7,2 Hz, $CH_2CH_2CH_3$), 3,26 (2H, q, *J* = 6,8 Hz), 3,69 (2H, s, CH_2COOH), 6,81 (1H, s, $C_{3'}$-H), 7,13-7,44 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, $C_{3,5}$-H), 7,50-7,52 (2H, d, *J* = 8,0 Hz $C_{2,4}$-H), 7,99 (1H, s, $C_{6'}$-H), 8,75 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, CONH), 12,47 (1H, s, COOH).

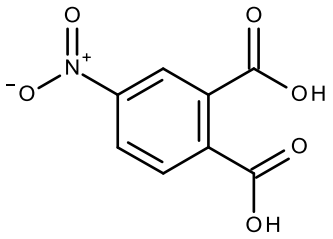
4-Nitroftalimidas (21)



Į iki 10 °C atšaldytą konc. sieros rūgšties (70 ml) 100% HNO_3 ir (12 ml, 0,29 mol) mišinį intensyviai maišant porcijomis sudedamas ftalimidas (10 g, 68 mmol), mišinio temperatūrai neleidžiant pakilti virš 15 °C. Sudėjus visą ftalimdą reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje 3 paras. Geltonas reakcijos mišinys intensyviai maišant išpilamas ant sugrūsto ledo (250 g), iškritusios nuosėdos filtruojamos, plaunamos vandeniu ir kristalinamos iš etanolio.

Išeiga: 7,5 g (57 %); lyd. t. 199-200 °C (Lit. 198 °C [56]).

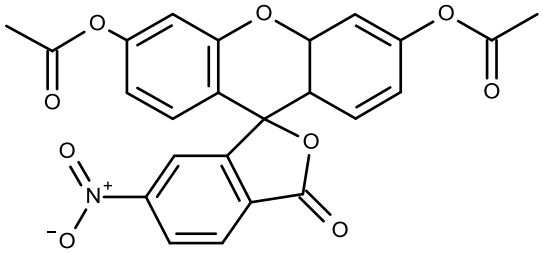
4-Nitroftalio rūgštis (22)



Natrio šarmo (10 g, 0,25 mol), vandens (90 ml) ir 4-nitroftalimido (30 g, 0,16 mol) mišinys virinamas dešimt minučių. Tada į jį pridedama konc. druskos rūgšties (55 ml, 0,67 mol) ir mišinys virinamas dar penkias minutes, atvėsinamas iki kambario temperatūros ir ekstrahuojamas eteriu (3 x 75 ml). Organinis sluoksnis džiovinamas bevandeniu magnio sulfatu, eteris pašalinamas sumažintame slėgyje. Liekana ištirpinama acetone, išsodinama vandeniu, filtruojama. Nuosėdos keletą kartų praplaunamos vandeniu.

Išeiga: 30,4 g (92 %); lyd.t 164-165 °C (Lit. 163-164 °C [57]).

3‘,6‘-Di-O-acetil-6-nitrofluoresceinas (24a)

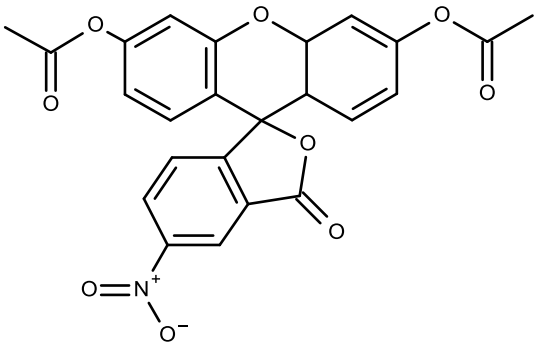


4-nitroftalio rūgšties (16,0 g, 75,0 mmol) ir rezorcinolio (17,0 g, 155 mmol) mišinys sulydomas kaitinant silikoninės alyvos vonioje 190-200 °C temperatūroje 5h. Gauta masė sutrinama ir pavirinama 0,5 N duskos rūgštyje (300 ml) 1 val., tirpalas atvėsinamas ir medžiaga nufiltruojama. Gautos nuosėdos (23 g) išdžiovinamos ir virinamos su acto anhidridu (30 ml) 1 val, tirpalas filtruojamas karštas, filtratas paliekamas šaldytuve dvi paras. Susidarę kristalai nufiltruojami, dar kartą perkristalinami iš acto

anhidrido, paskui iš tolueno. Gauti acto anhidrido filtratai koncentruojami iki maždaug pusės savo pradinio tūrio, atvėsinami ir nufiltruojami - gaunama papildoma mažesnio grynumo 6 izomero frakcija.

Išeiga: 7,9 g (45 %); lyd.t. 220-223 °C (Lit. 215-218 °C [42]).

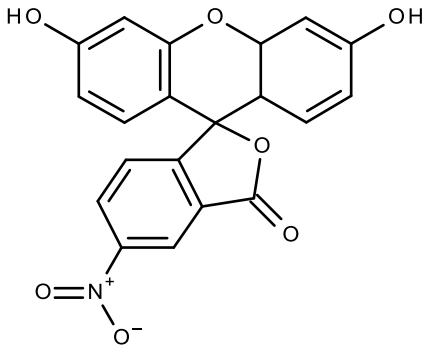
3‘,6‘-Di-O-acetil-5-nitrofluoresceinas (24b)



Toliau naudojami **24a** junginio sintezės metu po kristalinimo iš acto anhidrido gauti filtratai. Sumažintame slėgyje iš filtratų pašalinamas acto anhidridas ir susidariusi klampi masė ištirpinama minimaliame kiekyje karšto tolueno. Tirpalą atvėsinus susidarę kristalai nufiltruojami ir dar kartą perkristalinami iš tolueno.

Išeiga: 6,3 g (36 %); lyd. t. 193-194 °C (Lit. 191 °C [42]).

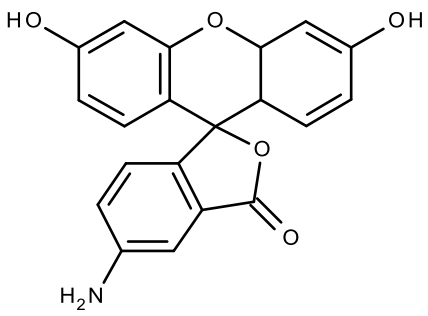
5-Nitrofluoresceinas (25)



3‘,6‘-Di-O-acetil-5-nitrofluoresceinas (6,3 g, 14 mmol) virinamas MeOH (330 ml) ir 10% NaOH (63 ml) mišinyje, kol pilnai ištirpsta (20 min), tada tirpalas praskiedžiamas vandeniu (100 ml), parūgštinamas acto rūgštimi (32 ml), dar kartą užvirinamas ir paliekamas šaldytuve kristalintis per naktį. Gauti kristalai nufiltruojami ir praplaunami vandeniu.

Išeiga: 5,06 g (98 %); lyd.t. 354-356 °C (Lit. > 250 °C [42]).

5-Aminofluoresceinas (26)

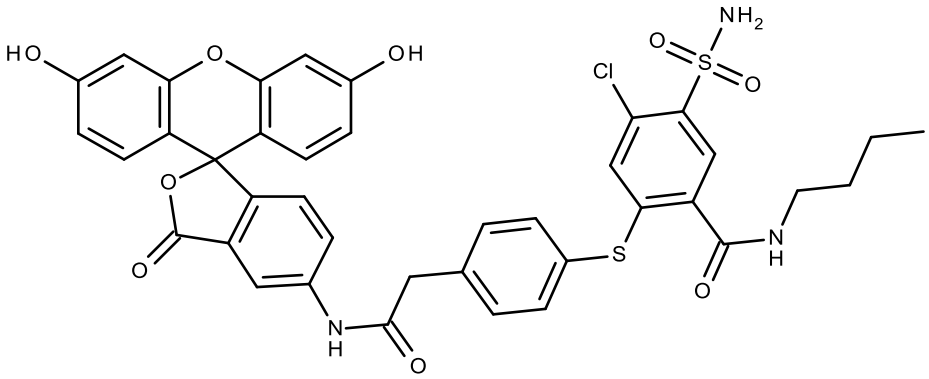


5-Nitrofluoresceino (5,00 g, 1,32 mmol), natrio hidrosulfido hidrato (NaHS · xH_2O) (7,40 g,) ir natrio šarmo (1,80 g, 44,0 mmol) tirpalas vandenyje (200 ml) virinamas 24 val., tada parūgšinamas acto r. iki pH = 5 ir iškritusios nuosėdos nufiltruojamos. Nuosėdos ištirpinamos 6% HCl (230 ml), tirpalas nufiltruojamas, filtratas paliekamas kristalintis šaldytuve per naktį. Susidarę kristalai nufiltruojami, ištirpinami 0,5 N NaOH (180 ml), tirpalas parūgštinamas acto r. iki pH = 5, nuosėdos nufiltruojamos ir praplaunamos vandeniu.

Išeiga: 1,5 g (33 %); lyd.t. 213-215 °C (Lit. 215-220 °C [58]).

^{1}H BMR δ, m.d.: 5,72 (2H, pl. s, NH_2), 6,53 (2H, dd, *J* = 2,4 Hz, *J* = 8,8 Hz, $C_{2',7'}$-H(xan)) 6,60-6,63 (4H, m, $C_{1',4',5',8'}$-H(xan)), 6,85 (1H, d, *J* = 8,4, C_7-H), 6,94 (1H, dd, *J* = 1,6 Hz, *J*= 8,4 Hz, C_6-H), 7,01 (1H, d, *J* = 1,6 Hz, C_4-H). ^{13}C BMR δ, m.d.:102,6, 107,3, 111,1, 113,6, 121,6, 125,0, 12,0, 129,5, 138,8, 150,8, 152,8, 161,2, 169,9, 173,7.

N-butil-4-chlor-2-[(4-{2-[(3',6'-dihidroksi-3-okso-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-ksanten]-5-il)amino]-2-oksoetil}fenil)sulfanil]-5-sulfamoil-benzamidas (35)



5-Aminofluoresceino (174 mg, 500 µmol), 2-[4-[2-(butilkarbamoil)-5-chlor-4-sulfamoil-fenil]sulfanilfenil]acto rūgšties (230 mg, 500 µmol) ir 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochlorido (105 mg, 547 µmol) mišinys piridine (2,3 ml) maišomas 24 val., po to išpilamas į

vandenį (20 ml), pargūštinamas su konc. druskos rūgštimi (iki pH < 2) ir maišomas valandą laiko, po to nufiltruojamas, nuosėdos kristalinamos iš acto r. ir vandens mišinio, po to papildomai gryninamos atliekant kolonėlinę chromatografiją (eliuentas – $CHCl_3$, MeOH; naudotas gradientas)

Išeiga: 134 mg (34 %); lyd. t. 210-213 °C.

ASMS apsk. ($C_{39}H_{32}ClN_3O_9S_2$)[$(M+H)^+$]= 786,1341, rasta: 786,1373.

6. Išvados:

1. Susintetinti keturi į 5-(1H-benzimidazol-1-il)-2-chlorbenzensulfonamidą panašūs junginiai, vietoje benzimidazolo žiedo turintys pakeistus benzimidazolo arba imidazolo fragmentus (**7-10**). Išmatuotos jų jungimosi su karboanhidrazėmis konstantos ir nustatyta, kad stipriausiai prie CA VA jungiasi benzimidazolo fragmentą turintys junginiai.
2. Susintetinti trys 2-pakeisti N-(benzimidazol-1-il)-4-chlor-5-sulfamoil-benzamidai (**18-20**). Išmatuotos jų jungimosi su karboanhidrazėmis konstantos ir nustatyta, kad pakeitus metilengrupę NH-fragmentu inhibitorių jungimasis prie CA VA susilpnėja.
3. Susintetinti šeši galimi IX karboanhidrazės inhibitoriai (**28**-**30**, **32**-**34**), trys iš jų turintys karboksigrupę yra tinkami sujungimui su fluorescenciniu fragmentu.
4. Nustatyta, kad junginių turinčių esterio ir amido funkcines grupes, esterinės gupės hidrolizė vyksta selektyviau šarminėje nei rūgštinėje terpėje.
5. Susintetintas fluorescencinį fragmentą turintis inhibitorius N-butil-4-chlor-2-[(4-{2-[(3',6'-dihidroksi-3-okso-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-ksanten]-5-il)amino]-2-oksoetil}fenil)sulfanil]-5-sulfamoil-benzamidas.

Synthesis of substituted 2-chlorobenzenesulfonamides as inhibitors of human carbonic anhydrases

Virginijus Ruibys

Graduation thesis for bachelor degree

Research supervisor: Audrius Zakšauskas

Summary

Human carbonic anhydrases (CA) are zinc containing metalloenzymes involved in a variety of metabolic functions. Abnormalities in their function are associated with a number of disorders, thus regulation of CA activity through inhibition proposes a therapeutic perspective. The aim of this study was the preparation of new aromatic sulfonamide derivatives, potentially useful in biomedicine as drugs or imaging agents.

In search of selective inhibitors of human carbonic anhydrase VA, seven new benzenesulfonamide based inhibitors were synthesized and the data of their binding to various carbonic anhydrases obtained. The synthesized compounds include: 2-chloro-5-[(4,5-diphenyl-1H-imidazol-1-yl)acetyl]benzenesulfonamide, 2-chloro-5-[(2-ethyl-1H-imidazol-1-yl)acetyl]benzenesulfonamide, 2-chloro-5-[(2-phenyl-1H-imidazol-1-yl)acetyl]benzenesulfonamide, 2-chloro-5-[(5,6-dimethyl-1H-benzimidazol-1-yl)acetyl]benzenesulfonamide, 5-(aminosulfonyl)-N-1H-benzimidazol-1-yl-2,4-dichlorobenzamide, 5-(aminosulfonyl)-N-1H-benzimidazol-1-yl-4-chloro-2-(cyclohexylthio)benzamide and 5-(aminosulfonyl)-N-1H-benzimidazol-1-yl-4-chloro-2-(phenylthio)benzamide.

As part of an effort to visualize cancer cells, seven new potential inhibitors of cancer-associated human carbonic anhydrase IX were synthesized, one of which was conjugated with a fluorescent dye. The synthesized compounds include: methyl 4-{[5-(aminosulfonyl)-2,4-dichlorobenzoyl]amino}butanoate, methyl 4-{[5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-(phenylthio)benzoyl]amino}butanoate, methyl 4-{[5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-(cyclohexylthio)benzoyl]amino}butanoate, 4-{[5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-(phenylthio)benzoyl]amino}butanoic acid, 4-{[5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-(cyclohexylthio)benzoyl]amino}butanoic acid, [4-({4-(aminosulfonyl)-2-[(butylamino)carbonyl]-5-chlorophenyl}thio)phenyl]acetic acid and 5-(aminosulfonyl)-N-butyl-4-chloro-2-[(4-{2-[(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)amino]-2-oxoethyl}phenyl)thio]benzamide.

8. Literatūros sąrašas

1. C. T. Supuran, A. Socozzafava, J. Conway. *Carbonic anhydrase: it's inhibitors and activators*. Boca Raton, 2004. p. 1-3.
2. S. Lindskog, J. E. Coleman, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1973, 70, 2505.
3. L. Koziol et al., *Inorg. Chem.*, 2012, 51, 6803.
4. N. Hen et al., *J. Med. Chem.*, 2011, 54, 3977.
5. B. B. Gao et al., *Nat. Med.*, 2007, 13, 181.
6. B. Basnyat et al., *High Alt. Med. Biol.*, 2003, 4, 45.
7. G. De Simone et al., *Curr. Pharm. Des.*, 2008, 14, 655.
8. A. D. Kenny, *Pharmacology*, 1985, 31, 97.
9. C. Merlin et al., *J. Bacteriol.*, 2003, 185, 6415.
10. C. T. Supuran et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, 35, 867
11. O. O. Guler et al., *Curr. Med. Chem.*, 2010, 17, 156.
12. J. Lau et al., *Nucl. Med.*, 2015, 56, 1434.
13. C. T. Supuran., *World J. Clin. Oncol*., 2012, 3, 98.
14. C. T. Supuran, A. Socozzafava, J. Conway. *Carbonic anhydrase: it's inhibitors and activators*. Boca Raton, 2004. p. 209-229
15. J. Y. Winum et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 3649.
16. C. T. Supuran, A. Socozzafava, J. Conway. *Carbonic anhydrase: it's inhibitors and activators*. Boca Raton, 2004. p. 229-233
17. A. Di Fiore et al., *Chem. Commun.*, 2012, 48, 8838.
18. M. S. Shingare, D. B. Ingale., *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 1979, 18, 277.
19. N. J. Leonard, S.N. Boyd Jr., *J. Org. Chem.*, 1946, 11, 405.
20. H. Oelschläger, O. Schreiber., *Justus Liebigs Ann.*,1961, 641, 81.
21. T. Fujikura et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30, 4092.
22. Patentas WO2013/96151 A1, 2013.
23. Patentas US2011/46108 A1, 2011.
24. A. O. Terent'ev et al., *Synthesis*, 2006, 7, 1087.
25. V.V. Angeles-Dunham et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, 53, 14538.
26. T. Fujikura et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1982, 30, 4092.
27. Mohamed Abdel-Meigid, *Synth. Commun.*, 2003, 33, 153.
28. U. F. Rohring et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 84, 284.
29. L. Florentino, F. Aznar, C. Valdes, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 10506.
30. E. Capkauskaitė et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 7357.
31. T. Kamijo et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1983, 31, 1213.
32. K. Sturm et al., *Chem. Ber.*, 1966, 99, 328.
33. W. Siedel, K. Sturm, W. Scheurich, *Chem. Ber.*, 1966, 99, 352.
34. D. M. Springer et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11, 281.
35. C. M. Tan et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 19, 6316.
36. P. Y. Reddy et al., *Synthesis*, 1998, 7, 999.
37. T. Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 13736.
38. S. X. Cai et al., *Chem. Mater.*, 1992,4, 879.

39. S. Fabritz et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 2212.
40. Y.Saito et al., *Chem. Commun.*, 2008, 45, 5984.
41. T. Hirano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12399.
42. H. Sigmund, W. Pfleiderer., *Helv. Chim. Acta*., 2003, 86, 2299.
43. Patentas US2006/228325 A1, 2006.
44. M. Tomasch et al., *Med. Chem. Lett.*, 2012, 3, 774.
45. N. Ieda et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, 25, 3172.
46. P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi., *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 17428.
47. C. Marculescu et al., *Chem. Commun.*, 2014, 50, 7139.
48. M. Choi et al., *Chem. Commun.*, 2009, 47, 7390.
49. F. Ge, C. Yang, Z. Cai., *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2015, 36, 2703.
50. R. Morty et al., *Biochem. Pharmacol*., 2000, 60, 1497.
51. R. M. Claramunt et al., *Khim. Geterotsikl. Soedin*., 1989, 221.
52. Patentas US4010273 A1, 1977.
53. D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.*, 2002, 75, 327.
54. D. Matulis. *Baltymų fizikinė chemija*. Kaunas, 2008. p. 94.
55. L. A. Baltina et al., *Chem. Nat. Compd.*, 2014, 50, 317.
56. X. Li et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22, 5738.
57. Markezich et al., *J. Org. Chem.*, 1977, 42, 3435.
58. A. H. Coons, M. H. Kaplan, *J. Exp. Med.*, 1950, 91, 1.