

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MEDICINOS FAKULTETAS

Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Baltymų amiloidinės agregacijos slopinimui skirtų 5-pakeistų-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinų
sintezė

Studentė: Gintarė Sapežinskaitė

5 kursas, 3 grupė

Darbo vadovė: doc. dr. Ieva Žutautė

_____ *parašas*

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

_____ *parašas*

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

_____ *parašas*

Darbo įteikimo data: 2024-05-14 Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas: gintare.sapezinskaite@mf.stud.vu.lt

2024 m.

TURINYS

SANTRAUKA.....	3
SUMMARY.....	5
SUTRUMPINIMAI.....	6
ĮVADAS.....	7
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	8
LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Amiloidai.....	9
1.2. Amiloidozė.....	10
1.3. Alfa-sinukleinas.....	12
1.4. Alfa-sinukleino agregacijos inhibitorių paieška.....	14
1.4.1. Polifenoliniai junginiai.....	14
1.4.2. Heterocikliniai junginiai.....	16
1.5. Insulinas ir lokali injekcinė amiloidozė.....	20
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS IR REZULTATAI.....	22
2.1. Tyrimo objektas.....	22
2.2. Pakaitų pasirinkimas.....	23
2.3. Tikslinių junginių retrosintetinė analizė.....	23
2.4. Sintezės metodai.....	24
3. TYRIMO METODAI.....	30
3.1. Sintezėms naudoti reagentai ir tirpikliai.....	30
3.2. Naudotos medžiagos ir aparatūra.....	30
3.3. 5-(4-metoksifenil)-7 <i>H</i> -imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3]tiazino sintezė (5a).....	31
3.4. 5-(3-metoksifenil)-7 <i>H</i> -imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3]tiazino (5b) ir jo benzimidazotiazino (5e), benzimidazotiazepino sintezė (5f).....	34
3.5. 5-(<i>o</i> -tolil)-7 <i>H</i> -imidazo[2,1- <i>b</i>][1,3]tiazino sintezė (5c).....	40
3.6. Acetamidų (6a-d) sintezė.....	44
IŠVADOS.....	50
ŠALTINIAI.....	51

SANTRAUKA

Gintarės Sapežinskaitės magistro baigiamasis darbas „Baltymų amiloidinės agregacijos slopinimui skirtų 5-pakeistų-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinų sintezė“. Mokslinė vadovė doc. dr. Ieva Žutautė. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos ir farmakologijos centras. Vilnius. 2024 m.

Darbo tikslas – susintetinti 5-pakeistus-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinus baltymų amiloidinės agregacijos slopiklių paieškai.

Darbo uždaviniai:

1. Pasirinkti kokius 5-pakeistus-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinus sintetinti, t.y., pasirinkti pakaitus. Sudaryti tikslinių junginių retrosintetinę analizę ir pritaikyti sintezės metodus.
2. Susintetinti tikslinius junginius iš sukurtų alkinilimidazolų per aukso chloridu katalizuojamą intramolekulinę nukleofilinę ciklizaciją.
3. Identifikuoti ir pagrįsti tikslinių junginių struktūras naudojant spektroskopinius analizės metodus.

Tyrimo objektas ir metodai. Magistro darbo objektas - naujų junginių, kurie galėtų pasižymėti baltymų amiloidinės agregacijos slopinimu sintezė. Sintezės (cheminių reakcijų) vykdytos įvairiomis metodikomis, tikslinių ir tarpinių reakcijų eiga vertinta taikant plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodą. Naujų junginių struktūros tirtos ir įrodytos ¹H ir ¹³C branduolinių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopijos, IR spektroskopijos metodais, nustatytos šių junginių lydymosi temperatūros. Tiksliniai junginiai paruošti amiloidinių baltymų slopinimo tyrimams naudojantis laboratorijos metodikomis.

Rezultatai ir išvados. Remiantis laboratorijoje jau ištirtų įvairių struktūrų junginiais, pagal palankiausias duomenis buvo parinkti septyni pakaitai: 2-metilfenilo, 4-metoksifenilo, 3-metoksifenilo ir 4 skirtingi 3-fenoksiacetamidai. Atlikta 5-pakeistų-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinų retrosintetinė analizė, pritaikytos sintezės metodikos, kurių pagalba tiksliniai junginiai susintetinti per 4 pagrindinius etapus. Susintetinti iki šiol literatūroje neaprašyti 9 tiksliniai junginiai: 5-(4-metoksifenil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5a**), 5-(4-metoksifenil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5b**), 5-(*o*-tolil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5c**), 4-(3-metoksifenil)-2*H*-benzo[4,5]imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5e**), 5-(3-metoksifenil)-1*H*,3*H*-benzo[4,5]imidazo[2,1-*c*][1,4]tiazepinas (**5f**), ir 4 skirtingi acetamidai (**6a-d**). Patvirtinta jau literatūroje aprašytų junginių struktūra naudojantis lyd. t. ir ¹H BMR spektrais. Naujų, dar neaprašytų junginių struktūra pilnai

ar dalinai identifikuota, įrodyta naudojantis lydymosi temperatūra, ^1H ir ^{13}C BMR spektrai, IR spektrai bei atlikus HRMS analizę.

SUMMARY

Master thesis of Gintarė Sapežinskaitė “Synthesis of 5-Substituted-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazines for Inhibition of Amyloid Aggregation” Supervisor doc. dr. Ieva Žutautė. Vilnius University Faculty of Medicine Institute of Biomedical Sciences Pharmacy and Pharmacology Center. Vilnius, 2024.

Aim of study – to synthesize 5-substituted-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazines for the search for inhibitors of amyloid protein aggregation.

Study objectives:

1. To choose which 5-substituted-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazines to synthesize, i.e. choose substituents. Perform retrosynthetic analysis of target compounds and apply synthetic methods.
2. To synthesize the target compounds from the designed alkynylimidazoles via gold chloride catalyzed intramolecular nucleophilic cyclization.
3. To identify and substantiate the structures of target compounds using spectroscopic analysis methods.

Study methods. The object of the master's thesis is the synthesis of new compounds that could be characterized by inhibition of protein amyloid aggregation. Synthesis was carried out using various methodologies, reactions were evaluated using thin-layer chromatography (TLC) method. Structures of new compounds were elucidated by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, IR spectroscopy, melting points.

Results and conclusions. Based on compounds of various structures already tested in the laboratory, seven substituents were selected according to the most favorable data: 2-methylphenyl, 4-methoxyphenyl, 3-methoxyphenyl and four different 3-phenoxyacetamides. Retrosynthetic analysis of 5-substituted-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazines was performed, appropriate methodologies were applied and target compounds were synthesized in 4 main stages. All nine target compounds (**5a-f**, **6a-d**) were new and not yet described in the literature. The structure of known intermediate compounds was confirmed with melting point and ¹H NMR. The structure of new, not yet described compounds has been fully identified and proven using melting point, ¹H and ¹³C NMR spectra, IR spectra and HRMS analysis.

SUTRUMPINIMAI

BMR – branduoliūinis magnetinis rezonansas

CDCl_3 – deuteruotas chloroformas

CH_3CN – acetonitrilas

DCE – 1,2-dichlorešanas

DCM – dichlormetanas

DLB – demencija su Lewy kūneliais

DMF – dimetilformamidas

DMSO – dimetilsulfoksidas

DPP – 3,5-difenilpirazolas

EA – etilacetatas

EGCG – epigalokatechin-3-galatas

HRMS – didelio pajėgumo masių spektrometrija (angl. *High Resolution Mass Spectrometry*)

IR – infraraudonieji spinduliai

ISA – Tarptautinė Amiloidozės Draugija (angl. *International Society of Amyloidosis*),

LIA – lokali injekcinė amiloidozė

MeOH – metanolis

PE – petrolio eteris

PL – Parkinsono liga

TEA – trietilaminas

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

Tol – toluenas

ĮVADAS

Žinomi 42 skirtingi baltymai ir peptidai žmogaus organizme sudarantys netirpias amiloidines fibriles, kurios nusėda organų ir audinių tarpląstelinuose tarpuose ir sukelia būklę, vadinamą amiloidoze [1]. Vis daugiau sutrikimų yra siejami su šių agregatų susidarymu - Alzheimerio liga, Parkinsono liga (PL), Hantingtono liga, II tipo diabetu ir kitomis. Dėl kiekvienais metais dažnėjančio minėtų ligų diagnozavimo amiloidinių baltymų sukeltos ligos tampa pasauline epidemija. Pasaulio Sveikatos Organizacijos (angl. *World Health Organization*, WHO) 2022 metų pranešime teigiama, jog neįgalumas ir mirtis dėl PL didėja greičiau nei bet kuris kitas neurologinis sutrikimas [2]. Efektyvaus gydymo PL ir daugeliui minėtų ligų nėra, tad norint užkirsti kelią šių ligų atsiradimui ir vystymuisi vykdoma įvairių mažamolekulinių junginių paieška.

Vilniaus Universiteto Chemijos ir geomokslų fakulteto Organinės chemijos katedros 113 laboratorija bendradarbiaudama su VU Gyvybės mokslų centre įsikūrusia amiloidų tyrimo grupe, kurioje tyrėjų komanda bando išaiškinti baltymų amiloidinės agregacijos mechanizmus, ieško junginių, galinčių sulėtinti ar stabdyti amiloidinių baltymų agregaciją. Šio tyrimo metu kuriami tiksliniai junginiai bus nukreipti į alfa-sinukleino ir insulino amiloidinės agregacijos slopinimą. Mūsų laboratorijoje buvo atrastos kelios klasės naujų sintetinių junginių, pasižyminčių minėtų baltymų agregacijos slopinimu. Tyrimų metu pastebėta, kad geriausią slopinimą parodė junginiai turintys 5-pakeistą-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazino karkasą. Todėl siekiant praplėsti tiriamų junginių imtį bei iširti pakaitų padėties įtaką aktyvumui, nuspręsta susintetinti specifines gurpes turinčius imidazotiazino, benzimidazotiazino bei benzimidazotiazepino karkasinės struktūros junginius, kurie skirtingai sąveikauja su skirtingais baltymais. Šie junginiai įtraukti į tikslinių junginių sintezės planą siekiant turėti platesnį junginių spektrą. Šio magistrinio darbo metu pagal ankstesnius tyrimus pasirinkti aktyvumą įtakojantys pakaitai, įvykdyta tikslinių junginių retrosintetinė analizė, pritaikytos sintezės metodikos. Pavyko susintetinti 9 tikslinius junginius, spektroskopijos metodais įrodyta jų struktūra ir šie junginiai yra išsiųsti tyrimams ant baltymų į VU Gyvybės mokslų centrą. Literatūros apžvalgoje bendrai aptariami amiloidai, jų sukeltos ligos, plačiau aprašomi alfa-sinukleino ir insulino amiloidai bei jų agregacijos slopinklių paieška.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – susintetinti 5-pakeistus-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinus baltymų amiloidinės agregacijos slopiklių paieškai.

Darbo uždaviniai:

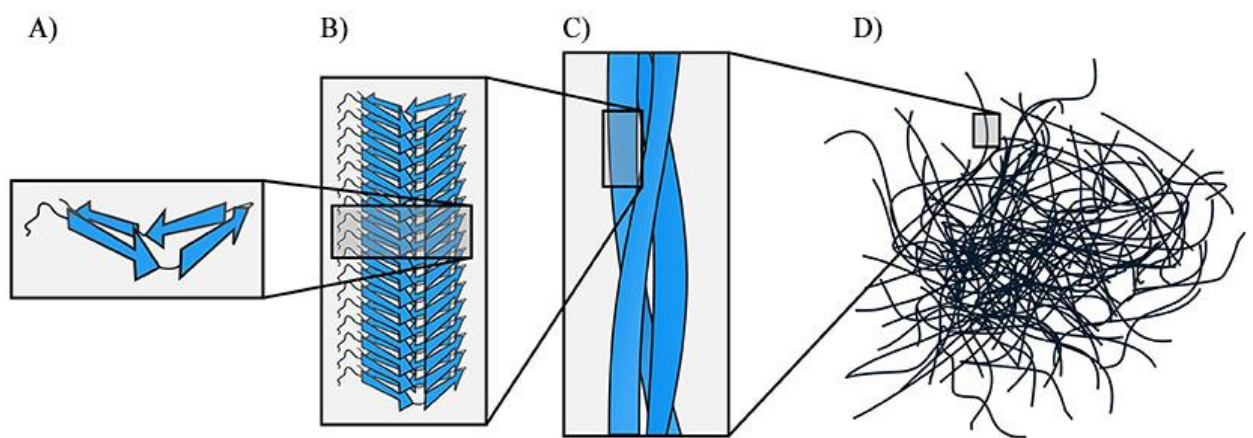
1. Pasirinkti kokius 5-pakeistus-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinus sintetinti, t.y., pasirinkti pakaitus. Sudaryti tikslinių junginių retrosintetinę analizę ir pritaikyti sintezės metodus.
2. Susintetinti tikslinius junginius iš sukurtų alkinilimidazolų per aukso chloridu katalizuojamą intramolekulinę nukleofilinę ciklizaciją.
3. Identifikuoti ir pagrįsti tikslinių junginių struktūras naudojant spektroskopinius analizės metodus.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidai

Pagal Tarptautinę Amiloidozės Draugiją (angl. *International Society of Amyloidosis*, ISA), amiloidai – tai terminas naudojamas apibūdinti netinkamai susilanksčiusiems baltymams, kurie kaupiasi kaip netirpios fibrilės įvairiose organų ir audinių vietose ir sukelia klinikinį sindromą, žinomą kaip amiloidozė [3].

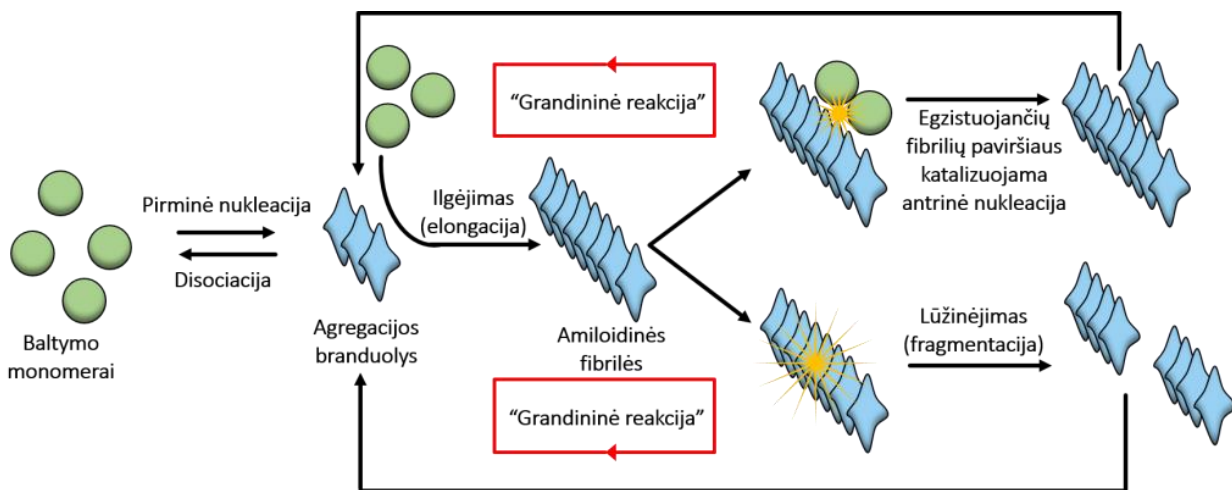
Jau 1959 metais atlikti stebėjimai atskleidė pagrindines amiloidų fibrilių susilankstymo savybes – nešakota morfologija, pailga forma, plotis, varijuojantis nuo 5 iki 20 nm [4]. Pagrindinė amiloido struktūra yra fibrilė. Ją sudaro vienas arba keli susukti protofilamentai, kurie susideda iš β -klostės struktūros baltymų (monomerinių subvienetų) sluoksnių. Protofilamentai, kitaip dar vadinami protofibrilėmis, yra sujungti vienas su kitu lygiagrečiai šoninėmis grandinėmis (1 pav.) [1]. Amiloidinės fibrilės gali turėti įvairią morfologiją. Manoma, jog šis polimorfizmas atsiranda dėl skirtingo protofilamentų skaičiaus ar jų orientacijos, taip pat dėl vidinių struktūros skirtumų [5].



1 pav. Amiloidinės fibrilės struktūra. A) Monomerinis subvientas; B) Protofilamentas C) Amiloidinė fibrilė; D) Amiloidinės plokštelės.

Įprastai amiloidinių fibrilių susidarymo procesas prasideda „lag“ stadija, kurioje vyksta nukleacija – visiškai arba iš dalies netvarkingi monomerai jungiasi į agregacijos branduolius (oligomerus) per termodinamiškai nepalankų procesą. Prie šio branduolio toliau prisijungia nauji monomerai ir vyksta ilgėjimo (elongacijos) fazė, taip formuojasi amiloidinės fibrilės. Kitas etapas yra lūžinėjimas arba fragmentacija, kai susiformavusios fibrilės skyla į trumpesnes fibriles ar

agregacijos branduolius, prie kurių vėl gali jungtis monomerai. Taip amiloidų fibrilių susidarymas yra lyg grandininė reakcija (2 pav.) [3].



2 pav. Amiloidinės fibrilės susidarymo mechanizmas [6].

Amiloidų „šeimą“ galima suskirstyti į 3 šakas: patologinius amiloidus, dirbtinius (angl. *artificial*) ir naujausiai identifikuotus – funkcinius amiloidus. Per pastaruosius du dešimtmečius išaiškinta, jog funkciniai amiloidai gali atlikti fiziologinį vaidmenį įvairiuose organizmuose, įskaitant bakterijas, grybus, augalus, pirmuonis, bei žmones [7]. Šie funkciniai amiloidai dalyvauja svarbiuose organizmo procesuose: ląstelių signaliniuose keliuose, peptidinių hormonų kaupime bei ilgalaikės atminties išsaugojime [8]. Puikus pavyzdys – amiloidas Pmel17, žmogaus organizme ir kituose žinduoliuose formuoja ir pagreitina mažų molekulių kovalentinę polimerizaciją į melaniną – itin svarbų polimerą, kuris saugo ląsteles nuo citotoksinių ultravioletinių spindulių pažeidimų [9].

Seniausiai žinomi amiloidai – patologiniai, 2022 metų ISA duomenimis yra identifikuoti 42 amiloidiniai baltymai, atsakingi už audinių ar organų pažeidimus. Plačiausiai žinomos su šiais baltymais siejamos ligos – Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono liga, II tipo diabetas [1, 10].

1.2. Amiloidozė

Amiloidinės fibrilės turi bendrus struktūrinius panašumus, tačiau jų pasiskirstymas organizme ir klinikinės apraiškos skiriasi, tai privertė rasti tinkamą amiloidozės klasifikaciją. Viena populiariausių praėjusio amžiaus klasifikacijų yra Reimann et al. [11] suskirstanti amiloidozę į keturias grupes:

1. Pirminę;

2. Antrinę;
3. Navikus formuojančią;
4. Su mieloma susijusią.

Ši klasifikacija buvo naudojama ilgą laiką, ją galime sutikti ir naujuose straipsniuose, tačiau vadovaujantis ISA nomenklatūros komiteto pateiktomis rekomendacijomis didėjant naujos informacijos kiekiui ši klasifikacija yra pasenusi ir neturėtų būti naudojama [3]. Šiuo metu priimtina kiekvieną specifinį amiloidinį baltymą įvardinti raidėmis, o neskirstyti į tam tikras grupes. Amiloidinės fibrilės baltymas yra pažymėtas raide A, o po jo – priesaga, kuri yra sutrumpinta pirminio baltymo pavadinimo forma. Ši metodika taip pat turėtų būti naudojama su baltymu susijusiai amiloido ligai. Pavyzdžiui, kai amiloidinės fibrilės yra gaunamos iš lengvų imunoglobulino grandinių, amiloido fibrilės baltymas yra vadinamas AL (amiloido lengvosios grandys, angl. *amyloid light chain*), o liga yra AL amiloidozė. Amiloido baltymas transtiretinis yra ATTR ir liga yra ATTR amiloidozė [1]. Šiuo metu yra maždaug 50 žinomų amiloidinių sutrikimų, kurie yra susiję su klaidingu vieno ar kelių, paprastai tirpių ir funkcinių baltymų agregacija. Pirmoje lentelėje pateikta nedidelė dalis amiloidinių ligų ir su jomis susijusių baltymų [12].

1 Lentelė. Žmonių ligos, susijusios su klaidingu baltymų susilankstymu ir amiloidų agregacija [12]

Liga	Pirminis baltymas	Polipeptido ilgis
Neurodegeracinės ligos		
Alzheimerio liga	Amiloido- β variacijos	37-44
Parkinsono liga	Alfa-sinukleinas	140
Spongiforminės encefalopatijos	Prionų baltymai ar jų fragmentai	208
Šeiminė amiloidų polineuropatija	Transtiretino variacijos	127
Sisteminės amiloidozės		
Amiloido lengvų grandžių (AL) amiloidozė	Imunoglobulino lengvosios grandys ar jų fragmentai	~90
Hemodializės amiloidozė	β 2-mikroglobulinas	99
Lokalizotos amiloidozės		

II tipo diabetas	Kasos salelių amiloido polipeptidas (amilinas)	37
Katarakta	γ -kristalinas (angl. <i>γ-crystallins</i>)	kintanti
Lokali amiloidozė	injekcinė Insulinas	21 ir 30

Baltymo agregaciją ir tapimą patogenišku paprastai sukelia klaidingas susilankstymas, kuris gali atsirasti dėl kelių įvykių [12]:

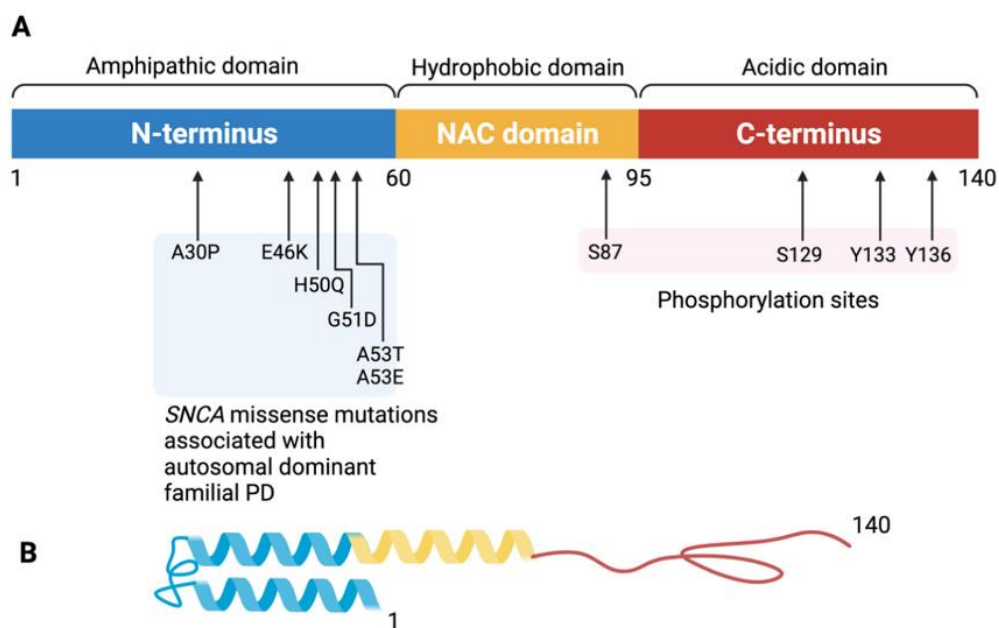
- (1) genų sekos mutacijos → baltymas nesugeba tinkamai susilankstyti;
- (2) transkripcijos ar translacijos procesų klaidos, dėl kurių susidarę modifikuoti baltymai;
- (3) šaperonų, padedančių tinkamai susilankstyti baltymams, pakitimas;
- (4) klaidos dėl potranslacinėlių modifikacijų;
- (5) struktūrinės modifikacijos, kurias sukelia aplinkos pokyčiai;
- (6) dėl ant paviršiaus iš anksto suformuotų agregatų.

Esant šiai įvairovei, yra sunkiau išsiaiškinti tiksliai amiloidozė atsiradimo priežastis ir identifikuoti biologinius mechanizmus.

Magistrinio darbo metu bus vykdoma potencialių alfa-sinukleino ir insulino amiloidinės agregacijos slopiklių sintezė, tad tolimesniuose skyriuose yra plačiau aprašomi tyrimai susiję su minėtais baltymais bei jų agregacijos slopikliai.

1.3. Alfa-sinukleinas

Alfa-sinukleinas yra iš 140 aminorūgščių sudarytas baltymas daugiausia ekspresuojamas neuronuose ir mažesniu kiekiu glijos ląstelėse. alfa-sinukleino didelė koncentracija yra presinapsiniuose galuose ir yra tiek tirpiose, tiek su membranomis susijusiose smegenų frakcijose [13]. Tai baltymas turintis tris domenus: N-galo lipidus surišančią alfa-spiralę, amiloidus surišančią centrinių domeną ir C-galo rūgštinę „uodegą“ (3 pav.) [14]. Neigiamai įkrautas C-galo domenas riboja patologinį susilankstymą veikdamas lyg šaperonas, o aminorūgščių praradimas šiame domene skatina amiloidinių fibrilių formavimąsi [15, 16].



3 pav. A) Alfa-sinukleino monomero struktūra. B) Alfa-sinukleino tretinė struktūra [17].

Įprastomis sąlygomis alfa-sinukleinas gali prisijungti prie lipidų membranos ir atlikti fiziologines funkcijas – jis jungiasi prie sinapsinių pūslelių membranų ir veikia neuromediatorių išsiskyrimą, nors molekulinė sąveika yra neaiški – nesutariama ar veikia slopinančiai ar aktyvuojančiai [18]. Manoma, jog šis baltymas galimai atlieka ir kitas fiziologines funkcijas, nesusijusias su sinapsinėmis, tokias kaip apoptozės reguliavimas, gliukozės ir kalmodulino lygio reguliavimas ir neuronų diferenciacija [19]. Tyrimai rodo, kad alfa-sinukleinas stabilizuoja mRNR, surišdamas baltymus, esančius bemembranėse organelėse, taip pat, galimai moduliuoja DNR atstatymą [20, 21].

Kaip minėta, patologiškai šis baltymas gali kauptis ir sudaryti netirpius agregatus, taip sukeldamas būklės bendrai vadinamas sinukleopatijomis.. Šių kūnelių lokacija ir „išvaizda“ skatina sinukleopatijas išskirstyti į kliniškai skirtingas grupes: Levi (Lewy) kūneliai sergant Parkinsono liga ir DLB (demencija su Lewy kūneliais), ir glialiniais citoplazminiais intarpais sergant multisistemine atrofija [22]. Tad ir sukūrus veiksmingą gydymą PL, neįmanoma garantuoti, jog gydymas bus veiksmingas kitoms alfa-sinukleino agregatų sukeltoms ligoms.

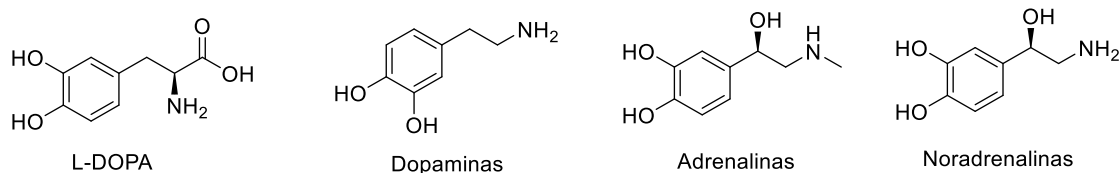
Iki šiol veiksmingų terapinių strategijų gydyti šią ligų grupę nėra, vaistų paieška yra ribota, nes trūksta žinių apie tikslius patologijos mechanizmus. Dabartiniai Parkinsono ligos ir susijusių sinukleopatijų gydymo metodai gali suteikti tik paliatyvų gydymą, kuriuo siekiama kontroliuoti motorinius simptomus ir sulėtinti ligos progresavimą. Patikimų *in vivo* ligos žymenų ir tinkamų gyvūnų modelių, skirtų šių ligų simptomams atkartoti, trūkumas trukdo plėtoti veiksmingo gydymo paieškas.

1.4. Alfa-sinukleino agregacijos inhibitorių paieška

Atsižvelgiant į svarbų alfa-sinukleino kiekio vaidmenį ligos patogenezėje, vienas iš gydymo būdų yra sumažinti bendrą šių baltymų kiekį slopinant gamybą arba skatinant skaidymą. Kitas būdas yra slopinti baltymų agregaciją ir klaidingą susilankstymą arba pakeisti α -sinukleino potransliacines modifikacijas, tokias kaip fosforilinimas, kurios, kaip manoma, turi įtakos agregacijos procesui ir toksiškų rūšių vystymuisi [23]. Dėl alfa-sinukleino gausaus išsidėstymo smegenyse ir atliekamų svarbių fiziologinių funkcijų, paieška sutelkiama ties inhibitoriais, kurie sąveikautų tik su agreguotomis ir toksiškomis formomis, o funkcionalūs monomerai išliktų nepakitę. Šiam tikslui yra tiriami gamtoje sutinkami junginiai bei rinkoje jau esantys vaistiniai preparatai, ieškoma įvairių mažamolekulinių junginių, taip bandoma identifikuoti baltymo aktyvius centrus, sumodeliuoti naujus aktyvius junginius. Alfa-sinukleino agregacijos slopiklių paieškoje vyraujančius junginius galima susiskirstyti į dvi bendras grupes: polifenolius ir heterociklinius junginius.

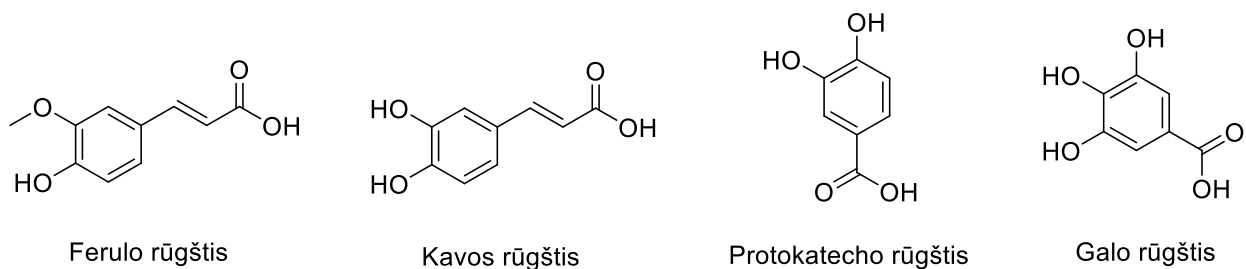
1.4.1. Polifenoliniai junginiai

Pirmosios alfa-sinukleino agregacijos moduliatorių paieškos buvo sutelktos į natūralius junginius - polifenoliai yra didžiausia ištirtų junginių grupė. 2001 metų tyrime pateiktos 169 molekulės. Nustatyta, kad katecholaminai, tokie kaip adrenalinas ir noradrenalinas, dopaminas, L-DOPA (4 pav.), sutrikdė alfa-sinukleino agregaciją *in vitro* [24]. Tačiau inhibicijos nebuvimas anaerobinėmis ir rūgštinėmis sąlygomis parodė, kad šių katecholaminų oksidaciniai produktai buvo aktyviausi junginiai agregacijos slopinime [25]. Tačiau kituose tyrimuose ant gyvūnų modelių šie junginiai neapsaugojo nuo alfa-sinukleino agregatų toksiškumo ar net paskatino toksinių agregatų susidarymą [26, 27].



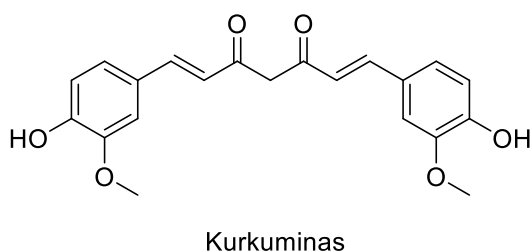
4 pav. L-DOPA, dopamino, adrenalino ir noradrenalino struktūros.

Vieni aktyviausių polifenolių – kurkuminas, baikaleinas, miricetinas, epigalokatechin-3-galatas (EGCG), ferulo rūgštis, kavos rūgštis, protokatecho rūgštis ir galo rūgštis [28–30]. 5 paveikslėlyje pateiktos minėtos vieną žiedą turinčios fenolinės rūgštys, pasižymėjusios subrendusių fibrilių destabilizacija *in vitro* [29–32].



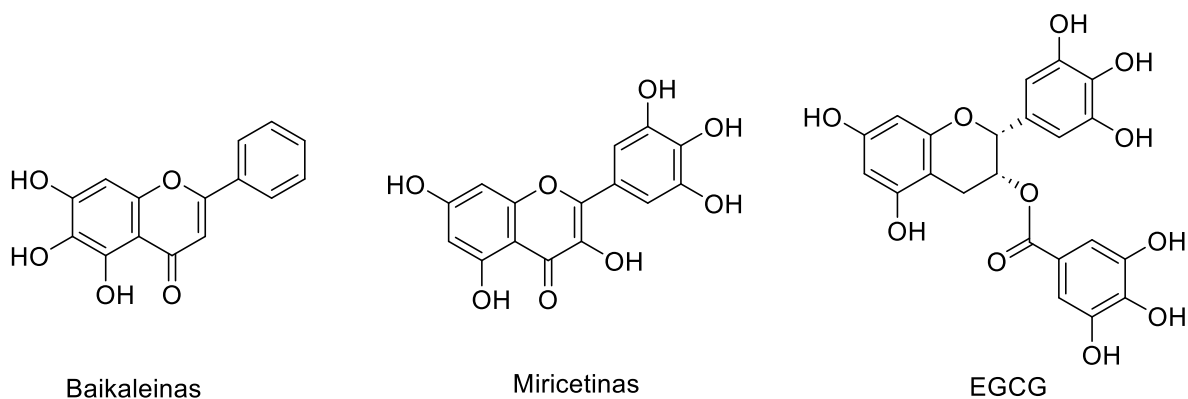
5 pav. Fenolinių rūgščių - ferulo, kavos, protokatecho, galo rūgščių struktūra.

Kurkuminas (6 pav.) yra vienas iš nedaugelio polifenolių, kurio agregacijos slopinimo aktyvumas ištirtas transgeniniuose PL gyvūnų modeliuose. Tyrimai rodo pagerėjusias pelių motorines funkcijas, tačiau kurkumino tiesioginis poveikis alfa-sinukleino agregacijoje nenustatytas [33].



6 pav. Kurkumino struktūra.

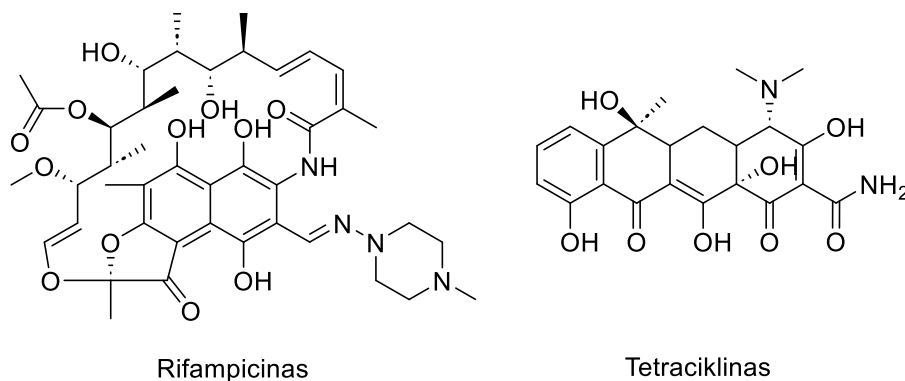
Tyrimai rodo, jog baikaleinas, miricetinas ir EGCG (7 pav.) slopina fibrilių susidarymą ir destabilizuoja iš anksto suformuotas fibriles [34–36]. Kitame tyrime nustatyta, kad EGCG palengvina fibrilių susidarymą, pašalindamas oligomeras, kurie, kaip manoma, yra labiausiai toksiški [37].



7 pav. Baikaleino, miricetino, EGCG struktūros.

Kitas polifenolinių junginių šaltinis yra jau patvirtinti, naudojami kitoms indikacijoms, medikamentai. Keletas antimikrobinių polifenolinių medžiagų rodo gerą alfa-sinukleino

agregacijos slopinimą, pagrindiniai – rifampicinas ir tetraciklinas (8 pav). Abi šios molekulės pasižymėjo monomero stabilizacija, taip blokuodamos agregacijos procesą, bei jau susiformavusių fibrilių išskaidymu [30, 38, 39].



8 pav. Rifampicino, tetraciklino struktūros.

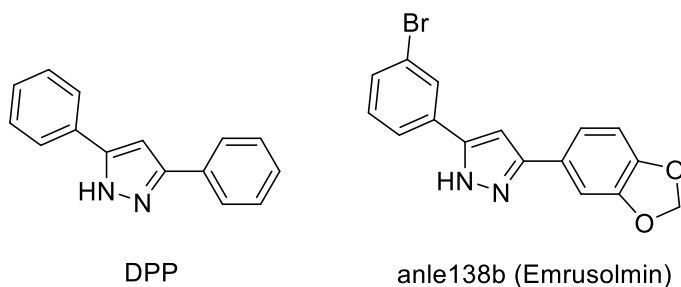
Apibendrinant, nors tikslūs veikimo mechanizmai nėra aiškūs, iš tyrimų rezultatų manoma, kad minėti polifenoliai pirmiausia sąveikauja su įkrauta ir netvarkinga alfa-sinukleino C-galo sritimi, sukeldami netoksiškų agregatų susidarymą pertvarkydami suformuotas toksiškas struktūras arba išardydami subrendusias fibriles [35, 37, 40]. Nepaisant polifenolių neuroprotektinių savybių įrodymų *in vitro*, informacija apie jų gebėjimą pereiti hematoencefalinį barjerą yra ribota, taip pat šie junginiai yra plačiai metabolizuojami žmogaus organizmo ir jo mikrofloros. Remiantis struktūros-aktyvumo analize, siūloma, kad pagrindiniai molekuliniai karkasai, kurie efektyviausiai slopina ir destabilizuoja alfa-sinukleino savaiminę agregaciją, turėtų aromatinį elementų ir gretimų hidroksilo grupių, esančių tame pačiame aromatiniame žiede [41].

1.4.2. Heterocikliniai junginiai

Šiuo metu vis dar nėra aiškiai apibrėžtos trimatės oligomerinės ir protofibrilinės alfa-sinukleino struktūros, tai neleidžia tikslingai kurti ir optimizuoti junginius, kurie sąveikautų su šiomis formomis. Atitinkamai, yra daug struktūriškai skirtingų junginių, kurie turi skirtingus veikimo mechanizmus, nukreiptus į alfa-sinukleino agregacijos slopinimą. Aukšto našumo atrankos metodai (angl. *High Throughput Screening*, toliau - HTS) tapo pagrindine tikslinių molekulių identifikavimo strategija. Šiuo metodu pavyko identifikuoti junginius, kurie slopina alfa-sinukleino amiloido susidarymą *in vitro* ir *in vivo*.

2013 metų Wagner et al., tyrime HTS pagalba buvo analizuojama ~20 000 chemiškai skirtingų į vaistus panašių struktūrų, kurios gebėtų užkirsti kelią baltymų agregacijai, iš jų 3,5-difenilpirazolas (DPP) pasižymėjo geriausiu aktyvumu (pav). Antrosios aukšto našumo atrankos

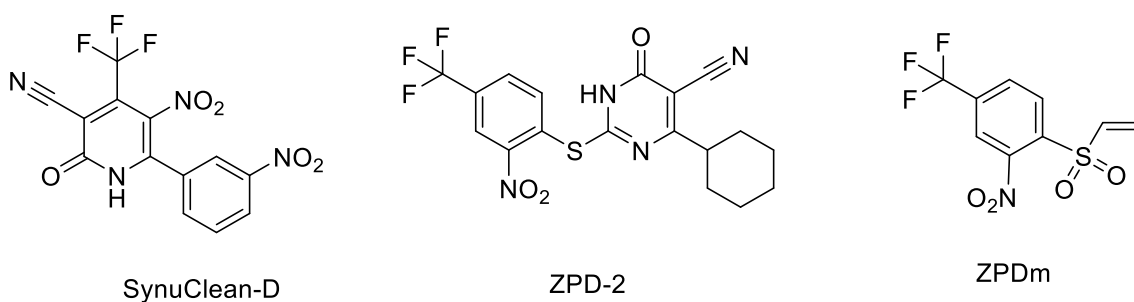
metu autoriai iš 150 DPP darinių analizavo kurie gali išlaikyti kraujo-smegenų barjero praeinamumą ir antiagregacinį aktyvumą. Taip buvo identifikuotas aktyvus junginys anle138b (Emrusolmin) (9 pav.) [42]. Ši molekulė nepasižymėjo reikšminga sąveika su monomeriniu alfa-sinukleinu, tačiau turėjo didelį afiniškumą su hidrofobine alfa-sinukleino oligomero „kišene“. Sąveika su oligomero neleidžia susidaryti β -klostei, todėl išvengiama tolesnės amiloidų agregacijos.



9 pav. Agregacijos inhibitoriaus anle138b (Emrusolmin) ir jo pirmtako DPP struktūros.

Anle138b vartojimas *per os* trijuose skirtinguose Parkinsono ligos pelių modeliuose pagerino su liga susijusius simptomus, tokius kaip motorines funkcijas, žarnyno judrumą, neuroprotekciją ir išgyvenamumą [43]. Iki klinikiniai tyrimai parodė, kad šis junginys yra nekenksmingas ir pasižymi geromis farmakologinėmis savybėmis, įskaitant reikšmingą hematoencefalinio barjero pralaidumą. 2019 metais I fazės klinikinio tyrimo metu anle138b sveikuose asmenyse pasižymėjo saugumu ir gera vaisto tolerancija [44]. Šiuo metu vyksta pasiruošimas II fazės klinikiniams tyrimams.

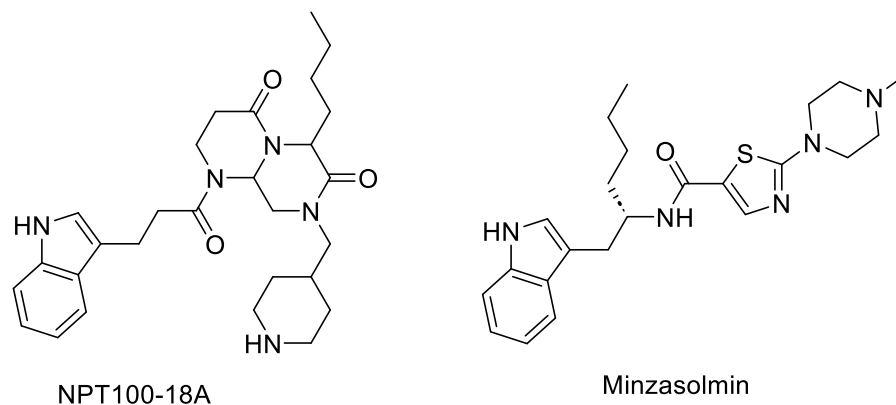
Kitos aktyvių junginių HTS paieškos metu identifikuoti trys potencialūs alfa-sinukleino agregacijos modulatoriai: SynuClean-D, ZPD-2 ir ZPDm (10 pav.) [45]. 2-piridono karkasą turintis junginys SynuClean-D, pasižymėjo alfa-sinukleino agregacijos slopinimu, subrendusių amiloidinių fibrilių struktūros sutrikdymu ir Parkinsono ligos dopaminerginių neuronų degeneracijos mažinimu apvaliosiose kirmėlėse, tačiau klinikinių stadijų šis junginys nėra pasiekęs [46]. Preliminarūs tyrimai rodo, kad kraujo-smegenų barjero pralaidumas SynuClean-D yra mažas, vykdoma jo darinių paieška. Siekiama pagerinti perėjimą pro kraujo-smegenų barjerą, išlaikyti mažą toksiškumą ir gerą agregacijos slopinimą [47].



10 pav. SynuClean-D, ZPD-2 ir ZPDm struktūros.

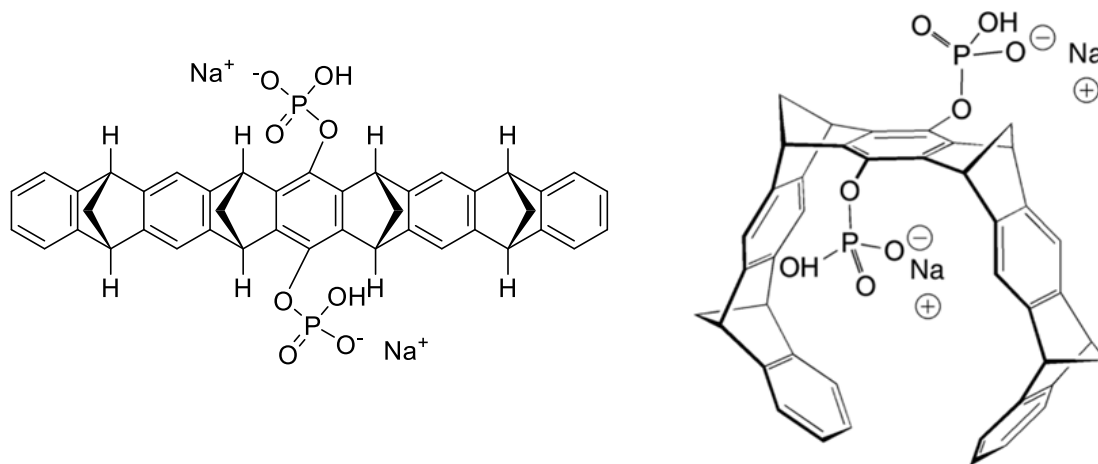
ZPD-2 ir ZPDm yra struktūriškai panašūs junginiai, ZPDm yra vienas iš nedaugelio nenatūralių junginių, kuris pasižymi antiagregaciniu aktyvumu ir struktūroje turi tik vieną aromatinį žiedą [48]. Abi molekulės sumažino baltymo agregaciją, tačiau skyrėsi veikimo mechanizmu: ZPD-2 veikia ankstyvuosius agregacijos etapus, ZPDm veiksmingiau suardo brandžius agregatus. Iš farmakokinetinės pusės, prognozuojama, jog ZPDm yra tirpesnis ir pasižymės geresne absorbcija virškinamajame trakte [49, 50], tačiau nei su vienu iš šių dviejų junginių kol kas nėra atlikta *in vivo* tyrimų.

2016 metais publikuotas pirimidopirazino karkasą turintis junginys NPT100-18A (11 pav.) buvo sumodeliuotas veikti į alfa-sinukleino 96-102 domenų, kurie, kaip manoma, yra atsakingi už baltymo dimerizaciją ant membranų. Inhibuojant šią sąveiką NPT100-18A sumažino kenksmingų oligomerų susidarymą žiurkių modeliuose ir jau esančių dimerų ir oligomerų kiekį. Ilgalaikis minėto junginio poveikis transgeninių pelių modeliuose parodė pagerėjusias motorines funkcijas, matoma sumažėjusi neuronų mirtis, sinaptodentritinių pažeidimų kiekis. Tačiau NPT100-18A pasižymėjo prastu perėjimu per kraujo-smegenų barjerą, todėl į klinikinių tyrimų fazę nepateko [51]. Naudojantis šiomis žiniomis ir modifikuojant junginio struktūrą, buvo susintetintas naujas junginys NPT200-11 (11 pav.), pasižymintis geresnėmis farmakokinetinėmis savybėmis bei išlaikytu panašiu veiksmingumu [52]. Išgrynintas jo R enantiomeras, pavadintas Minzasolmin, šiuo metu yra II klinikinių tyrimų stadijoje [53]. Tai tikriausiai yra vienas daugiausiai žadančių junginių nukreiptų į alfa-sinukleino agregacijos slopinimą.



11 pav. NPT100-18A ir NPT200-11 (Minzasolmino) struktūros.

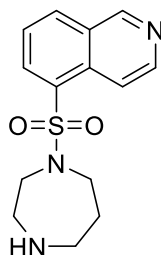
Junginys CLR01 (12 pav.), dar vadinamas molekulinio pincetu, *in vitro* tyrimuose pasižymėjo alfa-sinukleino agregacijos slopinimu ir gebėjimu išardyti jau suformuotas fibriles. Šis junginys zebriinių žuvų embrionų tyrime padidino embrionų išgyvenamumą sumažindamas ląstelių apoptozę, kurią sukėlė alfa-sinukleino agregatai. Tiek intracerebroventrikulinis, tiek podinis junginio skyrimas pelėms, kuriose padidėjusi baltymo ekspresija, žymiai sumažino tirpią alfa-sinukleino frakciją ir motorinius reiškinius. Tačiau šios molekulos prasiskverbimas pro kraujosmegėnų barjerą yra nedidelis, prieš tolesnius tyrimus teikiami siūlymai modifikuoti junginio struktūrą [54, 55].



12 pav. CLR01 „molekulinio pinceto“ plokščia ir erdvinė struktūra [56].

Kitas potencialus vaistas sinukleopatijų gydyme, komerciškai prieinamas Rho kinazės inhibitorius ir vazodilatatorius fasudilis (13 pav.). Ląstelių kultūrų tyrimuose šis vaistas žymiai sumažino alfa-sinukleino agregaciją. BMR analizė atskleidė fasudilio tiesioginį prisijungimą prie tirozino liekanų baltymo C-galo domene. Taip pat, įvertintas ilgalaikio gydymo poveikis *in vivo*

transgeniniame pelių modelyje, kurio metu fasudilis pagerino motorines ir kognityvines funkcijas [57, 58].



13 pav. Fasudilio struktūra.

Apibendrinus pateiktus duomenis, kol kas literatūros šaltiniuose nepateikiama tiksliai nustatytų struktūrinių karkasų ar farmakoforų, kurie būtų sistemingai atsakingi už alfa-sinukleino agregacijos slopinimą. Matomas azotinių heterociklų – penkianarių, šešianarių sistemų populiarumas. *In vitro* ar *in vivo* junginių aktyvumas nėra galutinis veiksmingumo rodiklis, vienas svarbiausių aspektų – gebėjimas pereiti kraujo-smegenų barjerą, geras junginio toleravimas bei mažas toksiškumas. Nors vis dar neturime mažamolekulinių junginių, sėkmingai pasiekusių paskutines (III bei IV) klinikinių tyrimų stadijas, nauji išplėstiniai tyrimai padeda geriau suprasti sinukleinopatijų mechanizmus ir ieškoti efektyvesnių ligą įveikiančių vaistų.

1.5. Insulinas ir lokali injekcinė amiloidozė

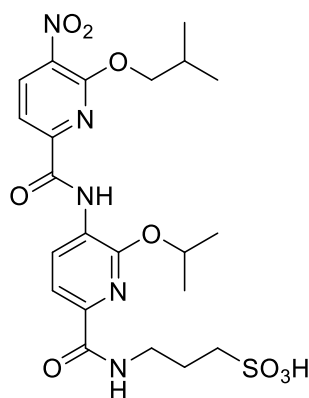
Insulinas – peptidinis hormonas gaminamas kasoje ir sudarytas iš dviejų grandinių (21 ir 30 aminorūgščių) sujungtų dvejais disulfidiniais tilteliais. Injekuojamas insulinas yra viena iš diabeto gydymo sudedamųjų dalių.

Yra žinoma, kad insulinas įvairiomis sąlygomis *in vitro* sudaro amiloidines fibriles. Jis naudojamas kaip pavyzdinis baltymas tiriant amiloidų susidarymą ir baltymų agraciją į fibriles ar antiamiloidinius vaistus [59]. Žinoma, jog *in vitro* fibrilių susidarymas ir morfologija priklauso nuo, pH, temperatūros, denatūruojančio organinio tirpiklio ir jo koncentracijos. Paprastas būdas skatinti insuliną agreguotis į fibriles yra baltymą patalpinti rūgštinėje terpėje ir pašildyti ar pakratyti [60]. Paruoštas poodinei injekcijai insulinas yra fiziologinėse sąlygose, kuriose agregacijos procesui sąlygos yra nepalankios. Nepaisant to, fiksuojami *in vivo* atvejai, kai injekcijos vietoje susidariusios insulino fibrilės sukelia lokalią injekcinę amiloidozę (LIA) – poodiniame sluoksnyje matomi gumbai. Šis estetiškai nepageidaujamas reiškinys sutinkamas retai, tačiau gali būti pavojingas sergantiems diabetu: užkemšamas nuolatinis kateteris, dėl agregatų injekcijos vietoje suprastėja insulino absorbcija į kraują → blogėja glikemijos kontrolė [61, 62].

Tikslus LIA procesas vis dar menkai suprantamas dėl retai fiksuojamų atvejų, kadangi panašią apraišką turi dažniau pasitaikanti patologija – lipohipertrofija. Tai injekcijos vietoje poodiniame sluoksnyje susidarę riebalinio ar randinio audinio gumbai. Vienintelis būdas tiksliai diagnozuoti yra atlikti biopsiją, tad ši invazinė procedūra yra labai retai atliekama [63]. Lokalios injekcinės amiloidozės gydymas apsiriboja chirurginiu pašalinimu arba pakartotinių injekcijos vietų vengimu.

LIA skirtų insulino agregacijos slopiklių paieška nėra plati, susitelkusi į junginius, kuriuos būtų galima įtraukti į injekuojamo insulino sudėtį. Nors buvo ištirta keletas natūralių ir sintetinių mažų molekulių ir peptidų, jie susiduria su praktiniais apribojimais, įskaitant specifiškumo trūkumą, nepilną slopinimą, proteolitinį skilimą ir ribotą supratimą apie jų veikimo mechanizmą.

Vienas iš naujausių junginių – PAD-S (14 pav.), tai vandenyje tirpus mažamolekulinis junginys, sąveikaujantis su hidrofobinėmis insulino sritimis ir pasižymintis veiksmingu amiloidų slopinimu ir jau susidariusių fibrilių skaidymu. Nors dar nėra ištirtas realus šio mišinio *in vivo* veiksmingumas, svarbiausias aspektas – insulinas paveiktas PAD-S išlieka biologiškai aktyvus [64].



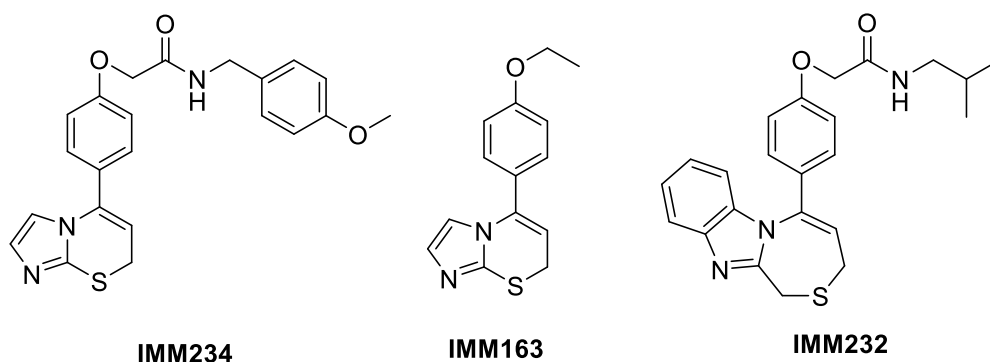
14 pav. PAD-S struktūra.

Apibendrinant, mažamolekulių insulino agregacijos slopiklių paieška yra didelis iššūkis. Svarbu, jog kuriamos molekulės būtų tirpios vandenyje, nesukeltų pašalinių reakcijų, nepakeistų injekuojamo insulino biologinio aktyvumo. Dėl retų LIA atvejų šių junginių paieškai nėra skiriama didelė svarba. Tačiau šis baltymas patogus tyrimams dėl stabilių atsikartojančių rezultatų ir greito reakcijos į junginius.

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS IR REZULTATAI

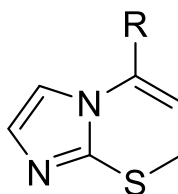
2.1. Tyrimo objektas

Šio magistrinio darbo objektas yra naujų junginių sintezė, kurie galėtų pasižymėti baltymų – alfa-sinukleino ir insulino amiloidinės agregacijos slopinimu. Laboratorijoje yra jau ištirti įvairių struktūrų junginiai, kurie pasižymėjo geru minėtų baltymų agregacijos slopinimu (15 pav.). Tyrimų metu pastebėta, jog junginiai turintys tiazino žiedą yra aktyvesni alfa-sinukleino agregacijos slopinime, o turintys tiazepino žiedą pasižymi geresniu aktyvumu insulino agregacijos slopinimui.



15 pav. Stipriausi laboratorijoje susintetinti amiloidinių baltymų agregacijos slopikliai.

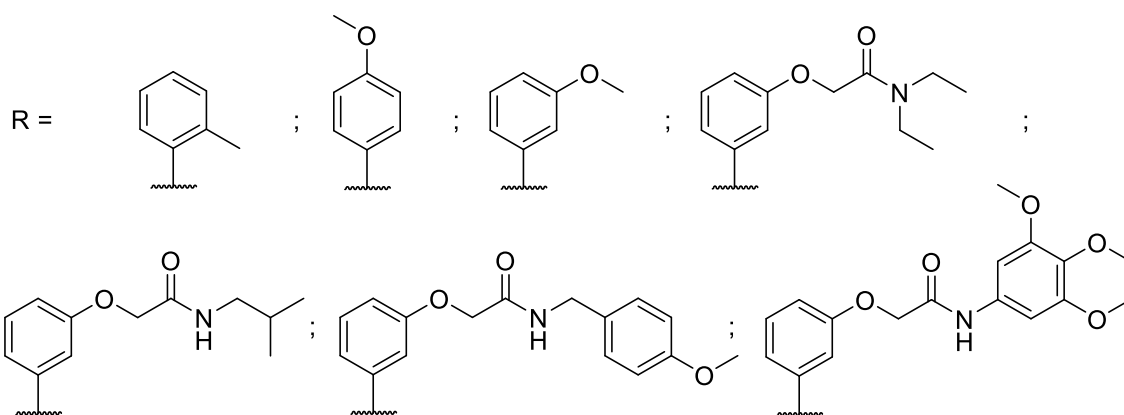
Apžvelgus literatūroje aprašytus baltymų agregacijos slopinimui tiriamus junginius, susidomėjimą heterociklinėmis sistemomis imidazotiazinų tyrimų trūkumą bei laboratorijoje atrastas aktyvias struktūras, nuspręsta susintetinti junginius, kurių struktūroje būtų 7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazino karkasas (16 pav.). Kaip minėta anksčiau, benzimidazotiazino bei benzimidazotiazepino karkasinės struktūros turi įtakos skirtingiems baltymams, siekiant turėti platesnį junginių spektrą, šie junginiai taip pat įtraukti į tikslinių junginių sintezės planą. Siekiant praplėsti tiriamų junginių imtį ir pakaitų padėties tyrimus nuspręsta prie šio karkaso prijungti skirtingus pakaitus.



16 pav. 5-pakeisto-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazino struktūra.

2.2. Pakaitų pasirinkimas

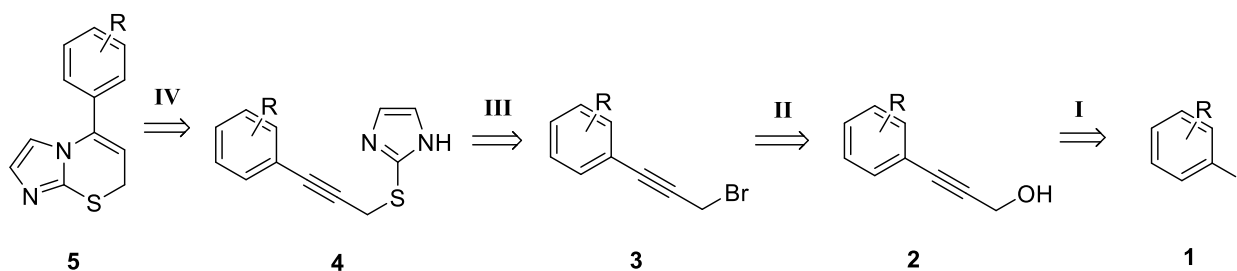
Pirminiai tyrimai buvo atlikti su *para* pakeistais arilimidazotiaziniais ir tiazepiniais. Dėl tolimesniems tyrimams nuspręsta išsiaiškinti pakaitų padėties įtaką agregacijos slopinimui pasirenkant junginius, turinčius grupes skirtingose aromatinio žiedo padėtyse (15 pav.). Šiuo tikslu pagal palankiausius duomenis buvo parinkti septyni pakaitai: 2-metilfenilo, 4-metoksifenilo, 3-metoksifenilo ir 4 skirtingi 3-fenoksiacetamidai (17 pav.):



17 pav. Tiksliniams junginiams pasirinktų pakaitų struktūros.

2.3. Tikslinių junginių retrosintetinė analizė

Naudojantis internetiniu *Reaxys* programos sintezės planavimo įrankiu sukurtas 5-pakeistų-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinų sintezės kelias. Atsižvelgiant į turimus reagentus, jų kainą bei prieinamumą nuspręsta tikslinius junginius sintetinti 4 pagrindiniais etapais (1 schema).



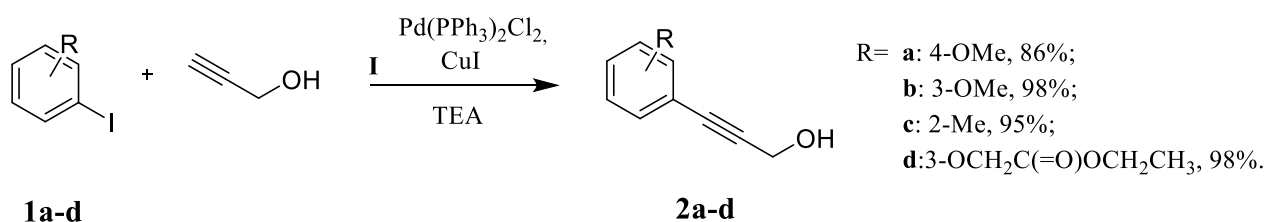
1 schema.

Norint gauti tikslinius tiazinus (**5**) reikia atlikti propargilimidazolo **4** ciklizaciją (**IV**), taip gaunant norimą pakaitą reikiamoje vietoje, t.y., 5 padėtyje. Junginiui **4** suformuoti naudojama klasikinė nukleofilinio pakeitimo reakcija (**III**), kuriai reikalingas propargilbromidas **3** gaunamas

brominimo metu (**II**). **II** etapui reikalingas fenilpropargilalkoholis gaunamas iš komerciškai prieinamų arilhalogenidų **1** Sonogashiros kopuliavimo reakcijoje su propargilalkoholiu (**I**).

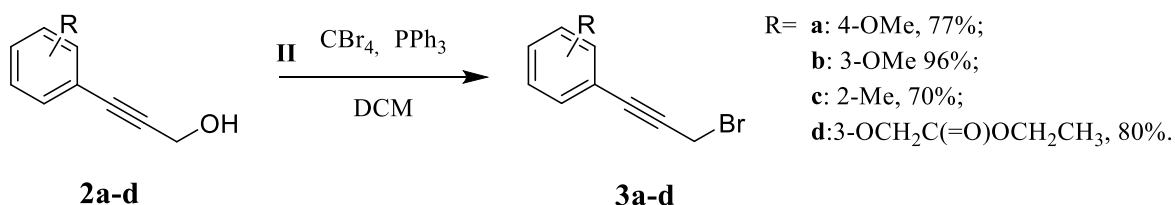
2.4. Sintezės metodai

Pirmuoju etapu vykdoma Sonogashiros reakcija [65], kurios metu, naudojantis literatūroje pateiktomis metodikomis, tarp parinktų arilhalogenidų ir propargilalkoholio vykdoma paladžio(**II**) ir vario(**I**) katalizuojama kopuliavimo reakcija, kurios metu formuojamas naujas C-C ryšys (2 schema, **I**). Šioms reakcijos panaudoti komerciškai prieinami 1-jod-4-metoksibenzenas (**1a**) ir 1-jod-3-metoksibenzenas (**1b**) ir specialiai šioms reakcijoms susintetinti 1-jod-2-metilbenzenas (**1c**) ir etil-2-(3-jodfenoksi)acetatas (**1d**). Trietilaminas (TEA) buvo naudotas kaip reakcijos tirpiklis ir bazė, reikalinga neutralizuoti susidariusį vandenilio jodidą. Reakcija vykdyta argono atmosferoje, 24 valandas kambario temperatūroje. Visiems junginiams buvo reikalingas chromatografinis gryninimas. Junginiai **2a-d** gauti labai geromis išeigomis - 86-98 %.



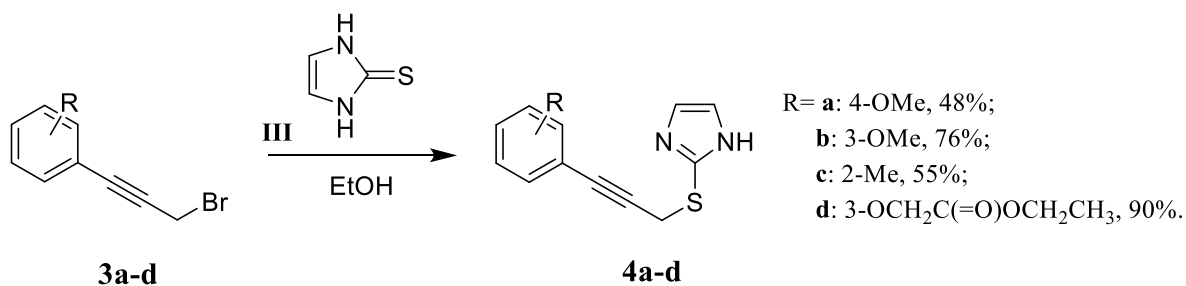
2 schema.

Antram etapui pasirinkta Appel reakcija [66], kurios metu propargilo hidroksigrupė yra keičiama bromu, veikiant anglies tetrabromidu ir trifenilfosfinu 0-5°C temperatūroje (3 schema, **II**). Junginiai **2a-d** ištirpinti dichlormetane (DCM) ir šaldomi ledo vonelėje iki 0-5°C, toliau suberiama CBr₄ ir dalimis sudedamas PPh₃. Po 40 minučių mišinys išimamas iš ledo vonios ir paliekami maišytis kambario temperatūroje apie 24 valandas. Reakcijos metu susidariusios trifenilfosfino oksido priemaišos šalinamos chromatografinio gryninimo metodais. Junginiai **3a-d** išskirti 70-96% išeigomis.



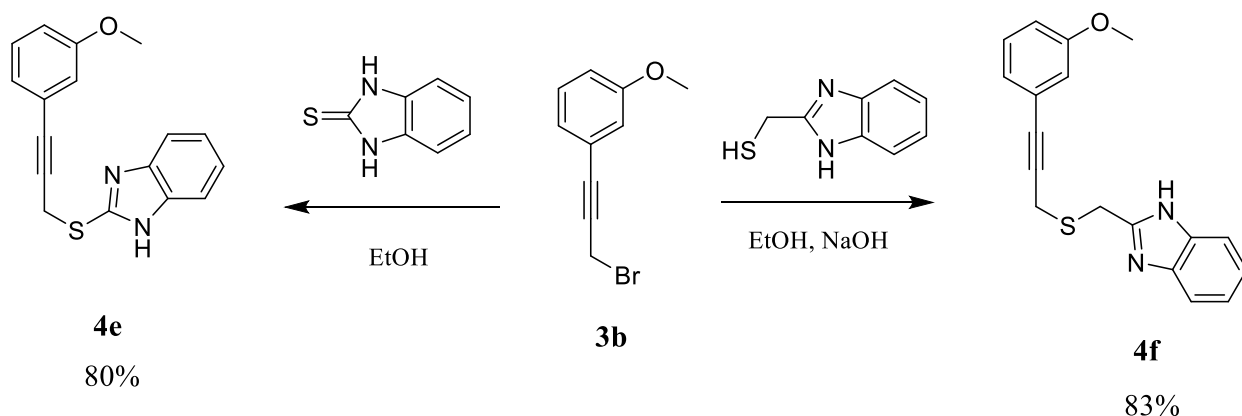
3 schema.

Trečiasis etapas – 2-alkiniltioimidazolų sintezė [67] (4 schema, III). Vykdoma nukleofilinio pakeitimo reakcija, 2-tioimidazolas keičia bromą junginiuose **3a-d** neutraliomis sąlygomis, tirpikliu naudojant etanolį, kambario temperatūroje per 18 valandų.



4 schema.

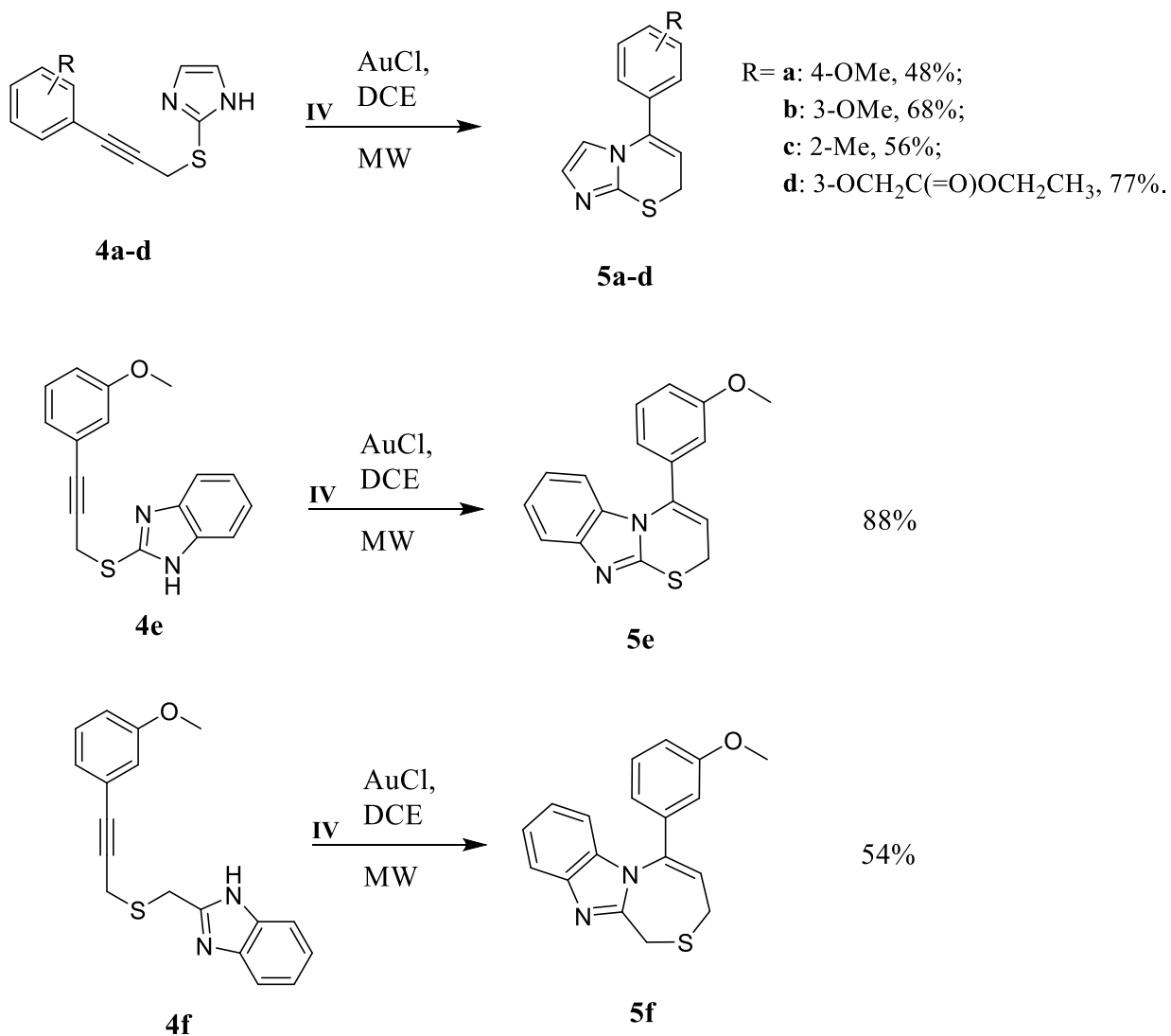
Šiame etape kaip nukleofilai taip pat naudojami 2-tiobenzimidazolas ir 2-metiltiobenzimidazolas, taip tiksliniuose junginiuose atitinkamai gaunant alkinilbenzimidazolus (**4e**, **4f**) (5 schema) [67]. Tuo tarpu norint įvesti 2-metiltiobenzimidazolą reikalingas NaOH. Junginių **4a-f** išeigos 48-90%.



5 schema.

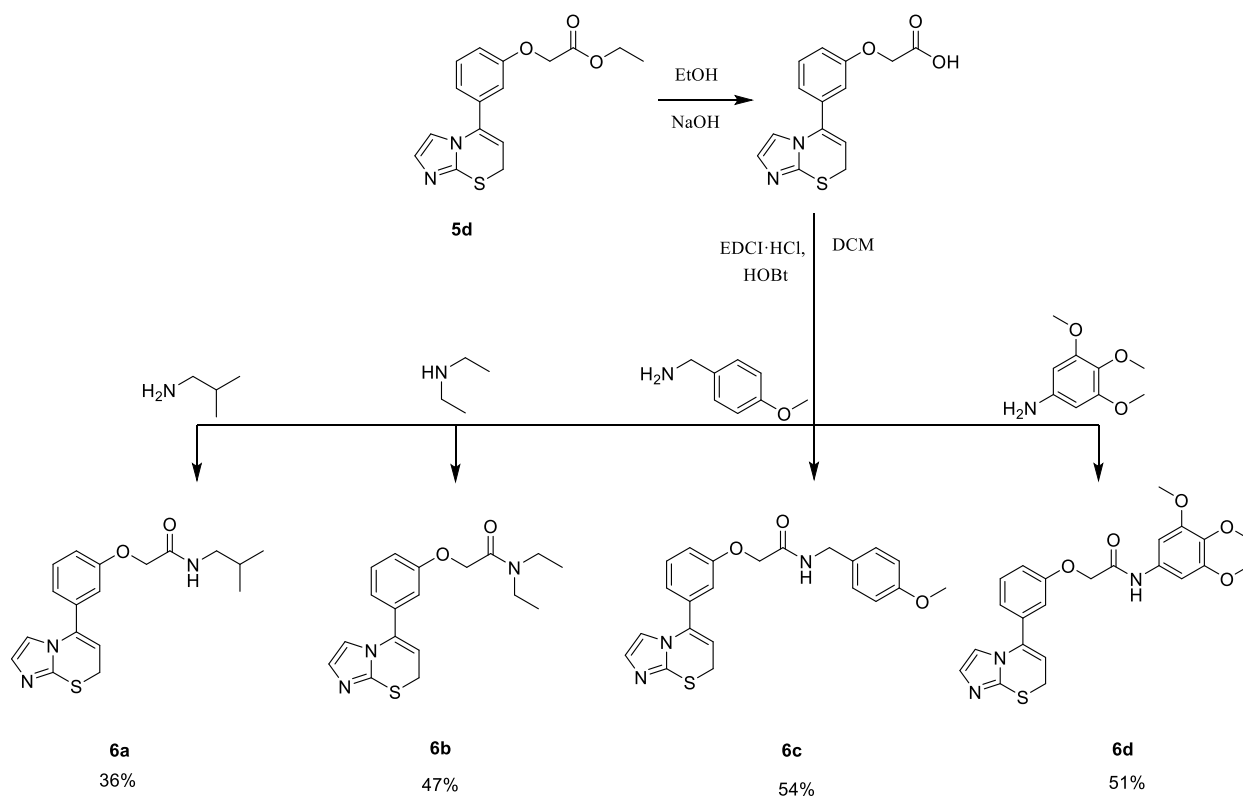
Ketvirtajame etape mikrobangų reaktoriuje vykdoma aukso (I) chloridu katalizuojama intramolekulinė nukleofilinė ciklizacija [68] (6 schema, IV), kurios metu iš minėtų alkinilimidazolų susintetinami imidazotiazinai (**5a-d**), benzimidazotiazinas (**5e**) ir

benzimidazotiazepinas (**5f**). **5a-f** junginių išeigos svyruoja tarp 48 ir 88 %. Šiame etape beveik visiems junginiams buvo reikalingas gryninimas.



6 schema.

Taip pat vykdytas papildomas etapas norint gauti junginius su acetamidine grupe. Atlikta **5d** junginio hidrolizė ir amidinimo reakcija [69], kurios metu panaudojus karbodimidą (EDCI·HCl), hidroksibenzotriazolą (HOBT) ir atitinkamus aminus gauti 4 nauji tiksliniai junginiai **6a-d** (7 schema) su 36-54% išeiga.

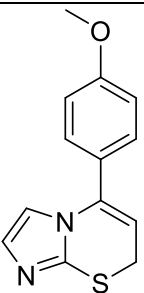
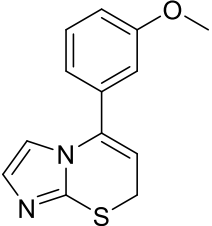
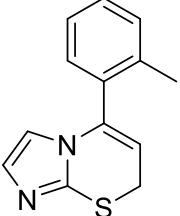
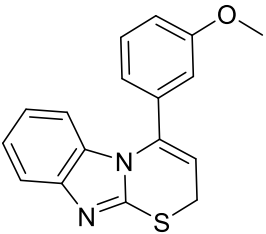
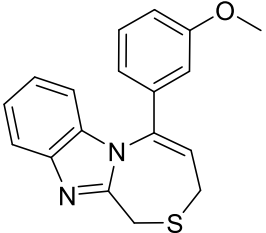


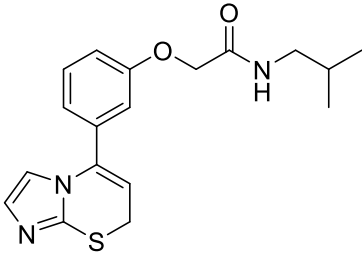
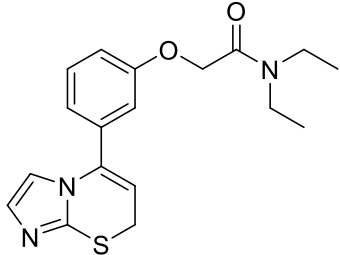
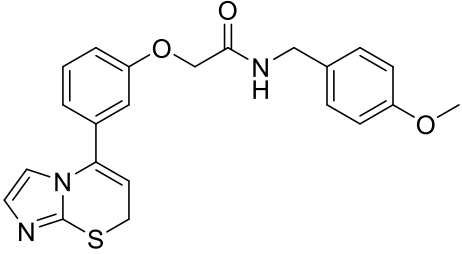
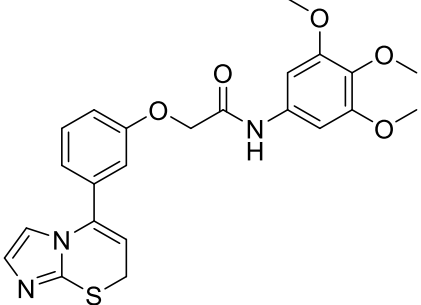
7 schema.

Apibendrinant, pirmojo sintezės etapo metu junginių **2a-d** išeigos buvo geros, vyravo 86-98 %, panašu, jog pakaitas ir jo padėtis įtakos šiai reakcijai neturėjo. Antrajame etape, brominimo reakcijos metu junginių išeigos svyravo tarp 70 ir 96%, prasčiausia išeiga pasižymėjo junginiai su 2 padėtyje metilo (**3a**) ir 4 padėtyje metoksi grupėmis (**3c**). Trečiajame etape susintetinti 6 nauji junginiai, jų išeigos svyravo 48-90%, prasčiausia išeiga pasižymėjo junginiai **4a** (48%) ir **4c** (56%) su jau minėtais pakaitais, tad manoma, jog šie pakaitai galimai turėjo įtakos sintezės efektyvumui. Ketvirtajame etape ciklizacijos reakcijų metu išeigos stipriai svyravo, prasčiausia išeiga pasižymėjo junginys **5c**, labai gera (88%) išeiga pasižymėjo benzimidazotiazinas (**5e**). Šio etapo metu susintetinti 6 nauji junginiai **5a-f**. Taip pat, buvo vykdomas papildomas etapas, kurio metu gauti 4 nauji tiksliniai acetamidai **6a-d**, jų išeigos buvo ganėtinai prastos, geriausia 54% išeiga pasižymėjo junginys **6c**.

Bendrai, pavyko susintetinti 9 tikslinius junginius su skirtingais pakaitais: septynis imidazotiazinus bei po vieną benzimidazotiaziną ir benzimidazotiazepiną (2 lentelė).

2 lentelė. Susintetinti tiksliniai junginiai.

	Struktūra	Išiga
5a		48%
5b		68%
5c		56%
5e		88%
5f		54%

	Struktūra	Išiga
6a		36%
6b		47%
6c		54%
6d		51%

2.4. Junginių identifikacija

Susintetintų žinomų junginių identifikacijai nustatyta lydymosi temperatūra ir užrašyti ^1H BMR spektrai. Naujų, dar neaprašytų junginių identifikacijai nustatomos lydymosi temperatūros, užrašomi ^1H ir ^{13}C BMR spektrai, IR spektrai bei atliekama HRMS analizė.

Junginių struktūros nustatymui naudota branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektrometrija. Užregistruotame ^1H spektre, veikiant 400 MHz magnetiniam laukui, stebimos charakteringų funkcinių grupių (turinčių rezonuojančius protonus), smailės su jiems būdingais cheminiais poslinkiais. Taip pat yra stebimas protonų smailių skilimas, dėl kaimyninių protonų sąveikos. Užregistruotame ^{13}C spektre, veikiant 100 MHz magnetiniam laukui, detektuojamas ^{13}C izotopo rezonavimas, taip gaunama informacija apie junginio anglies atomų skeletą. Aprašymuose BMR cheminių poslinkių reikšmės pateiktos δ poslinkio skalėje milijoninėmis dalimis bei naudojamas žymėjimas: s – singletas, d – dubletas, dd – dubleto dubletas, t – tripletas, m – multipletas, nurodomas protonų skaičius bei funkcinė grupė, pvz.: s, 3H, CH_3 .

IR metodas yra skirtas patvirtinti funkcinės grupės įvedimą junginyje. Pagal smailių poslinkius paprastai nustatomi trigubojo ryšio, karbonilinių, amidinių grupių virpesiai.

Iš HRMS analizės nustatoma tiksli junginio molekulinė formulė iš gautų aukštos raiškos masių spektro duomenų, tokiu būdu užtvirtinant molekulės struktūrinę sudėtį.

Lydymosi temperatūros nustatymas vykdomas dviem etapais. Pirmiausia nustatomos apytikslės junginių lydymosi temperatūros gyvsidabrio termometru virš elektrinės viryklės šildant medžiagos kristalus. Antrajame žingsnyje, žinant apytikslį temperatūros diapazoną, tikslios junginių lydymosi temperatūros nustatytos atviruose kapiliaruose Stuart SMP10 prietaisu.

3. TYRIMO METODAI

Šioje dalyje yra aprašoma kiekvieno tikslinio junginio sintezė ir turima struktūros identifikacija/įrodymas – lyd. t., BMR, IR spektrų, HRMS analizės reikšmės.

3.1. Sintezėms naudoti reagentai ir tirpikliai

Sintezės reakcijoms naudoti reagentai (aminai, jodbenzenai, katalizatoriai) buvo įsigyti iš Sigma-Aldrich ir Thermo-Fisher Scientific tiekėjų.

Reakcijose naudoti tirpikliai: acetonitrilas (CH_3CN), metanolis (MeOH), etanolis (EtOH), dimetilformamidas (DMF), chloroformas (CHCl_3), etilacetatas (EA), dichlormetanas (DCM), 1,2-dichlorešanas (DCE), petrolio eteris (PE), toluenas (Tol) buvo įsigyti iš Eurochemicals (Lietuva) ir Honeywell Riedel-HaenTM (Vokietija).

3.2. Naudotos medžiagos ir aparatūra

Medžiagų svėrimui buvo naudojamos KERN ABJ-NM analitinės svarstyklės, virinimui ir maišymui buvo naudojamos IKA RET Basic magnetinės maišyklės. Tirpiklių distiliacija atliekama naudojantis rotaciniu garintuvu Heidolph Laborota 4000.

Atliekant sintezės reakcijas, pirminis tapatumas, reakcijos progresas ir grynumas vertintas pasitelkiant plonasluoksnės chromatografijos metodą, naudojant TLC Silica gel 60 F254 Merc aliuminio plokšteles, stebint ultravioletinėje šviesoje (UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$; 365 nm) arba naudojant vanilino ryškiklį.

Mišinių atskyrimui, junginių gryninimui buvo naudojamas kolonėlinės chromatografijos metodas, sorbentu naudojant Silica gel 60 A (0,0035-0,070 mm), eliuantai – petrolio ir etilacetato, tolueno ir etilacetato, chloroformo ir acetonitrilo mišiniai.

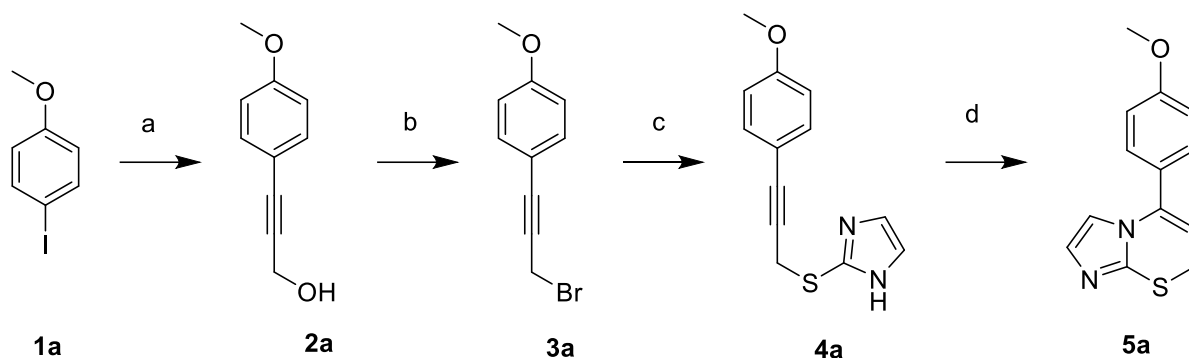
BMR spektrometrijos metu buvo rašomi ^1H ir ^{13}C spektrai BRUKER ASCEND 400 spektrometru, vidiniu standartu naudojant deuteruotą CHCl_3 ir DMSO tirpiklių likutines vertes.

Infraraudonųjų spindulių spektrai gauti Perkin-Elmer 1000 spektrometru su UATR priedu.

Lydymosi temperatūros nustatymui naudojamas Stuart SMP10 prietaisas.

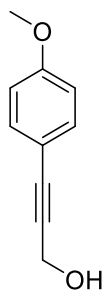
Reakcijos sąlygose nurodytoms mikrobangoms generuoti naudojamas mikrobangų reaktorius CEM Discover SP.

3.3. 5-(4-metoksifenil)-7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazino sintezė (5a)



8 schema.

3-(4-metoksifenil)prop-2-in-1-olis (2a)



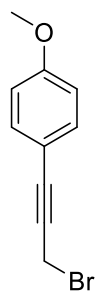
a) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,5 g (1 ekv., 2,1 mmol) 4-jodanizolo (**1a**) ir supilama 10 ml TEA. Tirpalas prapučiamas argono dujomis - reakcija vykdoma argono atmosferoje. Į kolbą, maišant, suberiama 45 mg (0,03 ekv., 0,063 mmol) Pd(PPh₂)₂Cl₂ katalizatoriaus ir sulašinama 150 μl (1,2 ekv., 2,5 mmol) propargilo alkoholio. Suberiama 6 mg (0,015 ekv., 0,03 mmol) CuI ir paliekama maišytis k.t. 24 val. Reakcijos mišinys nurotuojamas pašalinant TEA ir ekstrahuojamas su DCM. Organinė fazė plaunama sočiu NH₄Cl tirpalu, H₂O, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, Na₂SO₄ nufiltruojamas ir DCM nugarinamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą (PE:EA; 4:1) priemaišų nematome, BMR matome junginį atitinkantį spektrą, nebereikalingas gryninimas.

Išeiga: 0,299 g (86%), ruda alyva.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.39-7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 6.85-6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 4.48 (s, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, CH₃), 1.64 (s, 1H, OH).

¹H BMR spektras atitinka pateiktą literatūroje[70].

1-(3-bromprop-1-in-1-il)-4-metoksibenzenas (3a)



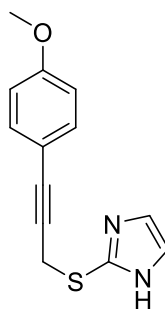
b) Į apvaliadugnę kolbą supilama 6 ml sauso DCM ir suberiama 0,25 g (1 ekv., 1,6 mmol) 3-(4-metoksifenil)prop-2-in-1-olio (**2a**). Kolba pastatoma į ledo vonią ant magnetinės maišyklės. Suberiama 0,63 g (1,2 ekv., 1,9 mmol) CBr_4 ir maišoma 15 min. Dalimis suberiama 0,54 g (1,3 ekv., 2 mmol) PPh_3 ir maišoma apie 40 minučių. Reakcijos mišinys ištraukiamas iš ledo vonios ir maišoma k.t. 12 valandų. Taikant TLC metodą (PE:EA; 70:1) matomos priemaišos. Gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant PE:EA santykiu 70:1. Po gryninimo BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys.

Išeiga: 0,27 g (77%), tamsiai ruda alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.39-7.37 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH), 6.85-6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH), 4.17 (s, 2H, CH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3).

^1H BMR spektras atitinka pateiktą literatūroje [71].

2-((3-(4-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-imidazolas (4a)



c) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,25 g (1 ekv., 1,1 mmol) 1-(3-bromprop-1-in-1-il)-4-metoksibenzeno (**3a**) ir supilama 10 ml EtOH. Suberiama 0,11 g (1 ekv., 1,1 mmol) 2-merkptoimidazolo ir paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su DCM, organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 , nufiltruojama ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ santykiu 4:1. BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys.

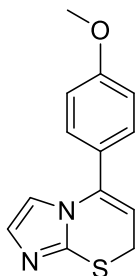
Išeiga: 0,12 g (48%), balti kristalai, lyd.t. 95 °C

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.23 (m, 2H, -N-CH-CH-N-), 7.25 – 7.19 (m, 2H, ArH), 6.83 – 6.73 (m, 2H, ArH), 3.98 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.42, 143.08, 132.64, 124.16, 123.76, 115.75, 114.76, 86.49, 82.30, 55.35, 20.34.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 245,0743, rasta: 245,0744.

5-(4-metoksifenil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (5a)



d) Į reaktoriaus kolbą suberiamas 0,05 g (1 ekv., 0,2 mmol) 2-((3-(4-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1*H*-imidazolo (**4a**) ir supilama 5 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 4,8 mg (0,1 ekv., 0,02 mmol) AuCl. Kolbą statome į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 50 °C temperatūroje 2 val. 40 min. Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ santykiu 4:1. BMR spektre matomas galutinis tikslinis reakcijos junginys.

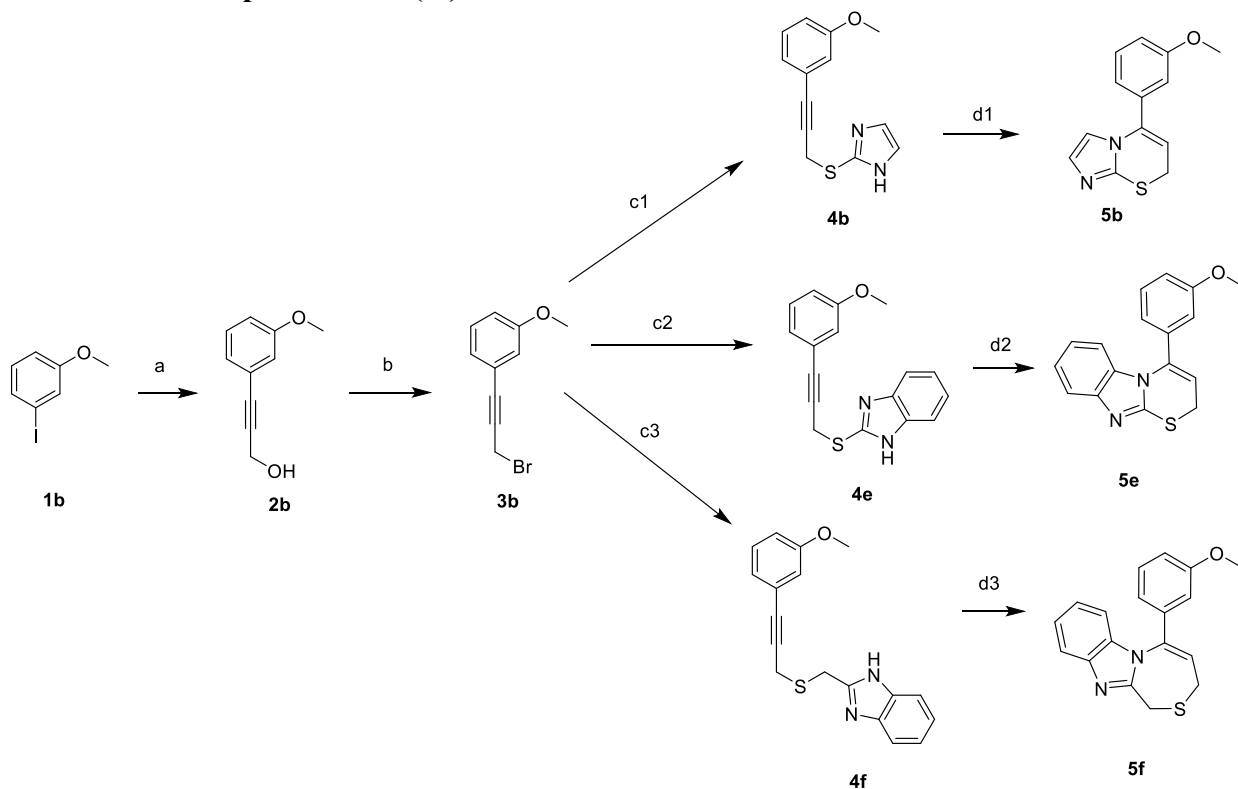
Išėiga: 0,12 g (48%), gelsva alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.30-7.28 (d, $J = 8.1, 6.1$ Hz, 2H, -N-CH-CH-N-), 7.04 – 6.77 (m, 4H, ArH), 5.57 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, CH), 3.84 (s, 3H, CH_3), 3.55-3.53 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 160.58, 140.35, 139.00, 129.62, 127.51, 126.84, 118.36, 114.07, 105.85, 77.28, 55.42, 24.37.

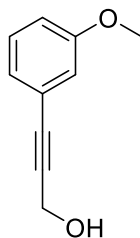
HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 245,0670, rasta: 245,0670.

3.4. 5-(3-metoksifenil)-7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazino (5b) ir jo benzimidazotiazino (5e), benzimidazotiazepino sintezė (5f)



9 schema.

3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-olis (2b)



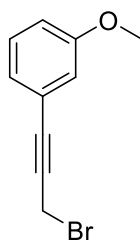
a) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,8 g (1 ekv., 3,4 mmol) 3-jodanizolo (**1b**) ir supilama 12 ml TEA. Tirpalas prapučiamas argono dujomis - reakcija vykdoma argono atmosferoje. Į kolbą, maišant, suberiama 72 mg (0,03 ekv., 0,1 mmol) Pd(PPh₂)₂Cl₂ katalizatoriaus ir sulašinama 236 μl (1,2 ekv., 4 mmol) propargilo alkoholio. Suberiama 10 mg (0,015 ekv., 0,05 mmol) CuI ir paliekama maišytis k.t. 24 val. Reakcijos mišinys nurotuojamas pašalinant TEA ir ekstrahuojamas su DCM. Organinė fazė plaunama sočiu NH₄Cl tirpalu, H₂O, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, Na₂SO₄ nufiltruojamas ir DCM nugarinamas rotaciniu garintuvu. Gauti . Taikant TLC metodą matomos priemaišos. Reakcijos mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant Tol:EA santykiu 10:1. BMR matome junginio struktūrą atitinkantį spektrą.

Išėiga: 0,54 g (98%). Geltona alyva

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.24-7.20 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.05-7.02 (dt, 1H, ArH), 6.97 (dd, 1H, ArH), 6.90-6.87 (ddd, 1H, ArH), 4.50 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3).

^1H BMR spektras atitinka pateiktą literatūroje [72].

1-(3-bromprop-1-in-1-il)-3-metoksibenzenas (3b)



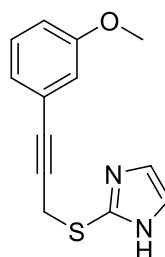
b) Į apvaliadugnę kolbą supilama 10 ml sauso DCM ir suberiama 0,54 g (1 ekv., 3,3 mmol) 3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-olio (**2b**). Kolba pastatoma į ledo vonią ant magnetinės maišyklės. Suberiama 1,33 g (1,2 ekv., 4 mmol) CBr_4 ir maišoma 15 min. Dalimis suberiama 1,14 g (1,3 ekv., 4,3 mmol) PPh_3 ir maišoma apie 40 minučių. Reakcijos mišinys ištraukiamas iš ledo vonios ir maišoma k.t. 12 valandų. Taikant TLC metodą (PE:EA; 4:1) matomos priemaišos. Gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant PE:EA santykiu 4:1.

Išeiğa: 0,72 g (96%). Gelsva alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.24-7.20 (t, 1H, ArH), 7.06-7.02 (m, 1H, ArH), 6.97 (dd, 1H, ArH), 6.91-6.87 (m, 1H, ArH), 3.98 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3).

^1H BMR spektras atitinka pateiktą literatūroje [73].

2-((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-imidazolas (4b)



c1) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,2 g (1 ekv., 0,8 mmol) 1-(3-bromprop-1-in-1-il)-3-metoksibenzeno (**3b**) ir supilama 10 ml EtOH. Suberiama 88 mg (1 ekv., 0,8 mmol) 2-

merkptoimidazolo ir paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su DCM, organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojama ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą (CHCl₃:CH₃CN; 4:1) matoma, jog junginys švarus.

Išeiga: 0,16 g (76%), balti kristalai, lyd.t. - 96°C.

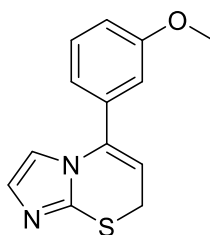
¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.03 (s, 1H, NH), 7.21 – 7.13 (m, 3H), 6.90 (dt, 1H, ArH), 6.84 (ddt, 2H, ArH), 3.89 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.90, 143.08, 130.04, 124.75, 124.16, 123.92, 123.76, 118.97, 115.57, 86.58, 82.51, 52.82, 20.34.

IR spektras (ν, cm⁻¹): 2167 (C≡C).

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₃H₁₂N₂OS (M+H⁺): 245,0743, rasta: 245,0744.

5-(4-metoksifenil)-7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazinas (5b)



d1)Į reaktoriaus kolbą su 0,150 g (1 ekv., 0,6 mmol) 2-((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-imidazolu (**4a**) supilama 5 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 14 mg (0,1 ekv., 0,06 mmol) AuCl. Kolbą statome į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 50 °C temperatūroje 2 val. 40 min. Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant CHCl₃:CH₃CN santykiu 4:1. BMR spektre matoma galutinio tikslinio reakcijos junginio struktūra.

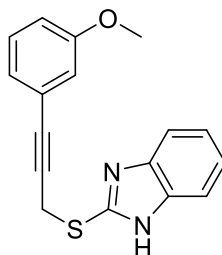
Išeiga: 0,1 g (68%), geltoni kristalai, lyd.t. – 102 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.37 – 7.29 (m, 1H), 7.03 – 6.92 (m, 3H), 6.88 (d, 2H), 5.67-5.64 (t, 1H, CH), 3.82 (s, 3H, CH₃), 3.58-3.56 (d, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.68, 139.21, 135.94, 129.77, 127.94, 120.64, 118.33, 115.15, 113.76, 107.00, 55.41, 24.40.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₃H₁₂N₂OS (M+H⁺): 245,0743, rasta: 245,0744.

2-((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-benzo[d]imidazolas (4e)



c2) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,2 g (1 ekv., 0,8 mmol) 1-(3-bromprop-1-in-1-il)-3-metoksibenzeno (**3b**) ir supilama 10 ml EtOH. Suberiama 0,134 g (1 ekv., 0,8 mmol) 1,3-dihidro-2H-benzo[d]imidazol-2-tiono ir paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su DCM, organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojama ir filtratas sukcentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą (CHCl₃:CH₃CN; 4:1) junginys švarus. BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys.

Išeiša: 0,21 g (80%), balti kristalai, lyd.t. 142 °C.

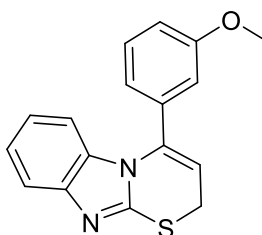
¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (dd, J = 6.0, 3.2 Hz, 2H), 7.28 – 7.12 (m, 3H), 6.95 (dt, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.88 – 6.83 (m, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.74 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.90, 151.36, 140.84, 138.25, 130.04, 124.75, 123.92, 122.45, 122.14, 118.97, 115.57, 114.49, 113.27, 86.61, 83.98, 55.26, 22.70.

IR spektras (ν, cm⁻¹): 2230 (C≡C).

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₇H₁₄N₂OS (M+H⁺): 295,0900, rasta: 295,0901.

4-(3-metoksifenil)-2H-benzo[4,5]imidazo[2,1-b][1,3]tiazinas (5e)



d2) Į reaktoriaus kolbą su 0,150 g (1 ekv., 0,6 mmol) 2-((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-benzo[d]imidazolu (**4e**) supilama 5 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 14 mg (0,1 ekv., 0,06 mmol) AuCl. Kolbą statome į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 50 °C temperatūroje 2 val. 40 min. Taikant TLC metodą (CHCl₃:CH₃CN; 4:1) matomos pradinio junginio taškas, statoma atgal į reaktorių 1 val. 50 °C temp. TLC pradinio matome mažai, yra priemaišų, gautas mišinys

gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant PE:EA santykiu 2:1. BMR spektre matoma galutinio tikslinio reakcijos junginio struktūra.

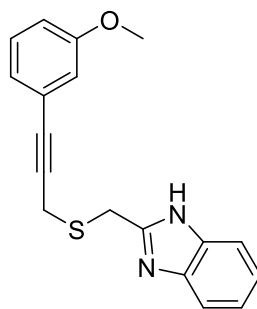
Išeiša: 0,13 g (88%).

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.67-6.65 (d, 1H), 7.33-7.29 (t, 1H), 7.18 – 7.15 (t, 1H), 7.02 – 6.99 (dd, 1H), 6.93 – 6.81 (m, 3H), 6.22 (d, 1H), 5.76 (t, 1H), 3.76 (s, 3H, CH_3), 3.63 (d, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.65, 142.74, 139.75, 135.47, 132.36, 129.72, 122.87, 122.20, 120.67, 118.90, 115.30, 113.61, 112.69, 108.33, 55.41, 24.70.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 295,0827, rasta: 295,0826.

2-(((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)metil)-1H-benzo[d]imidazolas (4f)



c3) Į kolbą ant magnetinės maišyklės su 0,2 g (1 ekv., 0,8 mmol) 1-(3-bromprop-1-in-1-il)-3-metoksibenzenu (**3b**) supilama 10 ml EtOH. Suberiama 0,14 g (1 ekv., 0,8 mmol) (1H-benzo[d]imidazol-2-il)metantiolio ir 42 mg (1,2 ekv., 1 mmol) NaOH. Paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su CHCl_3 , organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 , Na_2SO_4 nufiltruojamas ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą matomos priemaišos. Reakcijos mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ santykiu 4:1.

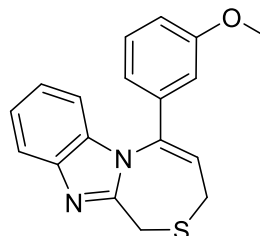
Išeiša: 0,23 g (83%). Geltona alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.30 (s, 1H, NH), 7.57 (dt, 2H, ArH), 7.33 – 7.21 (m, 2H, ArH), 7.14 (t, 1H, ArH), 6.88 – 6.77 (m, 3H, ArH), 4.26 (d, 2H, CH_2), 3.75 (s, 3H CH_3), 3.58 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.22, 154.51, 139.20, 136.56, 129.33, 124.24, 123.34, 123.01, 122.23, 118.97, 116.65, 115.57, 114.75, 84.40, 80.54, 55.27, 21.28, 15.09.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₈H₁₆N₂OS (M+H⁺): 309,1056, rasta: 309,1065.

5-(3-metoksifenil)-1*H*,3*H*-benzo[4,5]imidazo[2,1-*c*][1,4]tiazepinas (5f)



d3] reaktoriaus kolbą su 0,1 g (1 ekv., 0,3 mmol) 2-(((3-(3-metoksifenil)prop-2-in-1-il)tio)metil)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu (**4f**) supilama 5 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 8 mg (0,1 ekv., 0,03 mmol) AuCl. Kolbą statome į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 80 °C temperatūroje 2 val. 20 min. Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant CHCl₃:CH₃CN santykiu 4:1. BMR spektre matoma galutinio tikslinio reakcijos junginio struktūra.

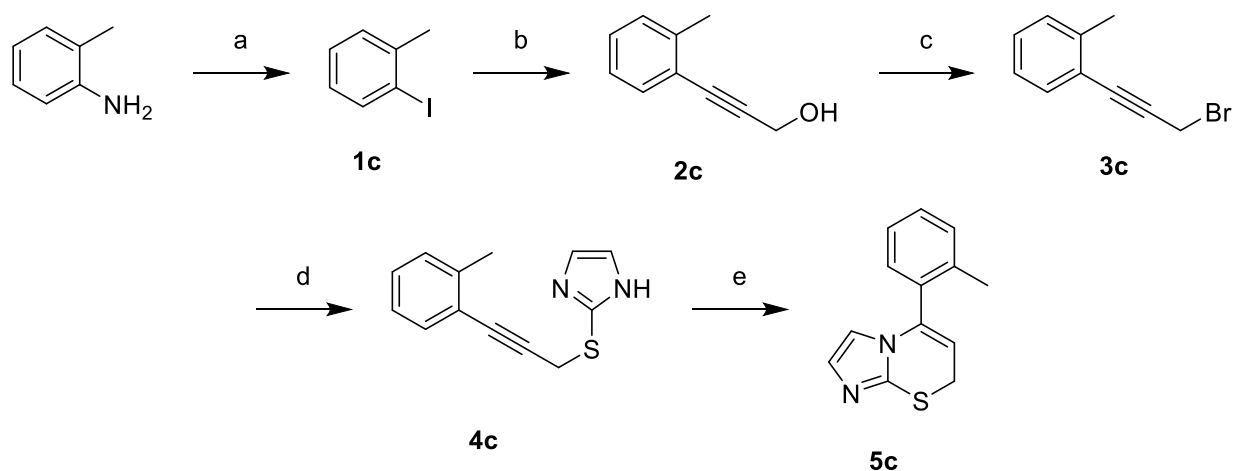
Išeiša: 54 mg (54%).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, 1H, ArH), 7.28 (m, 3H, ArH), 7.10 (t, 1H, ArH), 6.98 – 6.91 (m, 1H, ArH), 6.83 – 6.77 (m, 1H, ArH), 6.72 (d, 1H, ArH), 6.57 (t, 1H, CH), 4.08 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, CH₃), 3.16 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.03, 152.19, 138.83, 135.05, 133.81, 130.10, 123.41, 123.19, 120.15, 119.73, 118.89, 115.08, 112.10, 111.97, 55.39, 26.24, 25.24.

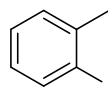
HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₈H₁₆N₂OS (M+H⁺): 309,1056, rasta: 309,1055.

3.5. 5-(o-tolil)-7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazino sintezė (5c)



10 schema.

1-jod-2-metilbenzenas (1c)

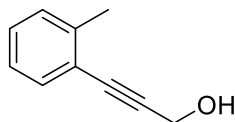


a) Į apvaliadugnę kolbą supilama 20 ml CH₃CN ir suberiama 5,37 g (3 ekv., 28 mmol) p-toluensulfono rūgšties monohidrato. Kolba pastatoma į ledo vonią ant magnetinės maišyklės, palaikoma 0-5 °C temperatūra. Į šaldomą mišinį sulašinama 1 ml (1 ekv., 9 mmol) o-toluidino (1). Mišinys susidrumstė rausvai baltomis nuosėdomis. Atskirai stiklinėje 10 ml H₂O ištirpinama 1,62 g (2,5 ekv., 23 mmol) NaNO₂ ir lėtai sulašinama į kolbą. Nuosėdos ištirpo, tirpalas tapo geltonos spalvos. Paliekama maišytis 30 min. Atskirai stiklinėje 10 ml H₂O ištirpinama 4,87 g (2,5 ekv., 23 mmol) KI ir lėtai sulašinama į kolbą. Tirpalas pasikeitė į tamsiai rudą spalvą. Mišinys išimamas iš ledo vonios ir paliekama maišytis k.t. 3 paras. Mišinys iš kolbos supilamas į stiklinę su 50 ml H₂O, pilama sotaus sodos tirpalo iki pH 9-10. Reakcijos mišinys ekstrahuojamas EA, plaunama natrio tiosulfato vandeniniu tirpalu, sočiu NaCl vandeniniu tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, Na₂SO₄ nufiltruojamas ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant PE, PE nugarintas rotaciniu garintuvu. Gauta skaidri gelsva alyva. Išeiga pirmuoju kartu siekė vos 14 %, reakcija kartojama, antruoju bandymu stipriai šaldoma, reakcijos mišinio temperatūra palaikoma kuo arčiau 0°C, gauta 1,48 g 72% išeiga.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.84-7.82 (d, 1H, ArH), 7.27-7.26 (d, 2H, ArH), 6.91-6.87 (dt, 1H, ArH), 2.46 (s, 3H, CH₃).

¹H BMR spektras atitinka literatūroje pateiktą informaciją [74].

3-(*o*-tolil)prop-2-in-1-olis (2c)



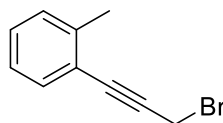
b) Į kolbą ant magnetinės maišyklės supilama 0,4 g (1 ekv., 1,8 mmol) 1-jodo-2-metilbenzeno (1c) ir 6 ml TEA. Tirpalas prapučiamas argono dujomis - reakcija vykdoma argono atmosferoje. Į kolbą, maišant magnetine maišykle, suberiama 39 mg (0,03 ekv., 0,05 mmol) Pd(PPh₂)₂Cl₂ katalizatoriaus ir sulašinama 126 μl (1,2 ekv., 2,2 mmol) propargilo alkoholio. Suberiama 5 mg (0,015 ekv., 0,025 mmol) CuI ir reakcijos mišinys paliekamas maišytis k.t. 24 val. Reakcijos mišinys nurotuojamas pašalinant TEA ir ekstrahuojamas su DCM. Organinė fazė plaunama sočiu NH₄Cl vandeniniu tirpalu, H₂O, sočiu NaCl vandeniniu tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, Na₂SO₄ nufiltruojamas ir DCM nugarinamas rotaciniu garintuvu. Gauti geltoni kristalai. Taikant TLC metodą (PE:EA; 4:1) matomos priemaišos, BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys ir minimalus priemaišų kiekis, tad nuspręsta junginio negryninti ir vykdyti sekančią reakciją.

Išeiga: 0,268 g (96%), geltona alyva.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45-7.42 (d, 1H, ArH), 7.25 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.15-7.11 (t, 1 H, ArH), 4.54 (s, 2H, CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹H BMR spektras atitinka literatūroje pateiktą informaciją [75].

1-(3-bromprop-1-in-1-il)-2-metilbenzenas (3c)



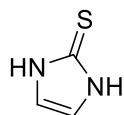
c) Į apvaliadugnę kolbą supilama 6 ml sauso DCM ir suberiama 0,25 g (1 ekv., 1,7 mmol) 3-(*o*-tolil)prop-2-in-1-olio (2c). Kolba pastatoma į ledo vonią ant magnetinės maišyklės. Suberiama 0,7 g (1,2 ekv., 2 mmol) CBr₄ ir maišoma 15 min. Dalimis suberiama 0,6 g (1,3 ekv., 2,2 mmol) PPh₃ ir maišoma apie 40 minučių. Reakcijos mišinys ištraukiamas iš ledo vonios ir maišoma k.t. 12 valandų. Taikant TLC metodą (PE:EA; 5:1) matomos priemaišos. Gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant PE:EA santykiu 5:1. Po gryninimo BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys ir trifenilfosfino priemaišos, jų kiekis apie 15 %, reali tikslinio junginio masė 0,26 g su 70% išeiga.

Išeiga: 0,26 g (70%), gelsva alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.41-7.39 (d, 1H, ArH), 7.24 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.15-7.11 (t, 1 H, ArH), 4.21 (s, 2H, CH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3).

Išvaizda ir spektras atitinka literatūroje pateiktą informaciją [76].

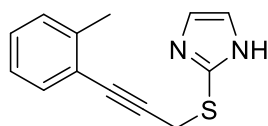
2-merkaptimidazolas



Kolboje maišant, šaldant 0°C temperatūroje, argono atmosferoje į 40 ml 2N HCl 30 minučių laikotarpyje sulašinama 10,37 ml (1 ekv., 71 mmol) 2,2-dietoksietan-1-amino. Po to suberiama 7 g (1,01 ekv., 72 mmol) kalio tiocianato ir maišoma šildant 96°C temperatūroje apie 6 val. Paliekama atvėsti. Kolboje matomi baltai gelsvi kristalai nufiltruoti, juos plaunant lediniu vandeniu siekiant nuplauti rūgštį, tikrinamas kristalų pH indikatoriniu popierėliu. Filtratas statomas į rotacinį garintuvą ir nugaruojant vandeniui matomi vėl besiformuojantys kristalai, kurie yra filtruojami, plaunami. Procesas kartojamas kol filtrate nebesusidaro kristalai. Kristalai džiovinami kambario temperatūroje. BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys.

Išeiga: 4,9 g (68%), balti kristalai, lyd. t. 230°C , pateikta žinyne – $228-231^\circ\text{C}$.

2-((3-(*o*-tolil)prop-2-in-1-il)tio)-1H-imidazolas (4c)



d) Į kolbą ant magnetinės maišyklės suberiama 0,25 g (1 ekv., 1,2 mmol) 1-(3-bromprop-1-in-1-il)-2-metilbenzeno (**3c**) ir supilama 10 ml EtOH. Suberiama 0,12 g (1 ekv., 1,2 mmol) 2-merkaptimidazolo ir paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su DCM, organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 , Na_2SO_4 nufiltruojamas ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$; 4:1) matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ santykiu 4:1. BMR spektre matomas tikslinis reakcijos junginys.

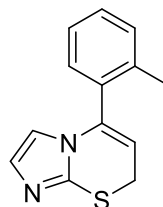
Išeiga: 0,158 g (55%), geltona alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.29-7.27 (d, 1H, ArH), 7.22 – 7.13 (m, 4H, ArH, CH), 7.10-7.06 (m, 1 H, ArH), 3,95 (s, 2H, CH_2), 2.29 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 140.41, 138.37, 132.02, 129.41, 128.41, 125.50, 124.51, 124.51, 122.40, 88.71, 83.23, 24.89, 20.60.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 229,0794, rasta: 229,0794.

5-(*o*-tolil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (5c)



e) Į reaktoriaus mėgintuvėlį suberiama 0,1 g (1 ekv., 0,43 mmol) 2-((3-(*o*-tolil)prop-2-in-1-il)tio)-1*H*-imidazolo (**4c**) ir įpilama 6 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 10 mg (0,1 ekv., 0,04 mmol) AuCl. Mėgintuvėlis užkemšamas specialiu dangeliu ir įstatomas į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 50 °C temperatūroje 2 val. 20 min. Taikant TLC metodą matome, jog liko pradinio junginio, todėl kolbą statome į mikrobangų reaktorių antrai rotacijai jau minėtomis sąlygomis. Gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$ santykiu 4:1. BMR spektre matomas galutinis tikslinis reakcijos junginys:

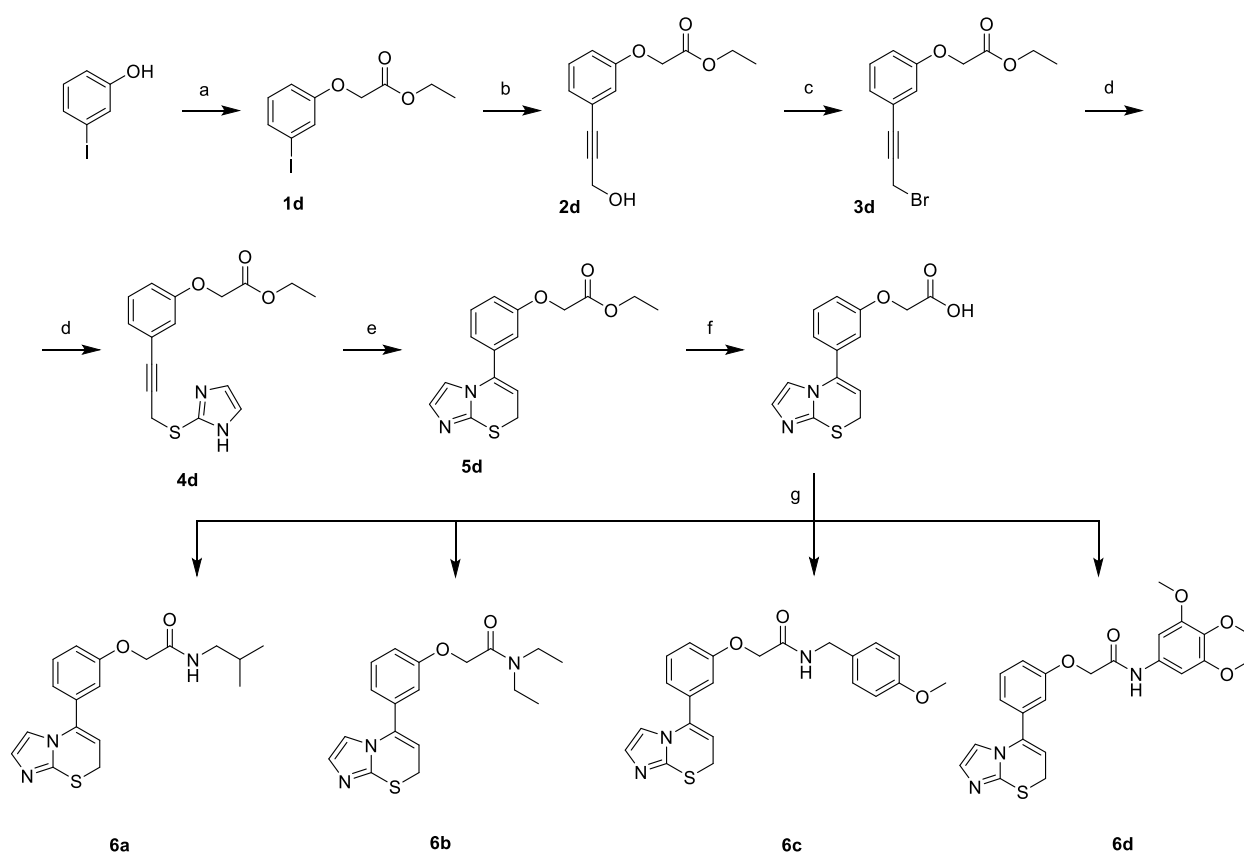
Išeiga: 0,158 g (56%), geltona alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (m, 1H, ArH), 7.33 – 7.25 (m, 3H, ArH), 6.95 (d, 1H), 6.55 (d, 1H) 5.49-5.47 (t, 1H, CH), 3.76-3.48 (d, 2H, CH_2), 2.05 (s, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 139.57, 138.59, 137.20, 134.09, 130.53, 130.05, 129.72, 128.25, 126.14, 117.60, 106.87, 24.59, 19.27.

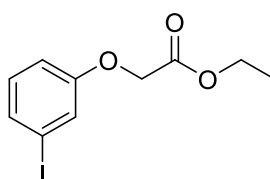
HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 229,0794, rasta: 229,0794.

3.6. Acetamidų (6a-d) sintezė.



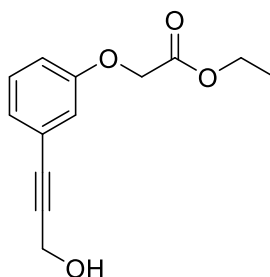
11 schema.

Etilo 2-(3-jodfenoksi)acetatas (1d)



a) Į kolbą su 4 g (1 ekv., 18 mmol) 3-jodfenolio supilama 10 ml DMF ir maišoma ant magnetinės maišyklės. Suberiama 3,76 g (1,5 ekv., 27 mmol) iškaitinto K_2CO_3 . Sulašinama 2,4 ml (1,2 ekv., 22 mmol) etil-2-bromacetatas. Reakcijos mišinys paliekamas maišytis k.t. 18 val. Kuo geriau rotaciniu garintuvu nugarinamas DMF. Ekstrahuojama su dideliu H_2O kiekiu (~200 ml) ir EA. Organinė fazė dar plaunama sočiu NaCl tirpalu, džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 , nufiltruojama ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Naudojantis TLC metodu (PE:EA; 15:1) priemaišų nematyti, spektrai nėra rašomi, vykdoma sekanti reakcija. Išėiga: 5,16 g (93%), ruda alyva.

Etilo 2-(3-(3-hidroksiprop-1-in-1-il)fenoksi)acetatas (2d)



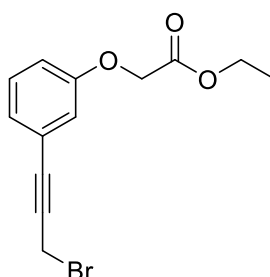
b) Į kolbą ant magnetinės maišyklės su 5,16 g (1 ekv., 17 mmol) etilo 2-(3-jodfenoksi)acetatu supilama 20 ml TEA. Tirpalas prapučiamas argono dujomis - reakcija vykdoma argono atmosferoje. Į kolbą, suberiama 0,35 g (0,03 ekv., 0,51 mmol) Pd(PPh₂)₂Cl₂ katalizatoriaus ir sulašinama 1,16 ml (1,2 ekv., 20,4 mmol) propargilo alkoholio. Suberiama 48 mg (0,015 ekv., 0,25 mmol) CuI ir reakcijos mišinys paliekamas maišytis k.t. 24 val. Reakcijos mišinys nurotuojamas pašalinant TEA ir ekstrahuojamas su DCM. Organinė fazė plaunama sočiu NH₄Cl tirpalu, H₂O, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, Na₂SO₄ nufiltruojamas ir DCM nugarinamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą (PE:EA; 1:1) matomos priemaišos, BMR spektre matomas norimas reakcijos junginys ir minimalus priemaišų kiekis, tad nuspręsta junginio negryninti ir vykdyti sekančią reakciją.

Išėiga: 3,9 g (98%), juoda alyva.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (t, 1H, ArH), 7.10 (d, 1H, ArH), 6.98 (t, 1H), 6.92 (dd, 1H, ArH), 4.63 (s, 2H, CH₂), 4.51 (s, 2H, CH₂), 4.34 – 4.20 (m, 2H, CH₂), 1.32 (t, 3H, CH₃).

IR spektras (ν, cm⁻¹): 1752 (C=O), 2930 (O-H).

Etilo 2-(3-(3-bromprop-1-in-1-il)fenoksi)acetatas (3d)



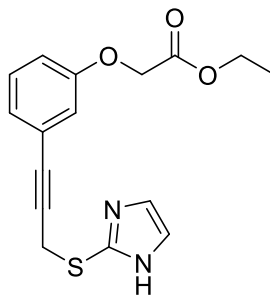
c) Į kolbą su 3,9 g (1 ekv., 17 mmol) etilo 2-(3-(3-hidroksiprop-1-in-1-il)fenoksi)acetato (**1d**) supilama 20 ml sauso DCM. Kolba pastatoma į ledo vonią ant magnetinės maišyklės. Suberiama 6,66 g (1,2 ekv., 20 mmol) CBr₄ ir maišoma 15 min. Dalimis suberiama 5,7 g (1,3 ekv., 22 mmol) PPh₃ ir maišoma apie 40 minučių. Reakcijos mišinys ištraukiamas iš ledo vonios ir

maišoma k.t. 12 valandų. Taikant TLC metodą matomos priemonės. Gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eluentu naudojant PE:EA santykiu 4:1.

Išga: 4 g (80%), gelsva skaidri alyva.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33 – 7.20 (m, 2H, ArH), 7.04 (t, 1H), 6.97 (ddd, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.26 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 1.28 (t, 3H).

Etilo 2-(3-(3-((1*H*-imidazol-2-il)tio)prop-1-in-1-il)fenoksi)acetatas (4d)



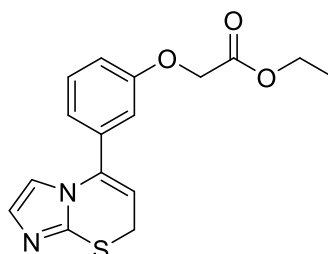
d) Į kolbą su 1 g (1 ekv., 3,4 mmol) etilo 2-(3-(3-bromprop-1-in-1-il)fenoksi)acetato (**2d**) įpilama 20 ml EtOH. Suberiama 0,33 g (1 ekv., 3,4 mmol) 2-merkaptimidazolo ir paliekama maišytis k.t. 18 valandų. EtOH nugarinamas rotaciniu garintuvu, reakcijos mišinys ekstrahuojamas su DCM, organinė fazė plaunama sočiu sodos tirpalu, sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na_2SO_4 , nufiltruojama ir filtratas sukcentruojamas rotaciniu garintuvu. Taikant TLC metodą ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}$; 4:1) matoma, jog junginys švarus.

Išga: 0,9 g (90%), ruda alyva.

IR spektras (ν , cm^{-1}): 1752 (C=O).

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 317,0954, rasta: 317,0955.

etilo 2-(3-(7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)acetatas (5d)



e) Į reaktoriaus kolbą su 1 g (1 ekv., 3 mmol) etilo 2-(3-(3-((1*H*-imidazol-2-il)tio)prop-1-in-1-il)fenoksi)acetatu (**3d**) supilama 25 ml sauso DCE, mišinys maišomas, prapučiamas argono dujomis, reakcija vykdoma argono atmosferoje. Suberiama 73 mg (0,1 ekv., 0,3 mmol) AuCl. Kolbą statome į mikrobangų reaktorių ir pasirenkamos sąlygos: 50 °C temperatūroje 2 val. 20 min.

Taikant TLC metodą matomos priemaišos, gautas mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant CHCl₃:CH₃CN santykiu 4:1.

Išeiga: 0,77 g (77%), ruda alyva.

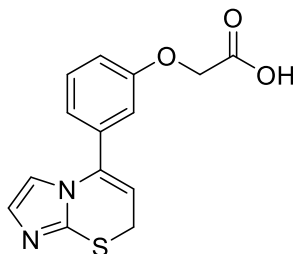
¹H BMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.33 (t, 1H, ArH), 7.03 – 6.94 (m, 3H, ArH, N-CH-CH-N), 6.91 – 6.82 (m, 2H, ArH), 5.65 (t, 1H, CH), 4.62 (s, 2H, CH₂), 4.26 (m, 2H, CH₂), 3.56 (d, 2H, CH₂), 1.29 (t, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.55, 157.95, 140.30, 138.92, 136.00, 129.94, 127.82, 121.64, 118.29, 115.81, 114.56, 107.29, 65.35, 61.52, 24.36, 14.17.

IR spektras (ν, cm⁻¹): 1752 (C=O).

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₆H₁₆N₂O₃S (M+H⁺): 317,0954, rasta: 317,0955.

2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)acto rūgštis (5d2)



f) Į kolbą su 0,77 g (1 ekv., 2,4 mmol) etilo 2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)acetatu (**4d**) supilama 10 ml EtOH. Atskirai stiklinėje mažame kiekyje vandens ištirpinama 0,1 g (1 ekv., 2,4 mmol) NaOH ir supilamam į reakcijos kolbą. Paliekama maišytis k.t. 18 valandų. Vykdoma ekstrakcija su CHCl₃ ir vandeniu, vandeninė fazė parūgštinta HCl (10%) iki 2 pH – tirpalas susidrumstė labai smulkiomis nuosėdomis, todėl nefiltruojama. Bandoma rūgštį perkelti į DCM – netirpsta, į EA – taip pat nepavyko, todėl nurotuojama vandeninė fazė.

Išeiga 0,61 g (87%), geltoni kristalai, lyd. t. – 190 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.49 (d, 1H, ArH), 7.43 (t, 1H, ArH), 7.32 (d, 1H, ArH), 7.07 (ddd, 1H, ArH), 7.07 – 6.98 (m, 2H), 6.11 (t, 1H, CH), 4.74 (s, 2H, CH₂), 3.89 (d, 2H, CH₂).

g) (*bendra metodika*) Į kolbą suberiama 50 mg (1 ekv. 0,17 mmol) 2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)acto rūgšties (**5d2**) ir supilama 7 ml DCM. Suberiama 66 mg (2 ekv., 0,34 mmol) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidroklorido, toliau suberiama 47 mg (2 ekv., 0,34 mmol) hidroksibenzotriazolo. Sudedama (2 ekv., 0,34 mmol) atitinkamo amino:

6a: 15 mg 2-metilpropan-1-amino;

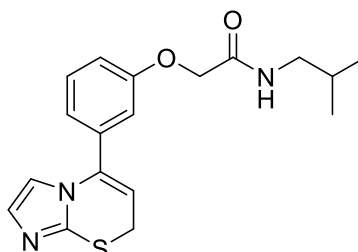
6b: 25 mg dietilamino;

6c: 48 mg (4-metoksifenil)metanamino;

6d: 63 mg 3,4,5-trimetoksianilino.

Paliekama maišytis 24 val. k.t. Reakcijos mišinys ekstrahuojamas vandeniu, DCM, plaunama sočiu NaCl tirpalu. Organinė fazė surenkama, džiovinama bevandeniu Na₂SO₄, nufiltruojama ir filtratas sukonzentruojamas rotaciniu garintuvu. Naudojantis TLC matomos priemaišos, mišinys gryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu eliuentu naudojant CHCl₃:CH₃CN santykiu 4:1.

2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)-N-izobutilacetamidas (6a)



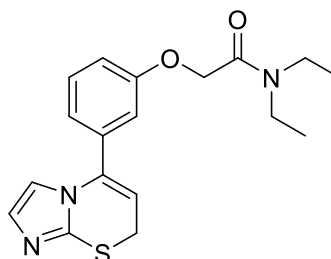
Išėiga: 17 mg (36%), geltona alyva.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.12 (t, 1H), 9.83 – 9.55 (m, 3H), 9.35 (s, 1H), 8.43 (t, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 6.33 (d, 1H), 5.98 – 5.72 (m, 2H), 4.53 (dd, 1H), 3.66 (t, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 167.58, 161.26, 157.40, 138.66, 136.14, 130.24, 127.42, 122.00, 118.24, 115.54, 115.00, 107.73, 67.50, 46.33, 28.52, 24.32, 20.03.

HRMS (ESI-MS): m/z apskaičiuota C₁₈H₂₁N₃O₂S (M+H⁺): 344,1427, rasta: 344,1432.

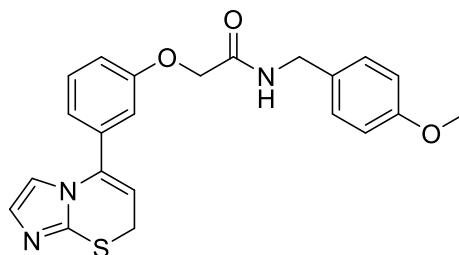
2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)-N,N-dietilacetamidas (6b)



Išėiga: 28 mg (47%). Geltona alyva.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.51, 157.28, 137.97, 134.87, 128.88, 126.75, 120.31, 117.34, 114.88, 113.51, 106.23, 66.11, 40.49, 39.40, 29.92, 23.34, 13.33, 11.82.

2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)-N-(4-metoksibenzil)acetamidas (6c)

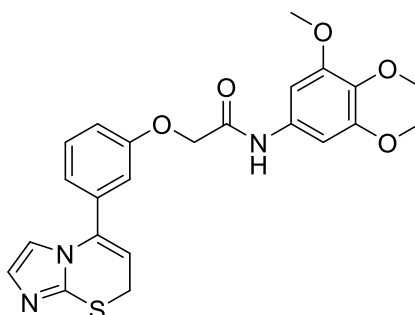


Išeiga: 38 mg (54%). Ruda alyva.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (t, 1H), 7.18 – 7.10 (m, 3H), 6.99 – 6.72 (m, 7H), 6.76 (s, 2H), 5.56 (t, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.40 (d, 2H), 3.72 (s, 4H), 3.70 (s, 1H), 3.49 (d, 2H), 2.10 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.48, 159.19, 157.31, 140.42, 138.66, 136.21, 130.19, 129.72, 129.22, 127.69, 122.00, 118.18, 115.50, 114.99, 114.17, 107.66, 67.46, 55.33, 42.57, 30.94, 24.31.

2-(3-(7H-imidazo[2,1-b][1,3]tiazin-5-il)fenoksi)-N-(3,4,5-trimetoksifenil)acetamidas (6d)



Išeiga: 48 mg (51%), skaidri alyva.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.47, 158.82, 154.54, 151.72, 137.95, 136.19, 135.41, 133.64, 133.34, 127.17, 122.56, 119.50, 116.66, 115.69, 112.34, 100.39, 67.59, 60.81, 56.26, 28.74.

IŠVADOS

1. Remiantis laboratorijoje jau ištirtų įvairių struktūrų junginiais, kurie pasižymėjo geru alfa-sinukleino ir insulino baltymų agregacijos slopinimu, pagal palankiausias duomenis buvo parinkti septyni pakaitai: 2-metilfenilo, 4-metoksifenilo, 3-metoksifenilo ir 4 skirtingi 3-fenoksiacetamidai. Atlikta 5-pakeistų-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinų retrosintetinė analizė, pritaikytos sintezės metodikos, kurių pagalba tiksliniai junginiai susintetinti per 4 pagrindinius etapus.

2. Susintetinti iki šiol literatūroje neaprašyti 9 tiksliniai junginiai: 5-(4-metoksifenil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5a**), 5-(4-metoksifenil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5b**), 5-(o-tolil)-7*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5c**), 4-(3-metoksifenil)-2*H*-benzo[4,5]imidazo[2,1-*b*][1,3]tiazinas (**5e**), 5-(3-metoksifenil)-1*H*,3*H*-benzo[4,5]imidazo[2,1-*c*][1,4]tiazepinas (**5f**), ir 4 skirtingi acetamidai (**6a-d**).

3. Patvirtinta jau literatūroje aprašytų junginių struktūra naudojantis lyd. t. ir ¹H BMR spektrais. Naujų, dar neaprašytų junginių struktūra pilnai ar dalinai identifikuota, įrodyta naudojantis lydymosi temperatūra, ¹H ir ¹³C BMR spektrais, IR spektrais bei atlikus HRMS analizę.

ŠALTINIAI

1. Buxbaum JN, Dispenzieri A, Eisenberg DS, Fändrich M, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Westermark P (2022) Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid* 29:213–219
2. Parkinson disease: a public health approach: technical brief. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240050983>. Accessed 14 May 2024
3. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermark P (2020) Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 27:217–222
4. Cohen AS, Calkins E (1959) Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* 183:1202–1203
5. Fändrich M, Meinhardt J, Grigorieff N (2009) Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils. *Prion* 3:89–93
6. Mokslas. Amiloidų tyrimo sektorius, <http://www.amyloid.bti.vu.lt/>. Accessed 9 April 2024.
7. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW (2007) Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences* 32:217–224
8. Otzen D, Riek R (2019) Functional Amyloids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a033860
9. Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW (2005) Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLOS Biology* 4:e6
10. Chiti F, Dobson CM (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry* 86:27–68
11. Reimann HA, Koucky RF, Eklund CM (1935) Primary Amyloidosis Limited to Tissue of Mesodermal Origin. *Am J Pathol* 11:977-988.3
12. Almeida ZL, Brito RMM (2020) Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules* 25:1195
13. Kim WS, Kågedal K, Halliday GM (2014) Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's Research & Therapy* 6:73
14. Outeiro TF (2017) Alpha-Synuclein. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.00471-5>
15. Souza JM, Giasson BI, Lee VM-Y, Ischiropoulos H (2000) Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Letters* 474:116–119
16. Sorrentino ZA, Giasson BI (2020) The emerging role of α -synuclein truncation in aggregation and disease. *Journal of Biological Chemistry* 295:10224–10244
17. Fan T-S, Liu SC-H, Wu R-M (2021) Alpha-Synuclein and Cognitive Decline in Parkinson Disease. *Life* 11:1239

18. Sharma M, Burré J (2023) α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. *Trends in Neurosciences* 46:153–166
19. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5122110/>. Accessed 9 Apr 2024
20. Hallaçli E, Kayatekin C, Nazeen S, et al (2022) The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability. *Cell* 185:2035-2056.e33
21. Schaser AJ, Osterberg VR, Dent SE, et al (2019) Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Sci Rep* 9:10919
22. Malfertheiner K, Stefanova N, Heras-Garvin A (2021) The Concept of α -Synuclein Strains and How Different Conformations May Explain Distinct Neurodegenerative Disorders. *Front Neurol*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.737195>
23. Manzanza N de O, Sedlackova L, Kalaria RN (2021) Alpha-Synuclein Post-translational Modifications: Implications for Pathogenesis of Lewy Body Disorders. *Front Aging Neurosci* 13:690293
24. Conway KA, Rochet J-C, Bieganski RM, Lansbury PT (2001) Kinetic Stabilization of the α -Synuclein Protofibril by a Dopamine- α -Synuclein Adduct. *Science* 294:1346–1349
25. Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease - Li - 2004 - The FASEB Journal - Wiley Online Library. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.03-0770fje>. Accessed 21 Apr 2024
26. Mor DE, Tsika E, Mazzulli JR, et al (2017) Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat Neurosci* 20:1560–1568
27. Mor DE, Daniels MJ, Ischiropoulos H (2019) The usual suspects, dopamine and alpha-synuclein, conspire to cause neurodegeneration. *Movement Disorders* 34:167–179
28. Caruana M, Högen T, Levin J, Hillmer A, Giese A, Vassallo N (2011) Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Letters* 585:1113–1120
29. Hornedo-Ortega R, Álvarez-Fernández MA, Cerezo AB, Richard T, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC (2016) Protocatechuic Acid: Inhibition of Fibril Formation, Destabilization of Preformed Fibrils of Amyloid- β and α -Synuclein, and Neuroprotection. *J Agric Food Chem* 64:7722–7732
30. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for α -synuclein fibrils in vitro - Ono - 2006 - Journal of Neurochemistry - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2006.03707.x>. Accessed 21 Apr 2024
31. Liu Y, Carver JA, Calabrese AN, Pukala TL (2014) Gallic acid interacts with α -synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844:1481–1485
32. Fazili NA, Naeem A (2015) Anti-fibrillation potency of caffeic acid against an antidepressant induced fibrillogenesis of human α -synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Biochimie* 108:178–185

33. Spinelli KJ, Osterberg VR, Meshul CK, Soumyanath A, Unni VK (2015) Curcumin Treatment Improves Motor Behavior in α -Synuclein Transgenic Mice. *PLoS One* 10:e0128510
34. Xu B, Mo X, Chen J, Yu H, Liu Y (2022) Myricetin Inhibits α -Synuclein Amyloid Aggregation by Delaying the Liquid-to-Solid Phase Transition. *ChemBioChem* 23:e202200216
35. Zhu M, Rajamani S, Kaylor J, Han S, Zhou F, Fink AL (2004) The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *J Biol Chem* 279:26846–26857
36. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A, Wanker EE (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15:558–566
37. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, Wanker EE (2010) EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:7710–7715
38. Li J, Zhu M, Rajamani S, Uversky VN, Fink AL (2004) Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol* 11:1513–1521
39. Xu J, Wei C, Xu C, Bennett MC, Zhang G, Li F, Tao E (2007) Rifampicin protects PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis and inhibits the expression of an alpha-Synuclein multimer. *Brain Res* 1139:220–225
40. Singh PK, Kotia V, Ghosh D, Mohite GM, Kumar A, Maji SK (2013) Curcumin Modulates α -Synuclein Aggregation and Toxicity. *ACS Chem Neurosci* 4:393–407
41. Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, et al (2014) Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of α -synuclein fibril formation and toxicity. *Front Aging Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00197>
42. Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, et al (2013) Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 125:795–813
43. Levin J, Schmidt F, Boehm C, Prix C, Bötzel K, Ryazanov S, Leonov A, Griesinger C, Giese A (2014) The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset. *Acta Neuropathol* 127:779–780
44. Levin J, Sing N, Melbourne S, et al (2022) Safety, tolerability and pharmacokinetics of the oligomer modulator anle138b with exposure levels sufficient for therapeutic efficacy in a murine Parkinson model: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1a trial. *eBioMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104021>
45. Pujols J, Peña-Díaz S, Conde-Giménez M, Pinheiro F, Navarro S, Sancho J, Ventura S (2017) High-Throughput Screening Methodology to Identify Alpha-Synuclein Aggregation Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 18:478
46. Pujols J, Peña-Díaz S, Lázaro DF, et al (2018) Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115:10481–10486
47. Mahía A, Peña Díaz S, Navarro S, Galano Frutos J, Pallarès I, Pujols Pujol J, Diaz de Villegas MD, Gálvez J, Ventura S, Sancho J (2021) Design, synthesis and structure-activity

- evaluation of novel 2-pyridone-based inhibitors of α -synuclein aggregation with potentially improved BBB permeability. *Bioorganic Chemistry* 117:105472
48. Peña-Díaz S, Ventura S (2022) One ring is sufficient to inhibit α -synuclein aggregation. *Neural Regeneration Research* 17:508
49. Peña-Díaz S, Pujols J, Pinheiro F, et al (2020) Inhibition of α -Synuclein Aggregation and Mature Fibril Disassembling With a Minimalistic Compound, ZPDm. *Front Bioeng Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.588947>
50. Peña-Díaz S, Pujols J, Conde-Giménez M, et al (2019) ZPD-2, a Small Compound That Inhibits α -Synuclein Amyloid Aggregation and Its Seeded Polymerization. *Front Mol Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00306>
51. Wrasidlo W, Tsigelny IF, Price DL, et al (2016) A de novo compound targeting α -synuclein improves deficits in models of Parkinson's disease. *Brain* 139:3217–3236
52. Price DL, Koike MA, Khan A, Wrasidlo W, Rockenstein E, Masliah E, Bonhaus D (2018) The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep* 8:16165
53. Price DL, Khan A, Angers R, Cardenas A, Prato MK, Bani M, Bonhaus DW, Citron M, Biere A-L (2023) In vivo effects of the alpha-synuclein misfolding inhibitor minzasolmin supports clinical development in Parkinson's disease. *npj Parkinsons Dis* 9:1–12
54. Prabhudesai S, Sinha S, Attar A, et al (2012) A Novel “Molecular Tweezer” Inhibitor of α -Synuclein Neurotoxicity in Vitro and in Vivo. *Neurotherapeutics* 9:464–476
55. Richter F, Subramaniam SR, Magen I, et al (2017) A Molecular Tweezer Ameliorates Motor Deficits in Mice Overexpressing α -Synuclein. *Neurotherapeutics* 14:1107–1119
56. Di J, Siddique I, Li Z, et al (2021) The molecular tweezer CLR01 improves behavioral deficits and reduces tau pathology in P301S-tau transgenic mice. *Alzheimer's Research & Therapy* 13:6
57. Tatenhorst L, Eckermann K, Dambeck V, et al (2016) Fasudil attenuates aggregation of α -synuclein in models of Parkinson's disease. *acta neuropathol commun* 4:39
58. Yang Y-J, Bu L-L, Shen C, et al (2020) Fasudil Promotes α -Synuclein Clearance in an AAV-Mediated α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease by Autophagy Activation. *Journal of Parkinson's Disease* 10:969–979
59. Wang SS-S, Liu K-N, Han T-C (2010) Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802:519–530
60. Hua Q, Weiss MA (2004) Mechanism of Insulin Fibrillation: THE STRUCTURE OF INSULIN UNDER AMYLOIDOGENIC CONDITIONS RESEMBLES A PROTEIN-FOLDING INTERMEDIATE*. *Journal of Biological Chemistry* 279:21449–21460
61. Lonsdale-Eccles AA, Gonda P, Gilbertson JA, Haworth AE (2009) Localized cutaneous amyloid at an insulin injection site. *Clin Exp Dermatol* 34:e1027-1028
62. Nagase T, Iwaya K, Iwaki Y, et al (2014) Insulin-derived amyloidosis and poor glycemic control: a case series. *Am J Med* 127:450–454

63. Hrudka J, Sticová E, Krbcová M, Schwarzmánová K (2023) Localized Insulin-Derived Amyloidosis in Diabetes Mellitus Type 1 Patient: A Case Report. *Diagnostics* 13:2415
64. Das A, Gangarde YM, Pariary R, Bhunia A, Saraogi I (2022) An amphiphilic small molecule drives insulin aggregation inhibition and amyloid disintegration. *International Journal of Biological Macromolecules* 218:981–991
65. Sonogashira K (2002) Development of Pd–Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *Journal of Organometallic Chemistry* 653:46–49
66. Baughman TW, Sworen JC, Wagener KB (2004) The facile preparation of alkenyl metathesis synthons. *Tetrahedron* 60:10943–10948
67. Faraji L, Shahkarami S, Nadri H, et al (2017) Synthesis of Novel Benzimidazole and Benzothiazole Derivatives Bearing a 1,2,3-triazole Ring System and their Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Journal of Chemical Research* 41:30–35
68. Misiūnaitė I, Bajarūnaitė R, Bukšnaitienė R, Brukštus A, Žutautė I (2023) Straightforward Approach to 5-Substituted 7H-Imidazo[2,1-b] [1,3]thiazines via Cyclization of 2-Alkynylthioimidazoles. *Synthesis*. <https://doi.org/10.1055/a-2179-1250>
69. Chan LC, Cox BG (2007) Kinetics of Amide Formation through Carbodiimide/N-Hydroxybenzotriazole (HOBt) Couplings. *J Org Chem* 72:8863–8869
70. Lin D, Sullivan A, Cîrceie M, Chiericoni V, Karpov J, Kluza K, O’Neill N, Risse W, Evans P (2023) An Intramolecular Enyne Metathesis Approach for the Synthesis of Cyclic 3-Substituted Unsaturated Sulfones. *European Journal of Organic Chemistry* 26:e202300840
71. Yang C-H, Fan H, Li H, Hou S, Sun X, Luo D, Zhang Y, Yang Z, Chang J (2019) Direct Access to Allenylphosphine Oxides via a Metal Free Coupling of Propargylic Substrates with P(O)H Compounds. *Org Lett* 21:9438–9441
72. Chen C, Huang Y, Zhang Z, Dong X-Q, Zhang X (2017) Cobalt-catalyzed (Z)-selective semihydrogenation of alkynes with molecular hydrogen. *Chem Commun* 53:4612–4615
73. Iron-Catalyzed Coupling of Propargyl Bromides and Alkyl Grignard Reagents - Domingo-Legarda - 2018 - *European Journal of Organic Chemistry* - Wiley Online Library. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.201800849>. Accessed 9 May 2024
74. Webster S, O’Rourke KM, Fletcher C, Pimlott SL, Sutherland A, Lee A-L (2018) Rapid Iodoboronation with and without Gold Catalysis: Application to Radiolabelling of Arenes. *Chemistry – A European Journal* 24:937–943
75. Gholinejad M, Dasvarz N, Nájera C (2018) Novel oxime-palladacycle supported on clay composite as an efficient heterogeneous catalyst for Sonogashira reaction. *Inorganica Chimica Acta* 483:262–270
76. Iodocyclization of Hydroxylamine Derivatives Based on the Control of Oxidative Aromatization Leading to 2,5-Dihydroisoxazoles and Isoxazoles | *The Journal of Organic Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo200407b>. Accessed 10 May 2024