

Sinteza derivata 4H-tieno[3,2-c]kromen-4-ona i ispitivanje inhibitornih učinaka na pSTAT1 i pSTAT5 izoliranih iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Bracanović, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:980378>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Sara Bracanović

Sinteza derivata 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona i ispitivanje inhibitornih
učinaka na pSTAT1 i pSTAT5 izoliranih iz mononuklearnih stanica periferne
krvi

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Sara Bracanović

Sinteza derivata 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona i ispitivanje inhibitornih
učinaka na pSTAT1 i pSTAT5 izoliranih iz mononuklearnih stanica periferne
krvi

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Karlo Wittine

Diplomski rad obranjen je dana 10.12.2018.

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Dean Marković
2. Izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić
3. Doc. dr. sc. Karlo Wittine

Rad ima 62 stranice, 38 slika, 10 shema, 1 tablicu i 38 literaturnih navoda

Skraćenice

COX - ciklooksigenaza

DCM - diklormetan

DMF - dimetilformamid

Et₂CO₃ – dietilkarbonat

Et₃N - trietilamin

FDA - američka Agencija za hranu i lijekove

GM-CSF - čimbenik stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IC₅₀ – 50% inhibitorna koncentracije

IFN- α – interferon- α

IL – interleukin

JAK – Janus *kinaza*

MeOH - metanol

NaOAc – natrijev acetat

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

NSAIDs – nesteroidni protuupalni lijekovi

p.a. – *per analysis*

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi

PIAS - proteinski inhibitor aktiviranih STAT

PPA – polifosforna kiselina

pSTAT – fosforilirani STAT

SOCS - supresor citokinskog signaliziranja

STAT - prijenosnik signala i aktivator transkripcije

THF - tetrahidrofuran

TNF- α – faktor nekroze tumora- α

Sažetak

U ovom radu opisana je sinteza tricikličkih angularnih spojeva, 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona (**7-8**, **9a-e**) i derivata (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil) tiofen-2,4-di-il)dimetanola (**5**, **6a-d**).

Ispitana je protuupalna učinkovitost spojeva **4**, **7**, **8** i **9a-e** *in vitro*, mjerenjem učinkovitosti inhibicije različitih fosfo-STAT proteina (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) koji su dio JAK (engl. *Janus kinase*)/STAT signalnog puta. Spoj **7** (etil 7-hidroksi-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksilat) pokazao je najbolja inhibicijska svojstva sa vrijednostima IC₅₀ 5,0 μM (pSTAT5/GM-CSF/PBMC); IC₅₀ 49,5 μM (pSTAT5/IL-2/PBMC) i IC₅₀ 10,50 μM (pSTAT1/IFN-α/PBMC).

Ključne riječi: tieno[3,2-*c*]kromen, metoksifenil-tiofen, protuupalno, interleukin, citokin, pSTAT1, pSTAT4, pSTAT5, PBMC, JAK

Abstract/Summary

Synthesis of tricyclic angular compounds, namely 4*H*-thieno[3,2-*c*]chromen-4-one (**7-8**, **9a-e**) and (5-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)thiophene-2,4-diyl)dimethanol (**5**, **6a-d**) derivatives, is described.

Compounds **4**, **7**, **8** and **9a-e** were tested *in vitro* for their anti-inflammatory activity, by measuring various pSTAT (signal transducer and activator of transcription) inhibition within the JAK (Janus-activated family kinase)/STAT signaling pathway. Compound **7** (ethyl 7-hydroxy-4-oxo-4*H*-thieno[3,2-*c*]chromene-2-carboxylate) showed best inhibition properties on inhibition of pSTAT5 in GM-CSF-triggered assay, with IC₅₀ value of 5.0 μM. Inhibition of pSTAT5 in IL-2-triggered assay showed IC₅₀ value of 49.5 μM, while inhibition of pSTAT1 in IFN-α-triggered assay showed IC₅₀ value of 10.5 μM.

Key words: thieno[3,2-*c*]chromene, methoxyphenyl-thiophene, anti-inflammatory, interleukine, cytokine, pSTAT1, pSTAT4, pSTAT5, PBMC, JAK

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	JAK/STAT signalni put.....	1
1.2.	Kumarini	6
1.2.1.	Sinteza kumarina.....	9
1.3.	Tiofeni	12
1.3.1.	Sinteza tiofena	13
2.	Cilj rada	17
3.	Materijali i metode.....	18
3.1.	Opće napomene	18
3.2.	Sinteze spojeva.....	19
3.2.1.	4-hidroksi-7-metoksi-2 <i>H</i> -kromen-2-on (2).....	19
3.2.2.	4-kloro-7-metoksi-2-okso-2 <i>H</i> -kromen-3-karbaldehid (3)	20
3.2.3.	Etil 7-metoksi-4-okso-4 <i>H</i> -tieno[3,2- <i>c</i>]kromen-2-karboksilat (4).....	21
3.2.4.	(5-(2-hidroksi-4-metoksifenil)tiofen-2,4-di-il) dimetanol (5)	22
3.2.5.	Općenita procedura za sintezu alkilnih derivata 6a-d	23
3.2.6.	Etil 7-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -tieno[3,2- <i>c</i>]kromen-2- karboksilat (7).....	27
3.2.7.	7-hidroksi-4-okso-4 <i>H</i> -tieno[3,2- <i>c</i>]kromen-2-karboksamid (8)	28
3.2.8.	Općenita procedura za sintezu <i>O</i> -7 alkilnih derivata 4 <i>H</i> -tieno[3,2- <i>c</i>]kromen-4-ona (9a-e).....	29
4.	Rezultati i rasprava	34
4.1.	Sinteze spojeva.....	34
4.1.1.	Sinteza esterskog derivata (4).....	35
4.1.2.	Redukcija estera i vezanje alkilnih lanaca.....	35
4.1.3.	Demetilacija i amonoliza	36
4.1.4.	Vezanje alkilnih lanaca	37
4.2.	Karakterizacija pripremljenih spojeva.....	37
4.2.1.	Analiza ¹ H NMR spektara.....	37

4.2.2.	Molekulska i kristalna struktura tieno[3,2-c]kromenskog derivata (4).....	41
4.3.	Ispitivanje protuupalne učinkovitosti in vitro	43
5.	Zaključak	47
6.	Literatura	48
7.	Prilozi	52
8.	Životopis	61

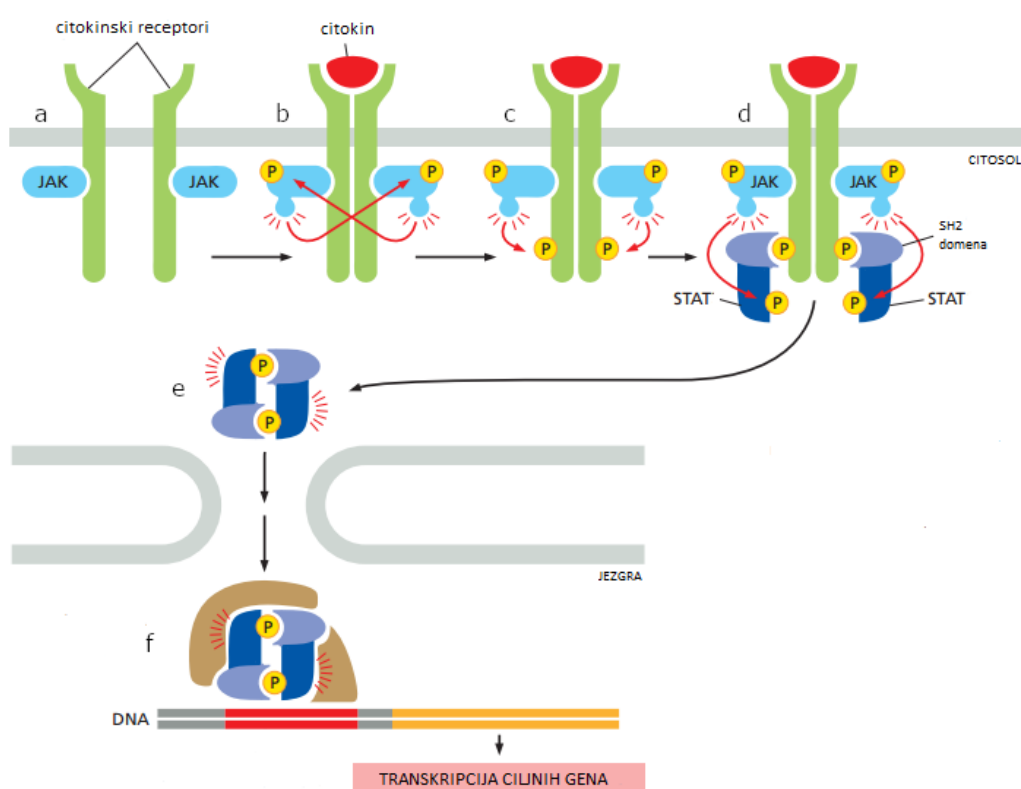
1. Uvod

1.1. JAK/STAT signalni put

Upala je biološki proces koji nastaje kao odgovor imunološkog sustava na kemijske, fizičke, imunološke i/ili biološke stimulanse ¹. Prilikom akutne upale leukociti migriraju iz krvnih žila u upaljeno tkivo. Kada leukociti stignu u upaljeno tkivo, otpuštaju inflamatorne medijatore (bioaktivne amine, citokine, kemokine i lipidne medijatore) koji kontroliraju akumulaciju i aktivaciju drugih stanica ². Taj proces dovodi do nastanka signala upale: crvenila, topline, oticanja, boli i gubitka funkcije ¹.

Regulacija ekspresije proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora ostvaruje se signalnim putevima ². Jedan od ključnih signalnih puteva za razvoj i funkcioniranje imunološkog sustava je JAK/STAT signalni put. Prvi put je opisan 1980-ih godina kao put koji regulira signalizaciju uzrokovanu interferonom. Poznato je da u navedenom signalnom putu sudjeluje preko 70 citokina i interferona ³. Uključen je u procese kao što su stanična proliferacija, diferencijacija, migracija i apoptoza ⁴. Do danas su identificirane 4 Janus kinaze (JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2) te 7 STAT proteina (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B i STAT6). Janus kinaze čine skupinu unutarstaničnih tirozin *kinaza*. Dobile su ime po rimskom bogu s dva lica, Janusu, jer sadrže 2 domene, katalitičku i kinaznu ⁵. Vezane su za citoplazmatska područja citokinskih receptora tipa I i tipa II. Ti receptori vežu interferone, interleukine (osim IL-1 i IL-8), čimbenike rasta, eritropoetin, trombopoetin, prolaktin i leptin ⁶. JAK3 se uvijek veže za istu podjedinicu receptora, γ -lanac, dok su ostale Janus kinaze manje selektivne i mogu se vezati za različite podjedinice receptora. STAT proteini pak nisu vezani za specifični citokinski receptor, stoga različiti ligandi mogu aktivirati isti STAT, što dovodi do funkcionalnog preklapanja među STAT proteinima ⁷.

Vezanje liganda za receptor uzrokuje dimerizaciju receptora, što dovodi do međusobnog približavanja Janus *kinaza* vezanih za receptor i njihove transfosforilacije (Slika 1, b) ⁵. Tako aktivirane kinaze zatim fosforiliraju receptor (Slika 1, c), čime se stvara vezno mjesto za STAT proteine (Slika 1, d). STAT proteini se vežu za receptor preko SH2 domene. JAK fosforilira tirozinske ostatke na STAT proteinu te nastaje dimer koji se otpusti sa receptora (Slika 1, e). Dimer odlazi u jezgru, gdje se veže za DNA, što uzrokuje transkripciju ciljnih gena (Slika 1, f) ³.



Slika 1. Vezanje liganda za citokinski receptor – JAK/STAT signalni put. Slika, uz modifikacije, preuzeta sa <http://www.biochempages.com/2015/08/arsenic-inhibits-the-jak-stat-signaling-pathway.html>

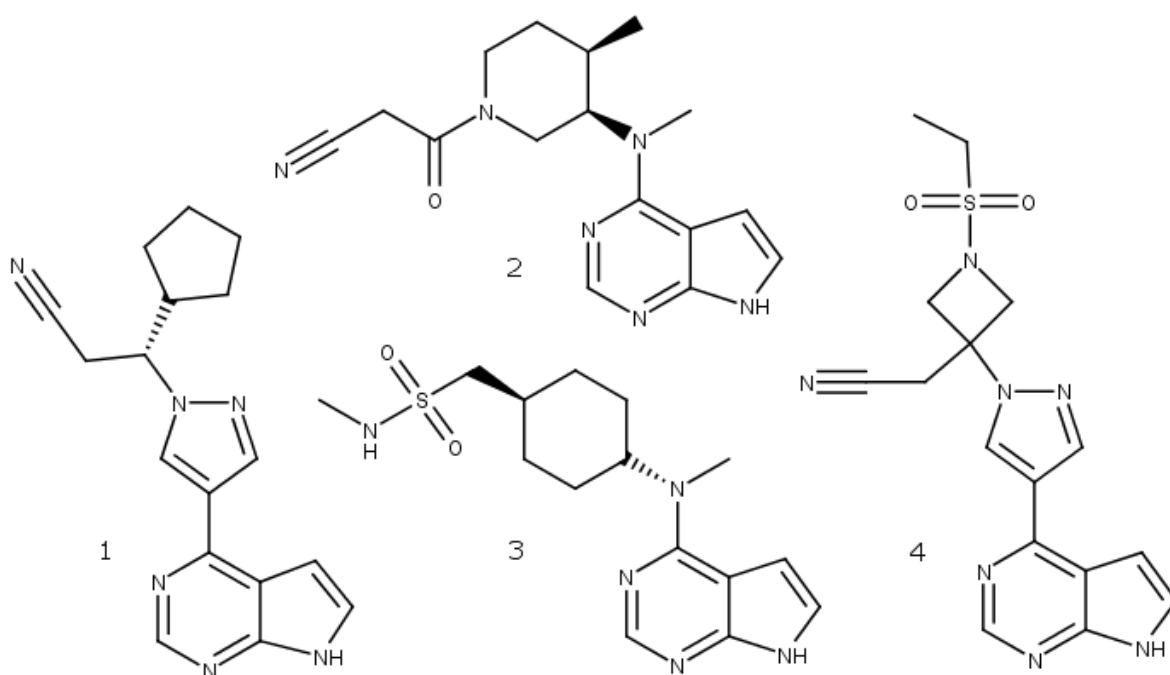
JAK/STAT signalni put je reguliran inhibitornim molekulama uključujući SOCS proteine (supresor citokinskog signaliziranja), PIAS proteine (proteinski inhibitor aktiviranih STAT) i tirozin *fosfataze*. Njima se kontroliraju inicijacija, vremensko trajanje i terminacija signalnih kaskada ⁵. SOCS proteini su najviše proučavani inhibitori JAK/STAT signalnog puta ⁸. Aktivirani STAT proteini induciraju ekspresiju SOCS proteina ³. SOCS proteini inhibiraju provođenje signala blokiranjem aktivacije i fosforilacije Janus kinaza i STAT proteina ⁸.

Disregulacija JAK/STAT signaliziranja dovodi do produljene aktivacije upalnih stanica i proizvodnje proinflamatornih medijatora, što u konačnici pridonosi nastanku kronične upale – dugotrajne upale uključene u patogenezu mnogih bolesti, poput artritisa, tumora, dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti ^{1,2}.

Za kontrolu kronične upale u kliničkoj primjeni koriste se uglavnom nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) ⁹. Djeluju tako da inhibiraju ciklooksigenaze (COX 1 i COX 2) – enzime odgovorne za pretvorbu arahidonske kiseline u lipidne medijatore, prostanoide ^{9,10}. Blokiranjem sinteze prostanoida, NSAIDs smanjuju simptome upale ¹⁰. Međutim, ta inhibicija, kao i općenito kiseli karakter tog razreda lijekova, dovode do nastanka želučanih tegoba ⁹. Selektivni COX-2 inhibitori imaju značajno smanjenu gastrointestinalnu toksičnost, ali dovode do povećane incidencije srčanih i moždanih udara ^{9,10}. Osim NSAIDs, terapijski uspjeh u kontroliranju autoimunih bolesti može se postići monoklonskim protutijelima i rekombinantnim proteinima.

Ljekoviti učinak može se postići vezanjem lijeka za citokine ili njihove receptore. Međutim, treba napomenuti da ciljanje jednog citokina ne može kompletno eliminirati patologiju određene bolesti. Stoga su se razvili inhibitori unutarstaničnih enzima i signalnih proteina, koji mogu istovremeno inhibirati nekoliko citokina. To su male, oralno dostupne molekule koje mogu biti pasivno transportirane preko staničnih membrana i blokirati unutarstaničnu aktivnost svojih meta ⁷. Primjeri takvih lijekova

su inhibitori Janus *kinaza* – *Jakinibs*. FDA je do sada odobrila 4 JAK inhibitora, a mnogi drugi su trenutno u fazi razvoja. Prvi odobreni JAK1 i JAK2 inhibitor bio je *Ruksolitinib* (**1**). Pri visokim koncentracijama može inhibirati i JAK3. *Ruksolitinib* je odobren za liječenje mijelofibroze i policitemije vere. Trenutno se ispituje njegova učinkovitost u liječenju psorijaze, bolesti presatka protiv primatelja (domaćina) (engl. *graft versus hist disease*, GvHD) i raznih tumora. *Tofacitinib* (**2**) prvenstveno blokira JAK3, a u manjoj mjeri može blokirati i JAK1 i JAK2. Odobren je za reumatoidni artritis. Trenutno je u kliničkim ispitivanjima za psorijazu, upalnu bolest crijeva, odbacivanje transplatanta od strane primaoca, juvenilni idiopatski artritis, spondiloartropatiju i ulcerozni kolitis. *Oklacitinib* (**3**) inhibira JAK1. Odobren je za liječenje psećeg alergijskog dermatitisa ^{5,6}. *Baricitinib* (**4**) je odobren za reumatoidni artritis (Slika 2). Inhibira JAK1/JAK2. Trenutno je u kliničkim ispitivanjima na psorijazu, autoinflamatornu bolest i dijabetičnu nefropatiju ¹¹.



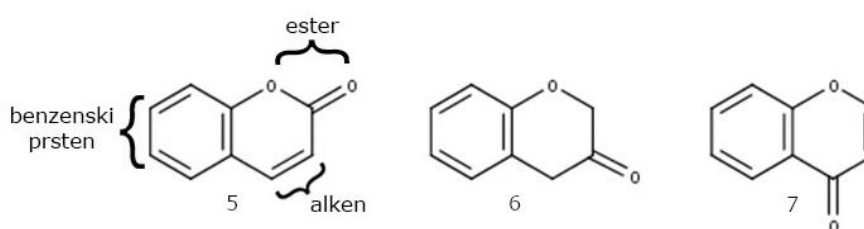
Slika 2. Inhibitori Janus kinaza: *ruksolitinib* (**1**), *tofacitinib* (**2**), *oklacitinib* (**3**) i *baricitinib* (**4**).

Trenutno dostupni inhibitori Janus *kinaza* kompetitivno blokiraju vezno mjesto adenozin trifosfata u JH1 domeni vežući se nekovalentnim interakcijama. Zbog strukturnih sličnosti JH1 domene i aktivnih domena drugih tirozin *kinaza* i zbog visoke očuvanosti te domene među svim Janus kinazama, JAK inhibicija blokira signaliziranje većeg broja citokina bitnih za razne fiziološke funkcije. Posljedica toga su brojni neželjeni učinci od kojih su najbrojnije infekcije uzrokovane imunosupresijom. Stoga je cilj razviti inhibitore Janus *kinaza* koji će selektivno inhibirati samo jednu JAK i tako smanjiti neželjene učinke. Nekoliko takvih inhibitora je trenutno u fazi razvoja ⁷.

Naspram uspjeha JAK inhibitora, do sada nije uspješno razvijen niti jedan STAT inhibitor. Razlog tome su visoka homologija među STAT proteinima što otežava selektivnost djelovanja te problemi bioraspoloživosti i *in vivo* učinkovitosti ⁵.

1.2. Kumarini

Kumarini (2*H*-kromen-2-oni) su organski heterociklički aromatski spojevi. Pripadaju širem razredu spojeva, benzopironima. Benzopironi se dijele na benzo- α -pirone (kumarini) (**5**), benzo- β -pirone (**6**) i benzo- γ -pirone (kromoni) (**7**) (Slika 3) ¹². Benzo- α -pironi su građeni od benzenskog prstena na koji je vezan prsten koji sadrži 2 funkcionalne skupine: alensku i estersku. Supstitucija na kumarinskoj okosnici moguća je u 6 različitih položaja, zbog čega su razvijeni brojni kumarinski derivati s različitim biološkim aktivnostima. Interakciji kumarinske okosnice s molekulama i ionima pridonosi njihov konjugirani sustav bogat elektronima i dobra svojstva prijenosa naboja.

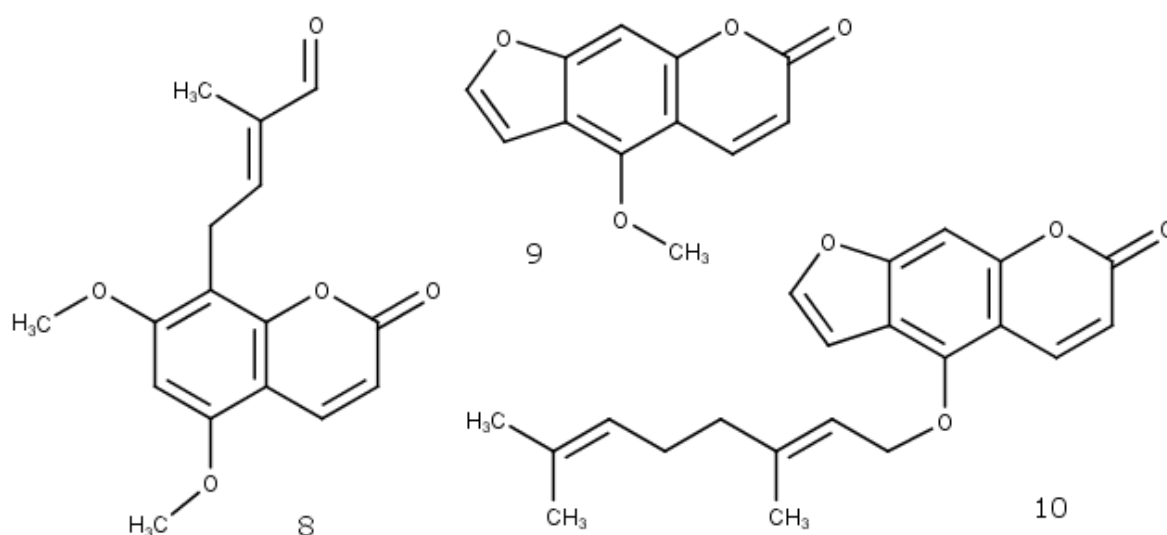


Slika 3. Benzopironi.

Kumarini su široko rasprostranjeni u prirodi, posebice u biljkama porodica Rutaceae, Moraceae, Leguminosae i Apiaceae. Naziv kumarin potječe iz riječi 'coumarou', što je francuski naziv za "tonka sjemenke" iz kojih je prvi put izoliran 1820. godine. Od tada se izoliralo i sintetiziralo preko 1300 kumarinskih derivata ¹³.

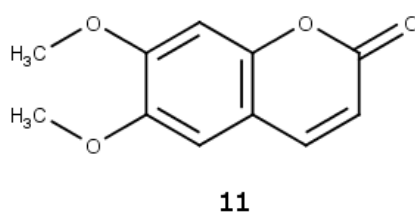
Mnoge biljke s kumarinskom okosnicom se koriste u tradicionalnoj medicini, primjerice, za liječenje reumatske boli i hiperglikemije ^{13,14}. Stoga su izolirani brojni spojevi podrijetlom iz biljaka s kumarinskom okosnicom kako bi se ispitali njihovi biološki učinci. Na slici 4 prikazani su primjeri spojeva s kumarinskom okosnicom koji djeluju na JAK/STAT signalni put. MC13 (**8**) inhibira sintezu inflamatornih medijatora (NO, TNF, IL-6). Djeluje na nekoliko signalnih putova uključujući JAK/STAT. Inhibira JAK2, STAT1 te

STAT3 fosforilaciju ¹⁵. Bergapten (**9**) i bergamotin (**10**) su furanokumarini. Imaju protutumorske i protuupalne učinke. Bergamotin inhibira STAT3, a bergapten inhibira JAK1, JAK2, STAT1 i STAT3 signaliziranje ^{16,17}. Međutim, inhibiraju i citokrom P450 3A4 - enzim odgovoran za metabolizam lijekova, što dovodi do neželjenih učinaka ^{17,18}.



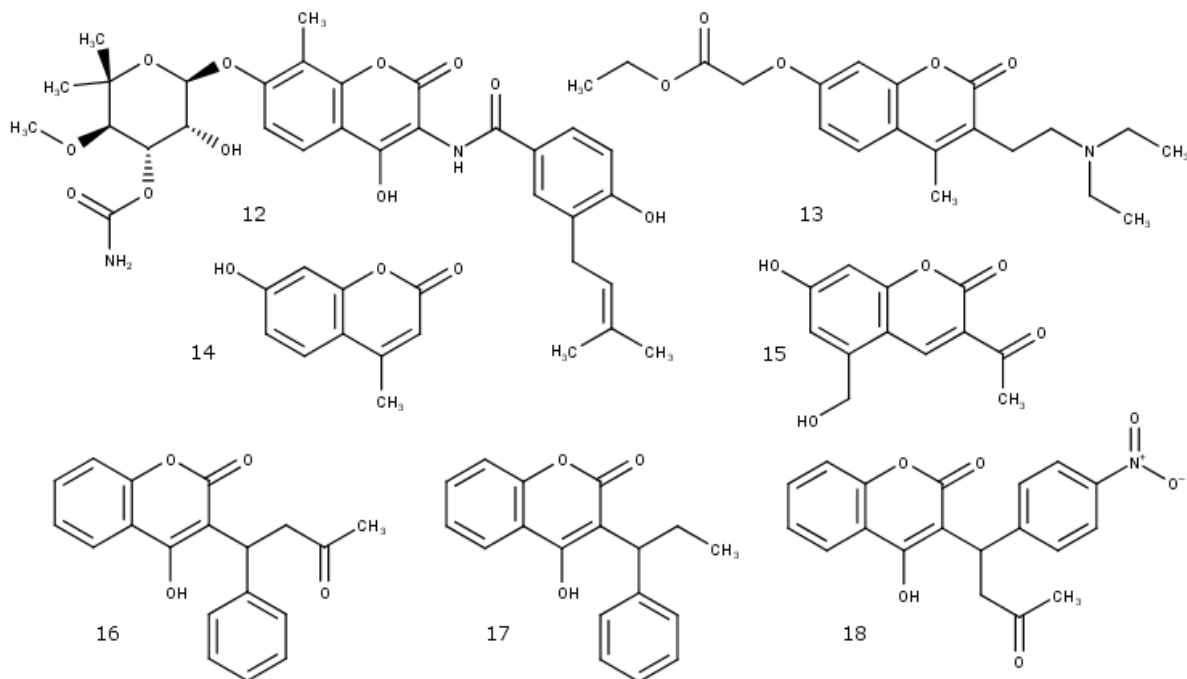
Slika 4. Izolirani kumarinski derivati koji djeluju na JAK/STAT signalni put: MC13 (**8**), bergapten (**9**) i bergamotin (**10**).

Skoparon (**11**) posjeduje protutumorske, antikoagulantne, hipolipidemijske, vazorelaksirajuće, antioksidativne i antiinflamatorne učinke. Protutumorske učinke ostvaruje vodikovim vezama između kisika laktonskog prstena i amino ostataka SH2 domene na STAT3 proteinu. Direktnim vezanjem na STAT3, skoparon inhibira njegovu fosforilaciju bez utjecaja na aktivnost JAK2 ili Src ¹⁹ (Slika 5). Sve navedene strukture imaju polarnu skupinu (-OH ili -OR) na poziciji C7' što ukazuje na njezinu važnost u biološkim učincima kumarinskih derivata.



Slika 5. Skoparon (**11**) – inhibitor STAT 3.

Za sada odobreni lijekovi s kumarinskom okosnicom su: novobiocin (antibiotik) (**12**), karbokromen (kronarna bolest) (**13**), himekromon (koleretik i antispazmolitik) (**14**), armilarizin A (antibiotik) (**15**), varfarin (antikoagulans) (**16**), fenoprokumon (antikoagulans) (**17**) i acenokumarol (antikoagulans) (**18**) (Slika 6) ²⁰.

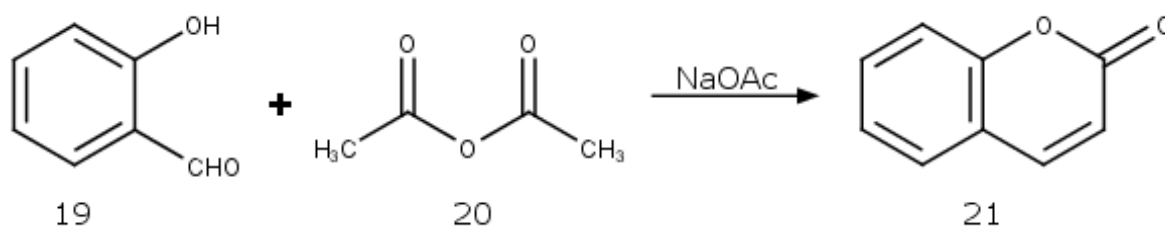


Slika 6. Odobreni lijekovi s kumarinskom okosnicom: novobiocin (**12**), karbokromen (**13**), himekromon (**14**), armilarizin A (**15**), varfarin (**16**), fenoprokumon (**17**) i acenokumarol (**18**).

1.2.1. Sinteza kumarina

Sinteza kumarina započela je 1868. godine Perkinovom reakcijom ²¹. Od tada je razvijeno nekoliko metoda za njihovu sintezu kao što su: Pechmann-ova kondenzacija, Knoevengael-ova kondenzacija, Wittig-ova reakcija i Kostanecki-Robinson-ova reakcija ²².

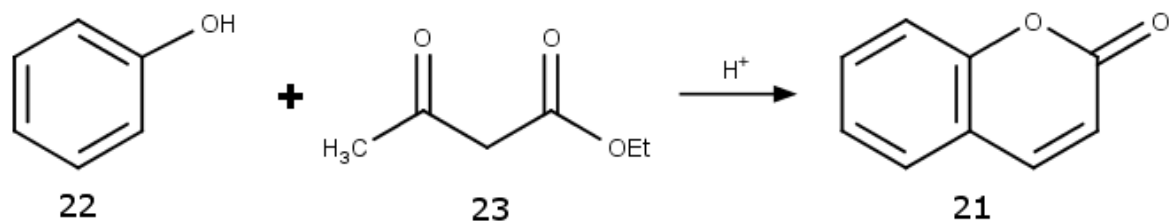
Perkinova reakcija uključuje zagrijavanje o-hidroksibenzaldehida s acetanhidridom u prisutnosti natrijevog acetata, kalijevog acetata ili trietilamina, pri čemu nastaje *trans*-cimetna kiselina ^{21,23}. Izomerizacijom i ciklizacijom cinaminske kiseline nastaje kumarin. Najbolje iskorištenje se postiže korištenjem omjera aldehyd:anhidrid=1:2 ²³.



Shema 1. Perkinova reakcija.

Još uvijek sa sigurnošću nije poznat mehanizam ove reakcije, ali je općenito prihvaćeno da dolazi do intermolekularne kondenzacije nakon čega slijedi dehidratacija ²¹. Nedostaci su slaba iskorištenja i žestoki reakcijski uvjeti ²³. Klasična sinteza je poboljšana korištenjem bezvodnog natrijeva fluorida kao katalizatora ili krunastog etera, dibenzo-18-kruna-6 ²².

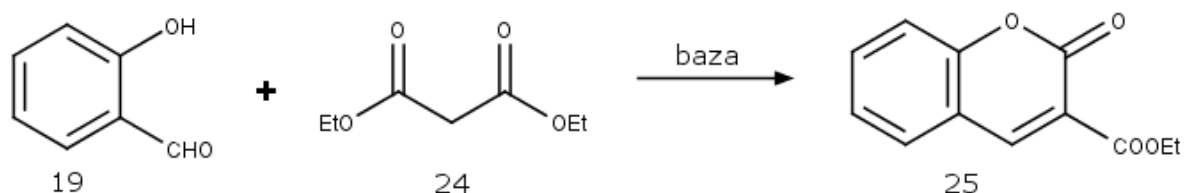
Pechmannova kondenzacija se često koristi jer su početne sirovine jeftine i lako dostupne ²⁴. Reakcijom fenola i β -keto estera u prisutnosti kiselog katalizatora nastaje kumarin ²⁵. Reakcija se odvija u 3 koraka: elektrofila aromatska supstitucija, transesterifikacija i dehidratacija. Međutim, redoslijed ovih koraka još nije poznat ²⁴.



Shema 2. Pechmannova kondenzacija.

Koriste se različiti kiseli katalizatori: H_2SO_4 , P_2O_5 , $FeCl_3$, $ZnCl_2$, $POCl_3$, $AlCl_3$, PPA, HCl , fosforna kiselina, trifluorooctena kiselina i drugi. Nedostatak ove reakcije je to što se katalizatori koriste u suvišku i stvara se toksični otpad koji dovodi do zagađenja okoliša. Nadalje, reakcije su dugotrajne, provode se pri visokim temperaturama te daju mala iskorištenja. Zbog navedenih nedostataka reakcija je modificirana kako bi bila ekološki prihvatljivija. Neke od alternativa uključuju korištenje mikrovalnog zračenja, krutih kiselih katalizatora, ion izmjenjivačke smole, ionskih tekućina i uvjeta bez otapala uz heterogeni katalizator ²⁵.

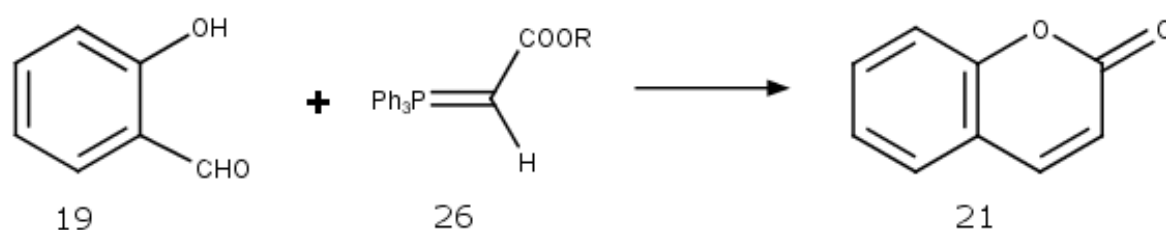
Knoevenagelovom reakcijom nastaju kumarini kondenzacijom aromatskog aldehida s aktiviranim spojem formule $Z-CH_2-Z'$ ili $Z-CHR-Z'$ ^{26,27}. Z i Z' su elektron odvlačeće skupine ($COOR$, $COOH$, CN i dr.) koje stabiliziraju metilenski spoj i omogućuju lakšu deprotonaciju ²⁷. Reakciju obično katalizira slaba baza ili kombinacija amina i karboksilne ili Lewisove kiseline u homogenim uvjetima.



Shema 3. Knoevenagelova kondenzacija.

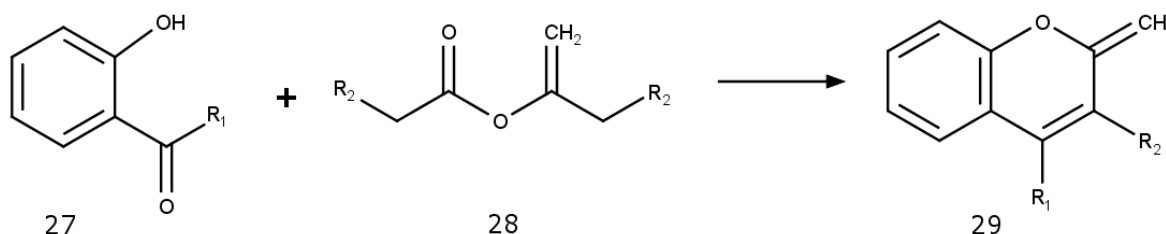
Opisane su brojne modifikacije ove reakcije, primjerice: provođenje reakcije uz mikrovalno zračenje, u uvjetima bez otapala, korištenje heterogenih katalizatora kao što su zeoliti i gline.

U Wittigovoj reakciji nastaje alken iz karbonilnog spoja i fosfonijevog ilida, uz nastaje međuprodukta betaina koji ciklizacijom prelazi u oksafosfetan. Kumarinski derivati nastaju olifenacijom orto-hidroksikarbonilnog aromatskog spoja, nakon čega dolazi do laktonizacije²². Da bi došlo do ciklizacije, treba nastati međuprodukt Z-konfiguracije²³.



Shema 4. Wittigova reakcija.

Kostanecki-Robinsonovom reakcijom nastaju kumarini acilacijom orto-hidroksiaril ketona s alifatskim anhidridima kiseline, nakon čega dolazi do ciklizacije. Ovom reakcijom se obično dobivaju kumarini supstituirani u položajima 3 i 4²².



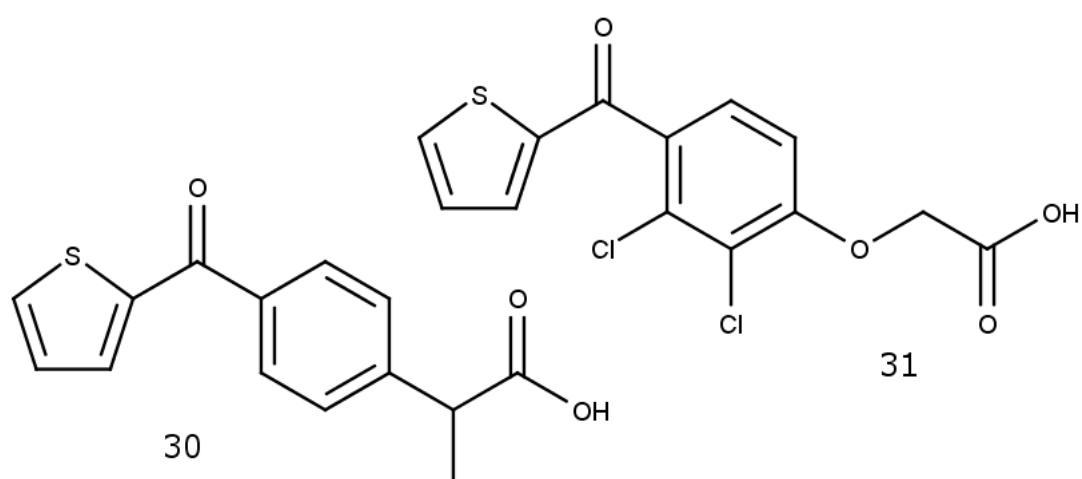
Shema 5. Kostanecki-Robinsonova reakcija.

1.3. Tiofeni

Tiofen je heterociklički aromatski spoj kemijske formule C_4H_4S . Jednostavni tiofeni su tekućine koje nalikuju benzenu po mirisu i točki vrelišta. Nalaze se u nafti i ugljenu ²⁸. Tiofenski derivati imaju bitne farmakološke učinke i široku primjenu ²⁹.

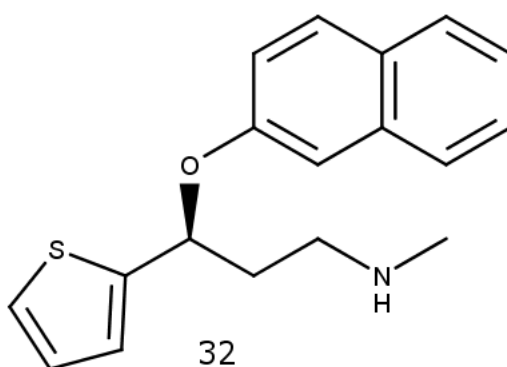
Derivati 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromena imaju protuupalna, protualergijska, analgetska, antiparkinsonska, protubakterijska, protugljivična i mukukolitička djelovanja. Koriste se za liječenje dijabetesa, hiperlipidemije, tumora i simptoma povezanih s menopauzom ³⁰.

Lijekovi koji sadrže tiofensku okosnicu mogu uzrokovati hepatotoksičnost. Citokrom P450 oksidira tiofenski prsten pri čemu nastaju reaktivni metaboliti: tiofen *S*-oksidi, tiofenski epoksidi te sulfenske kiseline. Njihovi toksični učinci posljedica su reakcija sa nukleofilnim aminokiselinskim ostacima proteina. Suprofen (**30**) i tienilna kiselina (**31**) su primjeri lijekova koji su povučeni s tržišta zbog ozbiljnih nuspojava uzrokovanih metabolizmom tiofenskog prstena (Slika 7).



Slika 7. Suprofen (**30**) i tienilna kiselina (**31**) – lijekovi povučeni s tržišta zbog nuspojava uzrokovanih metabolizmom tiofenskog prstena.

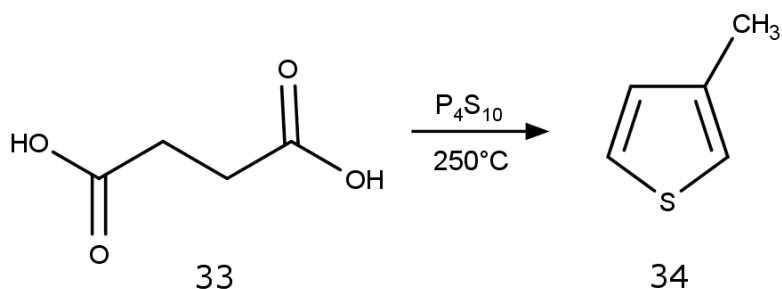
Međutim, većina spojeva nije toksična pri efektivnim dozama. Razlog tome je detoksifikacijski sustav organizma koji može neutralizirati male količine nastalih metabolita. Ostali čimbenici koji utječu na toksičnost su strukturne karakteristike lijeka, supstitucija na tiofenskom prstenu i biološka relevantnost modificiranog proteina. Stoga tiofenski prsten ne mora nužno dovesti do toksičnih učinaka. Duloksetin (**30**) je primjer lijeka koji sadrži tiofenski prsten i ne uzrokuje ozbiljne nuspojave (Slika 8) ³¹.



Slika 8. Duloksetin (**32**) – lijek koji se koristi u liječenju velikog depresivnog poremećaja, boli kod dijabetičke periferne neuropatije i generaliziranog anksioznog poremećaja.

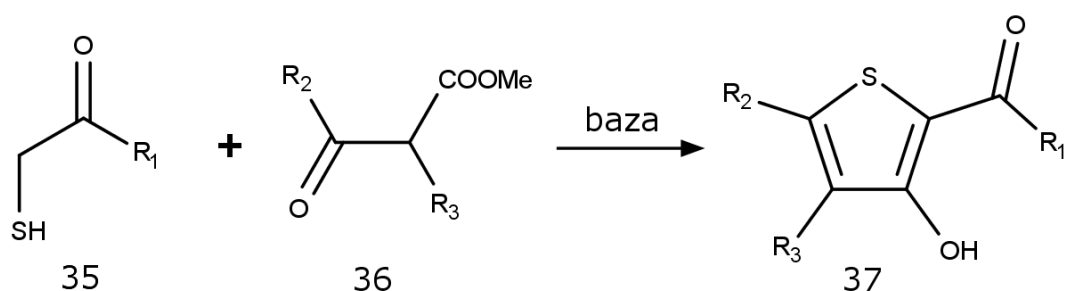
1.3.1. Sinteza tiofena

Paar-Knorr-ovom sintezom, tiofen nastaje kondenzacijom 1,4-dikarbonilnog spoja uz prisutnost izvora sumporovog atoma ²⁹. Standardni postupak uključuje korištenje fosforovog pentasulfida kao izvora sumpora. Međutim, fosforov pentasulfid dovodi do dehidratacije te nastaje smjesa furana i tiofena. Vremenom se ova metoda modificirala kako bi se smanjilo ili uklonilo nastajanje furana. Primjeri modifikacija reakcije su korištenje sumporovodika uz kiseli katalizator, Lawesson-ovog reagensa te bis(trimetilsilil)sulfida.



Shema 6. Paar-Knorr-ova sinteza tiofena.

Fiesselmann-ovom sintezom tiofena nastaje 3-hidroksi-2-tiofen karboksilna kiselina. Reakcija se sastoji od kondenzacije tioglikolne kiseline i α,β -acetilenskih estera uz prisutnost baze.



Shema 7. Fiesselmannova sinteza tiofena.

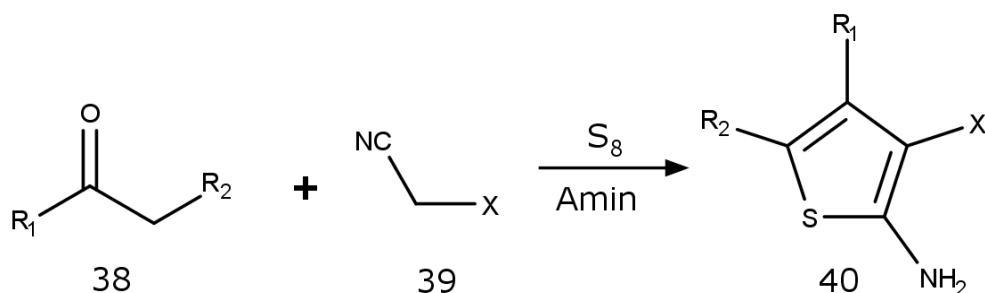
Postupak obuhvaća dvije uzastopne 1,4-adicije metil tioglikolata na α,β -acetilenski ester pri čemu nastaje tioacetal. Jaka baza dovodi do stvaranja enola iz kojeg Dieckmannovom kondenzacijom nastaje keton. Eliminacijom metil tioglikolata i tautomerizacijom dobije se konačni produkt, 3-hidroksitiofen dikarboksilat.

Derivati tioglikolne kiseline daju tiofene u reakciji s različitim karbonilnim sustavima, kao što su: β keto esteri, α,β -dihalo esteri, α,β -halovinil esteri te odgovarajući nitrili, ketoni te aldehidi. Umjesto derivata tioglikolne kiseline mogu se koristiti α -merkaptokarbonilni sustavi.

Gewald-ova sinteza aminotiofena uključuje kondenzaciju aldehida, ketona ili 1,3-dikarbonilnih spojeva s aktiviranim nitrilima kao što

su malonitril ili cijanoocteni esteri i elementarnim sumporom. Reakcija se odvija u prisutnosti amina pri sobnoj temperaturi.

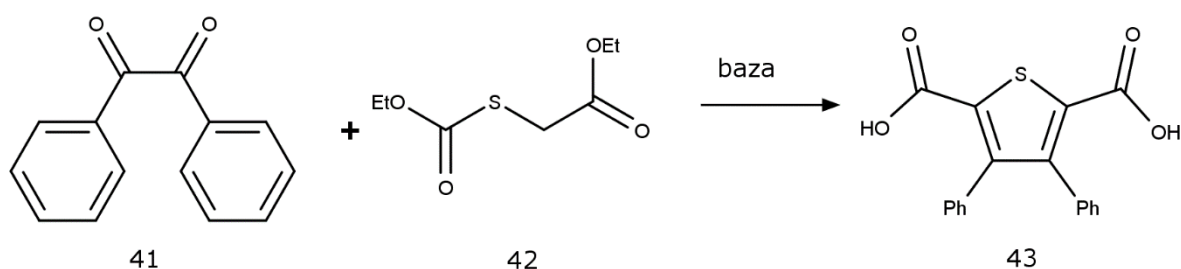
Prvi korak u mehanizmu Gewald-ove reakcije je Knoevenagelova kondenzacija aktiviranog nitrila s ketonom ili aldehidom. Na nastali akrilonitril se dodaje sumpor te se međuprodukt ciklizira. Bazno kataliziranom tautomerizacijom nastaje 2-aminotiofen.



Shema 8. Gewald-ova sinteza aminotiofena.

Regioselektivnost ove reakcije je varijabilna kad se kao početni materijal koristi nesimetrični keton, posebice kad su α i α' protoni ketona sterički dostupni. Jedan izomer 2-aminotiofena se može dobiti korištenjem ketona s izlazećom skupinom na α poziciji. Uvođenje sumprovog atoma se događa nuklofilnom susptitucijom izlazeće skupine s natrijevim sulfidom.

Hinsberg-ovom sintezom – 2 uzastopne kondenzacije dietil tiodiglikolata i α -diketona pri baznim uvjetima daju mono ester-karboksilat iz kojeg hidrolizom nastaje 3,4-disupstituirana-tiofen-2,5-dikarboksilna kiselina ^{29,32}.



Shema 9. Hinsbergova sinteza.

Početni korak ove reakcije je Stobbe-ova kondenzacija kojom nastaje lakton. Baza deprotonira lakton čime se otvori prsten. Zatim dolazi do intramolekularne ciklizacije nalik Knoevenagelovoj kondenzaciji te nastaje mono ester. Hidrolizom monoestera u kiselim uvjetima, nastaje tiofen dikarboksilna kiselina ³².

2. Cilj rada

Cilj je ovoga istraživanja sinteza derivata 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona i derivata (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil) tiofen-2,4-di-il)dimetanola i ispitivanje njihovih protuupalnih učinaka.

Prvo će se u 3 koraka sintetizirati etil 7-metoksi-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksilat koji će služiti kao prekursor za sintezu dvije skupine spojeva. Redukcijom i vezanjem alkilnih lanaca različitih duljina sintetizirati će se derivati (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil) tiofen-2,4-di-il)dimetanola, a derivati 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona će se pripremiti demetilacijom i vezanjem alkilnih lanaca različitih duljina. Osim spojeva s vezanim lancima, iz 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona će se sintetizirati i amidni derivat.

Protuupalni učinci će se ispitati *in vitro* mjerenjem inhibicijske učinkovitosti na proces fosforilacije proteina STAT1 i STAT5 koji su dio JAK/STAT signalnog puta. Fosforilacija STAT5 će biti inicirana IL-2 i GM-CSF, a STAT1 IFN- α u mononuklearnim stanicama periferne krvi.

3. Materijali i metode

3.1. Opće napomene

Komercijalno dostupni reagensi i otapala nabavljeni su od Sigma Aldrich (Njemačka) i Carlo Erba Reagents (Italija). Sva korištena otapala bila su HPLC ili p.a. čistoće. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), na aluminijskim pločama 60F–254 presvučenima slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 i 366 nm. Spojevi su pročišćavani: 1) kromatografijom na koloni punjenoj silikagelom Fluka (0,063–0,2 nm) pod utjecajem gravitacije; 2) flash kromatografijom Combi Flash Rf+ upotrebom RediSep Rf GOLD 12 g (20 – 40 μ m sferne čestice, veličina pora: 60 Å) i RediSep Rf 40 g (40–63 μ m nepravilne čestice, veličina pora: 60 Å) komercijalno dostupnih kolona; 3) ekstrakcija na čvrstoj fazi korištenjem Supelco kolona (SiO_2).

Jednodimenzijski spektri NMR snimljeni su pomoću instrumenata visokog razlučivanja Bruker 300 i 600 MHz (Bruker Spectrospin, Rheinstetten, Germany) u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković. Uzorci su otopljeni u deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d_6) ili dimetilformamidu (DMF-d_7) s 0,05 % (v/v) tetrametilsilanom (TMS) i snimani u 5 mm cjevčicama pri temperaturi od 25 °C.

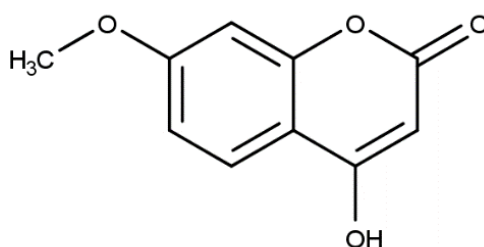
Točke tališta novosintetiziranih spojeva određene su na instrumentu Stuart Melting Point SMP20 i nisu korigirane.

Spektrometrija masa provedena je na instrumentu Agilent 1290 UPLC kromatografu spojenim sa Agilent 6550 iFunnel kvadrupolnim spektrometrom masa koji mjeri vrijeme preleta (QTOF) i AJS ESI (Agilent Technologies) izvorom. Uzorci su analizirani u pozitivnom načinu rada a točne mase su dobivene usklađivanjem (korekcijom) masa korištenjem referentnih otopina poznatih omjera m/z 121,0509 (protonirani purin) i 922,0098 (protonirani heksakis (1H, 1H, 3H-tetrafluorpropoksi)fosfazin).

Rendgenska strukturna analiza provedena je na difraktometru Oxford Diffraction Xcalibur2 sa Sapphire 3 CCD detektorom korištenjem grafitnog monokromatskog MoK_α zračenja ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

3.2. Sinteze spojeva

3.2.1. 4-hidroksi-7-metoksi-2*H*-kromen-2-on (2)

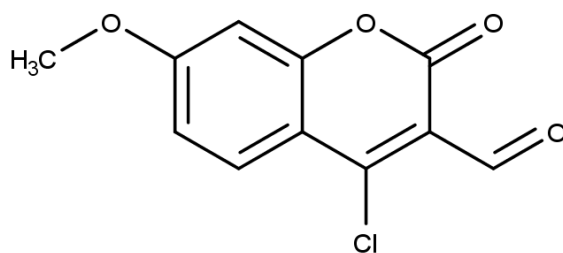


U otopinu NaH (5 g; 0,21 mol) u dietilkarbonatu (25 mL) polagano se dokapava otopina 2-hidroksi-4-metoksiacetofenona (**1**) (5 g; 0,03 mol) u dietilkarbonatu (35 mL) pri 0 °C. Reakcijska smjesa se miješa 14 sati na približno 85 °C. Zatim se ohladi do 0 °C te joj se doda destilirana voda. Dietilkarbonat se ekstrahira dietil-eterom (3 x 50 mL). Vodenom sloju se dokapava 2N HCl do pH vrijednosti 0. Nastali talog se prikupi vakuum filtracijom te ispere destiliranom vodom i petroleterom (3 x 50 mL) te ostavi sušiti preko noći na 90 °C. Dobivena je bijela krutina (5,6747 g; 98,13%).

¹H-NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 12.38 (1H, bs, OH-4), 7.72 (1H, d, CH-5, $J=8.43 \text{ Hz}$), 7.00-6.91 (1H, m, CH-6), 6.95 (1H, s, CH-8), 5.46 (1H, s, CH-3), 3.85 (1H, s, OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 165.97 (C-4), 162.92 (C-1), 162.23 (C-7), 155.38 (C-10), 124.30 (C-5), 111.81 (C-6), 108.89 (C-11), 100.50 (C-8), 88.47 (C-3), 55.83 (OCH₃).

3.2.2. 4-kloro-7-metoksi-2-okso-2*H*-kromen-3-karbaldehid (**3**)

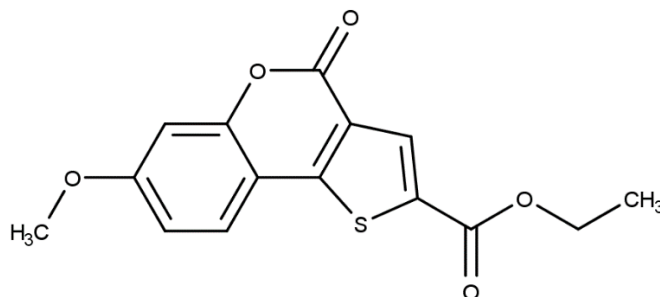


U smjesu DMF-a (0,91 mL; 11,71 mmol) i trikloroetilena (1,32 mL) polagano se dokapava POCl₃ (0,73 mL, 7,79 mmol) pri 0 °C. Smjesa se miješa 1 sat na sobnoj temperaturi. Spoj **2** (500 mg, 2,6 mmol) se otopi u trikloroetilenu (10 mL) i doda reakcijskoj smjesi. Smjesa se miješa 16 sati na 90 °C nakon čega se ohladi na sobnoj temperaturi. Doda joj se zasićena vodena otopina NaOAc te provede ekstrakcija s DCM. Organski sloj se zatim ispere s vodenom otopinom NaCl, suši iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtrira. Otapalo se upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom (eluens: petroleter/etil-acetat=10/1→5/1). Dobivena je žuta krutina (0,4591 g; 72,77%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 9.80 (1H, s, CHO), 7.91 (1H, d, CH-5, *J*=9.50 Hz), 7.04-6.99 (m, 2H, CH-8 and CH-6), 3.90 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): n.d.

3.2.3. Etil 7-metoksi-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksilat (4)

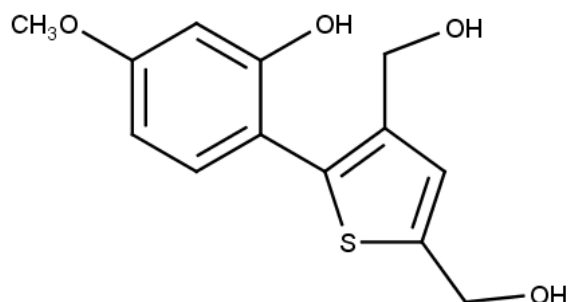


Otopini spoja **3** (0,1660 g; 0,70 mmol) u piridinu (1,39 mL) se dodaju etil-2-merkaptacetat (0,076 mL; 0,70 mmol) i trietilamin (0,243 mL; 1,74 mmol). Reakcijska smjesa se miješa 4 sata pri 70 °C, a zatim ohladi na sobnoj temperaturi te upari pod sniženim tlakom uz dodatak toluena. Uparenoj smjesi se doda destilirana voda i DCM te se provede ekstrakcija. Organski sloj se ispere s 2N HCl i vodenom otopinom NaCl nakon čega se suši iznad bezvodnog Na₂SO₄. Smjesa se filtrira i filtrat upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom (eluens: DCM). Dobivena je bijela krutina (0,1080 g; 50,94%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8.07 (1H, s, CH-3), 7.95 (1H, d, *J*=8.74 Hz, CH-9), 7.13 (1H, d, *J*=2.32 Hz, CH-6), 7.05/7.02 (1H, dd, *J*=2.38/8.74 Hz, CH-8), 4.36 (2H, q, *J*=7.09 Hz, CH₂-2^{II}), 3.89 (3H, s, OCH₃), 1.34 (3H, t, *J*=7.09 Hz, CH₃-2^{III}).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 163.11 (C-2^I), 161.12 (C-7), 156.48 (C-2c), 153.73 (C-4), 153.06 (C-11), 132.36 (C-2), 132.11 (C-3), 126.16 (C-9), 123.19 (C-3c), 113.68 (C-8), 109.63 (C-10), 102.02 (C-6), 62.31 (OCH₃), 56.58 (CH₂-2^{II}), 14.56 (CH₃-2^{III}).

3.2.4. (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil)tiofen-2,4-di-il) dimetanol (5)



U otopinu LiAlH_4 (0,0493 g; 1,30 mmol) u THF-u (2,6 mL) dodaje se otopina spoja **4** (0,1187 g; 0,39 mmol) u THF-u (7 mL) pri 0 °C. Reakcijska smjesa se miješa 3,5 sata na sobnoj temperaturi. Suvišak LiAlH_4 se uništi dodatkom vode uz hlađenje reakcijske smjese na ledenoj kupelji. Talog se filtrira uz ispiranje THF-om, a filtrat upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom (eluens: DCM/MeOH=50/1→20/1). Dobiveni produkt je prozirno ulje (0,086 g; 84,07%).

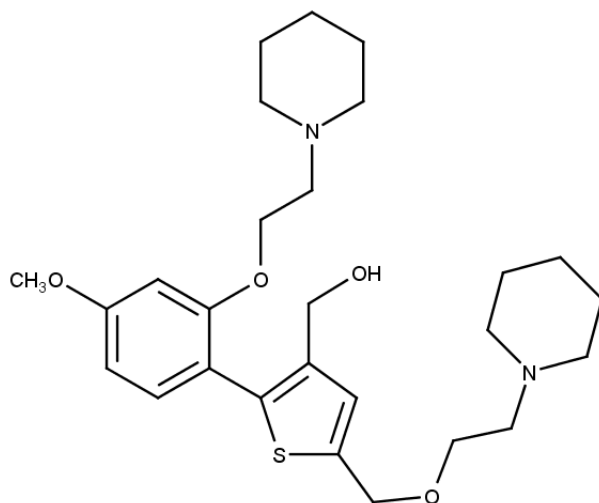
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ/ppm): 9.68 (1H, s, OH-2^I), 7.11 (1H, d, $J=8.35$ Hz, CH-6^I), 6.93 (1H, s, CH-4), 6.48 (1H, d, $J=2.34$ Hz, CH-5^I), 6.45/6.43 (1H, d, $J=2.44/8.42$ Hz, CH-3^I), 5.35 (1H, t, $J=5.74$ Hz, OH-5^{II}), 4.89 (1H, bs, OH-3^{II}), 4.57 (2H, d, $J=5.62$ Hz, CH₂-5^{II}), 4.22 (2H, s, CH₂-3^{II}), 3.72 (3H, s, OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) (δ/ppm): 160.06 (C-4^I), 155.77 (C-2^I), 143.61 (C-3), 138.72 (C-5), 133.12 (C-2), 132.23 (C-6^I), 125.32 (C-4), 113.24 (C-1^I), 104.69 (C-5^I), 101.43 (C-3^I), 58.44 (C-5^{II}), 57.81 (C-3^{II}), 54.98 (OCH₃).

3.2.5. Općenita procedura za sintezu alkilnih derivata 6a-d

U otopinu spoja **5** (0,3 mmol) u toluenu (15 mL) dodaju se otopina alkil klorid hidroklorida (2,1 mmol) u 50%-tnoj otopini NaOH (10 mL) i katalitička količina benziltriethylamonijevog klorida. Reakcijska smjesa se intenzivno miješa (800 rpm) na 110 °C preko noći. Zatim se ohladi na sobnoj temperaturi i upari pod sniženim tlakom. Smjesi se doda DCM i destilirana voda te se provede ekstrakcija. Organski sloj se suši iznad bezvodnog Na₂SO₄ te filtrira. Otapalo se upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom.

3.2.5.1. (2-4-metoksi-2-(2-(piperidin-1-il)etoksi)fenil)-5-((2-(piperidin-1-il)etoksi)metil)tiofen-3-il)metanol (**6a**)



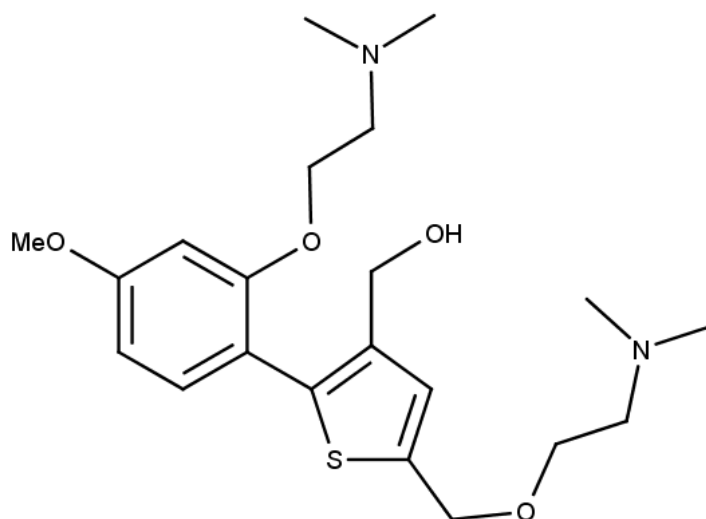
U otopinu spoja **5** (44,2 mg; 0,17 mmol) u toluenu (8,52 mL) dodana je otopina (1-(2-kloroetil)piperidin hidroklorida (0,2196 g; 1,19 mmol) u 50%-tnoj otopini NaOH (5,68 mL) i katalitička količina benziltriethylamonijevog klorida (2 mg); kolonska kromatografija (eluens: DCM/MeOH=10/1→4/1).

Dobiveni produkt je zelenkasto smeđe ulje (0,0066 g; 7,94%).

¹H-NMR (DMF-d₇) (δ/ppm): 7.24 (1H, d, *J*=8.42 Hz, CH-6^I), 7.07 (1H, s, CH-4), 6.74 (1H, d, *J*=2.17 Hz, CH-3^I), 6.64/6.61 (1H, dd, *J*=2.24; 8.41 Hz, CH-5^I), 4.64 (2H, s, CH₂-5^{II}), 4.28 (2H, s, CH₂-3^{II}), 4.10 (2H, t, *J*=5.60 Hz, CH₂-2^{II}), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.59 (2H, t, *J*=6.03 Hz, CH₂-5^{III}), 2.59 (2H, t, *J*=5.70 Hz, CH₂-2^{III}), 2.48 (2H, t, *J*=6.06 Hz, CH₂-5^{IV}), 2.40-2.30 (8H, m, 2x CH₂-2^{IV}, 2x CH₂-5^V), 1.52-1.42 (8H, m, 2x CH₂-2^V, 2x CH₂-5^{VI}), 1.40-1.30 (4H, m, CH₂-2^{VI}, CH₂-5^{VII}).

¹³C-NMR (DMF-d₇) (δ/ppm): 161.08 (C-4^I), 157.15 (C-2^I), 139.86 (C-3), 139.71 (C-5), 134.18 (C-2), 132.54 (C-6^I), 128.07 (C-4), 115.18 (C-1^I), 105.69 (C-5^I), 99.96 (C-3^I), 67.79 (C-5^{III}), 67.35 (C-2^{II}), 66.21 (C-5^{II}), 58.42 (C-3^{II}), 58.21 (C-2^{III}), 57.67 (C-5^V), 55.45 (OCH₃), 54.86 (C-2^{IV}), 54.65 (C-5^{IV}), 25.96 i 25.55 (C-5^{VI} i C-2^V), 24.29 i 24.21 (C-5^{VII} i C-2^{VI}).

3.2.5.2. (2-(2-(2-(dimetilamino)etoksi)-4-metoksifenil)-5-((2-(dimetilamino)etoksi)metil)tiofen-3-il)metanol (6b)



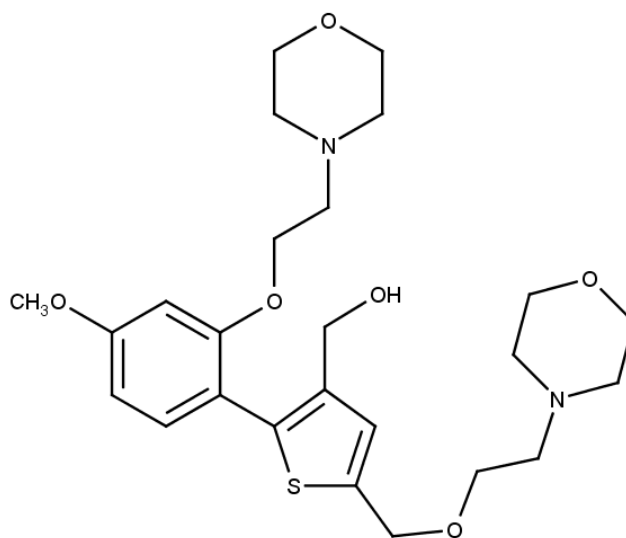
U otopinu spoja **5** (39 mg; 0,15 mmol) u toluenu (7,5 mL) dodana je otopina 2-kloro-*N,N*-dimetiletilamin hidroklorida (0,1505 g; 1,05 mmol) u 50%-tnoj otopini NaOH (5 mL) i katalitička količina benziltriethylamonijevog klorida (1 mg); grijanje pri 95 °C; Supelco ekstrakcija na čvrstoj fazi (eluens: DCM/MeOH=50/1→20/1).

Dobiveni produkt je smeđe ulje (0,0085 g; 13,87%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 7.19 (1H, d, *J*=8.39 Hz, CH-6^I), 7.01 (1H, s, CH-4), 6.68 (1H, d, *J*=2.18 Hz, CH-3^I), 6.60/6.57 (1H, dd, *J*=2.22/8.41 Hz, CH-5^I), 4.58 (2H, s, CH₂-5^{II}), 4.04 (2H, t, *J*=5.58 Hz, CH₂-2^{II}), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.53 (2H, t, *J*=5.88 Hz, CH₂-5^{III}), 2.16 (6H, s, N(CH₃)₂). 2.14 (6H, s, N(CH₃)₂).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 160.54 (C-4^I), 156.58 (C-2^I), 139.39 (C-3), 139.10 (C-5), 133.60 (C-2), 132.22 (C-6^I), 127.76 (C-4), 114.64 (C-1^I), 105.38 (C-5^I), 99.65 (C-3^I), 67.60 (C-5^{III}), 66.85 (C-2^{II}), 66.13 (C-5^{II}), 58.22 (C-2^{III}), 57.68 (C-3^{II}), 57.45 (C-5^{IV}), 55.30 (OCH₃), 45.52 (N(CH₃)₂), 45.22 (N(CH₃)₂).

3.2.5.3. (2-(4-metoksi-2-(2-morfolinoetoksi)fenil)-5-((2-morfolinoetoksi)metil)tiofen-3-il)metanol (6c)



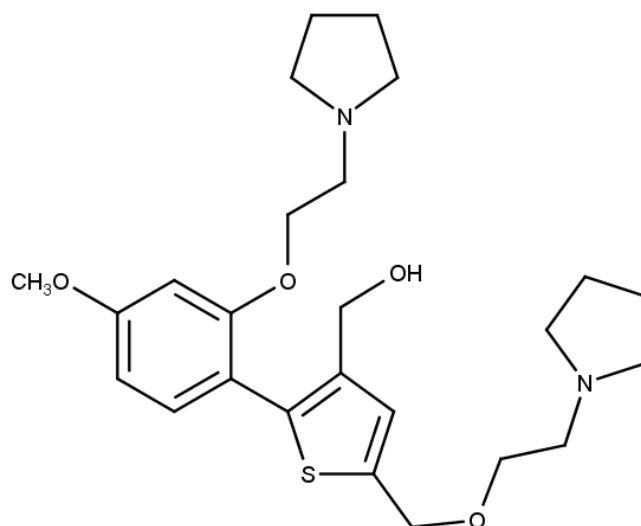
U otopinu spoja **5** (73 mg; 0,27 mmol) u toluenu (14 mL) dodana je otopina 4-(2-kloroetil)morfolin hidroklorida (0,3610 g; 1,94 mmol) u 50%-tnoj otopini NaOH (9,26 mL) i katalitička količina benziltriethylamonijevog klorida (2 mg); kolonska kromatografija (eluens: DCM/MeOH=40/1).

Dobiveni produkt je smeđe ulje (0,0066 g; 4,96%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 7.19 (1H, d, *J*=8.39 Hz, CH-6^I), 7.02 (1H, s, CH-4), 6.68 (1H, d, *J*=2.02 Hz, CH-3^I), 6.60/6.57 (1H, dd, *J*=2.06; 8.44 Hz, CH-5^I), 5.06 (1H, t, *J*=5.74 Hz, OH), 4.59 (2H, s, CH₂-5^{II}), 4.21 (2H, d, *J*=5.37 Hz, CH₂-3^{II}), 4.07 (2H, t, *J*=5.49 Hz, CH₂-2^{II}), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.59-3.49 (10H, m, 2x CH₂-2^V, CH₂-5^{III}, 2x CH₂-5^{VI}), 2.60 (2H, t, *J*=5.74 Hz, CH₂-2^{III}), 2.43-2.33 (10H, m, 2x CH₂-2^{IV}, CH₂-5^{IV}, 2x CH₂-5^V).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 160.56 (C-4^I), 156.70 (C-2^I), 139.36 (C-3), 139.08 (C-5), 133.62 (C-2), 132.16 (C-6^I), 127.61 (C-4), 114.69 (C-1^I), 105.50 (C-5^I), 99.74 (C-3^I), 67.10 (C-5^{III}), 66.88 (C-2^{II}), 66.16 (C-5^{VI}), 65.97 (C-2^V), 57.74 (C-3^{II}), 57.55 (C-2^{III}), 56.79 (C-5^{IV}), 55.31 (OCH₃), 53.66 (C-5^V), 53.48 (C-2^{IV}).

3.2.5.4. (2-(4-metoksi-2-(2-(pirolidin-1-il)etoksi)fenil)-5-((2-pirolidin-1-il)etoksi)metil)tiofen-3-il)metanol (6d)



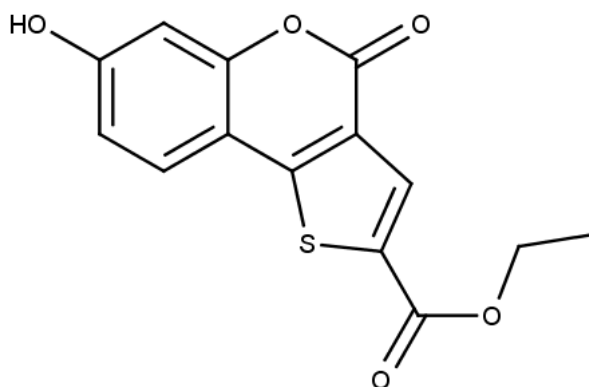
U otopinu spoja **5** (46 mg; 0,17 mmol) u toluenu (9 mL) dodana je otopina 1-(2-kloroetil)pirolidin hidroklorida (0,2088 g; 1,23 mmol) u 50%-tnoj otopini NaOH (6 mL) i katalitička količina benziltriethylamonijevog klorida (2 mg); kolonska kromatografija (eluens: DCM/MeOH=10/1→5/1).

Dobiveni produkt je narančasto ulje (0,0097 g; 12,39%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 7.24 (1H, d, *J*=8.39 Hz, CH-6^I), 7.07 (1H, s, CH-4), 6.74 (1H, d, *J*=2.23 Hz, CH-3^I), 6.85/6.82 (1H, dd, *J*=2.29; 8.41 Hz, CH-5^I), 4.65 (2H, s, CH₂-5^{II}), 4.27 (2H, s, CH₂-3^{II}), 4.11 (2H, t, *J*=5.42 Hz, CH₂-2^{II}), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.62 (2H, t, *J*=6.05 Hz, CH₂-5^{III}), 2.66 (2H, t, *J*=5.99 Hz, CH₂-2^{III}), 2.53-2.42 (8H, m, 2x CH₂-2^{IV}, CH₂-5^{IV}, 2x CH₂-5^V), 1.71-1.63 (8H, m, 2x CH₂-2^V, 2x CH₂-5^{VI}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 160.89 (C-4^I), 156.84 (C-2^I), 139.79 (C-3), 139.54 (C-5), 133.91 (C-2), 132.24 (C-6^I), 127.73 (C-4), 115.06 (C-1^I), 105.35 (C-5^I), 99.76 (C-3^I), 68.60 (C-5^{III}), 67.09 (C-2^{II}), 67.06 (C-5^{II}), 58.02 (C-3^{II}), 54.89 (OCH₃), 54.98, 54.38, 54.00, 53.55 (C-2^{III}, C-2^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V), 23.04, 22.92 (C-2^V, C-5^{VI}).

3.2.6. Etil 7-hidroksi-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksilat (**7**)

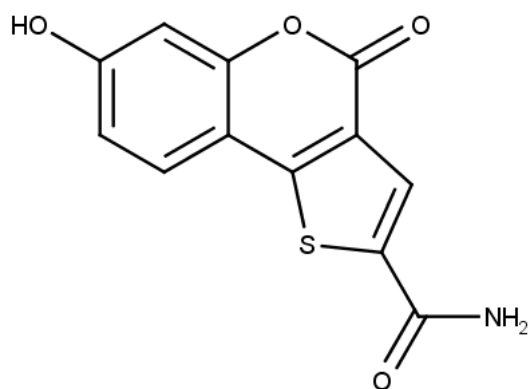


U otopinu spoja **4** (0,3925 g; 1,29 mmol) polagano se dokapava 1M otopina BBr₃ (0,7373 mL; 7,77 mmol) u diklormetanu (20 mL) u inertnoj atmosferi N₂. Reakcijska smjesa se miješa 4 sata na sobnoj temperaturi, a zatim razrijedi sa vodom i ekstrahira s diklormetanom. Organski sloj se zatim ispere s 1M vodenom otopinom HCl i vodenom otopinom NaCl, suši iznad bezvodnog Na₂SO₄ i upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom (petroleter/etil acetat = 5/1). Dobiven je spoj **7** (0,2500 g; 67,57%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 10.74 (1H, s, OH-7), 8.02 (1H, s, CH-3), 7.81 (1H, d, *J*=8.53 Hz, CH-9), 6.81 (1H, d, *J*=1.99 Hz, CH-6), 6.87 and 6.84 (1H, dd, *J*=2.09/8.57 Hz, CH-8), 4.34 (2H, q, *J*=7.09 Hz, CH₂-2^{II}), 1.34 (3H, t, *J*=7.08 Hz, CH₃-2^{III}).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 161.51 (C-2^I), 160.62 (C-7), 156.03 (C-2c), 153.25 (C-4^I), 152.96 (C-11), 131.61 (C-3), 131.19 (C-2), 125.81 (C-9), 122.04 (C-3c), 113.85 (C-8), 107.91 (C-10), 102.89 (C-6), 61.73 (C-2^{II}), 14.05 (C-2^{III}); MS *m/z* 401.0393 [MH⁺].

3.2.7. 7-hidroksi-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksamid (**8**)



U otopinu estera **7** (0,1000 g; 0,34 mmol) u metanolu (14 mL) uvodi se plinoviti amonijak pri 0 °C. Reakcijska smjesa miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi, a zatim su upari pod sniženim tlakom. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom (DCM/MeOH = 5/1). Dobiven je spoj **8** (0,0200 g; 22,25%).

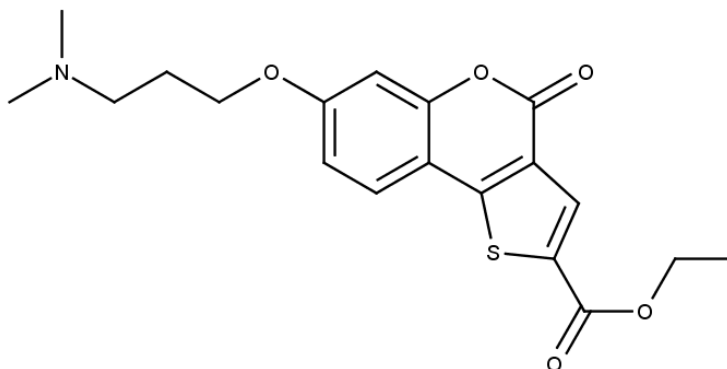
¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 10.62 (1H, s, OH-7), 8.26/7.67 (2x1H, 2xs, CONH₂), 8.24 (1H, s, CH-3), 7.77 (1H, d, *J*=8.52 Hz, CH-9), 6.86 and 6.85 (1H, dd, *J*=1.80/8.51 Hz, CH-8), 6.82 (1H, d, *J*=1.79 Hz, CH-6).

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 162.00 (C-2^I), 160.94 (C-7), 156.45 (C-2c), 152.89 (C-4), 151.54 (C-11), 139.24 (C-2), 126.79 (C-3), 125.56 (C-9), 122.35 (C-3c) 113.73 (C-8), 108.29 (C-10), 102.88 (C-6).

3.2.8. Općenita procedura za sintezu *O*-7 alkilnih derivata 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona (9a-e)

U otopinu spoja **7** (100 mg; 0,3448 mmol) u *N,N'*-dimetilformamidu (5,0 mL) dodaje se K₂CO₃ (95,31 mg; 0,6896 mmol). Reakcijska smjesa zagrije se na 100 °C i zatim se doda alkil klorid hidroklorid (0,42316 mol) te se uz miješanje ostavi preko noći. Zatim se reakcijska smjesa upari pod sniženim tlakom, a sirovi produkt pročisti kolonskom kromatografijom (DCM/MeOH = 10/1).

3.2.8.1. Etil 7-(3-(dimetilamin)propoksi)-4-okso-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-2-karboksilat (9a)



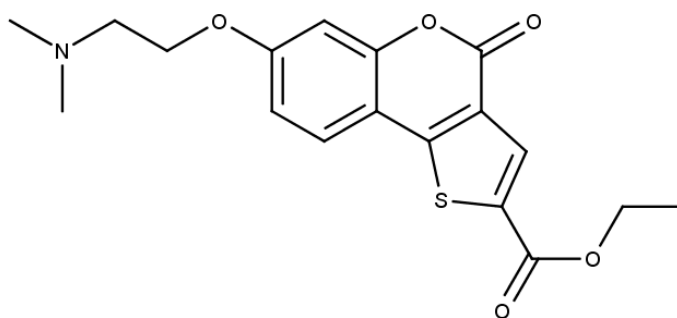
Prema općenitoj proceduri za sintezu spojeva **9a-e**, dodatkom 2-dimetilamin-1-propil klorid hidroklorida (66,9 mg; 0,42316) dobiveni su blijedo-žuti kristali (72 mg; 55,64%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm): 8.07 (1H, s, H-3), 7.95 (1H, d, *J*=8.45 Hz, H-9), 7.13 (1H, d, *J*=0.96 Hz, H-6), 7.04 and 7.02 (1H, 2xd, *J*=1.06/8.57

Hz, H-8), 4.36 (2H, q, $J=7.03$ Hz, $\text{CH}_2\text{-7}^{\text{I}}$), 4.20 (2H, t, $J=5.95$ Hz, $\text{CH}_2\text{-ester}$), 3.14 (2H, t, $J=6.53$ Hz, $\text{CH}_2\text{-7}^{\text{III}}$), 2.74 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.14 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-7}^{\text{II}}$), 1.34 (3H, t, $J=7.08$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ/ppm): 161.54 (C=O-2), 160.60 (C-7), 155.93 (C-2c), 153.15 (C=O-4), 152.44 (C-11), 132.00 (C-2), 131.60 (C-3), 125.70 (C-9), 122.77 (C-3c), 113.46 (C-8), 109.33 (C-10), 102.11 (C-6), 65.84 (C-7^I), 61.83 (C-2^I), 54.10 (C-7^{III}), 42.54 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 23.96 (C-7^{II}), 14.06 (CH_3).

3.2.8.2. Etil 7-(2-(dimetilamin)etoksi)-4-okso-4*H*-tieno[3,2-c]kromen-2-karboksilat (9b)

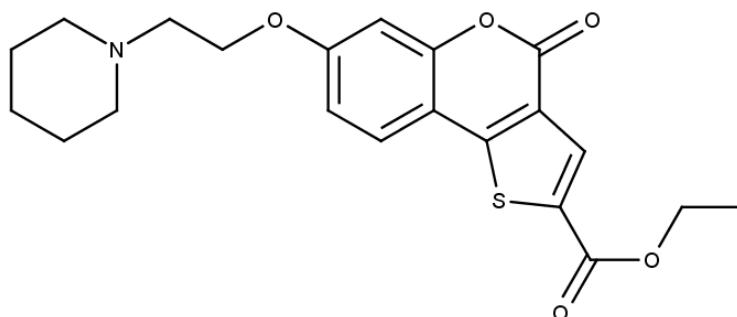


Prema općenitoj proceduri za sintezu spojeva **9a-e**, dodatkom 2-dimetilamin-1-etil klorid hidroklorida (60,95 mg; 0,42316 mmol) dobiveni su žuti kristali (70 mg; 55,18%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ/ppm): 8.08 (1H, s, H-3), 7.94 (1H, d, $J=8.74$ Hz, H-9), 7.15 (1H, d, $J=2.11$ Hz, H-6), 7.05 and 7.03 (1H, 2xd, $J=2.20/2.16$ Hz, H-8), 4.36 (2H, q, $J=7.08$ Hz, $\text{CH}_2\text{-7}^{\text{I}}$), 4.20 (2H, t, $J=5.58$ Hz, $\text{CH}_2\text{-ester}$), 2.67 (2H, t, $J=5.53$ Hz, $\text{CH}_2\text{-7}^{\text{III}}$), 2.24 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.34 (3H, t, $J=7.10$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) (δ/ppm): 161.70 (C=O-2), 160.60 (C-7), 155.95 (C-2c), 153.17 (C=O-4), 152.51 (C-11), 131.88 (C-2), 131.59 (C-3), 125.63 (C-9), 122.69 (C-3c), 113.53 (C-8), 109.16 (C-10), 102.06 (C-6), 66.27 (C-7^I), 61.80 (C-2^I), 57.11 (C-7^{II}), 45.14 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 14.06 (CH_3).

3.2.8.3. Etil 4-okso-7-(2-(piperidin-1-il)etoksi)-4*H*-tieno[3,2-c]kromen-2-karboksilat (9c)

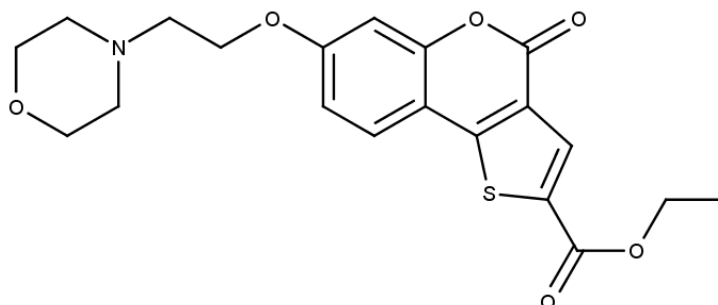


Prema općenitoj proceduri za sintezu spojeva **9a-e**, dodatkom 1-(2-kloretil) piperidin hidroklorida (77,91 mg; 0,42316 mmol) dobiveni su blijedo-žuti kristali (100 mg; 72,46%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8.06 (1H, s, H-3), 7.92 (1H, d, *J*=8.72 Hz, H-9), 7.13 (1H, d, *J*=2.05 Hz, H-6), 7.04 and 7.01 (1H, 2xd, *J*=2.13/2.13 Hz, H-8), 4.36 (2H, q, *J*=7.09 Hz, CH₂-ester), 4.25 (2H, t, *J*=5.37 Hz, 7^I), 2.81 (2H, s, 7^{II}), 2.56 (4H, s, CH₂-7^{III}), 1.54 (4H, m, 7^{IV}), 1.41 (2H, m, 7^V), 1.34 (3H, t, *J*=7.09 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162.17 (C=O-2), 161.10 (C-7), 156.46 (C-2c), 153.65 (C=O-4), 152.99 (C-11), 132.37 (C-2), 132.09 (C-3), 126.11 (C-9), 123.19 (C-3c), 114.05 (C-8), 109.66 (C-10), 102.60 (C-6), 66.49 (C-7^I), 62.30 (C-2^I), 57.19 (C-7^{II}), 54.58 (C-7^{III}), 25.55 (C-7^{IV}), 23.96 (C-7^V), 14.56 (CH₃).

3.2.8.4. Etil 7-(2-morfolinetoksi)-4-okso-4H-tieno[3,2-c]kromen-2-karboksilat (9d)

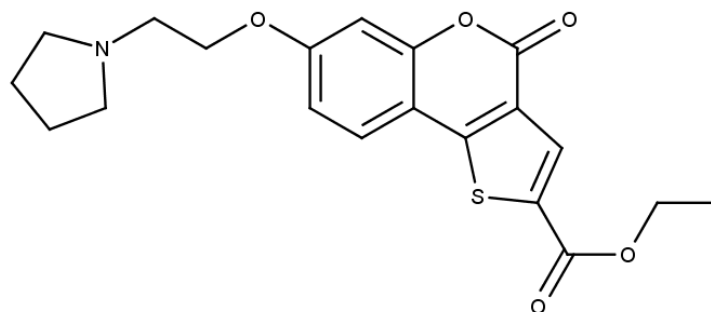


Prema općenitoj proceduri za sintezu spojeva **9a-e**, dodatkom 1-(2-kloretil) morfolin hidroklorida (78,74 mg; 0,42316 mmol) dobiveni su bijeli kristali (35 mg; 25,18%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8.08 (1H, s, CH-3), 7.93 (1H, d, *J*=8.72 Hz, CH-9), 7.16 (1H, d, *J*=2.09 Hz, CH-6), 7.06 and 7.03 (1H, 2xd, *J*=2.20/2.19 Hz, CH-8), 4.37 (2H, q, *J*=7.09 Hz, CH₂-2^{II}), 4.24 (2H, t, *J*=5.56 Hz, CH₂-7^I), 3.59 (4H, m, CH₂-7^{IV}), 2.74 (2H, t, *J*=5.48 Hz, CH₂-7^{II}), 2.51 (4H, m, CH₂-7^{III}), 1.35 (3H, t, *J*=7.09 Hz, CH₃-2^{III}).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 162.30 (C=O-2), 161.12 (C-7), 156.50 (C-2c), 153.70 (C=O-4), 153.62 (C-11), 132.41 (C-2), 132.13 (C-3), 126.15 (C-9), 123.24 (C-3c), 114.08 (C-8), 109.65 (C-10), 102.59 (C-6), 66.71 (C-7^I), 66.63 (C7^{IV}), 62.31 (C-2^I), 57.21 (C-7^{II}), 54.03 (C-7^{III}), 14.57 (CH₃).

3.2.8.5. Etil 4-okso-7-(2-(pirolidin-1-il)etoksi)-4*H*-tieno[3,2-c]kromen-2-karboksilat (9e)



Prema općenitoj proceduri za sintezu spojeva **9a-e**, dodatkom 1-(2-kloretil) pirolidin hidroklorida (71,97 mg; 0,42316 mmol) dobiveni su bijeli kristali (55 mg; 41,17%).

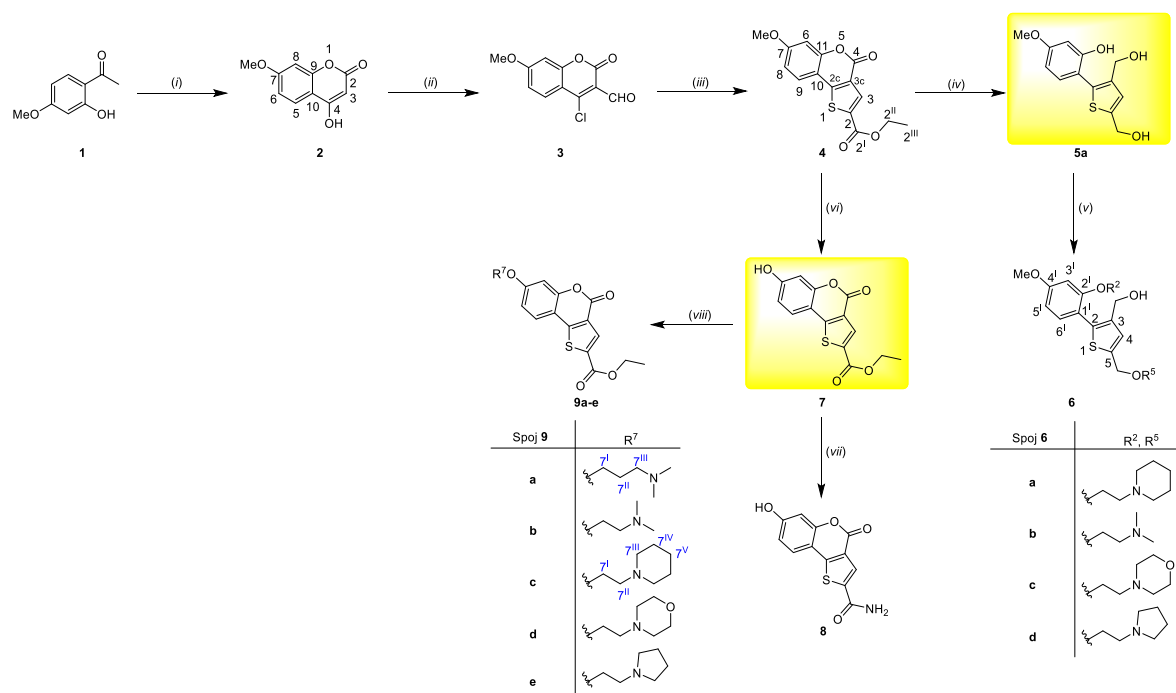
¹H-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 8.06 (1H, s, H-3), 7.92 (1H, d, *J*=8.70 Hz, H-9), 7.13 (1H, d, *J*=1.87 Hz, H-6), 7.04 and 7.02 (1H, 2xd, *J*=1.97/2.01 Hz, H-8), 4.36 (2H, q, *J*=7.08 Hz, CH₂-ester), 4.23 (2H, t, *J*=5.40 Hz, 7^I), 2.90 (2H, s, 7^{II}), 2.61 (4H, s, CH₂-7^{III}), 1.72 (4H, m, 7^{IV}), 1.34 (3H, t, *J*=7.11 Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm): 161.72 (C=O-2), 160.61 (C-7), 155.96 (C-2c), 153.18 (C=O-4), 152.52 (C-11), 131.86 (C-2), 131.60 (C-3), 125.64 (C-9), 122.69 (C-3c), 113.52 (C-8), 109.14 (C-10), 102.04 (C-6), 67.35 (C-7^I), 61.80 (C-7^{II}), 53.92 (C-7^{III}), 53.87 (C-2^I), 23.06 (C-7^{IV}), 14.06 (CH₃).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Sinteze spojeva

Sintetizirani su derivati 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona (**7-8**, **9a-e**) i derivati (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil)tiofen-2,4-di-il)dimetanola (**5**, **6a-d**) (shema 10).



Shema 10. Reagensi i reakcijski uvjeti: (i) NaH, Et₂CO₃, 85 °C, 14 sati; (ii) DMF, POCl₃, 90 °C, 16 sati; (iii) etil-2-merkptoacetat, piridin, Et₃N, 70 °C, 4 sata; (iv) LiAlH₄, THF, sobna temp., 3,5 sata; (v) alkil klorid hidroklorid, 50% NaOH, benzil trietil ammonijev klorid, toluen, 110 °C, 12 sati (vi) 1M BBr₃, CH₂Cl₂, sobna temp., 4 sata; (vii) NH₃, dioksan/metanol, sobna temp., preko noći; (viii) alkil klorid hidroklorid, K₂CO₃, DMF, 100 °C, preko noći.

4.1.1. Sinteza esterskog derivata (4)

Acilacijom 2-hidroksi-4-metoksiacetofenona (**1**) s dietilkarbonatom uz prisutnost NaH sintetiziran je 4-hidroksi-7-metoksi-2*H*-kromen-2-on (**2**). Mijenjanjem temperature i vremena reakcije dobivena su različita iskorištenja, od 74,91% do 98,13%. Najbolje iskorištenje se postiglo provođenjem reakcije pri 85 °C, 14 sati (98,13%). U drugom koraku se reakcijom POCl₃ i DMF-a u trikloretilenu dobio Vilsmeierov reagens. Vilsmeierovom reagensu je dodan spoj **2** otopljen u trikloretilenu. Nastali međuprodukt je baznom hidrolizom, s vodenom otopinom NaOAc, preveden u spoj **3**. Nedostatak ovog koraka sinteze je teško pročišćavanje kloraldehydnog derivata. Sirovi produkt se pokušao pročititi korištenjem flash i kolonske kromatografije (eluensi: DCM, petroleter:etil-acetat, diizopropil-eter:etil-acetat). Najbolje iskorištenje se postiglo provođenjem reakcije na 90 °C, 16 sati te pročišćavanjem kolonskom kromatografijom smjesom otapala petroleter:etil-acetat = 10:1 → 5:1 (72,77%). Fiessemann-ovom reakcijom spoja **3** s etil-2-merkaptacetatom u bazičnim uvjetima dobiven je tiofenski prsten. Spoj **4** fluorescira plavo pri 254 nm, a ljubičasto pri 365 nm. Prednost ove reakcije je jednostavno pročišćavanje kolonskom kromatografijom u DCM-u.

4.1.2. Redukcija estera i vezanje alkilnih lanaca

Redukcija spoja **4** s LiAlH₄ u THF-u nije proizvela željeni produkt, 2-(hidroksimetil)-7-metoksi-4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-on. Zbog visoke reaktivnosti LiAlH₄ nije se uspjela postići kemoselektivnost te je došlo do neželjene redukcije laktonskog prstena u diol (spoj **5**). Mijenjanje vremena reakcije (2 sata, 3,5 sati, 5 sati) nije promijenilo ishod. Iskorištenje je variralo od 50% do 84,07%. U literaturi je opisano nekoliko primjena uspješne redukcije estera uz očuvanje laktonskog prstena. Provođenjem

reakcije koristeći slabiji reducens NaBH_4 u MeOH, 2N HCl pri 0 °C, 5 sati ili pri pH 2-3 može se postići selektivnost ^{33,34}. Akchurin i suradnici opisali su redukciju estera uz očuvanje kumarinske jezgre u više sintetskih koraka. Ester vezan na tienokumarinsku okosnicu su preveli u kiselinu iz koje su sintetizirali anhidrid. Redukcijom anhidrida s NaBH_4 dobiven je alkohol ³⁵.

Williamsovom sintezom dodani su alkilni lanci željenih duljina na spoj **5**. NaOH je deprotonirao alkohol uz nastajanje alkoksida koji je zatim u reakciji s alkil halidom dao spoj **6**. Reakcija je provedena u uvjetima heterogene katalize koristeći fazno-prijenosni katalizator (engl. *phase transfer catalyst*), benziltriethylamonijev klorid. Spojevi **6a-d** su se pokušali pročititi korištenjem flash kromatografije, kolonske kromatografije te ekstrakcije na čvrstoj fazi (Supelco). Najbolja iskorištenja postignuta su korištenjem kolonske kromatografije. Ovisno o vezanom alkilnom lancu iznosila su od 4,96% do 13,87% no ta su iskorištenja također povezana s njihovom baznom aminskom prirodom i čvrstim vezanjem za punilo (SiO_2) u koloni.

4.1.3. Demetilacija i amonoliza

Demetilacijom spoja **4** dobiven je spoj **7** s iskorištenjem 67,57%. Korišteni dealkilirajući agens BBr_3 je jako osjetljiv na vlagu i raspada se na zraku uz stvaranje HBr ³⁶. Stoga je reakcija provedena u aprotičnom otapalu DCM-u i inertnoj atmosferi N_2 .

Reakcijom esterske skupine spoja **7** s plinovitim amonijakom uz miješanje 24 sata na sobnoj temperaturi nastaje amid (spoj **8**). Reakcija uključuje nukleofilni napad amonijaka na ester čime nastaje tetraedarski međuprodukt. Eliminacijom izlazeće skupine te deprotonacijom dobiven je spoj **8** s iskorištenjem 22,25%.

4.1.4. Vezanje alkilnih lanaca

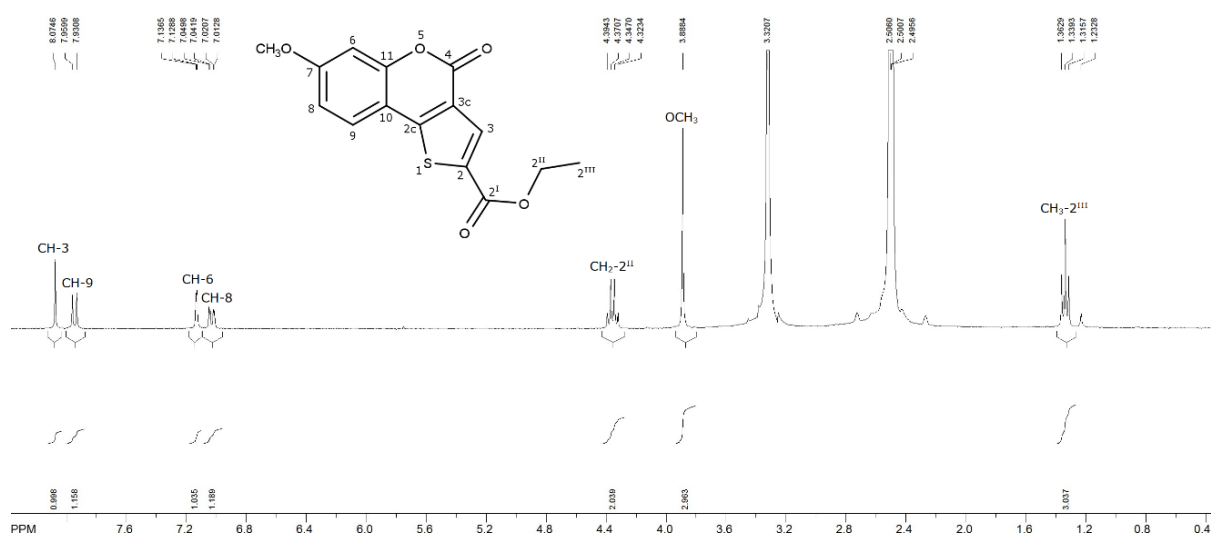
Williamsovom sintezom etera su na spoj **7** dodani alkilni lanci na hidroksilnu skupinu u položaju C-7. Za deprotonaciju alkohola korišten je K_2CO_3 . Reakcijom dobivenog alkoksida s alkil halidom dobiveni su spojevi **9a-e** s iskorištenjima od 25,18% do 72,46%, ovisno o korištenom alkil halidu.

4.2. Karakterizacija pripremljenih spojeva

4.2.1. Analiza 1H NMR spektara

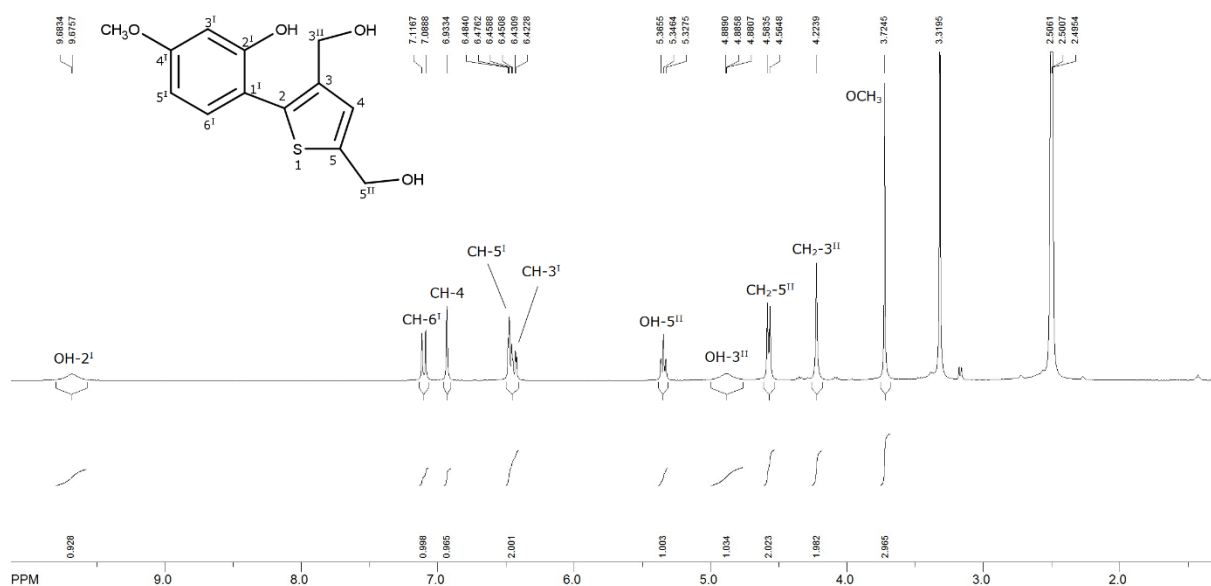
Spektri svih spojeva sadrže karakteristične signale za protone aromatskih heterocikala pri 6-9 ppm i metoksi skupine pri 3-4 ppm. Usporedbom 1H NMR spektara spoja **2** i spoja **3**, može se uočiti da u spektru spoja **3** izostaje signal za proton hidroksilne skupine u položaju 4 (12.38 ppm) i signal za proton CH-3 (5.46 ppm), a prisutan je signal za proton aldehidne skupine CHO (9.80 ppm). Time je potvrđena uspješnost Vilsmeier–Haack-ove reakcije, odnosno, nastajanje aldehida u položaju C-3 i kloriranje položaja C-4.

U aromatskom području spektra spoja **4** pored signala protona kumarinske okosnice (CH-6, CH-8, CH-9) prisutan je i dodatni signal (CH-3, 8.07 ppm), što ukazuje na nastanak novog aromatskog prstena, tiofena. Pikovi karakterističnih kemijskih pomaka metilenske i metilne skupine etil-estera vezanog za tiofenski prsten u položaju 5 nalaze se na 4.36 (CH_2-2^{II}) i 1.34 (CH_3-2^{III}) ppm (slika 9).



Slika 9. ^1H NMR spektar spoja **4**.

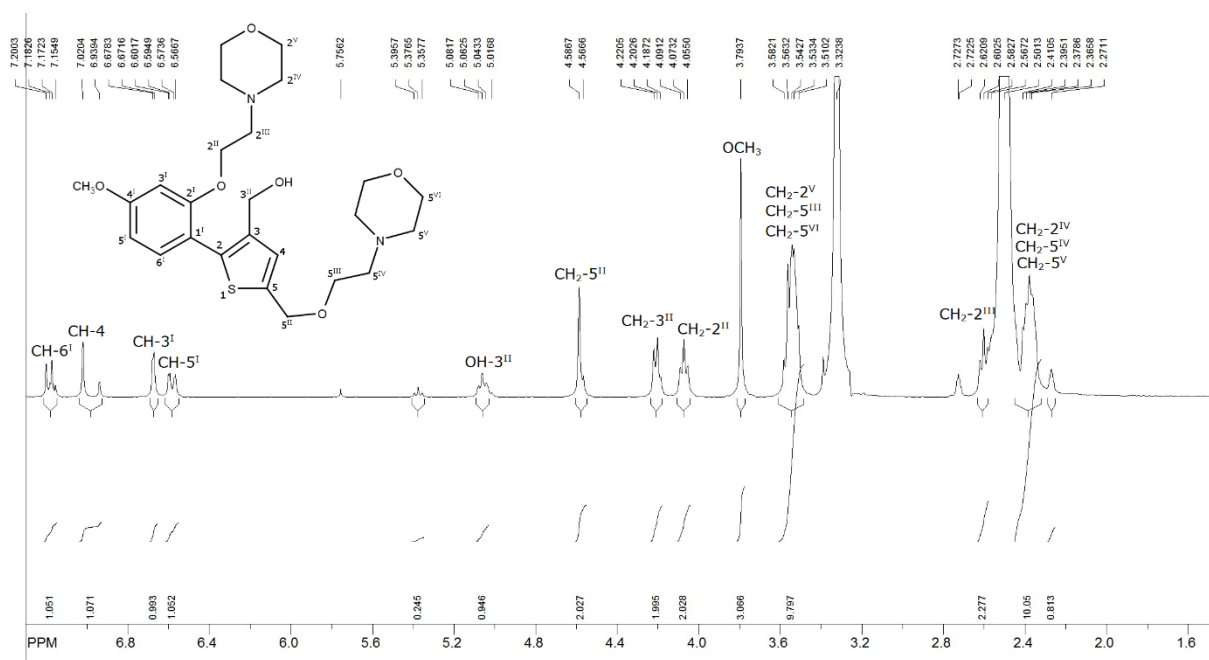
Spektar spoja **5** pokazuje signale protona triju različitih hidroksilnih skupina i signal protona za CH₂-3^{II} čime je potvrđeno da je uz redukciju estera došlo i do otvaranja laktonskog prstena i nastajanja diola (slika 10).



Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **5**.

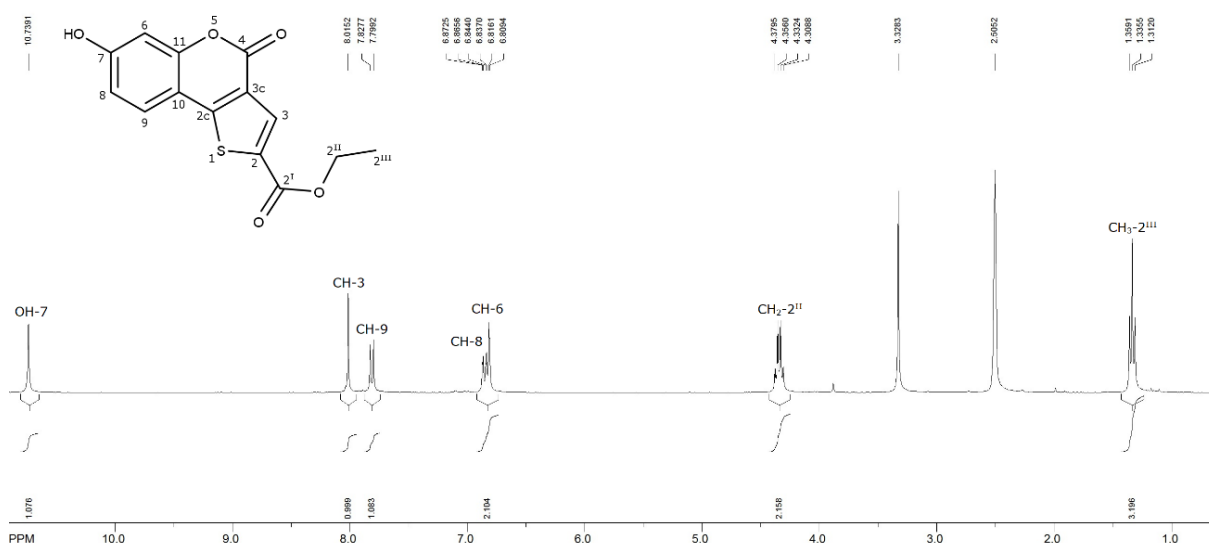
U spektrima spojeva **6a-d** izostaju signali za protone hidroksilnih skupina OH-2^I (9.68 ppm) i OH-5^{II} (5.35 ppm), čime je potvrđeno istodobno vezanje

alkilnih lanaca u dva položaja (slika 10). Primjer ^1H NMR spektra spoja **6c** koji to potvrđuje prikazan je na slici 11.



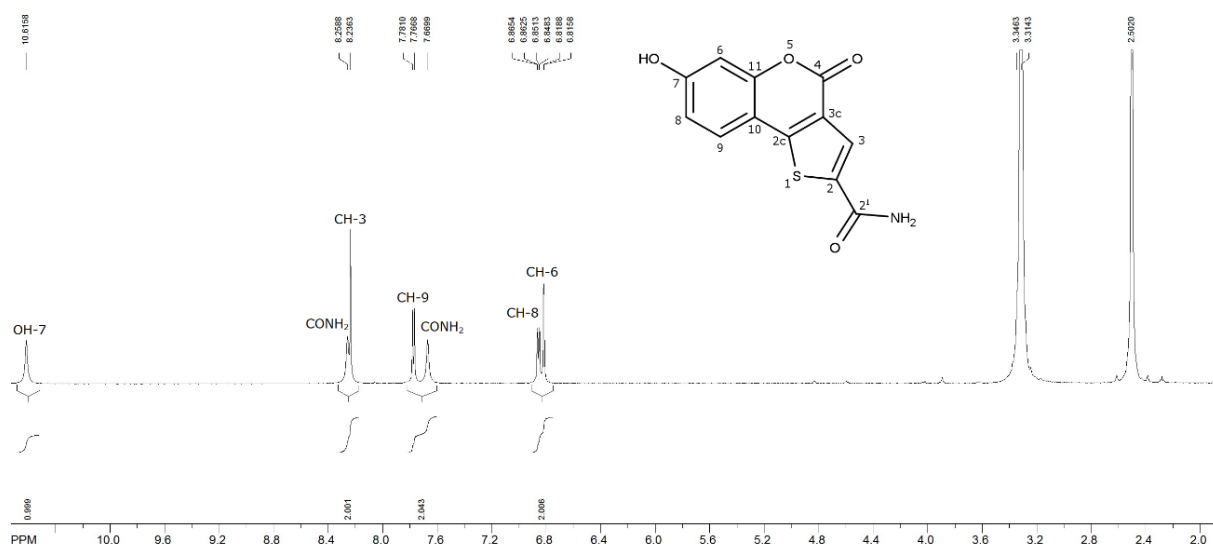
Slika 11. ^1H NMR spektar spoja **6c**.

Demetilacijom spoja **4** gubi se signal za protone OCH_3 skupine (3.89 ppm) te nastaje signal za proton OH -7 skupine na 10.74 ppm što se vidi u spektru spoja **7** (Slika 12).



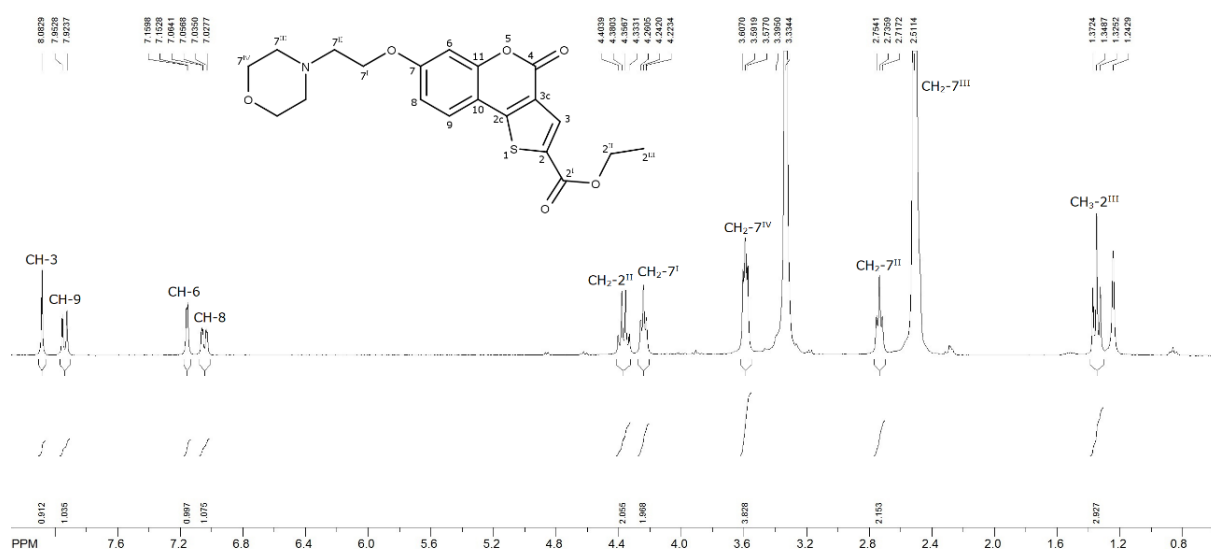
Slika 12. ^1H NMR spektar spoja **7**.

Amonolizom estera (**7**) nastaje amid (**8**), nestaju signali protona etil-esterske skupine vezane za tiofenski prsten ($\text{CH}_2\text{-}2^{\text{II}}$ (4.34 ppm) i $\text{CH}_3\text{-}2^{\text{III}}$ (1.34 ppm)) i nastaju 2 nova signala protona amino skupine CONH_2 na 8.26 i 7.67 ppm (Slika 13).



Slika 13. ^1H NMR spektar spoja **8**.

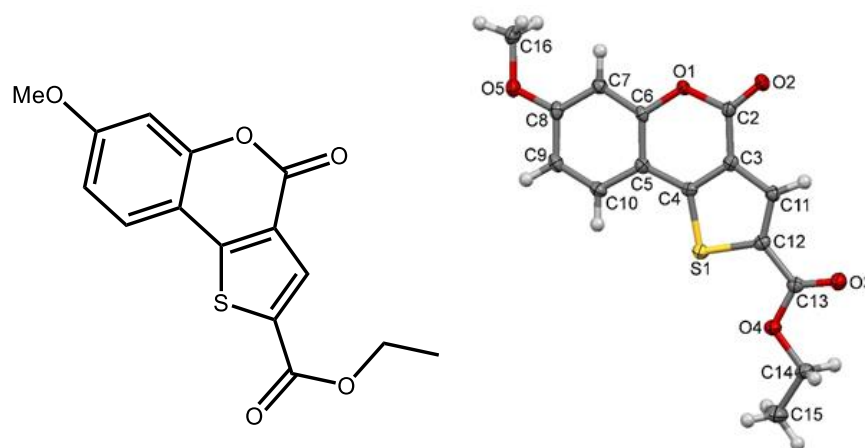
U spektrima spojeva **9a-e** izostaje signal za proton OH-7 (10.74 ppm) te nastaju dodatni signali protona vezanih alkilnih lanaca, čime je potvrđena uspješnost Williamsove sinteze etera. Primjer ^1H NMR spektra spoja **9d** koji to potvrđuje prikazan je na slici 14.



Slika 14. ^1H NMR spektar spoja **9d**.

4.2.2. Molekulska i kristalna struktura tieno[3,2-c]kromenskog derivata (**4**)

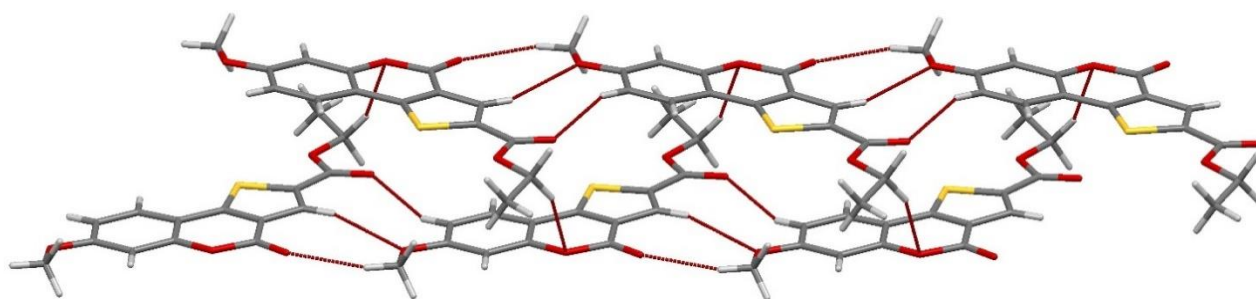
U spoju **4**, etil karboksilatna skupina vezana je za tienilni, a metoksi skupina vezana je za fenilni prsten tieno[3,2-c]kromenske okosnice (slika 15).



Slika 15. Molekulska struktura spoja **4** sa numeriranim atomima.

Cijela molekula je u biti planarna. Najveće odstupanje od središnje ravnine koju definiraju atomi koji nisu vodikovi atomi pokazuje terminalni C16 atom metoksi skupine i ona iznosi 0.215(2) Å. Samo je jedna slična struktura objavljena do sada u literaturi, u kojoj su metil karboksilatna i trifluormetilna skupina vezane za ugljikov atom tienilne skupine ³⁷. Duljine veza i kutovi u spoju **4** su standardni i ne pokazuje neočekivane vrijednosti, te su vrlo slični ekvivalentnim kutovima strukturno srodnih spojeva. Sumporov S1 atom tienilnog prstena i kisikov atom O4 etil karboksilatne skupine su *antiperiplanarni*; diedarski kut S1–C12–C13–O3 iznosi –179.86(14)°.

Molekula **4** se vodikovim vezama C9–H9···O3, C16–H16B···O2 i C11–H11···O5 udružuje u dimere (slika 12). Bočnim vezanjem prstenova sa tri vodikove veze nastaju $R_2^2(8)$ and $R_2^2(9)$ sustavi ³⁸ te se molekule međusobno povezuju u vrpce. Četvrtom vodikovom vezom C14–H14B···O1, međusobno se povezuju susjedne vrpce, te nastaju tubularne dvo-vrpčaste strukture (slika 16).

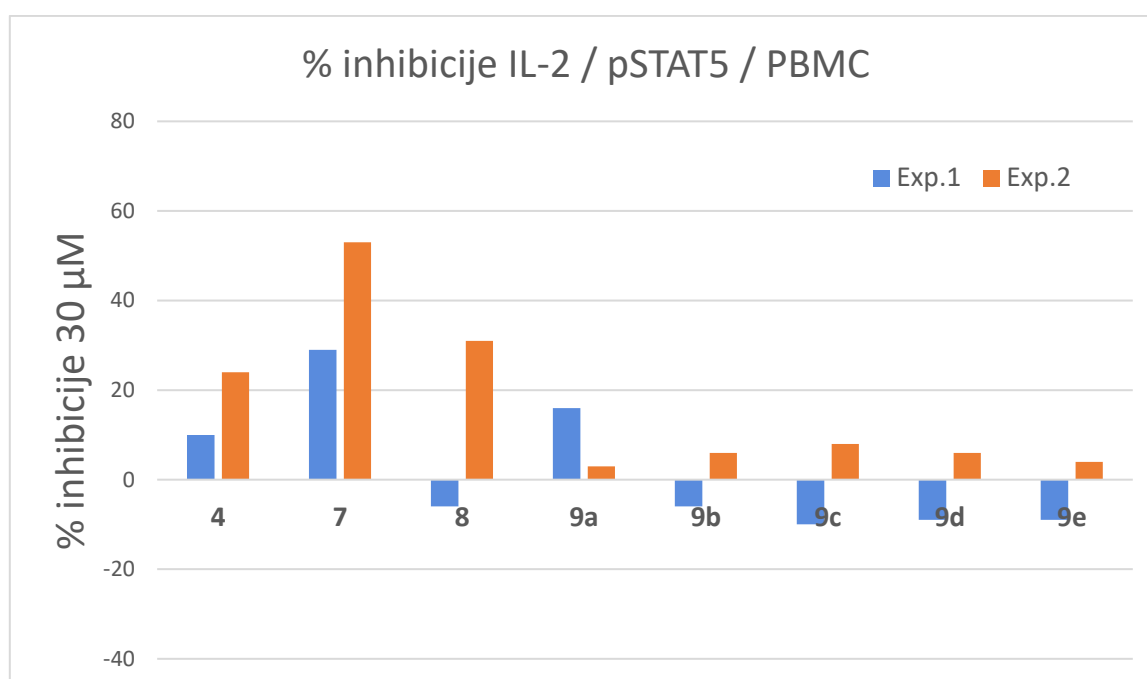


Slika 16. Dio kristalne strukture spoja **4**, u kojoj se vidi tubularna dvo-vrpčasta struktura koja je uzrokovana četvrtom C–H···O vodikovom vezom.

4.3. Ispitivanje protuupalne učinkovitosti in vitro

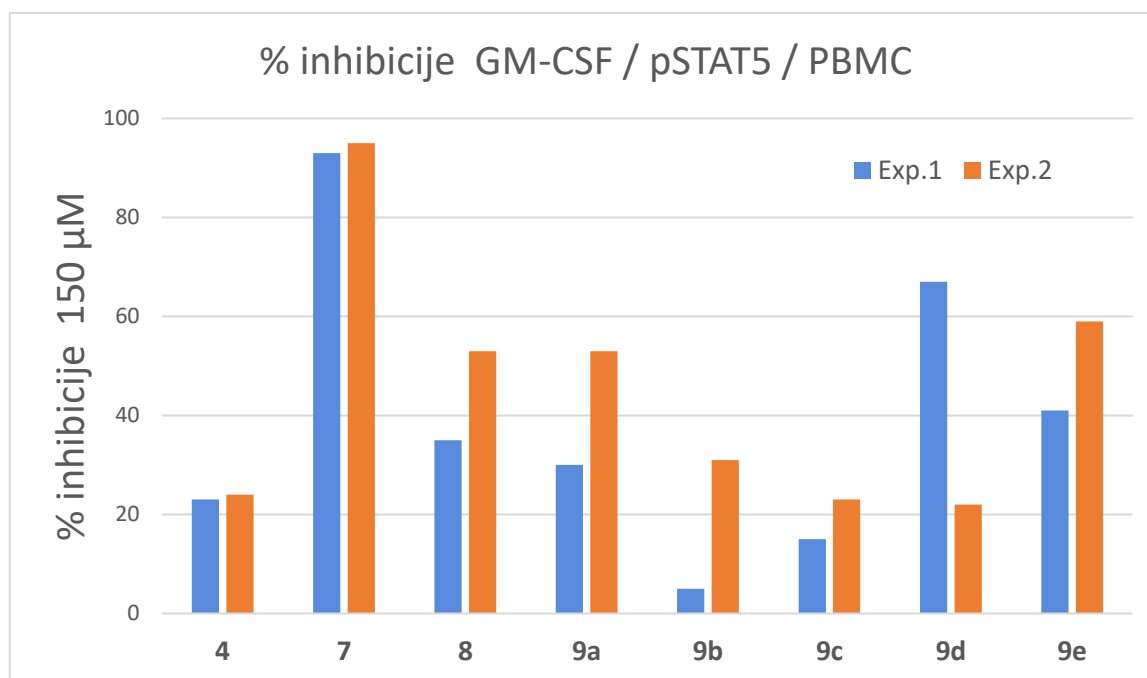
Ispitana je protuupalna učinkovitost *in vitro* spojeva **4**, **7**, **8** i **9a-e** mjerenjem inhibicije fosforilacije različitih proteina STAT koji su dio JAK/STAT signalnog puta.

1) Ispitana je inhibicijska moć spojeva **4**, **7**, **8**, **9a-e** koncentracije 30 μM na proces fosforilacije STAT5 iniciran IL-2 u mononuklearnim stanicama periferne krvi (IL-2 / STAT5 / PBMC) u dva zasebna eksperimenta.



Slika 17. Inhibicija fosforilacije STAT5 inicirana IL-2 u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Koncentracije spojeva 30 μM . Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dva zasebna eksperimenta.

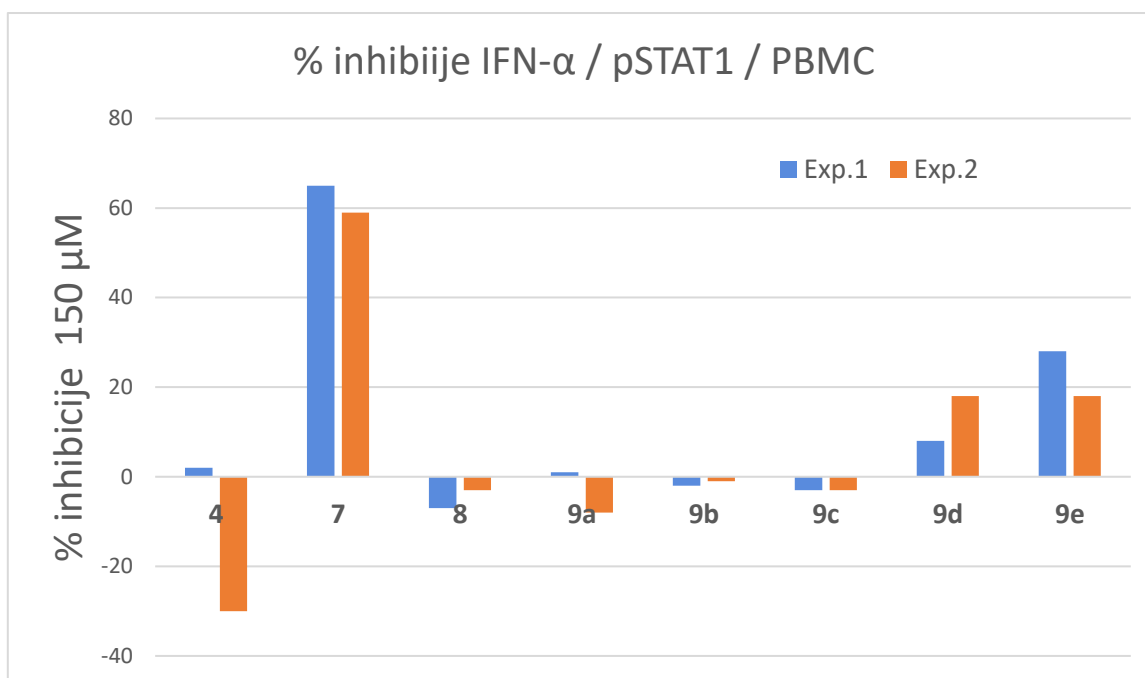
2) Ispitana je inhibicijska moć spojeva **4**, **7**, **8**, **9a-e** koncentracije 150 μM na proces fosforilacije STAT5 iniciran GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (GM-CSF / STAT5 / PBMC) u dva zasebna eksperimenta.



Slika 18. Inhibicija fosforilacije STAT5 inicirana GM-CSF u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Koncentracije spojeva 150 μ M. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dva zasebna eksperimenta.

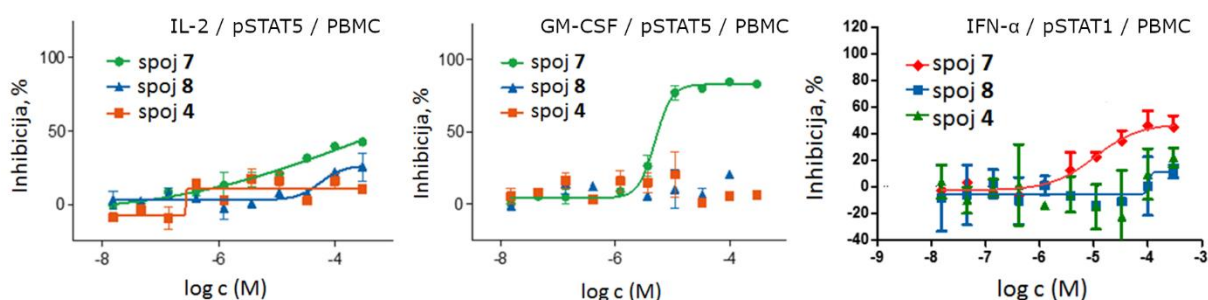
3) Ispitana je inhibicijska moć spojeva **4, 7, 8, 9a-e** koncentracije 150 μ M na proces fosforilacije STAT1 iniciran IFN- α u mononuklearnim stanicama periferne krvi (IFN- α / STAT1 / PBMC).

Kao i u slučaju inhibicije fosforilacije STAT5 inicirane IL-2 ili GM-CSF, jedino je spoj **7** pokazao značajniju inhibiciju fosforilacije STAT1 inicirane sa IFN- α (slika 19).



Slika 19. Inhibicija fosforilacije STAT1 inicirana IFN- α u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Koncentracija spojeva 150 μ M. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dva zasebna eksperimenta.

Spoj **7** je pokazao najbolja inhibitorna svojstva na fosforilaciju STAT5 iniciranu sa GM-CSF (IC_{50} 5,0 μ M). Također je djelovao inhibitorno ali u manjem obimu na proces fosforilacije STAT5 inicirane IL-2 (IC_{50} 49.5 μ M), i fosforilacije STAT1 inicirane sa IFN- α (IC_{50} 10.5 μ M).

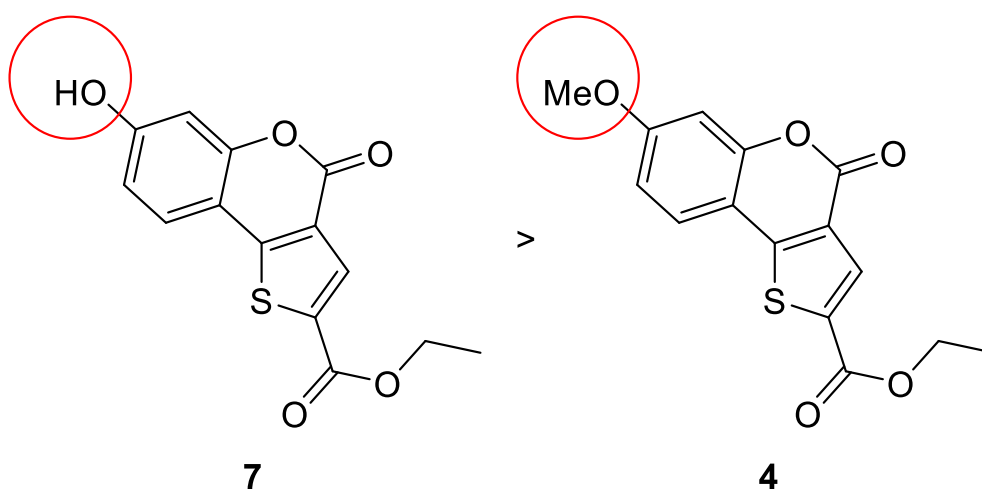


Slika 20. Krivulje reakcija inhibicije spojevima **4**, **7** i **8** na procese fosforilacije STAT1 i STAT5.

Tablica 1. Vrijednosti inhibitornih koncentracija spojeva **4**, **7**, **8**.

	IL-2		GM-CSF		IFN-α	
SPOJ	IC₅₀/nM	pIC₅₀	IC₅₀/nM	pIC₅₀	IC₅₀/nM	pIC₅₀
4	>300000	<3,5	>300000	<3,5	>300000	<3,5
7	49490	4,3	5016	5,3	10510	5,0
8	>300000	<3,5	>300000	<3,5	>300000	<3,5
Tofacitinib	44	7,4	194	6,7	35	7,5
Baricitinib	27	7,6	26	7,6	11	8,0

Usporedbom strukturnih karakteristika spoja **4** i **7** (slika 21) može se zaključiti da hidroksilna skupina na benzenskom prstenu značajno doprinosi aktivnosti. Prevođenjem metoksi skupine u položaju 7 u hidroksilnu skupinu protuupalna učinkovitost značajno raste.



Slika 21. Usporedba kemijskih struktura spojeva **4** i **7**.

5. Zaključak

U ovom istraživanju sintetizirani su derivati 4*H*-tieno[3,2-*c*]kromen-4-ona (**7-8**, **9a-e**) i derivati (5-(2-hidroksi-4-metoksifenil) tiofen-2,4-di-il)dimetanola (**5**, **6a-d**). Početni spoj ove sinteze, 2-hidroksi-4-metoksiacetofenon (**1**), preveden je u ester (**4**) u 3 koraka. Postupak uključuje acilaciju s dietilkarbonatom, Vilsmeier–Haack-ovu reakciju te Fiessemann-ovu sintezu tiofena. Redukcijom spoja **4** s LiAlH₄ došlo je do otvaranja laktonskog prstena te je dobiven diol (**5**). U drugom sintetskom putu provedena je demetilacija estera s BBr₃ čime je dobiven spoj **7**. Reakcijom esterske skupine spoja **7** s plinovitim amonijakom dobiven je amid (**8**). U završnom su koraku sinteze na spojeve **5** i **7** dodani alkilni lanci Williamsovom sintezom etera čime su sintetizirani spojevi **6a-d** te **9a-e**.

Strukture svih pripremljenih spojeva potvrđene su ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom, a spoja **7** također i masenom spektrometrijom. Kristalna i molekulska struktura spoja **4** određena je metodom rendgenske difrakcije. Molekule spoja **4** se povezuju vodikovim vezama te nastaju tubularno dvo-vrpčaste strukture.

Ispitani su inhibitorni učinci spojeva **4**, **7**, **8** i **9a-e** na proces fosforilacije proteina STAT1 i STAT5 koji su dio JAK/STAT signalnog puta. STAT5 je iniciran IL-2 i GM-CSF, a STAT1 IFN-α u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Najbolje inhibitorne učinke na fosforilaciju oba proteina pokazao je spoj **7**.

Bilo bi svrhovito u budućim eksperimentima provjeriti da li se inhibitorna aktivnost spoja **7** dodatno povećava prevođenjem esterske skupine na tiofenskom prstenu u alkoholnu. Također valjalo bi testirati fenil-tiofenske spojeve (**5**, **6a-d**) kako bi provjerili da li, i kako, otvaranje laktonskog prstena utječe na protuupalnu aktivnost.

6. Literatura

1. Bansal, Y., Sethi, P. & Bansal, G. Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. *Med. Chem. Res.* **22**, 3049–3060 (2013).
2. Lawrence, T. & Gilroy, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution?: The resolution of inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* **88**, 85–94 (2006).
3. Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H. & Benveniste, E. N. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clin. Immunol.* **189**, 4–13 (2018).
4. Rawlings, J. S. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 1281–1283 (2004).
5. Seif, F. *et al.* The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun. Signal.* **15**, (2017).
6. Cornez, I., Yajnanarayana, S. P., Wolf, A. M. & Wolf, D. JAK/STAT disruption induces immuno-deficiency: Rationale for the development of JAK inhibitors as immunosuppressive drugs. *Mol. Cell. Endocrinol.* **451**, 88–96 (2017).
7. Banerjee, S., Biehl, A., Gadina, M., Hasni, S. & Schwartz, D. M. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs* **77**, 521–546 (2017).
8. Kiu, H. & Nicholson, S. E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* **30**, 88–106 (2012).
9. Arora, R. K., Kaur, N., Bansal, Y. & Bansal, G. Novel coumarin–benzimidazole derivatives as antioxidants and safer anti-inflammatory agents. *Acta Pharm. Sin. B* **4**, 368–375 (2014).
10. Revankar, H. M., Bukhari, S. N. A., Kumar, G. B. & Qin, H.-L. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. *Bioorganic Chem.* **71**, 146–159 (2017).
11. Drug Innovation - Novel Drug Approvals for 2018. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm592464.htm>. (Accessed: 30th August 2018)
12. Navnath Sangshetti, J., Zambare, A., Khan, F., Zambare, S. & Shinde, S. ChemInform Abstract: Recent Advances in the Synthesis of

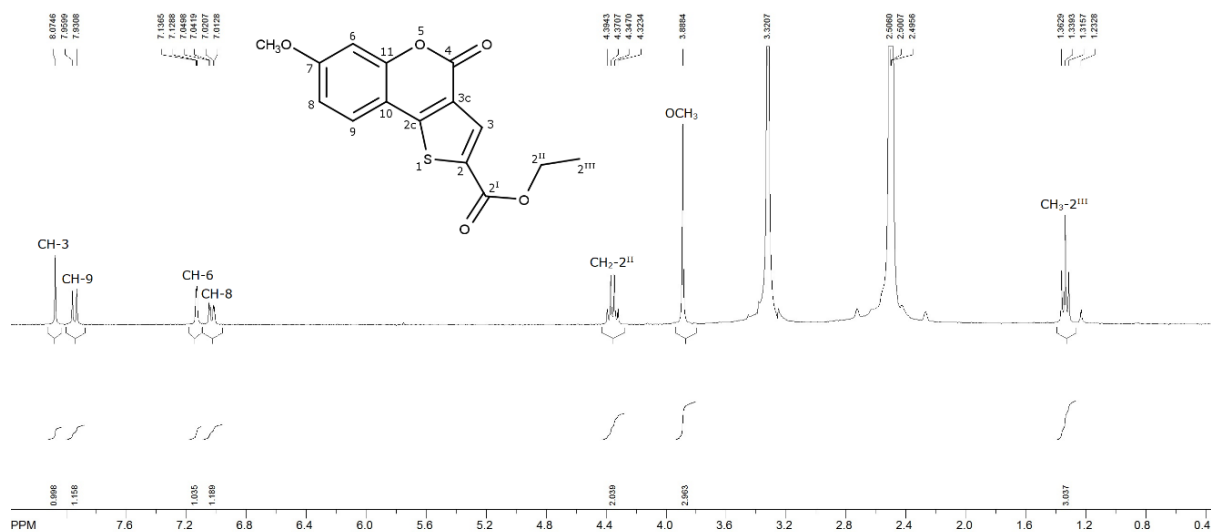
Coumarin Derivatives via Pechmann Condensation. *ChemInform* **47**, (2016).

13. Matos, M. J. *et al.* Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. in *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* (eds. Rao, A. V. & Rao, L. G.) (InTech, 2015). doi:10.5772/59982
14. Majouli, K., Hamdi, A., Abdelhamid, A., Bouraoui, A. & Kenani, A. Anti-inflammatory activity and gastroprotective effect of *Hertia cheirifolia* L. roots extract. *J. Ethnopharmacol.* **217**, 7–10 (2018).
15. Zeng, K.-W. *et al.* Anti-Neuroinflammatory Effect of MC13, a Novel Coumarin Compound From Condiment *Murraya*, Through Inhibiting Lipopolysaccharide-Induced TRAF6-TAK1-NF- κ B, P38/ERK MAPKS and Jak2-Stat1/Stat3 Pathways: ANTI-NEUROINFLAMMATORY EFFECT OF MC13. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1286–1299 (2015).
16. Zhou, Y. *et al.* Bergapten prevents lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells through suppressing JAK/STAT activation and ROS production and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *Int. Immunopharmacol.* **48**, 159–168 (2017).
17. Hung, W.-L., Suh, J. H. & Wang, Y. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J. Food Drug Anal.* **25**, 71–83 (2017).
18. Guo, L. & Yamazoe, Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacol Sin* **8** (2004).
19. Kim, J.-K. *et al.* Scoparone Exerts Anti-Tumor Activity against DU145 Prostate Cancer Cells via Inhibition of STAT3 Activity. *PLoS ONE* **8**, e80391 (2013).
20. Alonso, M. M. *et al.* Coumarins and metabolic syndrome: Brief Report. **5**, 20 (2017).
21. Majumder, S., Majumder, P. L., Majumder, S. & Majumder, P. L. Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde and a Novel Synthesis of 1,1-diphenyl-2(2'-hydroxyphenyl) ethene from O- α,α -diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N. *2007 Vol 0 Page 1* **0**, 1 (2007).
22. Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L. & Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **12**, 887–916 (2005).
23. Musa, M.A. Applications of the Baylis-Hillman reaction in the synthesis of coumarin derivatives. (2003).

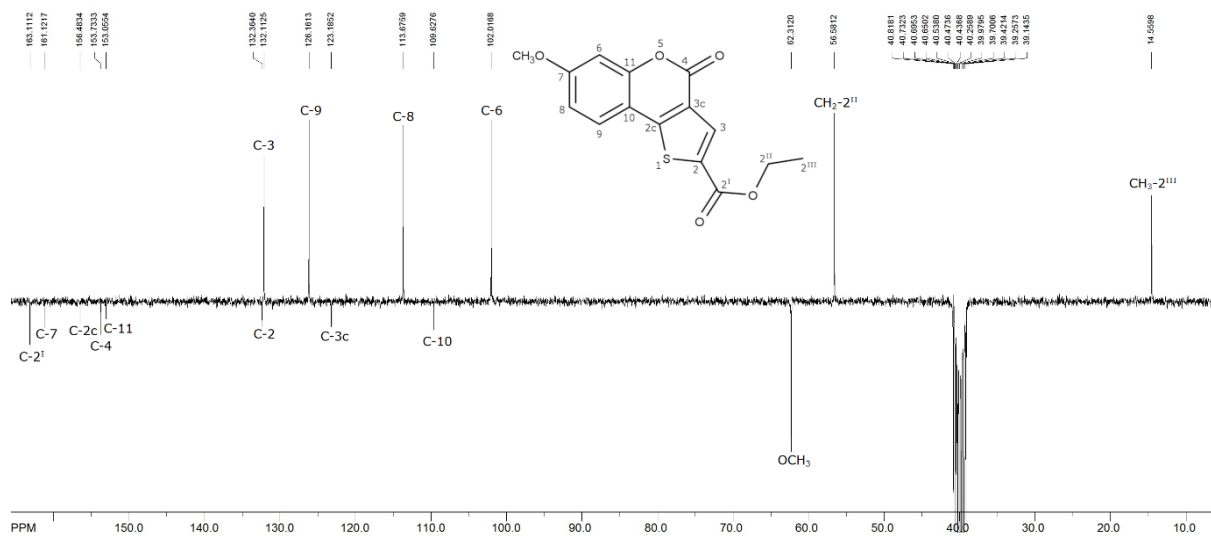
24. Daru, J. & Stirling, A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. *J. Org. Chem.* **76**, 8749–8755 (2011).
25. Maheswara, M., Siddaiah, V., Damu, G. L. V., Rao, Y. K. & Rao, C. V. A solvent-free synthesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. *J. Mol. Catal. Chem.* **255**, 49–52 (2006).
26. Kumar, K., Nagamallu, R., Pavithra, G. & Govindappa, V. K. Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *J Chem Pharm Res* **2015**, 67–81 (2015).
27. Smith, M. & March, J. *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. (Wiley-Interscience, 2007).
28. Mishra, R. & Sharma, P. K. A Review on Synthesis and Medicinal Importance of Thiophene.
29. Mishra, R., Tomar, I., Singhal, S. & K. Jha, K. Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review. *Pharma Chem.* **3**, 38–54 (2011).
30. Bogza, Y. P., Katsiel', A. L., Sharypova, A. N., Tolstikova, T. G. & Fisyuk, A. S. Synthesis and Biological Activity of 4H-Thieno[3,2-c]Chromene Derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **50**, 1712–1718 (2015).
31. Gramec, D., Peterlin Mašič, L. & Sollner Dolenc, M. Bioactivation Potential of Thiophene-Containing Drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1344–1358 (2014).
32. *Name reactions in heterocyclic chemistry*. (Wiley-Interscience, 2005).
33. Sodium Borohydride Digest | Sodium Hydroxide | Alcohol. *Scribd* Available at: <https://www.scribd.com/document/326437122/Sodium-Borohydride-Digest>. (Accessed: 25th September 2018)
34. C. P., P. *et al.* Stabilization of NaBH₄ in Methanol Using a Catalytic Amount of NaOMe. Reduction of Esters and Lactones at Room Temperature without Solvent-Induced Loss of Hydride. *J. Org. Chem.* **83**, 1431–1440 (2018).
35. Akchurin, I. O., Yakhutina, A. I., Bochkov, A. Y., Solovjova, N. P. & Traven, V. F. Synthesis of novel push-pull fluorescent dyes – 7-(diethylamino)furo[3,2-c]coumarin and 7-(diethylamino)thieno[3,2-c]coumarin derivatives. *Heterocycl. Commun.* **24**, 85–91 (2018).
36. Suzuki, A., Hara, S. & Huang, X. Boron Tribromide. in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (American Cancer Society, 2006). doi:10.1002/047084289X.rb244.pub2

37. Iaroshenko, V. O. *et al.* 4-Chloro-3-(trifluoroacetyl)- and 4-chloro-3-(methoxalyl)coumarins as novel and efficient building blocks for the regioselective synthesis of 3,4-fused coumarins. *Tetrahedron* **67**, 7946–7955 (2011).
38. Bernstein, J., E. Davis, R., Shimon, L. & Chang, N.-L. Patterns in Hydrogen Bonding: Functionality and Graph Set Analysis in Crystals. *Angew. Chem.-Int. Ed. - ANGEW CHEM INT ED* **34**, 1555–1573 (1995).

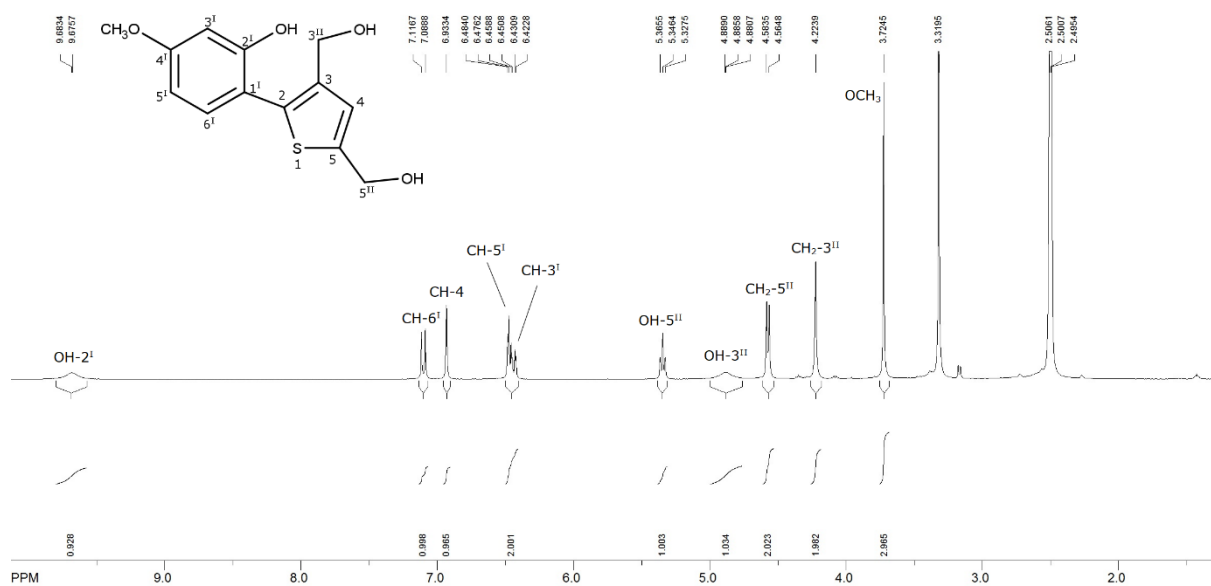
7. Prilozi



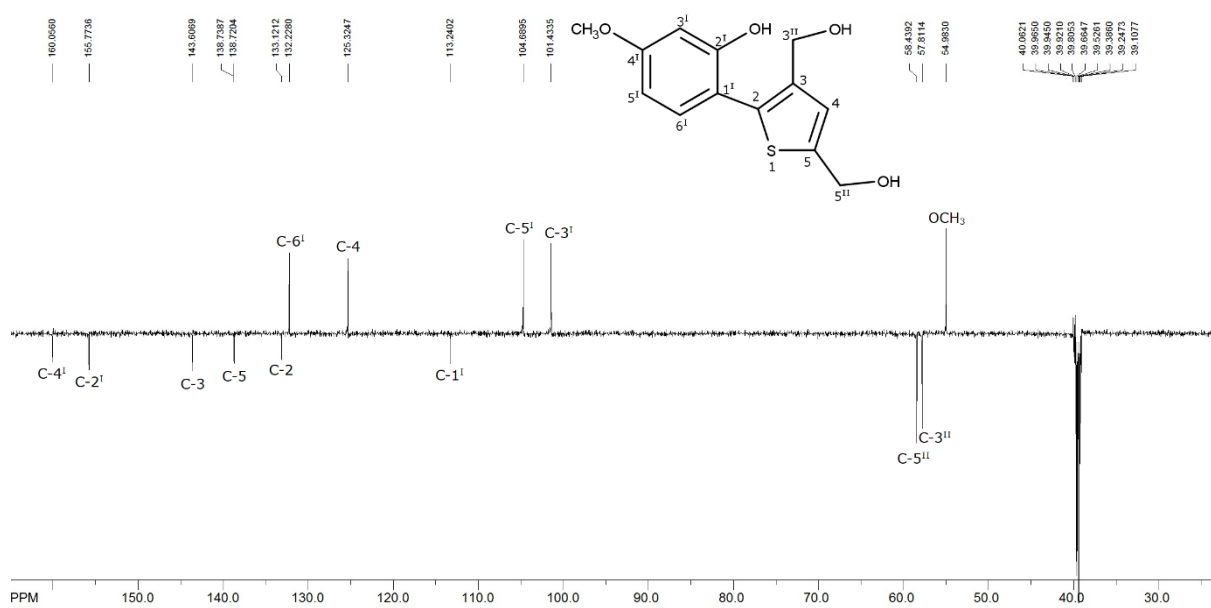
Slika 22. ¹H NMR spektar spoja **4**.



Slika 23. ¹³C NMR spektar spoja **4**.

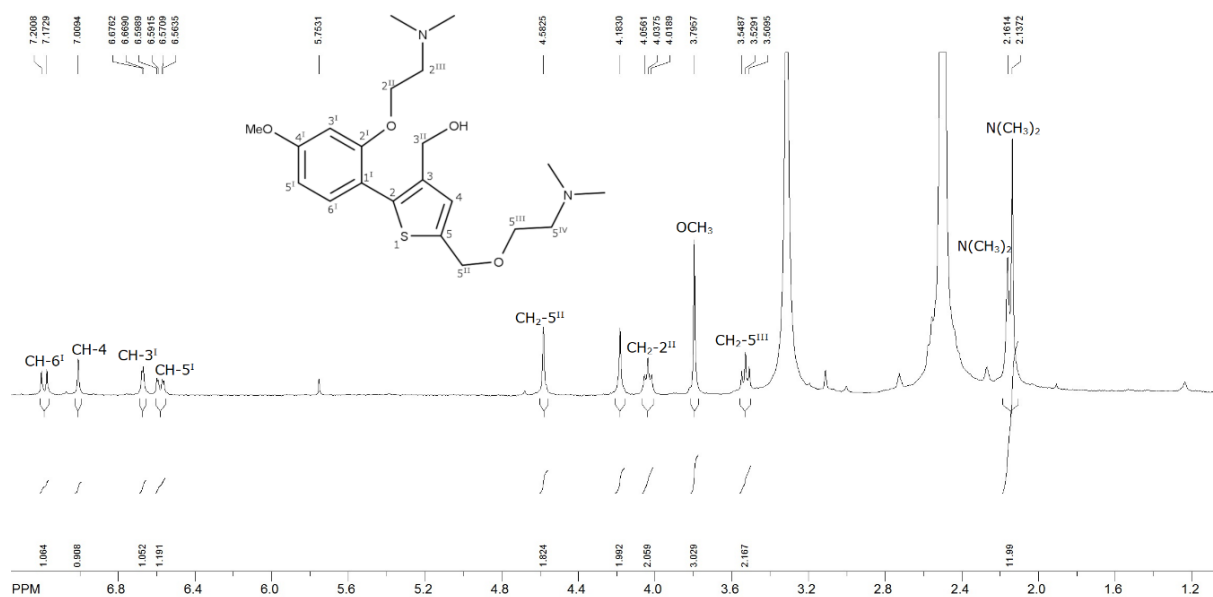


Slika 24. ¹H NMR spektar spoja **5**.

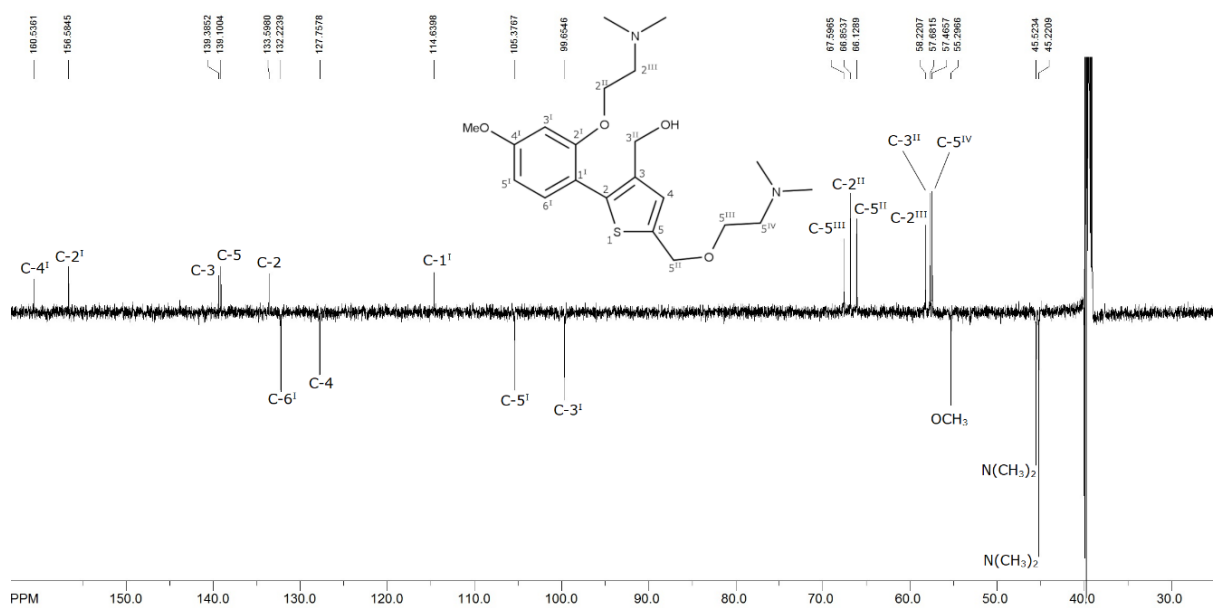


Slika 25. ¹³C NMR spektar spoja **5**.

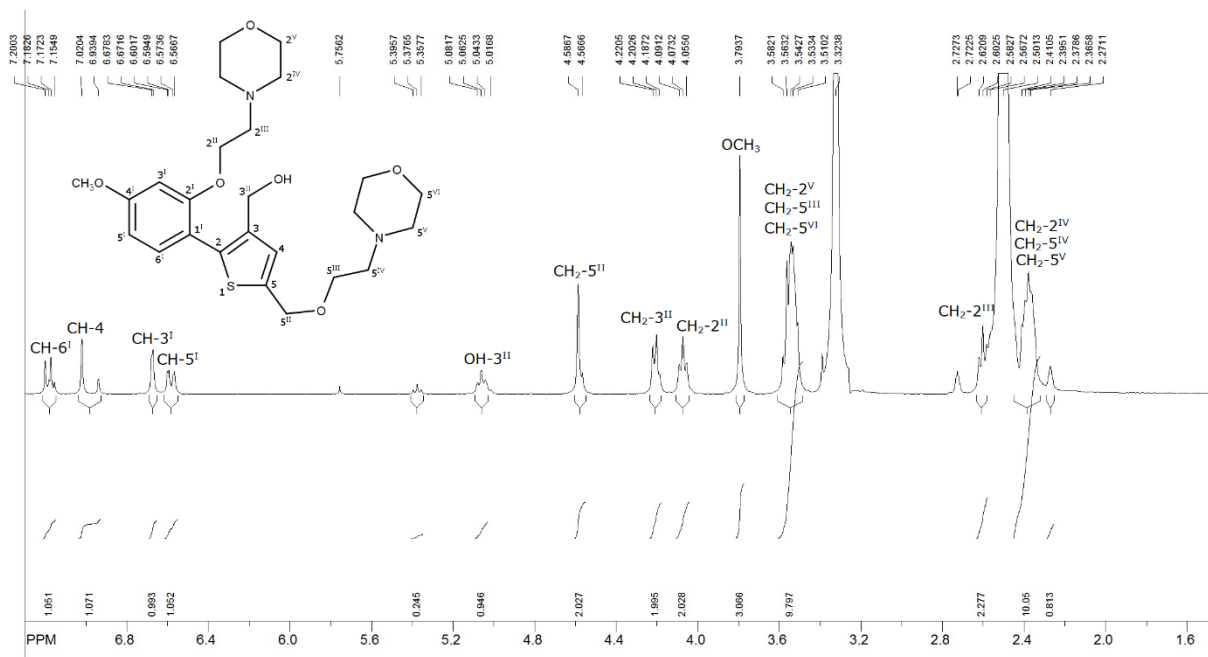




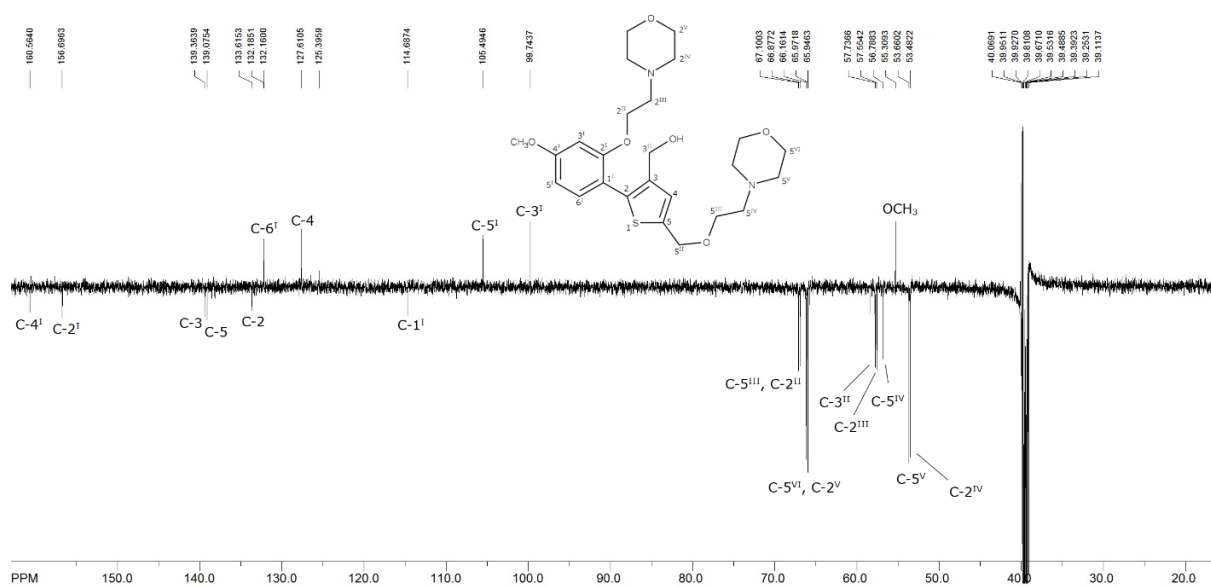
Slika 28. ¹H NMR spektar spoja **6b**.



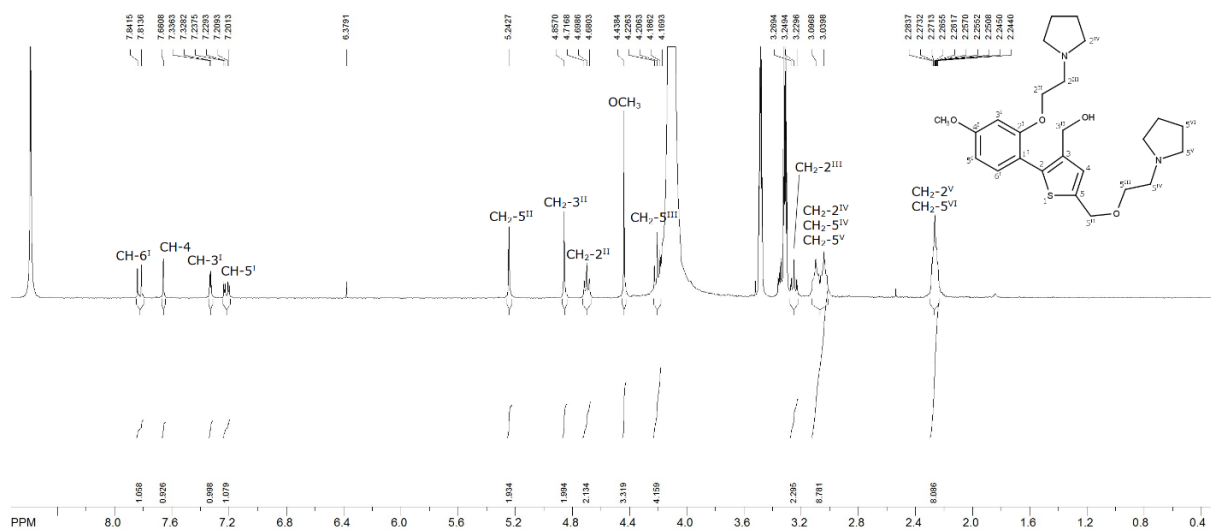
Slika 29. ¹³C NMR spektar spoja **6b**.



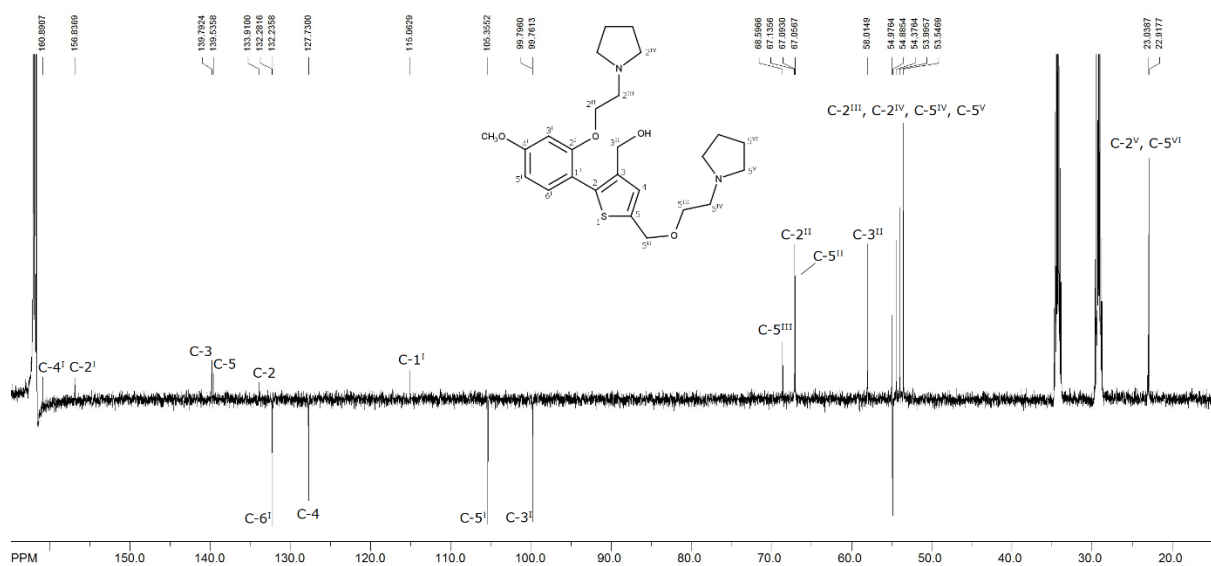
Slika 30. ¹H NMR spektar spoja **6c**.



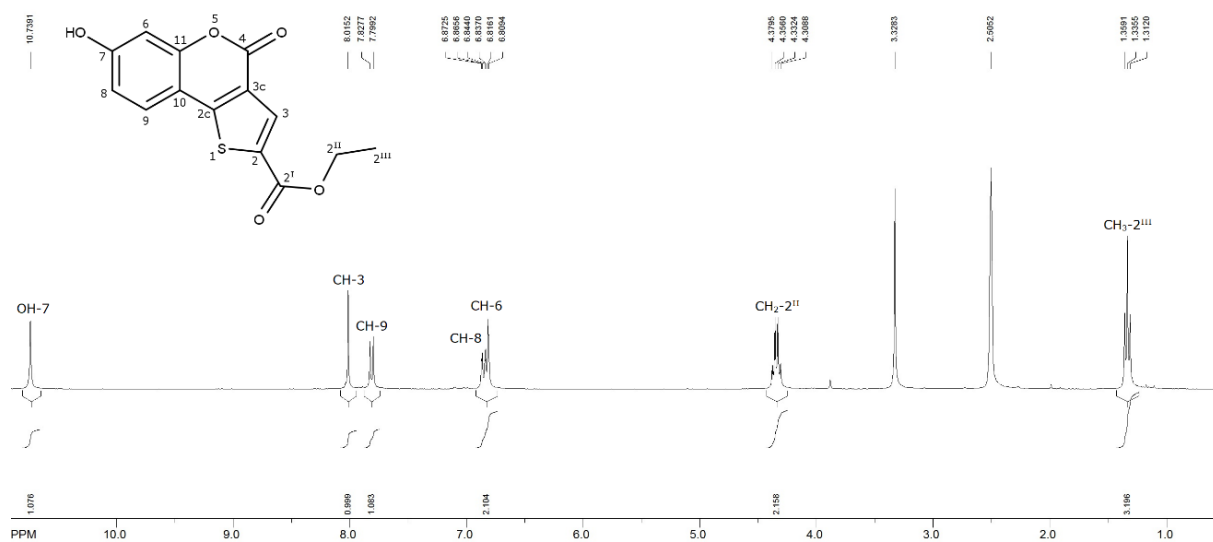
Slika 31. ¹³C NMR spektar spoja **6c**.



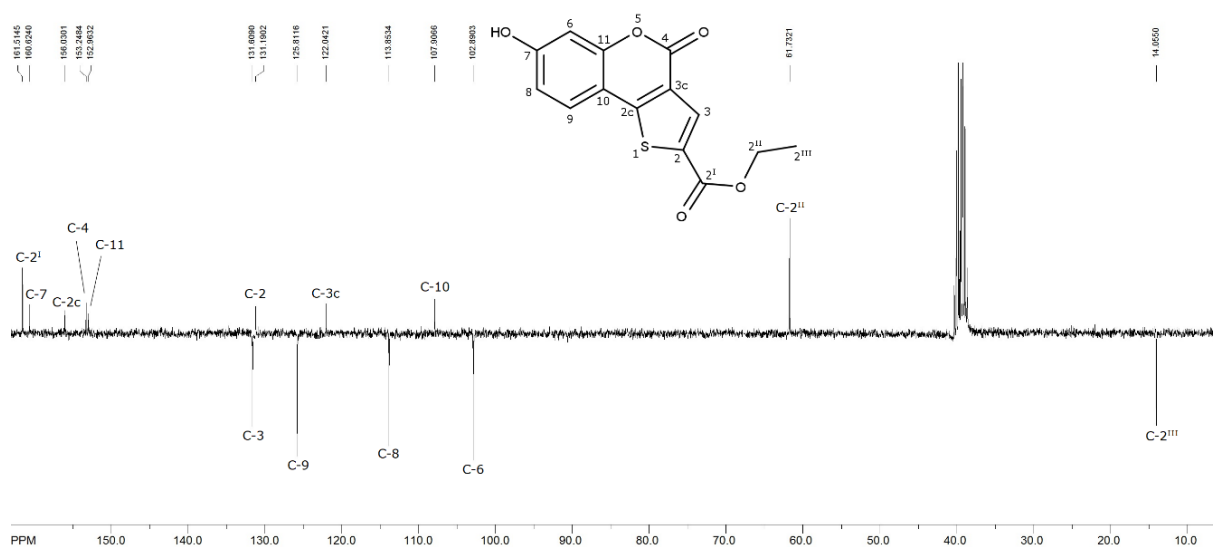
Slika 32. ^1H NMR spektar spoja **6d**.



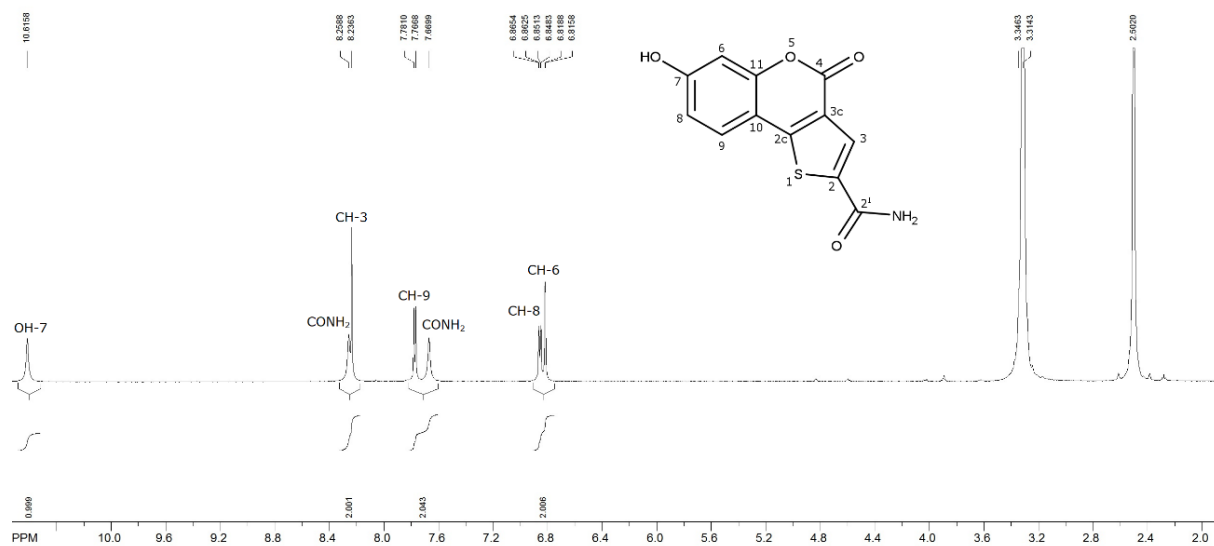
Slika 33. ^{13}C NMR spektar spoja **6d**.



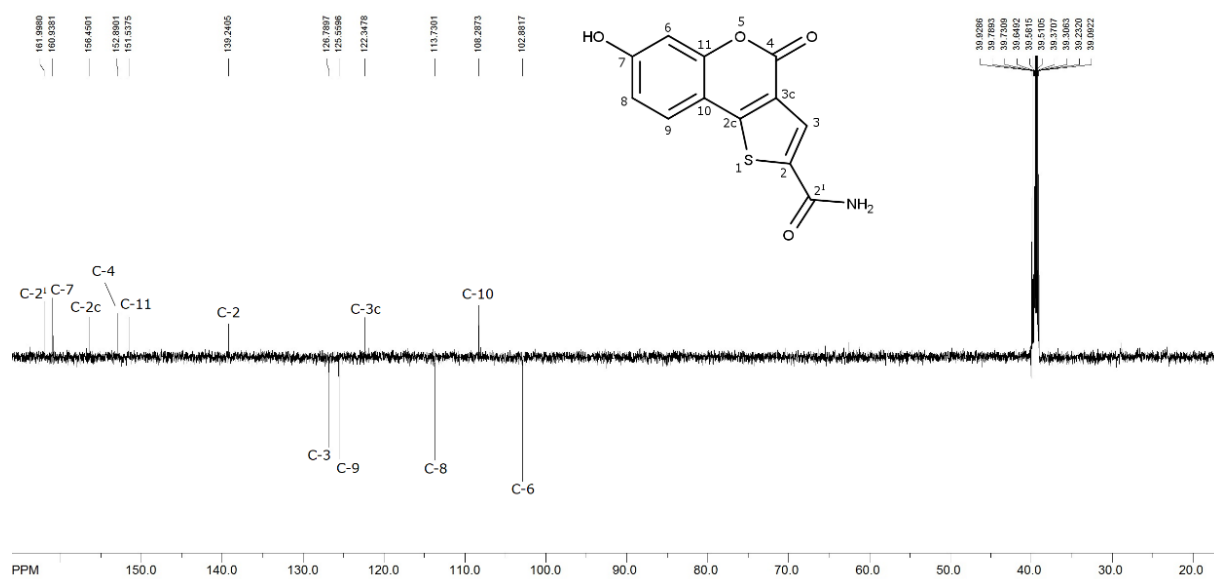
Slika 34. ¹H NMR spektar spoja **7**.



Slika 35. ¹³C NMR spektar spoja **7**.



Slika 36. ¹H NMR spektar spoja **8**.



Slika 37. ¹³C NMR spektar spoja **8**.

8. Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE

Bracanović Sara

 Vukovarska 151, 21000 Split (Hrvatska)

 (+385)919585818

 bracanovic.sara@live.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2016–danas

Diplomski studij medicinske kemije

Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

2013–2016

Preddiplomski studij biotehnologije i istraživanja lijekova

Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

2009–2013

Srednja stručna sprema

II. gimnazija, Split (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

12/03/2018–23/07/2018

Diplomski rad

Odjel za biotehnologiju, dr. sc. Karlo Wittine, Rijeka (Hrvatska)

- sinteza novih protuupalnih spojeva

27/06/2016–08/07/2016

Stručna praksa

Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka (Hrvatska)

- istraživanje i razvoj

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
talijanski	B1	B1	B1	B1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

- paket Microsoft Office
- programi za molekularno modeliranje (Avogadro, AutoDock Vina, APBS, MarvinSketch, Pymol, Spark, UCSF, VMD-NAMD i dr.)
- programi za statističku obradu podataka (Statistica i MedCalc)