Sinteza 4,5-dihidrobenzo[b]tieno[2,3-d]oksepinskih derivata radi ispitivanja njihove inhibicijske učinkovitosti na NF-kB i JAK/STAT signalni put

Čubranić, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:749132

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

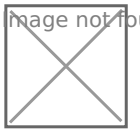


Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Daria Čubranić

SINTEZA 4,5-DIHIDROBENZO[*b*]TIENO[2,3-*d*]OKSEPINSKIH DERIVATA RADI ISPITIVANJA NJIHOVE INHIBICIJSKE UČINKOVITOSTI NA NF-κB I JAK/STAT SIGNALNI PUT

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Daria Čubranić

SINTEZA 4,5-DIHIDROBENZO[*b*]TIENO[2,3-*d*]OKSEPINSKIH DERIVATA RADI ISPITIVANJA NJIHOVE INHIBICIJSKE UČINKOVITOSTI NA NF-κB I JAK/STAT SIGNALNI PUT

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Karlo Wittine

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTEHNOLOGY

Graduate university study

Medicinal chemistry

Daria Čubranić

SYNTHESIS OF 4,5-DIHYDROBENZO[*b*]THIENO[2,3-*d*]OXEPINE DERIVATIVES TO TEST THEIR INHIBITORY EFFICIENCY ON NF-κB AND JAK/STAT SIGNALING PATHWAYS

Master's thesis

Rijeka, 2019.

Diplomski rad je obranjen dana 26.09.2019. u 10 sati

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. sc. Dean Marković (predsjednik povjerenstva)
2. Izv. prof. sc. Sandra Kraljević Pavelić (član)
3. Doc. dr. sc. Karlo Wittine (mentor rada)

Rad sadrži 52 stranice, 39 slika, 9 shema i 25 literaturnih navoda.

Rad je izrađen u laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja na Zavodu za medicinsku kemiju Odjela za biotehnologiju u Rijeci. U radu je korištena oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci" financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR).

Prvenstveno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Karlu Wittine na ukazanom povjerenju, strpljivosti, stručnom vodstvu i smjernicama tijekom izrade diplomskog rada. Najviše se zahvaljujem na ohrabrivanju u trenucima slabosti i uvijek dobrom raspoloženju što je uveliko olakšalo rad u laboratoriju te brzom odgovaranju na sva moja pitanja.

Hvala Edi, Nini i Martini na društvu i pomoću tijekom izrade diplomskog rada i tijekom cijelog studija.

Veliko hvala mom Dorianu koji je uvijek tu uz mene.

I na kraju, zahvaljujem se mojim roditeljima, bratu i Sonji na svoj pruženoj podršci i ljubavi tijekom mog školovanja i života. Hvala vam.

Sažetak

Upala je obrambeni mehanizam, a istovremeno i jedan od glavnih uzroka mnogih bolesti. Na tržištu se trenutno nalazi niz lijekova s protuupalnim djelovanjem, no s obzirom na gastrointestinalne i kardiovaskularne nuspojave povezane s njihovom primjenom, još uvijek smo u potrazi za novim, djelotvornijim lijekovima. U sklopu ovog diplomskog rada pripravljeni su: etil-8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksilat (**5**) koji je ključni međuprodukt u sintezi te različiti derivati 4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepina poput amida **6**, alkohola **7** i tri različita aminoalkoksi derivata **8a-c**.

Strukture novopripravljenih spojeva razjašnjene su korištenjem spektroskopije ^{1}H i ^{13}C NMR. Spojevima je namjena ispitati protuupalnu učinkovitost, posebice njihovu sposobnost inhibicije NF-κB i JAK/STAT signalnih puteva.

Ključne riječi:

4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin, JAK/STAT, NF-κB, tiofen, upala

Summary

Inflammation is a defense mechanism and at the same time common, causative factor in many diseases. There are currently a number of anti-inflammatory drugs on the market, but they are associated with gastrointestinal and cardiovascular side effects. Therefore, we are still pursuing new molecules, which could serve as effective drugs. As part of this thesis, a key intermediate, ethyl-8-methoxy-4,5-dihydrobenzo[*b*]thieno[2,3-*d*]oxepine-carboxylate (**5**) as well as various 4,5-dihydrobenzo[*b*]thieno[2,3-*d*]oxepine derivatives such as amide **6**, alcohol **7** and three different aminoalkoxy derivatives **8a-c** were prepared.

The structures of the newly prepared compounds were elucidated on the basis of their ^{1}H and ^{13}C NMR spectra. Anti-inflammatory activity evaluation of the synthesized compounds, especially their ability to inhibit NF-κB and JAK/STAT signaling pathways is planned in the near future.

Key words:

4,5-dihydrobenzo[*b*]thieno[2,3-*d*]oxepine, inflammation, JAK/STAT, NF-κB, thiophene

Popis kratica:

COX	*ciklooksigenaza*
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
EtOH	etanol
GPCR	G protein spregnuti receptor
IKK	IκB *kinaza*
IL	interleukin
INF-R	receptor interferona
INF-γ	interferon-γ
IκB	inhibitor κB
JAK	Janus *kinaza*
LPS	lipopolisaharid
MARK	mitogenom aktivirana protein *kinaza*
MMP	matriks *metaloproteinaza*
NF-κB	nuklearni faktor-κB
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
PPA	polifosforna kiselina
ROS	reaktivne kisikove vrste
STAT	signalizator i aktivator transkripcije
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta-β
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija
TLR	„Toll-like" receptor
TNFR	receptor čimbenika nekroze tumora
TNF-α	čimbenik nekroze tumora-α

Sadržaj:

1. Uvod ... 1

2. Literaturni pregled ... 2

2.1. Upala ... 2

2.1.1. Mehanizam upalnog odgovora ... 3

2.1.2. Aktivacija upalnih puteva ... 3

2.1.2.1. NF-κB upalni put ... 4

2.1.2.2. JAK/STAT upalni put ... 5

2.2. Protuupalna terapija ... 7

2.2.1. Male molekule kao protuupalni lijekovi ... 7

2.2.1.1. NF-κB inhibitori ... 8

2.2.1.2. JAK/STAT inhibitori ... 9

2.3. Heterociklički spojevi ... 10

2.3.1. Tiofen ... 11

2.3.1.1. Sinteza tiofena ... 11

2.3.2. Benzoksepin ... 13

2.3.2.1. Sinteza benzoksepina ... 14

2.3.2.2. Sinteza benzotienooksepina ... 15

3. Materijali i metode ... 16

3.1. Opće napomene ... 16

3.2. Priprava spojeva ... 17

4. Rezultati i rasprava ... 27

4.1. Sinteze spojeva ... 27

4.1.1. Williamsonova sinteza ... 28

4.1.2. Hidroliza estera ... 28

4.1.3. Friedel-Craftsova acilacija ... 29

4.1.4. Vilsmeier-Haackova formilacija ... 29

4.1.5. Fiesselmannova reakcija ... 30

4.1.6. Amonoliza estera ... 31

4.1.7. Redukcija estera ... 31

4.1.8. Vezanje amino lanaca na alkohol ... 32

4.2. Analiza spektara ^{1}H NMR ... 34

5. Zaključak ... 37

6. Literatura ... 38

7. Dodaci.....41
8. Životopis.....52

1. Uvod

Upala je često ključni element u patološkom razvoju bolesti. Postalo je sve jasnije da niz upalnih poremećaja uključuje razne bolesti koje se obično pogoršavaju nekontroliranom ekspresijom širokog spektra različitih proupalnih čimbenika, kao što su citokini i kemokini, čimbenik faktora rasta i razni regulatori imunološkog odgovora. Njihova proizvodnja i aktivnost su regulirani različitim signalnim putevima poput puteva ciklooksigenaze-2 (COX-2), nuklearnog faktor κB (NF-κB), mitogenom aktivirane protein *kinaze* (MAPK) i Janus *kinaze*/signalizatora i aktivatora transkripcije (JAK/STAT). Zbog značajnih nuspojava koje uzrokuju mnogi inhibitori proupalnih citokina i inhibitori COX-2, nove male molekule - regulatori NF-κB i JAK/STAT signalnih puteva već su dobili veliku pozornost kao obećavajući kandidati za lijekove protiv različitih upalnih stanja, uključujući reumatoidni artritis, psorijazu, multiplu sklerozu, kroničnu opstruktivnu plućnu bolest i dijabetes. Do danas su se mnogi od ovih spojeva već lansirali na tržište dok se drugi još uvijek sintetiziraju i ispituju u nadi da će se razviti novi, učinkovitiji i u isto vrijeme sigurniji lijekovi.[1]

Razni spojevi koji sadrže heterocikličku jezgru spadaju u medicinski važne spojeve te pokazuju značajna biološka djelovanja. Točnije, spojevi koji sadrže jezgre tiofena i/ili oksepina, poput benzoksepina[2], benzotienooksepina[3], dibenzoksepina[4] te dibenzo[*b*,*f*]tieno[2,3-*d*]oksepina[5] pokazali su se kao značajni protuupalni agensi koji djeluju na razne komponente upalnih procesa poput citokina i signalnih puteva. Prema tome, u ovom radu odlučili smo se za sintezu spojeva koji sadrže tricikličku strukturu tj. benzotienooksepinsku jezgru radi ispitivanja njihovog protuupalnog djelovanja na NF-κB i JAK/STAT signalni put.

2. Literaturni pregled

2.1. Upala

Jedna od glavnih sastavnica imunološkog odgovora je upala. Dio je nespecifičnog imunološkog odgovora tijela. Ono što pokreće upalu su stanice imunološkog sustava i njihovi produkti.

Upala je veoma složen biološki i biokemijski odgovor ljudskog organizma na različite štetne stimulanse poput patogena, uništenih stanica i rana, infekcija, virusa i bakterija te nadražujućih sredstava. Prema tome, upala je obrambeni mehanizam koji je ključan za zdravlje.[6]

Upala se može općenito podijeliti na akutnu ili kroničnu. Akutna upala je početni odgovor ljudskog tijela na štetne stimulanse te se sastoji od povećanog protoka krvi kroz ozlijeđeno tkivo, povećanja permeabilnosti krvnih žila te kretanja leukocita iz krvotoka na mjesto ozlijede ili infekcije. Taj proces praćen je kaskadom različitih biokemijskih događaja koji reguliraju upalni odgovor usmjeren prema liječenju zahvaćenog tkiva te obnovi homeostaze. Na razini tkiva, upala je karakterizirana crvenilom i oticanjem uz toplinu i bol te gubitkom funkcije tkiva (lat. *rubor, tumor, calor, dolor, functio laesa*). Međutim, nekontrolirana akutna upala koja traje nekoliko tjedana može postati kronična.[7] Kronična upala dovodi do progresivnih abnormalnih promjena u stanicama koje su prisutne u i oko središta upale. Abnormalnosti povezane s kroničnom upalom obuhvaćaju veliku grupu poremećaja koji su uzrok različitih bolesti poput reumatoidnog artritisa, ateroskleroze, fibroze, ishemijske bolesti srca, nekoliko neurodegenerativnih bolesti uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, bolesti dišnog sustava poput astme i kronične opstruktivne bolesti pluća, te tumora. Kako bi se izbjegli štetni učinci, upala se u normalnim uvjetima kontrolira pomoću različitih regulacijskih čimbenika koji mogu postati potencijalne mete za lijekove u obliku malih molekula.[1]

2.1.1. Mehanizam upalnog odgovora

Upalni odgovor je koordinirana aktivacija signalnih upalnih puteva koji reguliraju razine upalnih medijatora u stanicama oštećenog tkiva i u upalnim stanicama mobiliziranim iz krvi. Procesi upalnog odgovora ovise o prirodi početnog podražaja i mjestu njegovog djelovanja u tijelu.[7]

Različiti čimbenici, poput ozlijede tkiva, infekcija te ostalih štetnih podražaja, mogu potaknuti upalu zbog oštećenja tkiva. Kao odgovor na oštećenje tkiva, tijelo putem imunoloških upalnih stanica (makrofaga, monocita) pokreće kaskadu kemijske signalizacije koja potiče odgovor usmjeren na liječenje oštećenog tkiva. Kemijska signalizacija je ostvarena pomoću međustaničnih signalnih polipeptida koji se nazivaju citokini. Citokini mogu biti proupalni (IL-1, IL-2, IL-6, INF-γ, TNF-α, kemokini) koji potiču upalu, te protuupalni (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β i dr.) koji potiskuju upalu. Kemokini aktiviraju kemotaksiju leukocita iz krvotoka do mjesta oštećenja te tako aktivirani leukociti i endotelne stanice oštećenog tkiva proizvode citokine. Citokini se zatim vežu za odgovarajuće receptore na staničnim membranama čime pokreću upalne puteve koji uključuju unutarstanične enzime i transkripcijske čimbenike koji potiču ili umanjuju ekspresiju odgovarajućih gena.[7]

2.1.2. Aktivacija upalnih puteva

Upalni putevi utječu na patogenezu brojnih kroničnih bolesti. Upalni odgovor, kao što je opisano, sastoji se od četiri glavne komponente: upalnog pokretača (infekcija ili ozljeda tkiva), senzora koji ih otkrivaju (makrofagi ili monociti), upalnih medijatora (citokini) te ciljnog tkiva koji su pod utjecajem upalnih medijatora.[8] Svaka komponenta dolazi u različitim oblicima te prema tome njihove različite kombinacije mogu potaknuti različite unutarstanične upalne puteve u koje su uključeni COX-2, MAPK, NF-κB i/ili JAK/STAT.[1]

Razumijevanje kako su upalni putevi aktivirani i regulirani ključno je za razvoj strategija za blokiranje ili smanjenje upalnih odgovora. U zadnjih nekoliko godina najviše pažnje privukli su NF-κB i JAK/STAT upalni putevi jer predstavljaju najperspektivnije mete za razvoj novih protuupalnih lijekova iz razreda malih molekula.

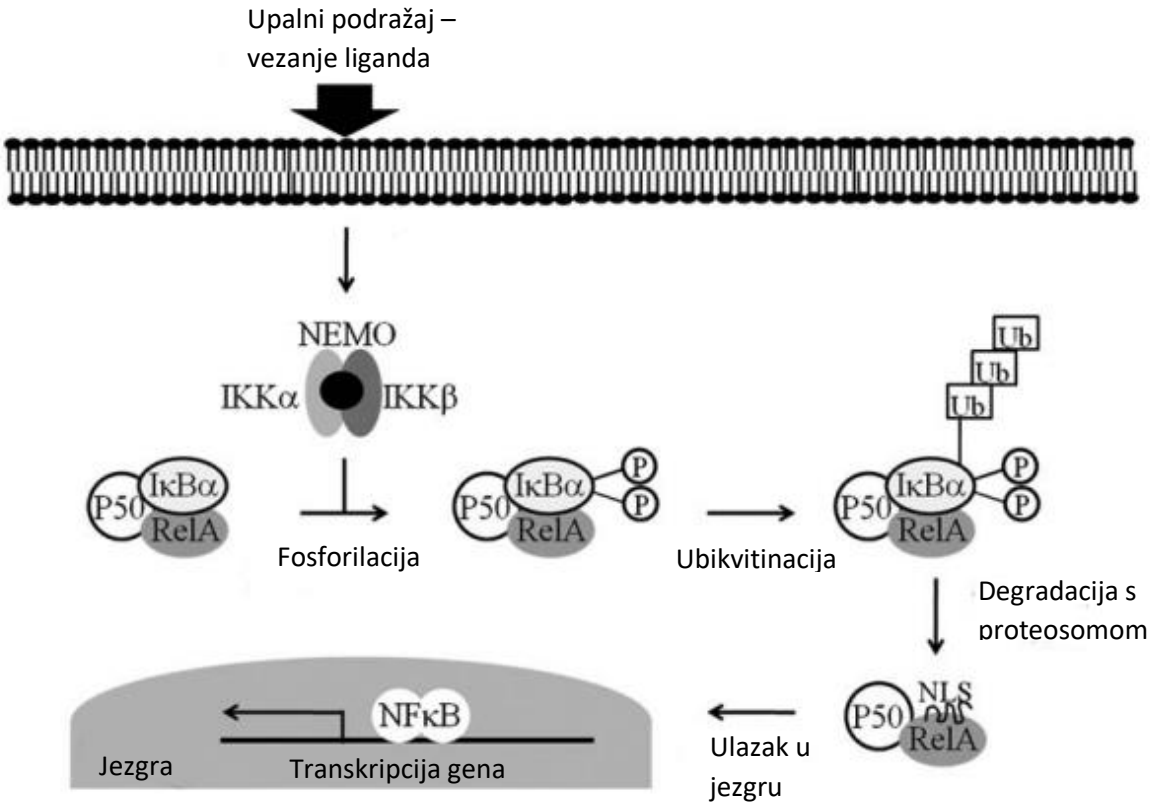
2.1.2.1. NF-κB upalni put

NF-κB predstavlja skupinu homodimernih i heterodimernih čimbenika transkripcije koji reguliraju različite skupine gena uključenih u preživljavanje i proliferaciju stanica te u različite procese imunoloških i upalnih odgovora. NF-κB spada u brzo-reagirajuće transkripcijske čimbenike.[9]

NF-κB je skupina strukturno povezanih proteina koju čine 5 članova: NF-κB1 (p50; p105) i NF-κB2 (p52; p100) koji nemaju transkripcijsku domenu i RelA (p65), RelB i c-Rel koji imaju transkripcijsku domenu te međusobno tvore razne homodimerne i heterodimerne oblike. U normalnim staničnim uvjetima, kada stanica nije potaknuta štetnim podražajima, NF-κB dimeri, npr. p50/RelA, su zadržani u citoplazmi pomoću interakcija s obitelji inhibitora κB (IκB) koji uključuju IκBα, IκBβ, IκBε i Bcl-3.[10,11]

Pokretači aktivacije NF-κB upalnog puta su reaktivne kisikove vrste (ROS), čimbenik nekroze tumora α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), bakterijski lipopolisaharidi (LPS) te mnogi drugi. U mnogim slučajevima, vezanje pokretača (liganda) za receptor na staničnoj površini (receptor TNF-α (TNFR) ili „Toll-like" receptore (TLR)) potiče aktivaciju IκB *kinaza* (IKK). IKK kompleks se sastoji od α i β katalitičke podjedinice (IKKα i IKKβ) te regulacijskog proteina NEMO ili IKKγ. IKK fosforilira IκB što vodi k IκB ubikvitinaciji i degradaciji s proteosomom. Zatim NF-κB kompleks ulazi u jezgru stanice gdje pokreće transkripciju i ekspresiju specifičnih gena važnih za imunološke i upalne odgovore (slika 1.). NF-κB također potiče ekspresiju vlastitog inhibitora, IκB, koji ga zatim opet inhibira i na taj način

automatska povratna informacija (sprega) rezultira oscilirajućom razinom djelovanja NF-κB.[9]



Slika 1. Prikaz aktivacije NF-κB upalnog puta.

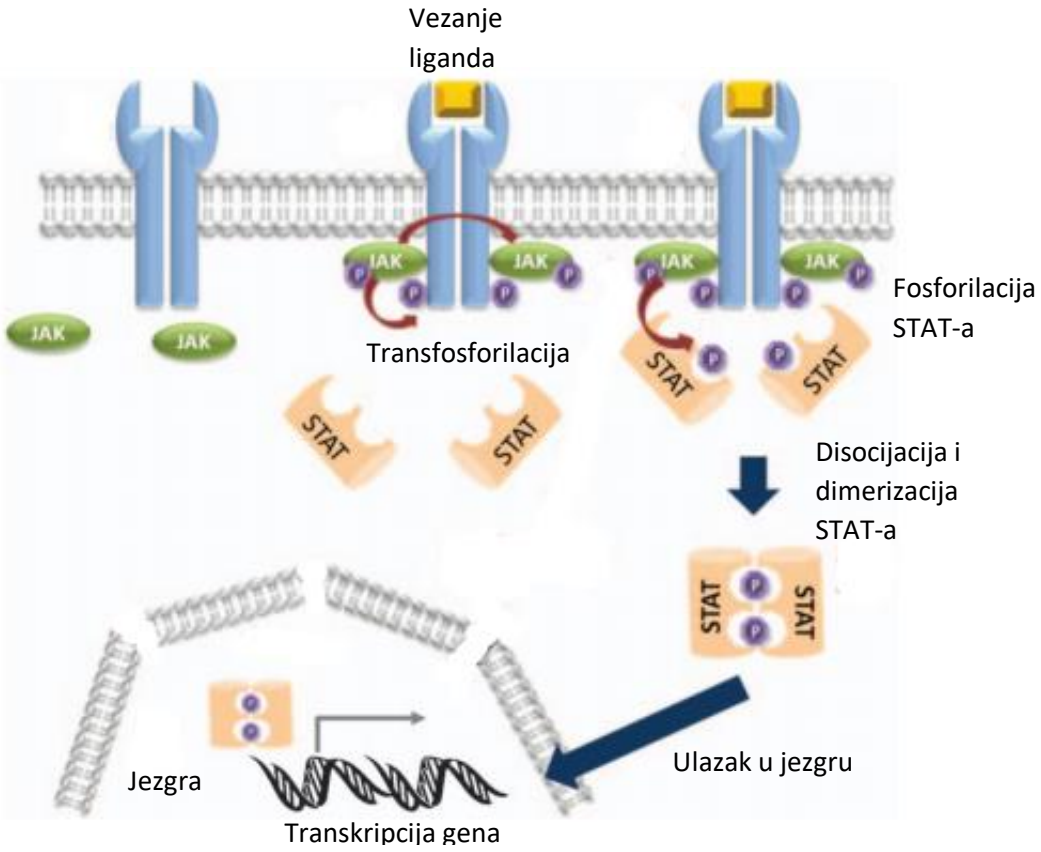
2.1.2.2. JAK/STAT upalni put

JAK/STAT upalni put je signalni mehanizam kroz koji izvanstanični čimbenici kontroliraju transkripciju i ekspresiju gena. Tri glavna dijela JAK/STAT puta su: Janus *kinaze* (JAK), signalizator i aktivator transkripcije (STAT) te receptori (vežu kemijske signale; citokinski receptori, EGFR, GPCR i INF-R).[12]

JAK pripada obitelji nereceptorskih protein *tirozin-kinaza* koja uključuje: JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2. JAK se sastoji od nekoliko važnih domena: SH2-vezujuće domene, kinazne domene i pseudokinazne domene. STAT su latentni citoplazmatski transkripcijski čimbenici koji se aktiviraju vezanjem na JAK-receptor kompleks. Postoji sedam STAT proteina: STAT1,

STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6. STAT proteini se sastoje od mnogo različitih domena s različitim funkcijama, a najočuvanije i najvažnije su SH2 i transkripcijska domena.

Za širenje signala, dvije podjedinice citoplazmatske domene receptora moraju biti u kompleksu s JAK. Vezanje različitih liganada, najčešće citokina poput interleukina i interferona, na receptore stanične membrane uzrokuje dimerizaciju receptora što omogućuje da dvije JAK budu privučene u neposrednu blizinu te se međusobno fosforiliraju (transfosforilacija) čime se povećava aktivnost njihovih kinaznih domena. Aktivirana JAK zatim fosforilira tirozinske ostatke na receptoru stvarajući tako mjesta vezanja za proteine koji imaju SH2 domenu. STAT se zatim vežu na fosforilirane tirozinske receptore pomoću svojih SH2 domena. JAK fosforiliraju vezane STAT što uzrokuje njihovu disocijaciju s receptora. Zatim disocirani STAT tvore hetero- ili homodimere i kao takvi se translociraju u jezgru i potiču transkripciju ciljanih gena (slika 2.).[13]



Slika 2. Prikaz aktivacije JAK/STAT upalnog puta.

2.2. Protuupalna terapija

Današnje liječenje upalnih bolesti unaprijeđeno je otkrićem proupalnih efektorskih mehanizama koji uključuju velik broj različitih signalnih molekula, specifičnih proteina te transkripcijskih čimbenika. Glavni efektori koji direktno ili indirektno utječu na proizvodnju proupalnih citokina i regulatornih proteina: IL-1/IL-6, TNF-α, INF-γ i MMP, su proupalne signalne molekule: MAPK, JAK, STAT te NF-κB.

Još krajem prošlog stoljeća započele su protu-citokinske terapije, od kojih je najatraktivnija protu-TNFα terapija, te su u potpunosti potvrdile ključne uloge ovih molekula u upalnim bolestima. Međutim, neki citokinski inhibitori, kao na primjer antitijelo *infliksimab*, bili su učinkoviti samo u kombinaciji s drugim lijekovima, a duža uporaba je izazivala infekcije nakon liječenja. Zbog toga, znanstvenici i dalje nastavljaju potragu za malim molekulama - lijekovima koji mogu inhibirati važne proupalne ili unutarstanične signale koji su direktni ili indirektni uzročnici raznih upalnih bolesti.[1]

Među mnogobrojnim biološkim metama, NF-κB i JAK/STAT signalizacijske kaskade trenutno se smatraju najboljim metama za postizanje učinkovitih terapijskih odgovora uz minimalne štetne učinke.

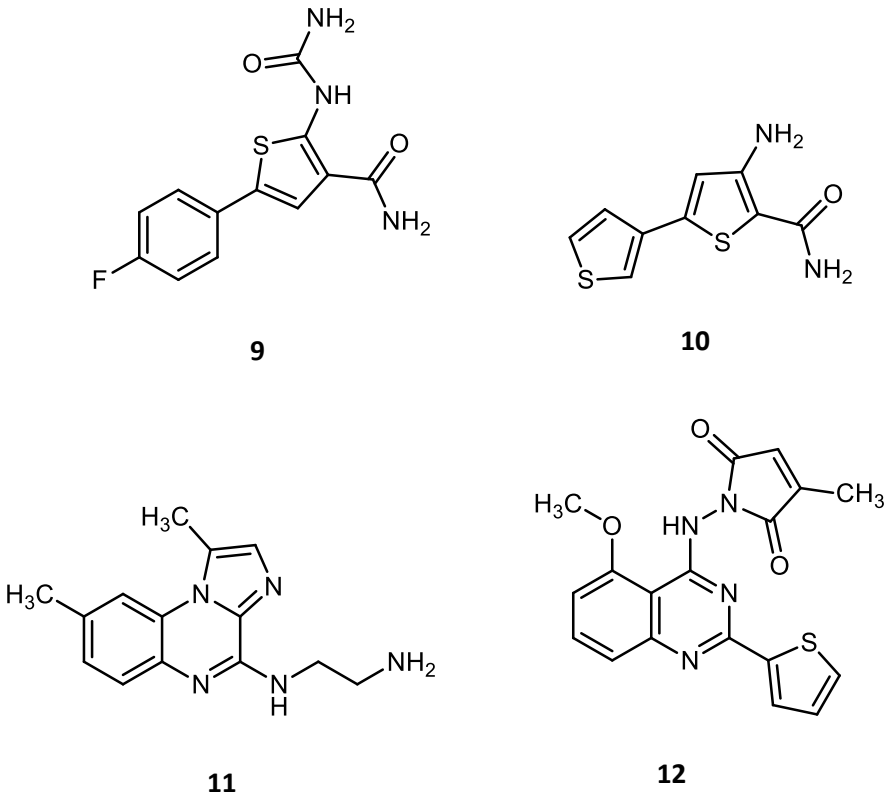
2.2.1. Male molekule kao protuupalni lijekovi

Male molekule su unutarstanično-ciljajuće, male i specifične organske supstance s dobro definiranom strukturom i molekularnom težinom manjom od 900 Daltona koje pomažu u reguliranju bioloških procesa. Neke od prednosti su njihova veličina, jednostavan dolazak na mjesto djelovanja, oralna primjena te jednostavnost sinteze što smanjuje njihovu cijenu. Među najznačajnijim malim molekulama za selektivnu inhibiciju NF-κB te JAK/STAT puta pokazali su se raznovrsni heterociklički spojevi.[14]

2.2.1.1. NF-κB inhibitori

NF-κB inhibitori mogu djelovati na različite komponente NF-κB signalizacijskog puta. No, među njima su se najviše istaknule male molekule koje djeluju na IKK podjedinicu, IKKβ, koja ima važnu ulogu u aktivaciji NF-κB. Neki od potencijalnih inhibitora IKKβ podjedinice spadaju u spojeve koji sadrže heterocikličke sustave poput tiofena, benzimidazola, indola, indazola, kinazola, imidazola itd.[15]

S obzirom na cilj ovog rada te nedavni napredak u različitim pretkliničkim modelima koji su jasno identificirali terapeutski potencijal malih molekulskih inhibitora NF-κB prikazat ćemo samo neke obećavajuće inhibitore koji posjeduju djelomičnu strukturnu sličnost s našim sintetiziranim molekulama, a to su: TPCA-1 (**9**), SC-514 (**10**), BMS-345541 (**11**) i SPC-839 (**12**) (slika 3.).[16]



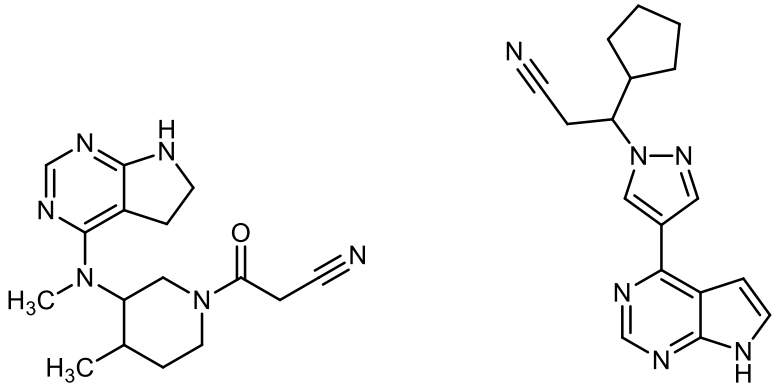
Slika 3. NF-κB inhibitori koji se trenutno nalaze u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima: TPCA-1 (**9**), SC-514 (**10**), BMS-345541 (**11**) i SPC-839 (**12**).

TPCA-1 i SC-514 pripadaju skupini tiofenkarboksamida. TPCA-1 je snažan, selektivni i ATP kompetitivni inhibitor aktivnosti ljudske IKKβ te tako utječe na proizvodnju raznih proupalnih medijatora i pokazuje terapeutski učinak u bolestima kao što su reumatoidni artritis, astma te kronična opstrukcijska bolest pluća. Ovaj spoj inhibira proizvodnju proupalnih medijatora uključujući TNF-α, IL-6 i IL-8 od strane LPS-induciranih ljudskih monocita, sprječava fosforilaciju i degradaciju IκBα te nuklearnu translokaciju NF-κB. Spoj SC-514 je također pokazao sličan način djelovanja, ali manjeg intenziteta što je u skladu s njegovom slabijom inhibicijskom moći prema IKKβ u odnosu na spoj TPCA-1. TPCA-1 i SP-514 nalaze se u ranoj fazi kliničkih ispitivanja.[16] BMS-345541 je derivat imidazokinoksalina te spada u grupu tricikličkih, selektivnih i ATP-nekompetitivnih inhibitora IKKβ. Ovaj spoj ima slabo inhibicijsko djelovanje na IKKα. BMS-345541 se ne veže na vezno mjesto ATP već na alosteričko mjesto IKKβ i IKKα te na taj način onemogućava njihovo vezanje. Sprječava LPS-induciranu proizvodnju NF-κB ovisnih citokina u THP-1 stanicama. BMS-345541 je prvi spoj koji je pokazao *in vivo* protuupalno djelovanje.[17] SPC-839, analog kinazolina, je selektivni i ATP-kompetitivni inhibitor IKKβ. Pokazuje značajnu protuupalnu aktivnost kad je primijenjen oralno kod štakora s adjuvantnim artritisom. Poput prethodnog spoja, SPC-839 smanjuje proizvodnju proupalnih citokina djelovanjem na upalni signalni put NF-κB.[18]

2.2.1.2. JAK/STAT inhibitori

JAK/STAT inhibitori su male molekule koje se koriste u upalnim i autoimunim bolestima povezanim s disregulacijom JAK/STAT signalizacijskog puta; utječu na više članova JAK obitelji *kinaza*. Kao najbolji inhibitori pokazali su se također heterociklički spojevi, točnije pirolopirimidinske strukture. Nekoliko spojeva je već odobreno za upotrebu, dok su drugi trenutno u različitim kliničkim ispitivanjima.[19]

Glavni primjeri ovih inhibitora, tofacitinib (CP-690550) (**13**) i ruksolitinib (INCB18424) (**14**) koji su već odobreni od strane FDA za liječenje reumatoidnog artritisa odnosno mijelofibroze, prikazani su na slici 4. Oba lijeka uzimaju se oralno. Tofacitinib (CP-690550) je snažan selektivni inhibitor koji pokazuje značajno smanjivanje JAK3 aktivnosti. Ruksolitinib (INCB18424) je snažan i relativno selektivan dvostruki JAK1/JAK2 inhibitor. Ovaj lijek, zbog mogućnosti inhibicije JAK2 *kinaze*, uspješno djeluje kod mijelofibroze. Oba lijeka također se klinički ispituju i na druge upalne bolesti.[19]



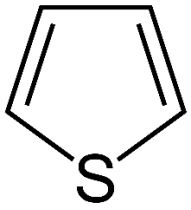
Slika 4. JAK/STAT inhibitori: tofacitinib (**13**) i ruksolitinib (**14**).

2.3. Heterociklički spojevi

Heterociklički spojevi su organski ciklički spojevi koji u prstenu, osim ugljika, imaju i druge atome poput kisika, sumpora i dušika. Heterociklički aromatski spojevi dijele se na peteročlane, šesteročlane, sedmeročlane i kondenzirane spojeve.[20] Ovi spojevi su široko rasprostranjeni u prirodi te su neophodni za život. Heterociklički prsteni nalaze se u mnogim biološki aktivnim prirodnim produktima i sintetskim spojevima. Velika većina komercijalno dostupnih lijekova sadrži heterocikličku strukturnu komponentu.[21]

2.3.1. Tiofen

Tiofen pripada peteročlanim heterocikličkim aromatskim spojevima koji sadrže atom sumpora (slika 5.). Jezgra tiofena jedna je od najvažnijih heterocikličkih struktura koja pokazuje izvanredna farmakološka djelovanja te se može pripojiti raznim drugim heterocikličkim sustavima čime se stvaraju novi spojevi pojačane biološke aktivnosti, poput prethodno navedenih NF-κB inhibitora. Tiofen i njegovi supstituirani derivati vrlo su važna skupina heterocikličkih spojeva koji pokazuju niz primjena u medicinskoj kemiji.[22,23]

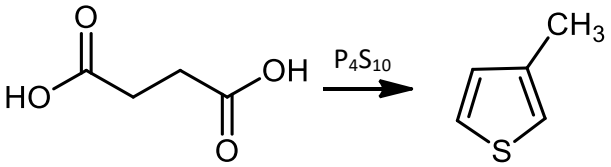


Slika 5. Kemijska struktura tiofena.

2.3.1.1. Sinteza tiofena

Tiofeni se mogu sintetizirati na različite načine, ali četiri su glavna sintetska puta:

a) Paal-Knorr-ova sinteza tiofena: 1,4-dikarbonilni spojevi (**15**) reagiraju s izvorom sulfida, najčešće je to fosforov pentasulfid, što je praćeno dehidrogenacijom uz nastanak tiofena (slika 6.).[22]

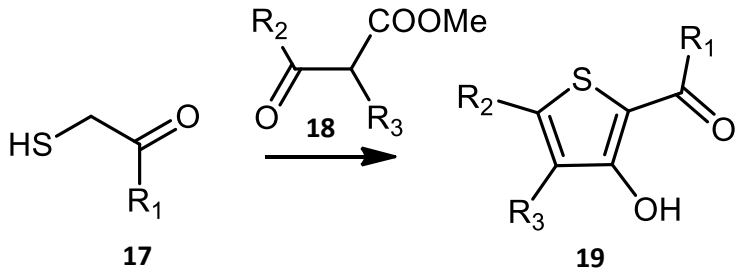


15 **16**

Slika 6. Paal-Knorr-ova sinteza tiofena.

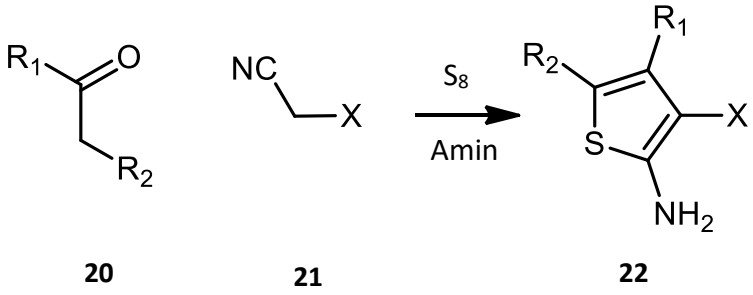
b) Fiesselmann-ova sinteza tiofena: kondenzacijska reakcija derivata tioglikolne kiseline (**17**) s α,β-acetilenskim esterima (**18**), što nakon

reakcije s bazom rezultira stvaranjem 3-hidroksi-2-tiofenkarboksilne kiseline (**19**) (slika 7.).[22]



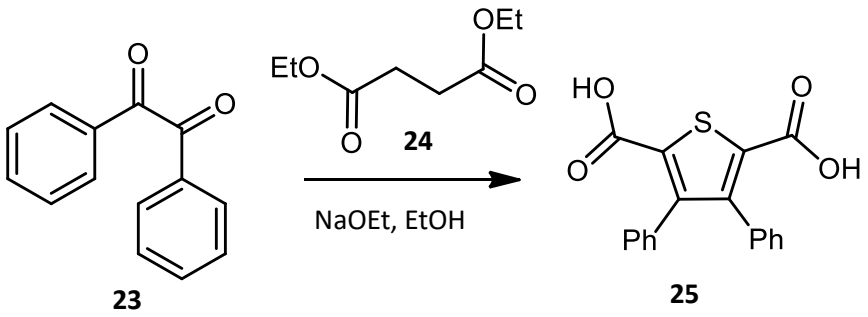
Slika 7. Fiesselmann-ova sinteza tiofena.

c) Gewald-ova sinteza aminotiofena: kondenzacijska reakcija aldehida, ketona ili 1,3-dikarbonilnih spojeva s aktiviranim nitrilima, poput malononitrila, i elementarnog sumpora u prisutnosti amina kao katalizatora, čime se dobivaju odgovarajući 2-aminotiofeni (**22**) (slika 8.).[22]



Slika 8. Gewald-ova sinteza tiofena.

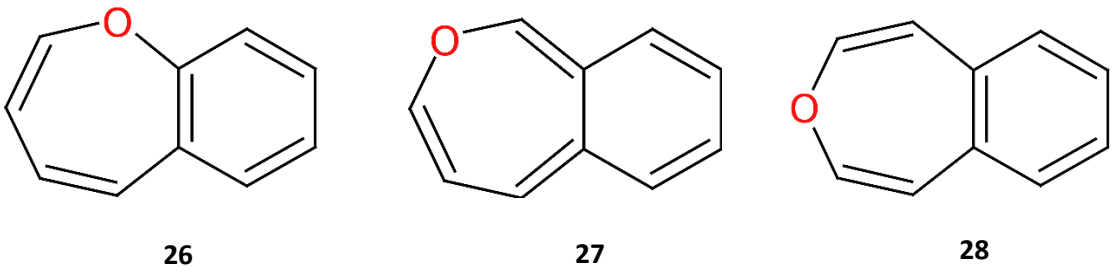
d) Hinsberg-ova sinteza tiofena: kondenzacijska reakcija dietil tiodiglikolata (**23**) i α-diketona (**24**), pri standardnim uvjetima, kojom se dobivaju 3,4-disupstituirane tiofen-2,5-dikarboksilne kiseline (**25**) nakon hidrolize estera u kiselim uvjetima (slika 9.).[22]



Slika 9. Hinsberg-ova sinteza tiofena.

2.3.2. Benzoksepin

Benzoksepin je sedmeročlani heterociklički spoj koji sadrži kisik, a sastoji se od oksepinskog i benzenskog prstena. Postoje tri vrste benzoksepinskog prstena ovisno o položaju kisikovog atoma s obzirom na benzenski prsten: 1-benzoksepin (**26**), 2-benzoksepin (**27**) i 3-benzoksepin (**28**) (slika 10.).[2]



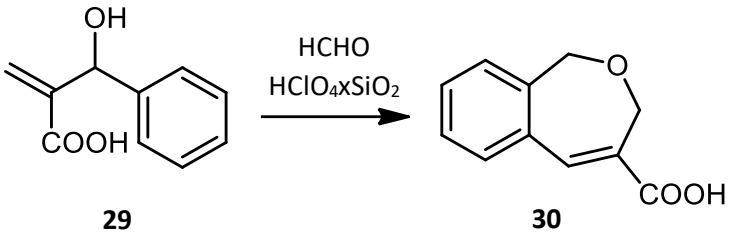
Slika 10. 1-benzoksepin (**26**), 2-benzoksepin (**27**) i 3-benzoksepin (**28**).

Benzoksepinska jezgra nalazi se u brojnim prirodnim proizvodima i pokazuje širok raspon bioloških svojstava poput protutumorskog, protuupalnog, antioksidativnog, antibakterijskog te mnogih drugih. S obzirom na to, benzoksepin je postao jedan od najzanimljivijih prekursora za sintezu njegovih derivata kao novih farmakološki zanimljivih spojeva.[24]

2.3.2.1. Sinteza benzoksepina

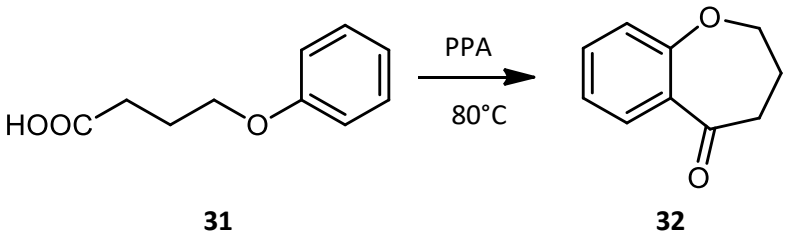
Zbog svoje jedinstvene strukture te bioloških svojstava, benzoksepin je potaknuo znanstvenike na razvoj njegovih sinteza.[17] Neke od njih su:

a) kondenzacija Morita-Baylis-Hillman adukta s formaldehidom: Das i sur. su sintetizirali 1,3-dihidrobenzo[*c*]oksepin-4-karboksilnu kiselinu (**30**) iz Morita-Baylis-Hillman (**29**) adukta i formaldehida, a reakcija je katalizirana s perkloratnom kiselinom u prisustvu silicijevog dioksida (slika 11.).[25]



Slika 11. Kondenzacija Morita-Baylis-Hillman adukta s formaldehidom.

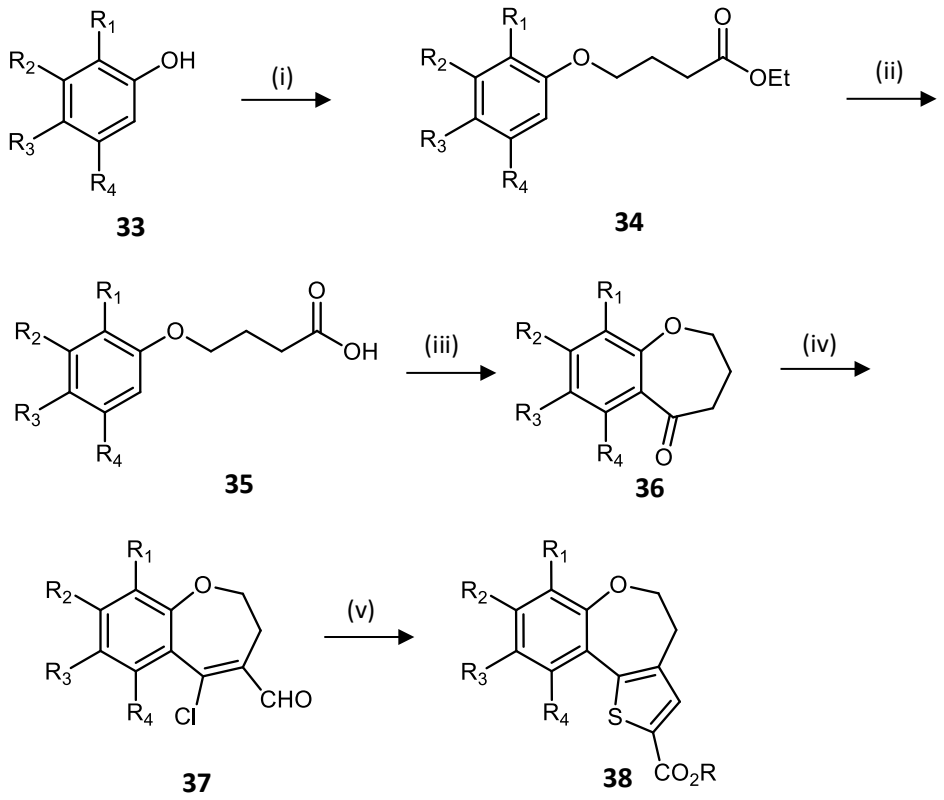
b) intramolekulska Friedel-Crafts-ova acilacija: Barrett i sur. su koristili Friedel-Craftsovu acilaciju 4-fenoksimaslačne kiseline (**31**) u prisutnosti polifosforne kiseline pri 80°C da sintetiziraju 3,4-dihidrobenzo[*b*]oksepin-5(2*H*)-on (**32**) (slika 12.).[2]



Slika 12. Intramolekulska Friedel-Crafts-ova acilacija.

2.3.2.2. Sinteza benzotienooksepina

Slika 13. prikazuje općenitu sintezu benzotienooksepina koji predstavlja važan međuprodukt za sintezu odabranih spojeva u ovom radu.



Slika 13. Uvjeti reakcije: (i) etil 4-brombutanoat, K_2CO_3, kat. NaI, aceton; (ii) LiOH, H_2O, THF; (iii) PPA, toluen; (iv) $POCl_3$, DMF; (v) K_2CO_3, merkaptoacetatni ester, DMF.

Fenolni spoj (**33**) je *O*-alkiliran s etil 4-brombutanoatom kako bi se dobio etil 4-fenoksibutanoat (**34**) nakon čega slijedi njegova saponifikacija u karboksilnu kiselinu (**35**). Zatim se karboksilna kiselina putem intramolekulske ciklizacije u kiselim uvjetima prevodi u 3,4-dihidrobenzo[*b*]oksepin-5(2*H*)-on (**36**). Keton se formilira s fosforovim trikloridom i DMF čime se dobiva 5-kloro-2,3-dihidrobenzo[*b*]oksepin-4-karbaldehid (**37**) koji zatim ciklizacijom s etil merkaptoacetatom, u prisustvu kalijevog dikarbonata i u DMF-u, daje 4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksilatni ester (**38**) čiji se ciklički dio sastoji od benzoksepinskog i tiofenskog prstena.[3]

3. Materijali i metode

3.1. Opće napomene

Sva otapala i reagensi korišteni u reakcijama su komercijalno dostupni te nisu dodatno sušeni ni pročišćavani. Sva otapala su bila p.a. ili HPLC čistoće.

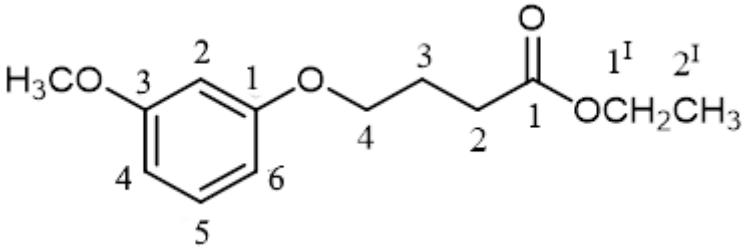
Za provjeru i praćenje tijeka reakcija te pročišćavanja korištena je tankoslojna kromatografija (TLC), na aluminijskim pločicama presvučenima slojem silikagela, 60Å, Fluka F_{254}, u odgovarajućem sustavu otapala, a za detekciju izoliranih komponenti korištena je UV svjetlost valnih duljina 254 nm i 365 nm. Kromatografija na koloni je korištena za pročišćavanje spojeva. Staklene kolone su punjene silikagelom (60Å, Fluka, 35-60 μm), a kao eluens su korištene odgovarajuće smjese CH_2Cl/CH_3OH i petrol eter/etil acetat. Za pojedina dodatna pročišćavanja koristila se flash kromatografija koja je provedena na uređaju Combi Flash Rf+ sa silikagel RediSep Rf GOLD 12g (60Å) kolonom. Uklanjanje otapala provedeno je pri sniženom tlaku na rotacijskom uparivaču (Büchi).

^1H i ^{13}C NMR spektri su snimljeni pomoću spektrometra Avance 600 Brüker u Centru za NMR, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu. ^1H spektri su snimani na 300 ili 600 MHz, a ^{13}C spektri su snimani na 75 ili 150 MHz. Uzorci su otapani u DMSO ili $CDCl_3$, a njihovi kemijski pomaci (δ), u ppm, su određeni prema internom standardu tetrametilsilana (TMS, 0 ppm).

Temperature tališta sintetiziranih spojeva mjerene su na uređaju Stuart Melting Point SMP20 i nisu korigirane.

3.2. Priprava spojeva

Etil-4-(3-metoksifenoksi)butanoat (1)

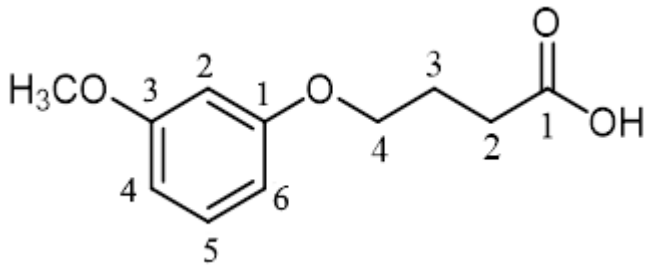


U otopinu 3-metoksifenola (10 g, 0,08 mol), etil-4-brombutanoata (19 g, 0,097 mol) i acetona (150 ml) doda se K_2CO_3 (33,5 g, 0,24 mol). Kao katalizator doda se natrijev jodid. Reakcijska smjesa miješa se 22 sata na temperaturi od 55°C. Na kraju reakcije, što se provjeri tankoslojnom kromatografijom, reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu, K_2CO_3 se odfiltrira putem Büchnerovog lijevka i dodatno ispere acetonom, a filtrat se upari pri sniženom tlaku. Ostatak se otopi u etil acetatu, a zatim ekstrahira tri puta sa zasićenom otopinom NaCl. Organski sloj se suši iznad bezvodnog Na_2SO_4, filtrira i upari pri sniženom tlaku. Izoliran je spoj **1** kao žuto-narančasto ulje u kvantitativnom iskorištenju (20,1 g).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.16 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH-10), 6.54–6.46 (m, *J* = 4.2, 2.2 Hz, 2H, CH-9,11), 5.74 (s, 1H, CH-7), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH_2-1^I), 3.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH_2-4), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 2.45 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2-2), 1.97 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH_2-3), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_3-2^I).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 172.49 (C-1), 160.51 (C-8), 159.72 (C-6), 129.86 (C-10), 106.49 (C-9), 106.23 (C-11), 100.62 (C-7), 66.40 (C-4), 59.82 (C-1^I) , 54.97 (O<u>C</u>H$_3$), 30.12 (C-2), 24.21 (C-3), 14.01 (<u>C</u>H$_3$-2^I).

4-(3-metoksifenoksi)butanska kiselina (2)

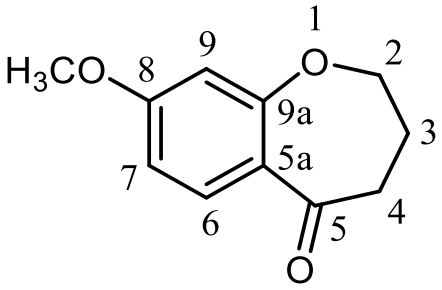


Spoj **1** (20,1 g, 0,08 mol) se otopi u tetrahidrofuranu (58 ml), metanolu (58 ml) i vodi (29 ml) te se reakcijska smjesa ohladi na -5°C, a zatim se u reakcijsku smjesu doda $LiOHxH_2O$ (3,8183 g, 0,09 mol). Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 21 sat, a zatim se doda još 20% mase $LiOHxH_2O$ (0,7657 g) te se reakcijska smjesa nastavi miješati na sobnoj temperaturi 22 sata. Otapalo se upari pri sniženom tlaku, a u dobiveni ostatak se doda voda te tri puta ekstrahira s etil acetatom. Vodeni sloj se zakiseli do pH 1-2 s 2M HCl (37%) i zatim ekstrahira etil acetatom. Organski sloj se suši putem bezvodnog Na_2SO_4, filtrira i upari pri sniženom tlaku. Izoliran je spoj **2** kao ružičasto-smeđi kristali (14,5 g, 86%, T_t = 77-87°C).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 12.10 (s, 1H, COOH), 7.16 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH-10), 6.50 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 2H, CH-9, 11), 6.47 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, CH-7), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2-4), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2-2), 1.96 – 1.88 (m, 2H, CH_2-3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 174.05 (C-1), 160.47 (C-8), 159.73 (C-6), 129.89 (C-10), 106.55 (C-9), 106.29 (C-11), 100.61 (C-7), 66.51 (C-4), 55.02 ($O\underline{C}H_3$), 30.09 (C-2), 24.20 (C-3).

8-metoksi-3,4-dihidrobenzo[*b*]oksepin-5(2*H*)-on (3)

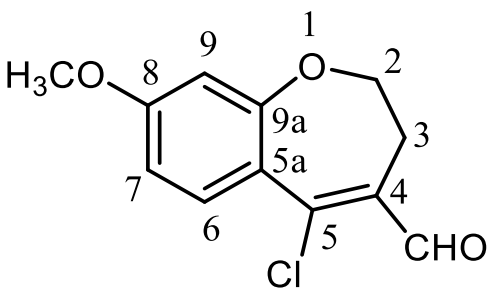


Polifosforna kiselina (20,1 g) se zagrije na temperaturu od 80°C te se doda klorbenzen (15 ml). U pripremljenu smjesu doda se spoj **2** (2,0036 g, 0,009 mol) te se reakcijska smjesa miješa 24 sata na 80°C. Nakon 24 sata reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu i doda se 1M NaOH, a zatim se tri puta ekstrahira s etil acetatom. Organski sloj se tri puta ispire s NaCl, osuši iznad bezvodnog Na_2SO_4 te filtrira i upari pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu s CH_2Cl_2 kao eluensom. Izoliran je spoj **3** u obliku svijetlo-smeđeg ulja (1,1 g, 58%).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH-6), 6.72 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H, CH-7), 6.63 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH-9), 4.20 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH_2-2), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 2.74 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH_2-4), 2.15–2.02 (m, 2H, CH_2-3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 198.71 (C-5), 164.28 (C-9a), 163.93 (C-8), 131.16 (C-6), 122.44 (C-5a), 110.42 (C-7), 105.45 (C-9), 73.09 (C-2), 56.11 (O<u>C</u>H$_3$), 40.75 (C-4), 25.71 (C-3).

5-kloro-8-metoksi-2,3-dihidrobenzo[*b*]oksepin-4-karbaldehid (4)

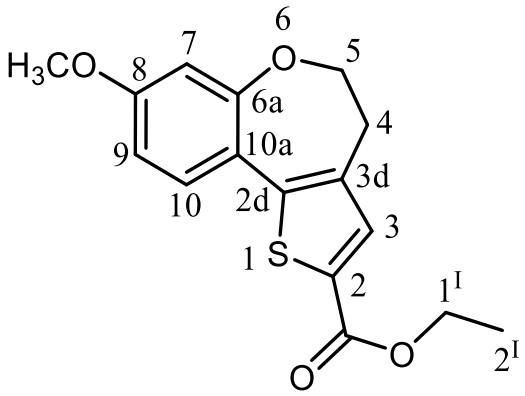


Fosforov oksiklorid (3 ml, 0,03 mol) se doda u otopinu *N',N*-dimetilformamida (3,7 ml) i trikloretilena (5,3 ml) na 0°C. Reakcijska smjesa miješa se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Spoj **3** (2,0 g, 0,01 mol) se otopi u trikloretilenu (8 ml) te se doda u reakcijsku smjesu. Reakcijska smjesa se miješa 22 sata na temperaturi od 90°C. Na kraju reakcije smjesa se ohladi na sobnu temperaturu te se polako doda zasićena vodena otopina CH_3COONa, a zatim se ekstrahira tri puta s CH_2Cl_2. Organski sloj se ispere tri puta s NaCl, osuši iznad bezvodnog Na_2SO_4, filtrira te upari pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu s CH_2Cl_2 kao eluensom. Izoliran je spoj **4** u obliku žutih kristala (1,8 g, 76%, T_t = 84-87°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 10.23 (s, 1H, CHO), 7.73 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, CH-6), 6.91 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H, CH-7), 6.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH-9), 4.45 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2-2), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 2.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2-3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 189.72 (C̲HO), 163.36 (C-8), 158.15 (C-5), 145.71 (C-9a), 134.39 (C-4), 131.58 (C-9), 122.02 (C-5a), 111.38 (C-7), 107.65 (C-6), 78.48 (C-2), 56.18 (OC̲H_3), 26.17 (C-3).

Etil-8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksilat (5)



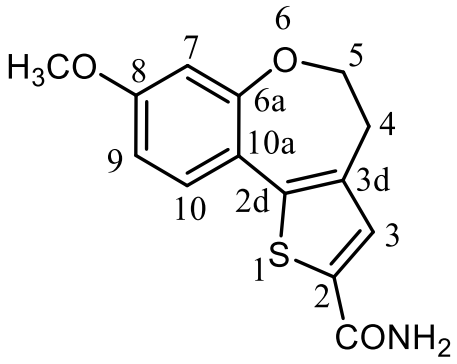
U otopinu spoja **4** (0,99 g, 4,14 mmol) u piridinu (8,3 ml) doda se etil-2-merkaptoacetat (0,45 ml, 4,12 mmol) i trietilamin (1,14 ml, 10,29

mmol). Reakcijska smjesa miješala se 4 sata na temperaturi od 70°C, a tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Nakon 4 sata, reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu te se otapala upare pri sniženom tlaku. Dodatno se reakcijska smjesa koevaporira dva puta s toluenom. U ostatak smjese, nakon uparavanja, doda se voda te se tri puta ekstrahira s CH_2Cl_2. Organski sloj se ispere tri puta s 2M HCl (37%) i tri puta sa zasićenom otopinom NaCl, osuši iznad bezvodnog Na_2SO_4, filtrira i upari pri sniženom tlaku. Produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu sa sustavom petrol eter:etil acetat = 10:1 kao eluensom. Izoliran je spoj **5** u obliku svijetlo-žutih kristala (1,16 g, 92,8%, T_t = 111-120°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.71–7.58 (m, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH-3, 10), 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H, CH-9), 6.60 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, CH-7), 4.38–4.17 (m, 4H, CH_2-1^I, CH_2-5), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.18 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH_2-4), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_3-2^I).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 161.78 (C=O), 160.87 (C-8), 159.59 (C-6a), 142.60 (C-2d), 137.49 (C-3), 137.04 (C-3d), 129.99 (C-10), 128.63 (C-2), 116.06 (C-10a), 110.72 (C-9), 106.36 (C-7), 70.15 (C-1^I), 61.39 (C-5), 55.90 (O<u>C</u>H_3), 33.38 (C-4), 14.67 (C-2^I).

8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksiamid (6)



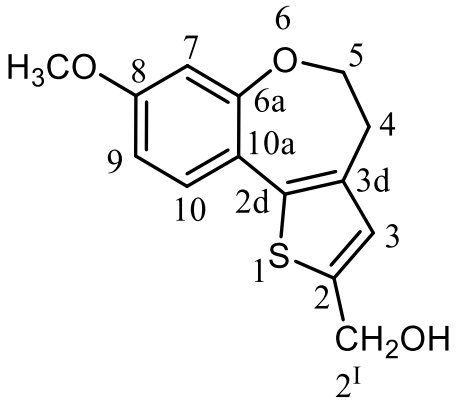
U otopinu spoja **5** (0,21 g, 0,68 mmol) u dioksanu (5 ml) doda se metanol (10 ml). Uvodi se plinoviti amonijak 4 sata uz hlađenje na 0°C.

Reakcijska smjesa se dodatno miješa 3 dana na sobnoj temperaturi. Uvedene su nove količine plinovitog amonijaka (3 sata) i reakcijska smjesa ostavljena uz miješanje još 10 dana na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa se zatim upari pri sniženom tlaku te pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu u sustavu CH_2Cl_2:CH_3OH = 40:1 kao eluensom. Izoliran je spoj **6** u obliku žutog ulja (0,07 g, 38%).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.88 (bs, 1H, NH), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH-10), 7.54 (s, 1H, CH-3), 7.33 (bs, 1H, NH), 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.7 Hz, 1H, CH-9), 6.59 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, CH-7), 4.27 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH_2-5), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.14 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH_2-4).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 162.66 (C=O), 159.86 (C-8), 158.77 (C-6a), 139.30 (C-2d), 135.99 (C-3d), 135.65 (C-2), 132.02 (C-3), 129.22 (C-10), 116.16 (C-10a), 110.06 (C-9), 105.83 (C-7), 69.71 (C-5), 55.34 ($O\underline{C}H_3$), 33.13 (C-4).

(8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-il)metanol (7)



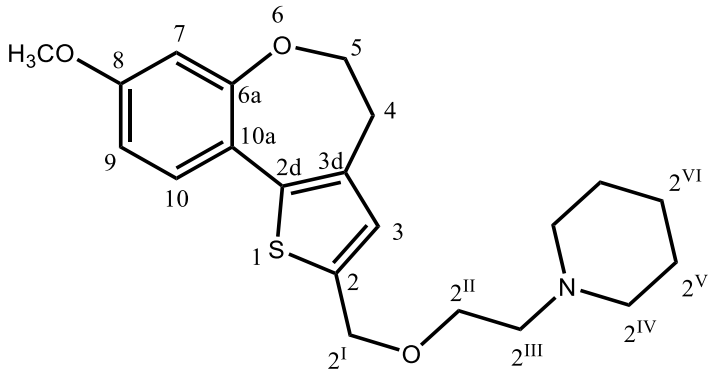
Otopina spoja **5** (0,6 g, 1,97 mmol) u tetrahidrofuranu (27 ml) lagano se dokapava u otopinu $LiAlH_4$ (0,26 g, 6,57 mmol) i tetrahidrofurana (14 ml). Reakcijska smjesa miješa se 2 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Na kraju reakcije dodaje se kap po kap vode sve dok se smjesa ne prestane pjeniti. Nakon 45 minuta dodatnog miješanja na sobnoj temperaturi smjesa se filtrira preko

naboranog filtarskog papira. Filtrat se upari pri sniženom tlaku, a produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu u sustavu CH_2Cl_2:CH_3OH = 40:1 kao eluensom. Izoliran je spoj **7** u obliku žutog ulja (0,41 g, 80%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.48 (d, *J* = 8.71 Hz, 1H, CH-10), 6.77 (s, 1H, CH-3), 6.68/6.66 (dd, *J* = 8.73, 2.66 Hz, 1H, CH-9), 6.56 (d, *J* = 2.60 Hz, 1H, CH-7), 5.44 (t, *J* = 5.71 Hz, 1H, OH-2^I), 4.55 (d, *J* = 5.64 Hz, 2H, CH_2-2^I), 4.23 (t, J=5.10 Hz, 2H, CH_2-5), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.08 (t, *J* = 5.10 Hz, 2H, CH_2-4).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 159.39 (C-8), 158.66 (C-6a), 143.33 (C-2), 135.56 (C-3d), 133.80 (C-2d), 129.05 (C-10), 128.33 (C-3), 117.54 (C-10a), 110.24 (C-9), 106.24 (C-7), 70.12 (C-5), 58.66 (C-2^I), 55.75 (OCH_3), 33.63 (C-4).

1-(2-((8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-il)metoksi)etil)piperidin (8a)



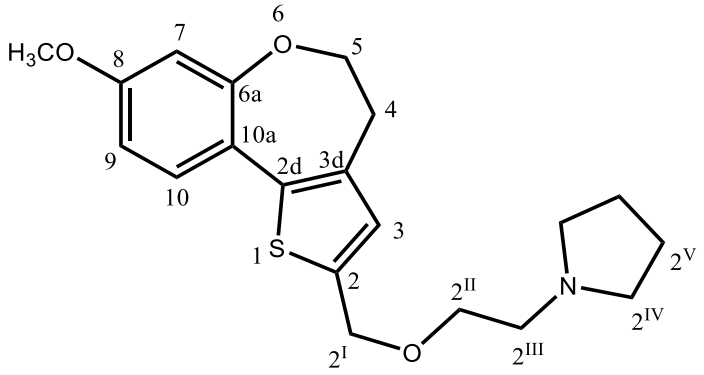
U otopinu 1-(2-kloretil)piperidin hidroklorida (0,75 g, 4,06 mmol) u 50% NaOH (20 ml) doda se otopina spoja **7** (0,15 g, 0,58 mmol) u toluenu (29 ml). Benzil trietil amonijev klorid doda se u reakcijsku smjesu kao u katalitičkim količinama. Reakcijska smjesa se intenzivno miješa preko noći pri temperaturi vrenja (110°C), a zatim 4 dana na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije otapalo se upari pri sniženom tlaku. Ostatak, nakon uparavanja, se tri puta ekstrahira s CH_2Cl_2. Organski sloj se upari pri

sniženom tlaku te pročisti kolonskom kromatografijom na silikagelu CH_2Cl_2:CH_3OH = 20:1 → CH_2Cl_2:CH_3OH = 10:1. Spoj se dodatno pročisti Flash kromatografijom u sustavu petrol eter:etil acetat = 5:1 → 4:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1 → 1:2 kao eluensima. Izoliran je spoj **8a** u obliku žutog ulja (0,26 g, 22,4%).

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.49 (d, *J* = 8.72 Hz, 1H, CH-10), 6.90 (s, 1H, CH-3), 6.70/6.67 (dd, *J* = 2.58/8.72 Hz, 1H, CH-9), 6.58 (d, *J* = 2.52 Hz, 1H, CH-7), 4.61 (s, 2H, CH_2-2^{I}), 4.26 (t, *J* = 5.02 Hz, 2H, CH_2-5), 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.67 (t, *J* = 4.71 Hz, 2H, CH_2-2^{II}), 3.12 (t, *J* = 5.01 Hz, 2H, CH_2-4), 2.95-2.65 (m, 6H, CH_2-2^{III} + CH_2-2^{IV}), 1.68–1.56 (m, 4H, CH_2^{V}), 1.49–1.39 (m, 2H, CH_2^{VI}).

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 159.64 (C-8), 158.83 (C-6a), 137.78 (C-2), 135.62 (C-3d), 135.32 (C-2d), 131.07 (C-10), 129.16 (C-3), 117.23 (C-10a), 110.33 (C-9), 106.27 (C-7), 70.14 (C-5), 67.02 (C-2^{II}), 57.04 (C-2^{I}), 55.78 (OCH_3), 53.94 (C-2^{IV}), prekriven signalom DMSO-a (C-2^{III}), 33.56 (C-4), 24.48 (C-2^{V}), 23.12 (C-2^{VI}).

1-(2-((8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-il)metoksi)etil)pirolidin (8b)



U otopinu 1-(2-kloretil)pirolidin hidroklorida (0,48 g, 2,85 mmol) u 50% NaOH (14 ml) doda se otopina spoja **7** (0,11 g, 0,41 mmol) u toluenu (21 ml). Zatim se doda katalitička količina benzil trietil amonijevog klorida. Reakcijska smjesa se intenzivno miješa 24 sata na temperaturi vrenja

(110°C). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu i upari pri sniženom tlaku. Ostatak se tri puta ekstrahira s CH_2Cl_2, a organski sloj ekstrakcije se upari pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu sa sustavima CH_2Cl_2:CH_3OH = 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1 kao eluensima. Izoliran je spoj **8b** u obliku žuto-smeđeg ulja (0,07 g, 52%).

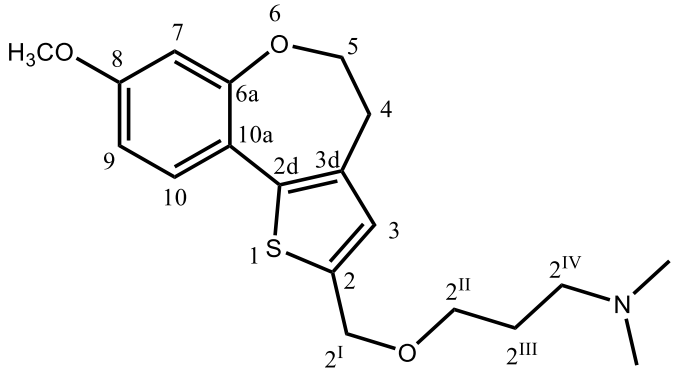
^{1}H-NMR (600 MHz,DMSO-d_6) δ/ppm: 7.49 (d, *J* = 8.70 Hz, 1H, CH-10), 6.91 (s, 1H, CH-3), 6.69/6.67 (dd, *J* = 2.62/8.72 Hz, 1H, CH-9), 6.57 (d, *J* = 2.56 Hz, 1H, CH-7), 4.62 (s, 2H, CH_2-2^{I}), 4.25 (t, *J* = 5.05 Hz, 2H, CH_2-5), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.67 (t, *J* = 4.76 Hz, 2H, CH_2-2^{II}), 3.11 (t, *J* = 5.08 Hz, 2H, CH_2-4), prekriven signalom DMSO-a (CH_2-2^{III}), prekriven signalom DMSO-a (CH_2-2^{IV}), 1.82 (s, 4H, CH_2-2^{V}).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 3.16–3.14 (m, 4H, CH_2-2^{III}+CH_2-2^{IV}).

^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 159.17 (C-8), 158.35 (C-6a), 137.06 (C-2), 135.14 (C-3d), ne vidi se (C-2d), 130.72 (C-10), 128.68 (C-3), 116.71 (C-10a), 109.85 (C-9), 105.78 (C-7), 69.65 (C-5), 66.56 (C-2^{II}), 65.82 (C-2^{I}), 55.29 (OCH_3), 53.70 (C-2^{IV}), ne vidi se (C-2^{III}), 33.06 (C-4), 22.68 (C-2^{V}).

^{3}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 134.81 (C-2d).

3-((8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-il)metoksi)-*N*,*N*-dimetilpropan-1-amin (8c)



U otopinu 3-dimetilaminopropil klorid hidroklorida (0,46 g, 2,93 mmol) u 50% NaOH (15 ml) doda se otopina spoja **7** (0,11 g, 0,42 mmol) u toluenu te se doda benzil trietil amonijev klorid kao katalizator. Reakcijska smjesa se intenzivno miješa 24 sata na temperaturi vrenja (110°C). Nakon 24 sata, reakcijska smjesa se ohladi na sobnu temperaturu te se otapalo upari pri sniženom tlaku, a ostatak se tri puta ekstrahira s CH_2Cl_2. Organski sloj se upari pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom na silikagelu u sustavu CH_2Cl_2:CH_3OH = 10:1 $\rightarrow$ 5:1 kao eluensima. Izoliran je spoj **8c** u obliku svijetlo-žutog ulja (0,09 g, 60,7%).

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 7.49 (d, *J* = 8.72 Hz, 1H, CH-10), 6.85 (s, 1H, CH-3), 6.69/6.66 (dd, *J* = 2.62/8.73 Hz, 1H, CH-9), 6.57 (d, *J* = 2.62 Hz, 1H, CH-7), 4.54 (s, 2H, CH_2-2^{I}), 4.24 (t, *J* = 5.02 Hz, 2H, CH_2-5), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.46 (t, *J* = 6.46 Hz, 2H, CH_2-2^{II}), 3.10 (t, *J* = 4.47 Hz, 2H, CH_2-4), 2.26 (t, *J* = 7.07 Hz, 2H, CH_2-2^{IV}), 2.11 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 1.65 (p, *J* = 6.66/7.07 Hz, 2H, CH_2-2^{III}).

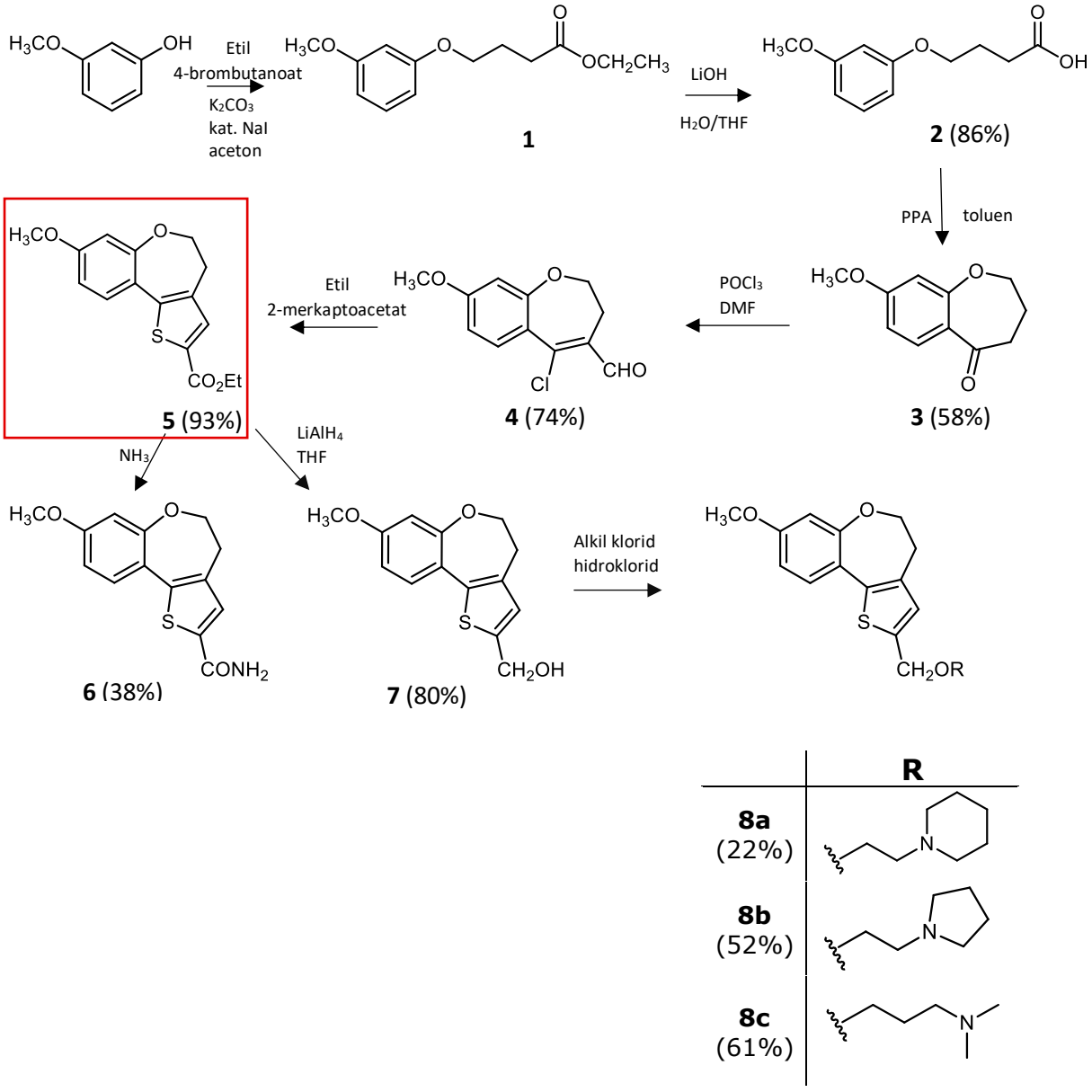
^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 159.57 (C-8), 158.78 (C-6a), 138.56 (C-2), 135.56 (C-3d), 134.99 (C-2d), 130.53 (C-10), 129.17 (C-3), 117.31 (C-10a), 110.29 (C-9), 106.26 (C-7), 70.13 (C-5), 68.13 (C-2^{II}), 66.97 (C-2^{I}), 56.43 (C-2^{IV}), 55.76 (OCH_3), 45.59 ($N(CH_3)_2$), 33.57 (C-4), 27.76 (C-2^{III}).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Sinteze spojeva

Sinteza novih spojeva prikazana je u shemi 1.

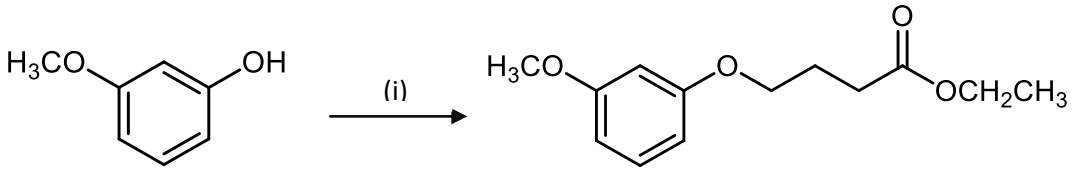
Ključni međuprodukt u sintezi novih spojeva je etil-8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksilat (**5**). Pripravljeni su različiti derivati 4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepina poput amida **6**, alkohola **7** i tri različita aminoalkoksi derivata **8a-c**.



Shema 1. Sinteza derivata 4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepina.

4.1.1. Williamsonova sinteza

U prvom koraku sinteze, alkilacijom 3-metoksifenola s etil 4-brombutanoatom dobiven je spoj **1**, etil 4-(3-metoksifenoksi)butanoat. Reakcija je provedena u acetonu, uz prisutnost K_2CO_3, a kao katalizator je korišten natrijev jodid. Ester je dobiven u kvantitativnom iskorištenju.

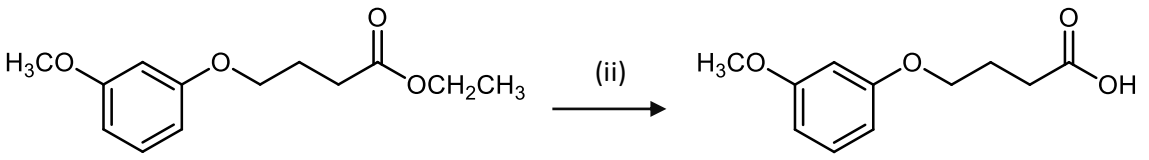


1

Shema 2. Sinteza spoja **1**; Reagensi i uvjeti: (i) etil 4-brombutanoat, K_2CO_3, kat. NaI, aceton, 55°C, refluks, 22 sata.

4.1.2. Hidroliza estera

Sljedeći korak sinteze je hidroliza estera **1** u reakciji kataliziranoj bazom, $LiOHxH_2O$. Reakcija se odvijala u otopini THF-a, metanola i vode. Dobivena smjesa se ekstrahirala s etil-acetatom. Reakcijom nastala karboksilna sol je ostala u vodenom sloju te se na taj način odvojila od organskih nečistoća. Zakiseljavanjem vodenog sloja s HCl dobiva se karboksilna kiselina **2**, 4-(3-metoksifenoksi)butanska kiselina. Ekstrakcijom s etil acetatom izolirana je karboksilna kiselina u prinosu od 86%. Kiselina nije dodatno pročišćavana.

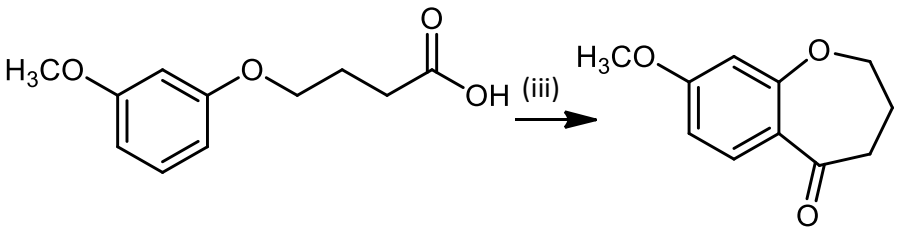


1 **2** (86%)

Shema 3. Sinteza spoja **2**; Reagensi i uvjeti: (i) LiOH, THF, metanol, H_2O, sobna temperatura, 21 sat.

4.1.3. Friedel-Craftsova acilacija

U trećem koraku karboksilna kiselina (**2**) ciklizira u keton, 8-metoksi-3,4-dihidrobenzo[*b*]oksepin-5(2*H*)-on (**3**), intramolekulskom Friedel-Craftsovom acilacijom u prisutnosti PPA u klorbenzenu, pri temperaturi od 80°C. Dodatkom karboksilne kiseline u zagrijanu PPA dolazi do stvaranja crveno-smeđe viskozne tekućine što je ukazalo na nastajanje ketona. Prinos reakcije nije bio zadovoljavajuć, 58%, što se može pripisati viskoznosti PPA uslijed nedovoljnog povišenja temperature reakcije zbog čega nije došlo do njenog potpunog reagiranja s karboksilnom kiselinom te otežanoj ekstrakciji s etil acetatom zbog čega dio produkta ostaje u vodenom sloju. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu.

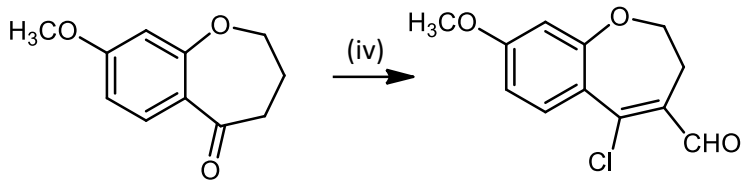


2 **3** (58%)

Shema 4. Sinteza spoja **3**; Reagensi i uvjeti: PPA, klorbenzen, 80°C, refluks, 24 sata.

4.1.4. Vilsmeier-Haackova formilacija

Vilsmeier-Haackov reagens pripravljen je miješanjem fosforovog oksiklorida, DMF-a i trikloretilena pri 0°C uz nastanak klorimnijevog iona, zaduženog za formilaciju ketona **3**. Naknadnim zagrijavanjem preko noći pri temperaturi od 90°C, te dodatkom natrijevog acetata u reakcijsku smjesu dobiven je produkt **4**, β-klorovinilni aldehid, 5-kloro-8-metoksi-2,3-dihidrobenzo[*b*]oksepin-4-karbaldehid, koji je pročišćen kromatografijom na stupcu i dobiven u prinosu od 76%.



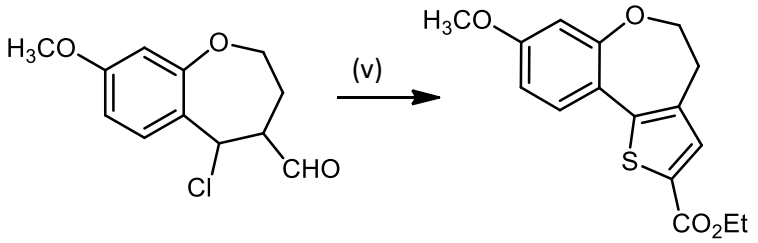
3 **4** (76%)

Shema 5. Sinteza spoja **4**; Reagensi i uvjeti: (i) $POCl_3$, DMF, trikloretilen, 90°C, refluks, 22 sata.

4.1.5. Fiesselmannova reakcija

U sljedećem koraku dolazi do stvaranja glavne strukturne komponente, benzotienooksepinske jezge, za sintezu željenog produkta. Fieselmann-ovom reakcijom β-klorvinil aldehida **4** i etil 2-merkapto acetata dolazi do stvaranja estera **5**, etil 8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksilata. Reakcija je provedena u piridinu i trietilaminu 4 sata pri temperaturi od 70°C. Koevaporacijom s toluenom uklonio se višak piridina. Pročišćavanjem kolonskom kromatografijom na stupcu ester je dobiven u obliku žutih kristala, u velikom prinosu od 93%.

Anulacijom tiofenskog prstena odnosno izgradnjom proširenog konjugiranog sustava pojačavaju se fluorescentna svojstva estera **5** što je vidljivo osvjetljavanjem spoja UV svjetlošću valnih duljina 254 i 365 nm.



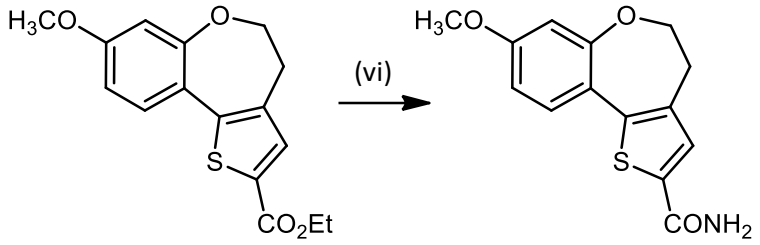
4 **5** (93%)

Shema 6. Sinteza spoja **5**; Reagensi i uvjeti: etil 2-merkapto acetat, piridin, trietilamin, 70°C, refluks, 4 sata.

4.1.6. Amonoliza estera

Amonolizom estera **5** u ovom koraku sinteze nastaje 8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-karboksiamid (**6**). U ester otopljen u dioksanu i metanolu, uvodi se plinoviti amonijak uz miješanje na sobnoj temperaturi. Nakon sveukupno dva tjedna miješanja na sobnoj temperaturi u zasićenoj otopini amonijaka, prinos reakcije nakon pročišćavanja bio je 38%.

Osvjetljavanjem amida **6** UV svjetlošću valnih duljina 254 i 365 nm uočava se plava boja, ali ne toliko intenzivna kao kod estera **5** što se može pripisati zamjeni karboksilne skupine s amidnom skupinom.



5 **6** (38%)

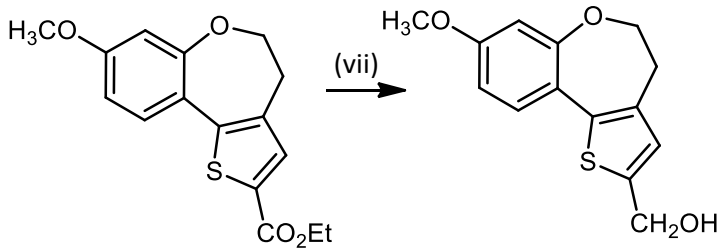
Shema 7. Sinteza spoja **6**; Reagensi i uvjeti: NH_3, dioksan, metanol, sobna temperatura, 13 dana.

4.1.7. Redukcija estera

U otopinu estera **5** i tetrahidrofurana dokapavala se otopina $LiAlH_4$ u THF-u te je došlo do redukcije estera u alkohol **7**, (8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-il)metanol. Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu dodala se voda kako bi se uklonio neizreagirani $LiAlH_4$. Alkohol je nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom dobiven u prinosu od 80%.

Osvjetljavanjem tiofenskog alkohola **7** UV svjetlošću valne duljine 365 nm, intenzitet plave boje je veoma slab, skoro nevidljiv, u odnosu na

intenzitet estera **5** i amida **6**. Razlog gubitka fluorescencijskih svojstava je zamjena karboksilne skupine s hidroksilnom.

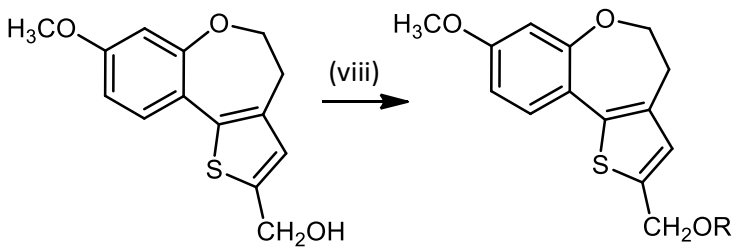


5 **7** (80%)

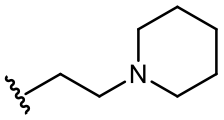
Shema 8. Sinteza spoja **7**; Reagensi i uvjeti: $LiAlH_4$, THF, sobna temperatura, 2 sata.

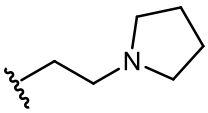
4.1.8. Vezanje amino lanaca na alkohol

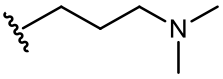
U posljednjem koraku sinteze cilj je bio vezati tri različita amino lanca na primarnu hidroksimetilensku skupinu u položaju 1 tiofenskog prstena spoja **7**. Alkohol otopljen u toluenu reagira s alkil klorid hidrokloridom u baznom okruženju s benzil trietil amonijevim kloridom kao katalizatorom. Reakcijske smjese su se miješale preko noći na temperaturi vrenja toluena. Svi dobiveni spojevi, **8a-c**, su pročišćeni kolonskom kromatografijom te dobiveni u prinosima od 22% (1-(2-kloretil)piperidin hidroklorid, **8a**), 52% (1-(2-kloretil)pirolidin hidroklorid, **8b**) i 61% (3-dimetilaminopropil klorid hidroklorid, **8c**).



7 **8a-c**

R= **a** (22%) 

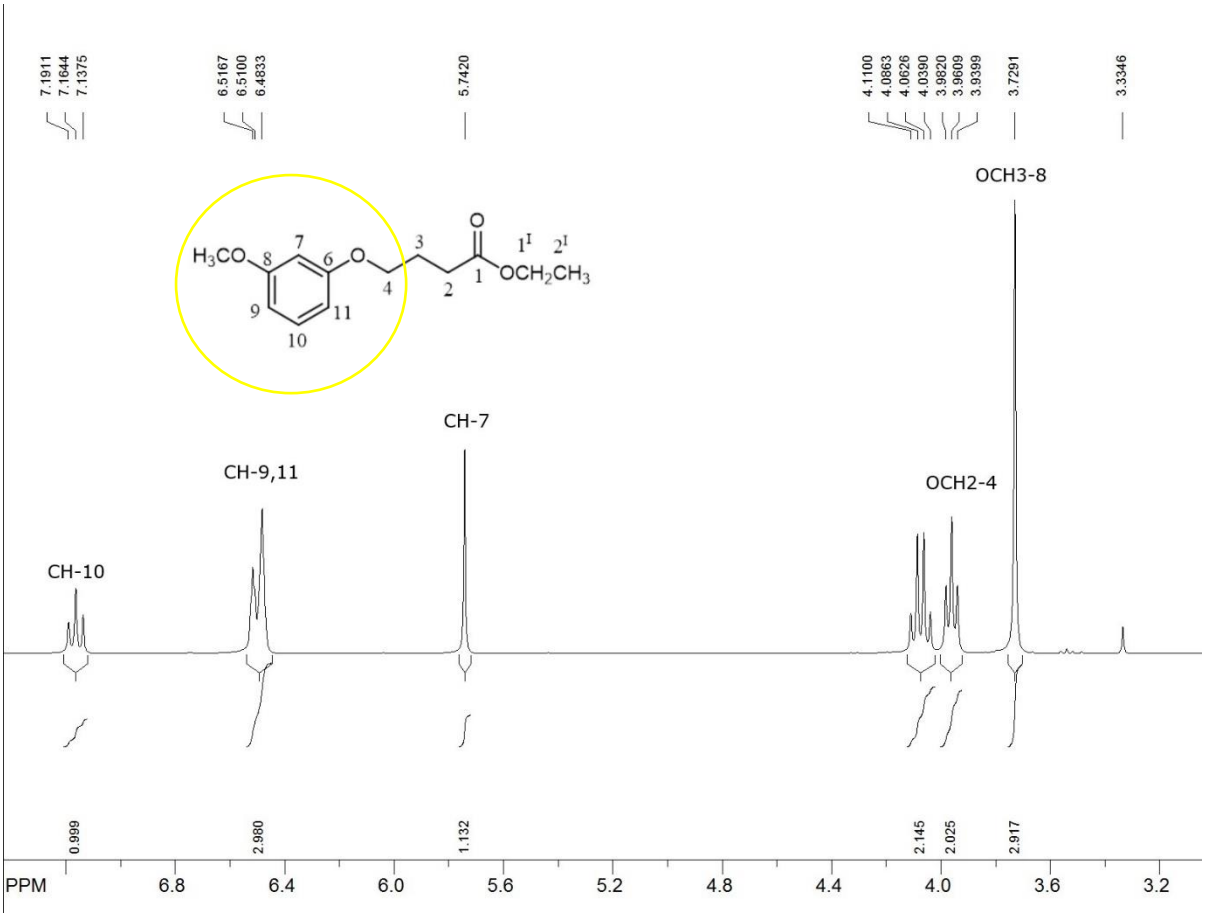
b (52%) 

c (61%) 

Shema 9. Prikaz sinteze spojeva **8a-c**; Reagensi i uvjeti: alkil klorid hidroklorid (R), NaOH, toluen, benzil trietil amonijev klorid, 110°C, refluks, 24 sata.

4.2. Analiza spektara ^{1}H NMR

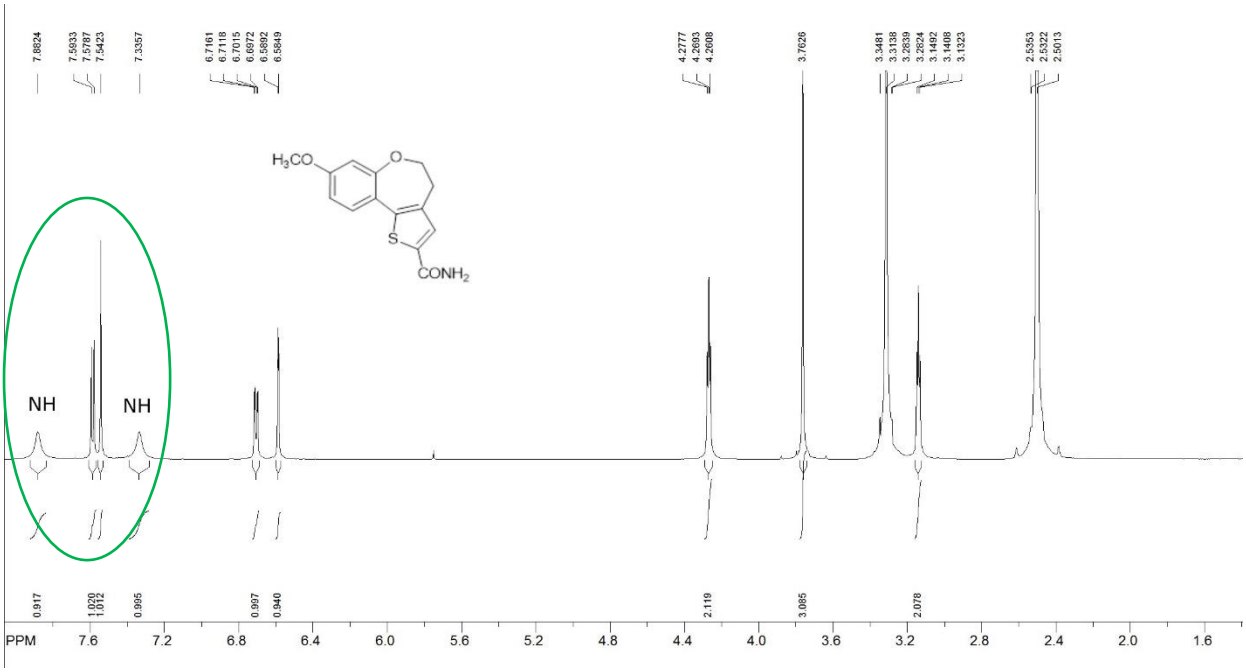
Pomoću NMR spektara praćene su promjene prilikom reakcija sinteze. Strukture svih pripravljenih spojeva određene su na temelju kemijskih pomaka, veličine signala, veličine i multipliciteta rezonancije te sprega spin-spin između jezgara H-H. Spektri ^{1}H NMR za sve dobivene spojeve sadrže karakteristične signale za protone metoksi skupine na benzenskom prstenu (~3,8 ppm), signale vodikovih atoma metilenske skupine u susjedstvu kisikovog atoma oksepinskog prstena (~3,9-4,4 ppm) i signale aromatskih protona na benzenu (slika 14.) što ukazuje da je glavni skelet očuvan tijekom sinteze željenog konačnog produkta.



Slika 14. Dio ^{1}H NMR spektra spoja **1** prikazuje karakteristične signale koje sadrže svi spojevi dobiveni u opisanoj sintezi.

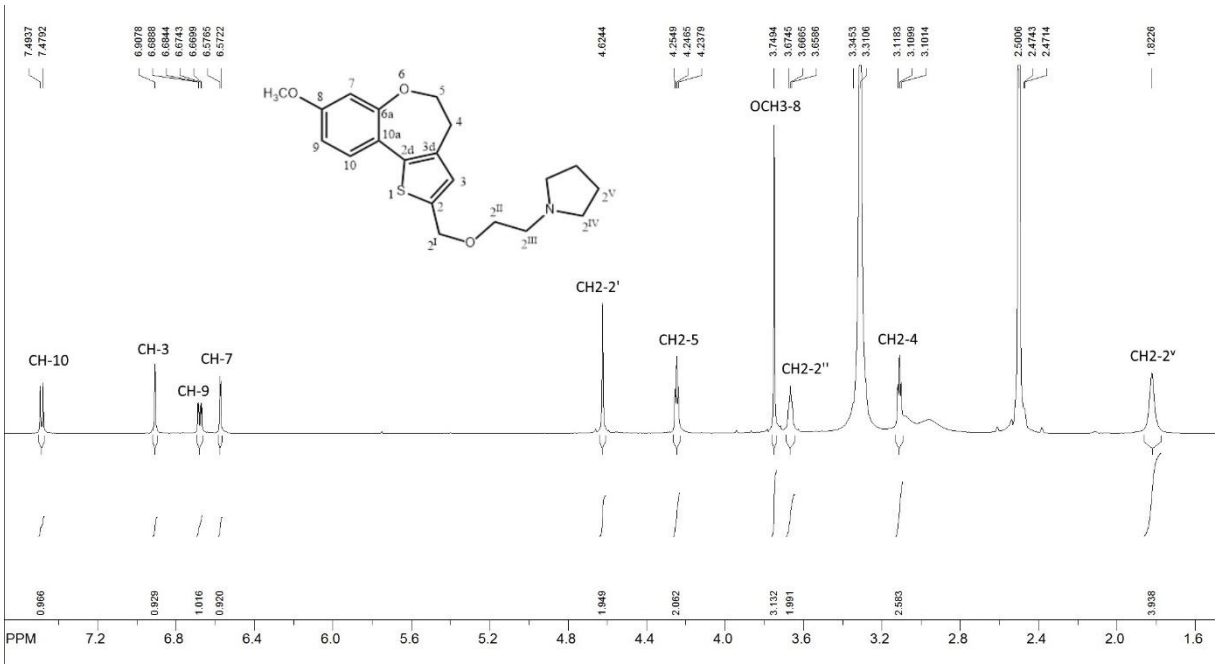
Hidrolizom estera u NMR spektru može se vidjeti nastanak širokog singleta na ~12,1 ppm signala karakterističnog za proton karboksilne

kiseline. Prilikom ciklizacije uočava se gubitak signala za karboksilnu skupinu i pomak svih signala protona prema nižim poljima za ~0,5 ppm. U Vilsmeier-Haackovoj reakciji stvara se β-klorvinil aldehid što potvrđuje singlet signal na 10,23 ppm. Stvaranjem tiofenskog prstena u spektru nestaje singlet signal za aldehid, a pojavljuju se triplet i kvartet signal za alifatske protone te aromatski singlet tiofenskog prstena. Amonolizom estera stvaraju se dva šira singlet signala za protone amidne skupine, te nestaju triplet i kvartet signali alifatskih protona estera (slika 15.).

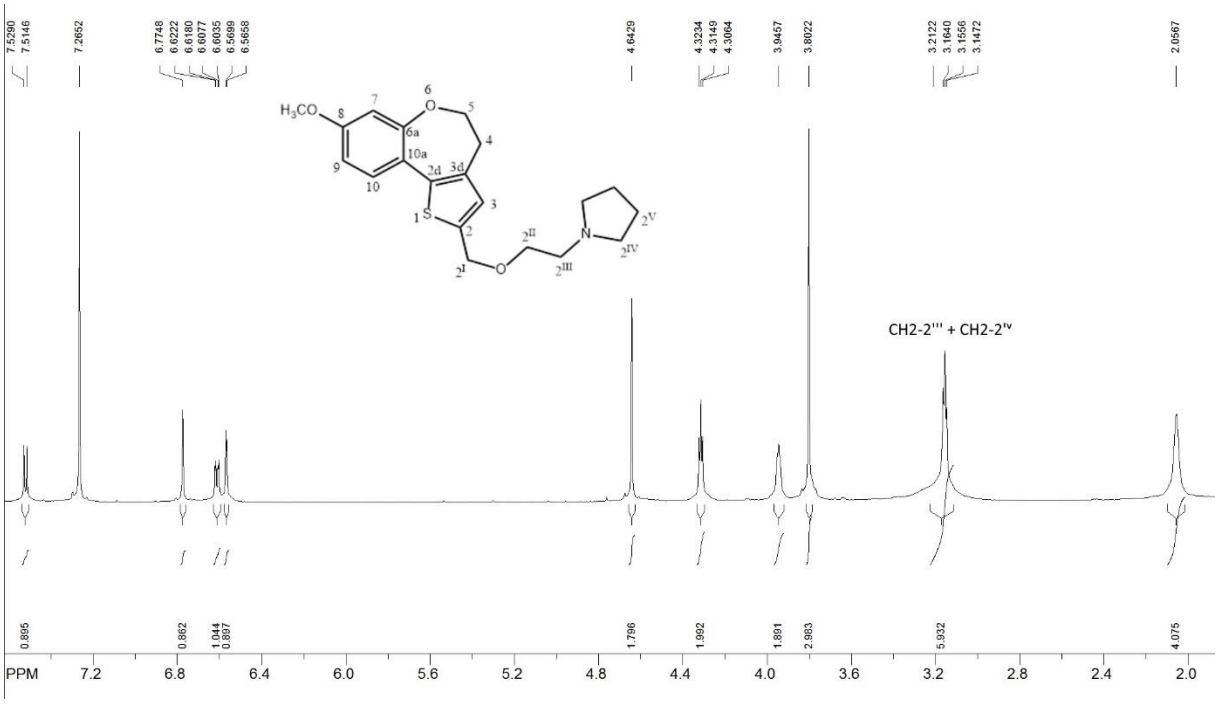


Slika 15. ^{1}H NMR spektar spoja **6** na kojem su označeni signali karakteristični za protone amidne skupine.

Redukcijom estera pojavljuje se triplet signal na ~5,4 ppm što odgovara hidroksilnoj skupini i dublet signal na ~4,5 ppm za protone CH_2 na hidroksilnoj skupini što dokazuje nastanak alkohola. U spektrima konačnih produkata, aminoalkoksi derivatima tiofenskog alkohola **8a-c**, vidi se gubitak hidroksilne skupine i pojava signala karakterističnih za pojedini lanac. U spoju **8b** pojedini signali nisu mogli biti uočeni jer su se preklapali sa signalom otapala, DMSO, pa je spektar morao biti ponovno napravljen u drugom otapalu, $CDCl_3$ (slika 16. i 17.).



Slika 16. ^{1}H NMR spektar spoja **8b** u otapalu DMSO-d_6.



Slika 17. ^{1}H NMR spektar spoja **8b** u CDCl3. Vidljivi su signali protona metilenskih skupina koji su bili prekriveni u slučaju kada se kao otapalo koristio DMSO-d_6.

5. Zaključak

U sklopu ovog diplomskog rada sintetizirani su derivati 4,5-dihidro[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepina (**5-8**). Ključni intermedijer sinteze, ester **5**, pripravljen je u pet reakcijskih koraka koji uključuju stvaranje benzoksepinskog prstena kroz Friedel-Craftsovu acilaciju te anulaciju tiofenskog prstena s Fiesselmannovom reakcijom. Nadalje, uspješno su pripravljeni različiti derivati 4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepina poput amida **6** i alkohola **7** te tri različita derivata (8-metoksi-4,5-dihidrobenzo[*b*]tieno[2,3-*d*]oksepin-2-il)metanola, **8a-c** (1-(2-kloretil)piperidin hidroklorid (**8a**), 1-(2-kloretil)pirolidin hidroklorid (**8b**) i 3-dimetilaminopropil klorid hidroklorid (**8c**)). Strukture svih pripravljenih spojeva su razjašnjene korištenjem ^{1}H i ^{13}C NMR spektroskopije. Svim spojevima će biti ispitana protuupalna učinkovitost, posebice sposobnost inhibicije NF-κB i JAK/STAT signalnih puteva.

6. Literatura

1. Ivanenkov, Y. A., Balakin, K. V. & Lavrovsky, Y. Small Molecule Inhibitors of NF-kB and JAK/STAT Signal Transduction Pathways as Promising Anti-Inflammatory Therapeutics. 24
2. Kuntala, N., Telu, J. R., Anireddy, J. S. & Pal, S. A Brief Overview on Chemistry and Biology of Benzoxepine. *Lett. Drug Des. Discov.* **14**, (2017).
3. Benzopyran and benzoxepin PI3K inhibitor compounds and methods of use - Patent US7928248 - PubChem. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US7928248. (Accessed: 31st August 2019)
4. Olivera, R., Sanmartin, R., Churruca, F. & Domínguez, E. DIBENZO[*bf*]OXEPINES: SYNTHESES AND APPLICATIONS. A REVIEW. *Org. Prep. Proced. Int.* **36**, 297–330 (2004).
5. Pešić, D. *et al.* Dibenzo[b,f]oxepin-10(11H)-one and dibenzo[b,f]thiepin-10(11H)-one as useful synthons in the synthesis of various dibenzo[e,h]azulenes. *J. Heterocycl. Chem.* **49**, 243–252 (2012).
6. Humski, A. Escherichia coli - opomena sustavu kontrole sigurnosti hrane. 96
7. Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, (2018).
8. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).

9. Gilmore, T. D. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
10. Škunca, Ž. & Planinc-Peraica, A. Prognostički utjecaj NF-κB ekspresije kod podskupina difuznog B-velikostaničnog limfoma. in (2015).
11. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 17023 (2017).
12. Rawlings, J. S. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* **117**, 1281–1283 (2004).
13. Malemud, C. & Pearlman, E. Targeting JAK/STAT Signaling Pathway in Inflammatory Diseases. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **4**, 201–221 (2009).
14. Nwibo, D. D., Levi, C. A. & Nwibo, M. I. Small Molecule Drugs; Down but Not Out: A Future for Medical Research and Therapeutics. 8
15. Kulkarni, R., Achaiah, G. & Narahari Sastry, G. Novel Targets for Antiinflammatory and Antiarthritic Agents. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 2437–2454 (2006).
16. Young, E. R. R. CHAPTER 9. IKKβ as a Therapeutic Intervention Point for Diseases Related to Inflammation. in *RSC Drug Discovery* (ed. Levin, J. I.) 255–296 (Royal Society of Chemistry, 2012). doi:10.1039/9781849735346-00255
17. Burke, J. R. *et al.* BMS-345541 Is a Highly Selective Inhibitor of IκB Kinase That Binds at an Allosteric Site of the Enzyme and Blocks NF-κB-

dependent Transcription in Mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 1450–1456 (2003).

18. Bhagwat, S. S. Kinase inhibitors for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders. *Purinergic Signal.* **5**, 107–115 (2009).

19. Skynner, M., Jeffrey, P., Binks, M. & Woodrow, M. CHAPTER 8. Janus Kinases – Just Another Kinase or a Paradigm Shift for the Treatment of Autoimmune Disease? in *RSC Drug Discovery* (ed. Levin, J. I.) 211–254 (Royal Society of Chemistry, 2012). doi:10.1039/9781849735346-00211

20. Eicher, T., Hauptmann, S. & Speicher, A. *The Chemistry of Heterocycles*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/352760183X

21. Gomtsyan, A. Heterocycles in drugs and drug discovery. *Chem. Heterocycl. Compd.* **48**, 7–10 (2012).

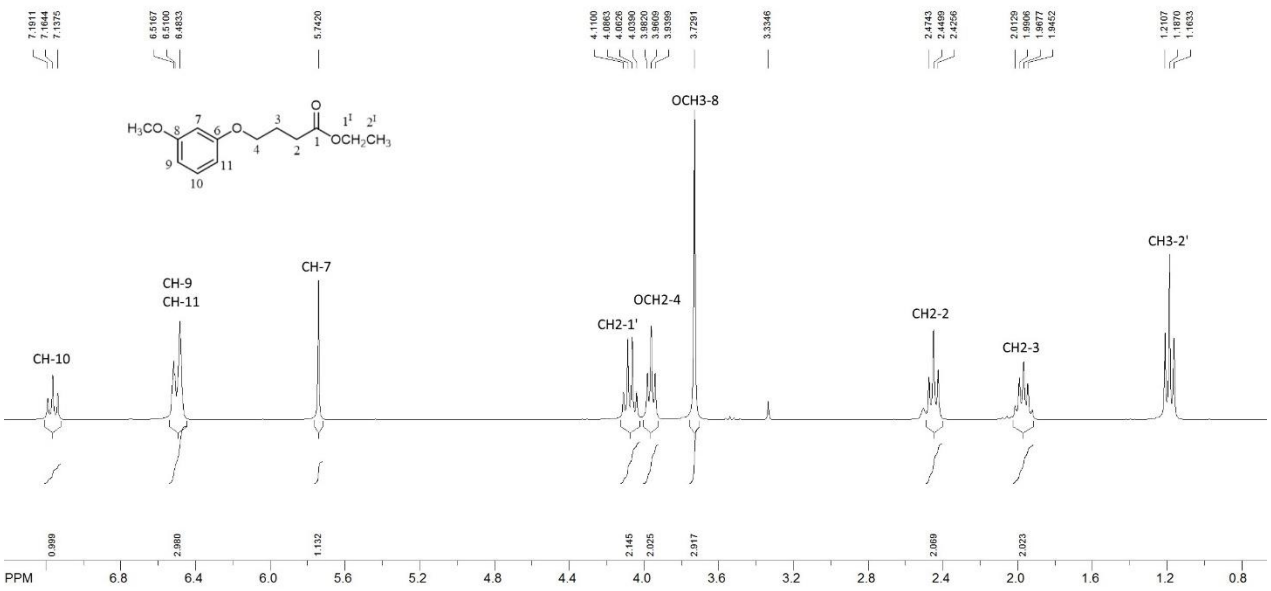
22. Mishra, R. & Sharma, P. K. A Review on Synthesis and Medicinal Importance of Thiophene. 14

23. Shah, R. & Verma, P. K. Therapeutic importance of synthetic thiophene. *Chem. Cent. J.* **12**, 137 (2018).

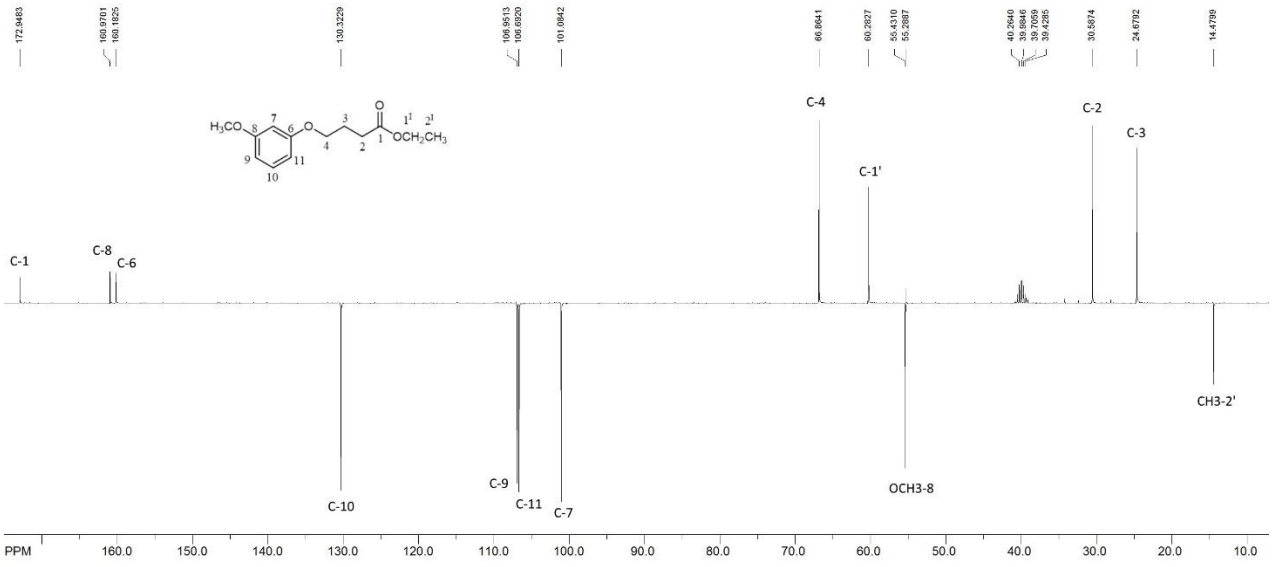
24. Gao, W. *et al.* An efficient access to the synthesis of novel 12-phenylbenzo[6,7]oxepino[3,4- *b*]quinolin-13(6 *H*)-one derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 1849–1857 (2012).

25. Das, B. *et al.* An Efficient Synthesis of 2-Benzoxepines from Morita–Baylis–Hillman Adducts Using Heterogeneous Recyclable Catalysts. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **54**, 403–405 (2006).

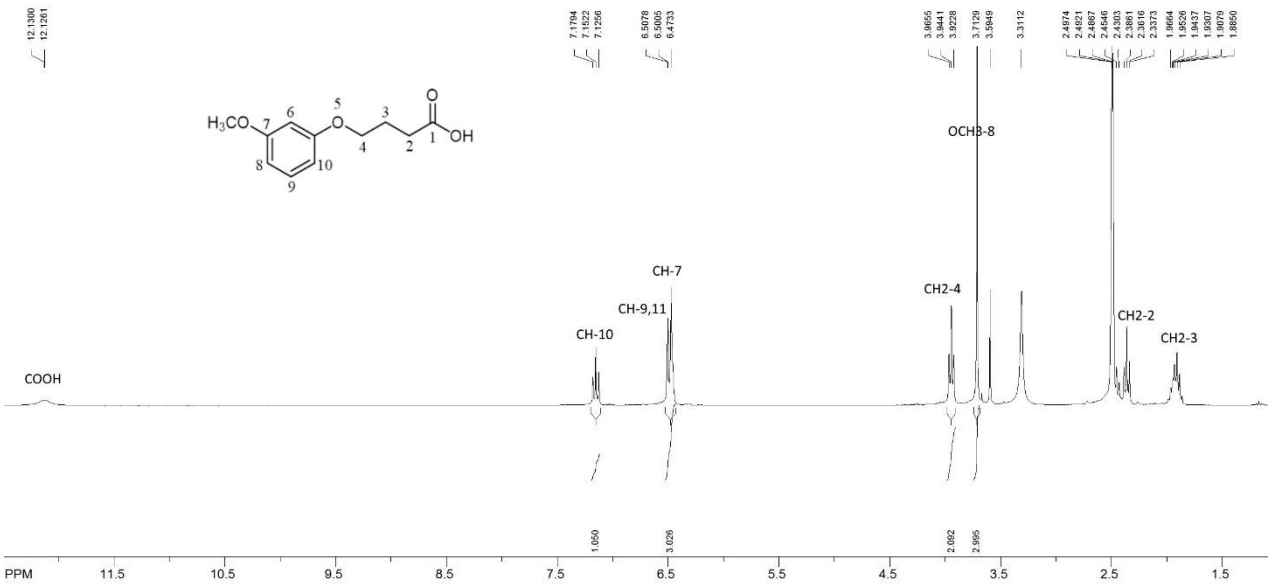
7. Dodaci



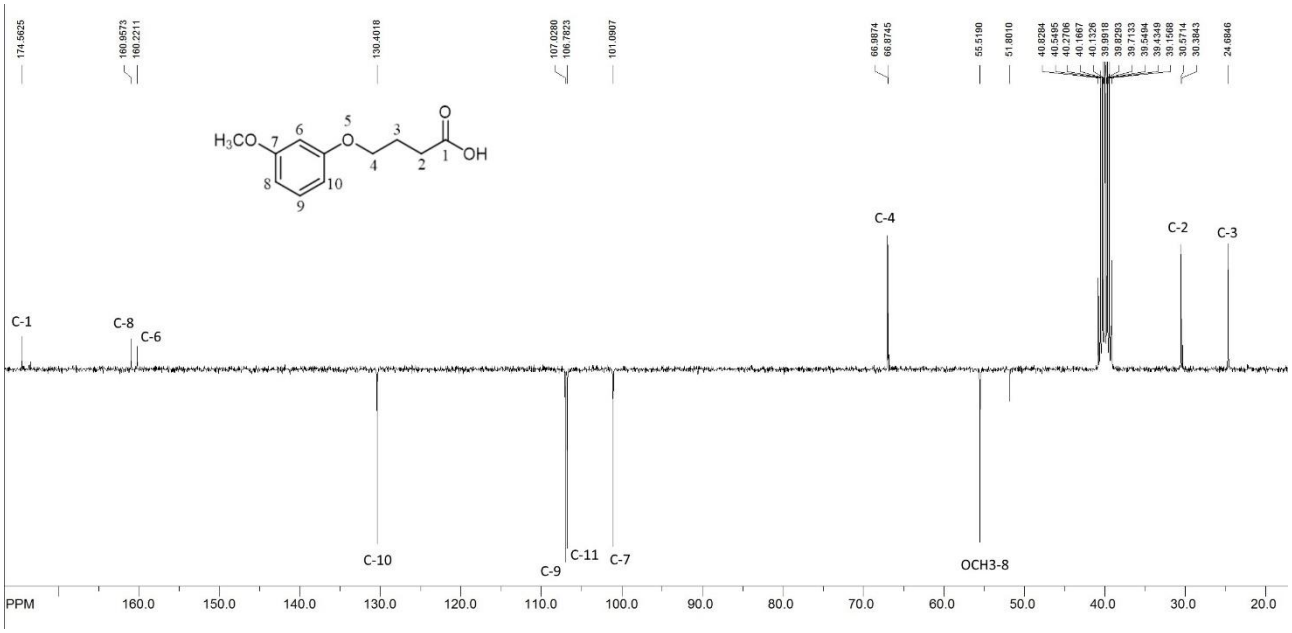
Slika 18. ^{1}H NMR spektar spoja **1** u DMSO-d_6 pri 300 MHz.



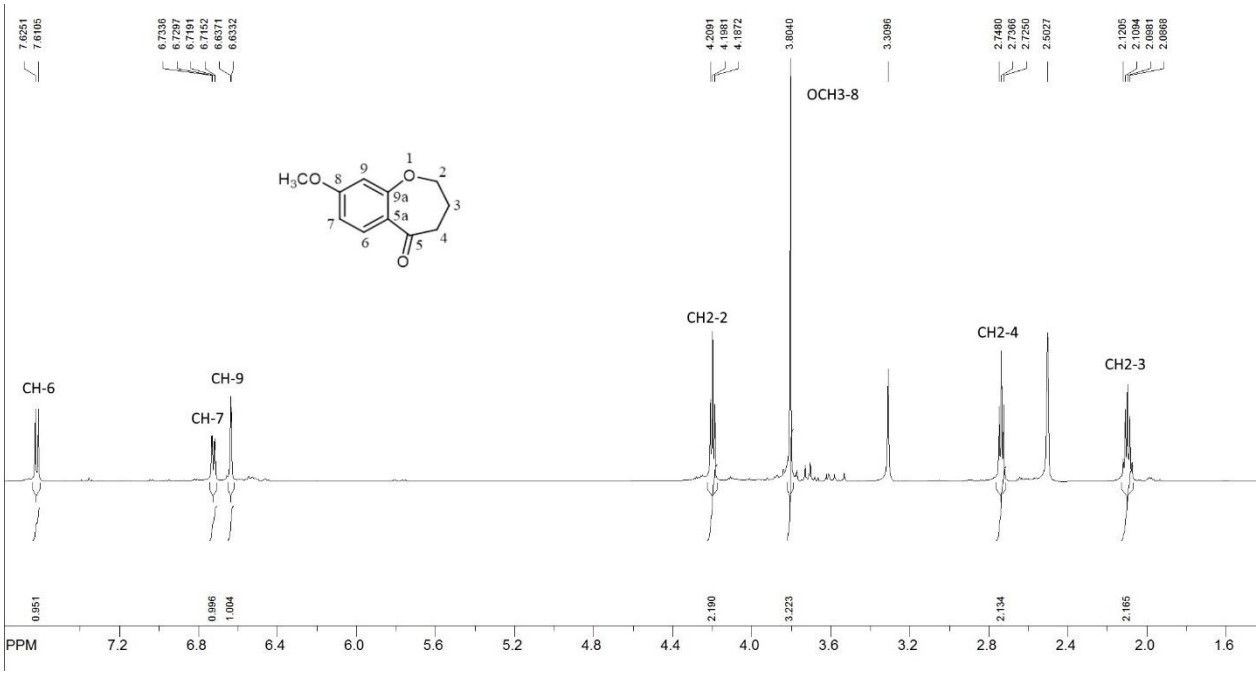
Slika 19. ^{13}C NMR spektar spoja **1** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



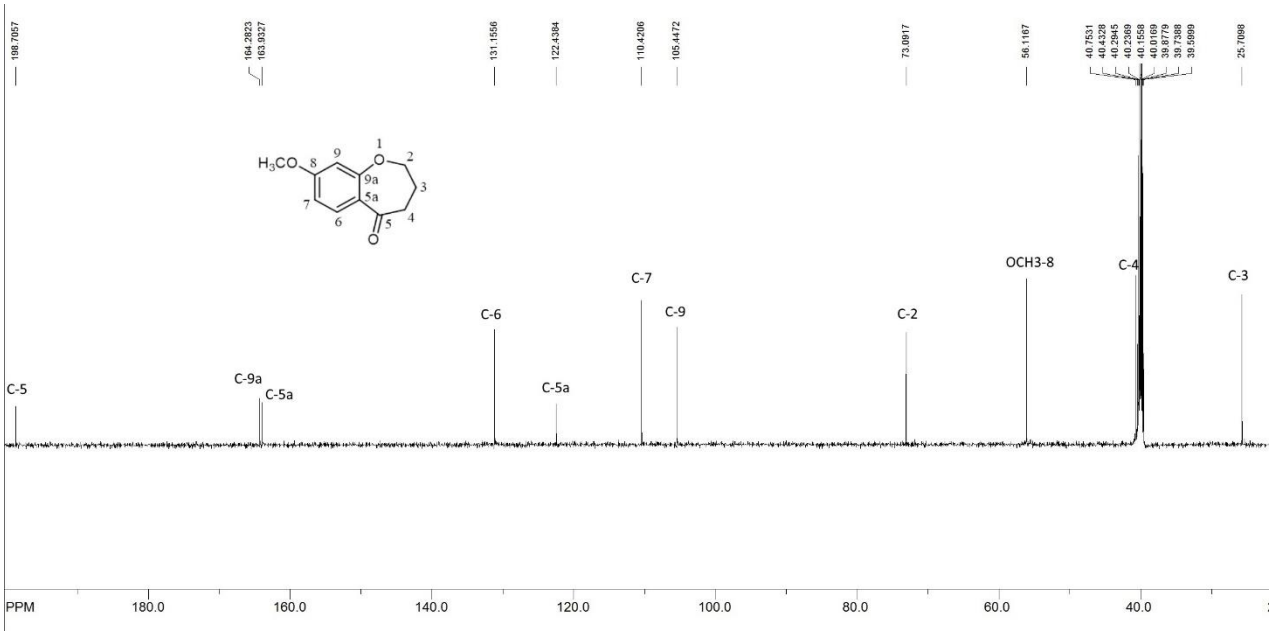
Slika 20. ^{1}H NMR spektar spoja **2** u DMSO-d_6 pri 300MHz.



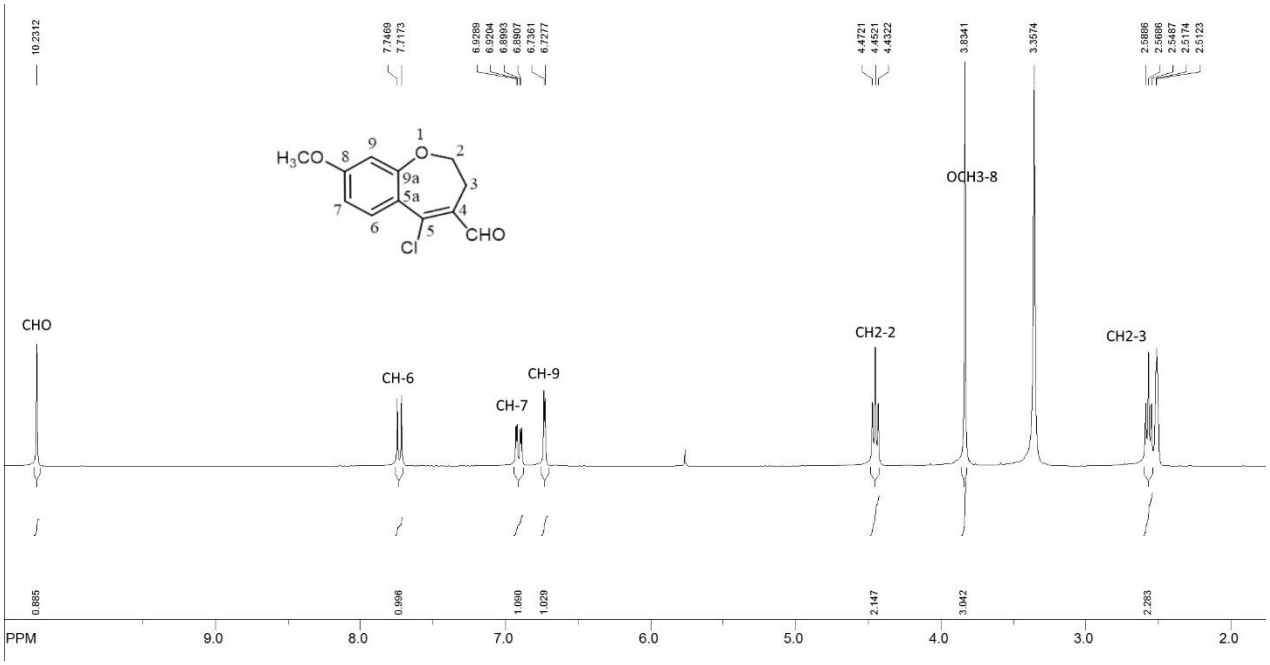
Slika 21. ^{13}C NMR spektar spoja **2** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



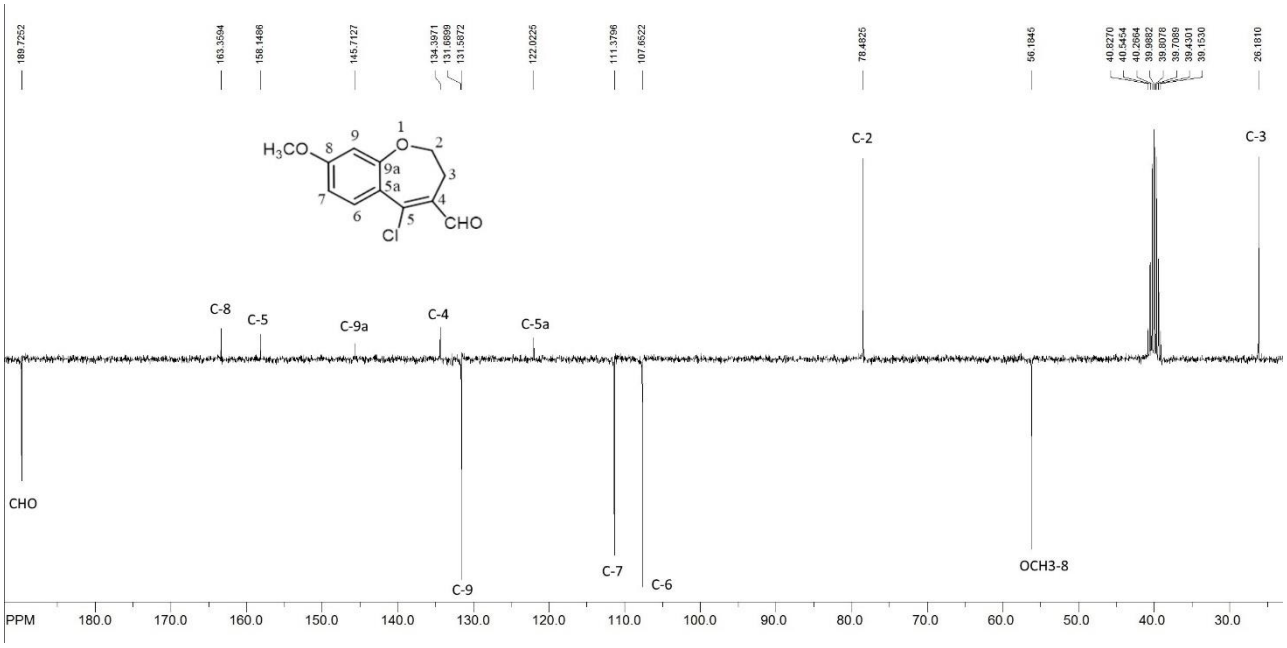
Slika 22. ^{1}H NMR spektar spoja **3** u DMSO-d_6 pri 600 MHz.



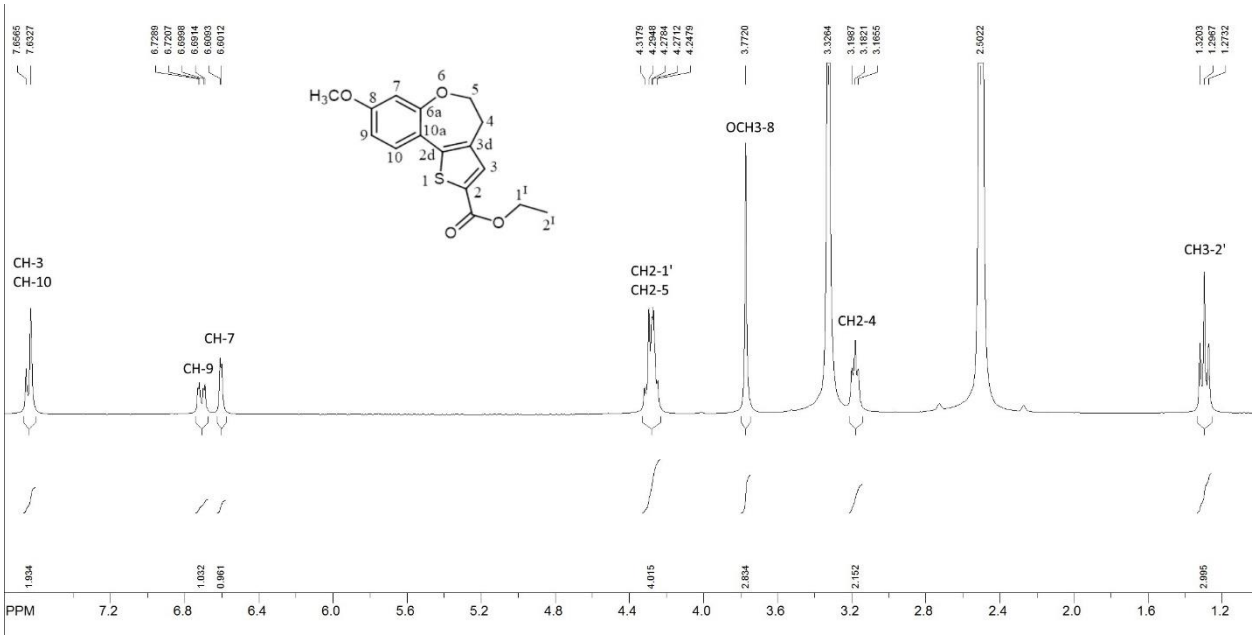
Slika 23. ^{13}C NMR spektar za spoj **3** u DMSO-d_6 pri 150 MHz.



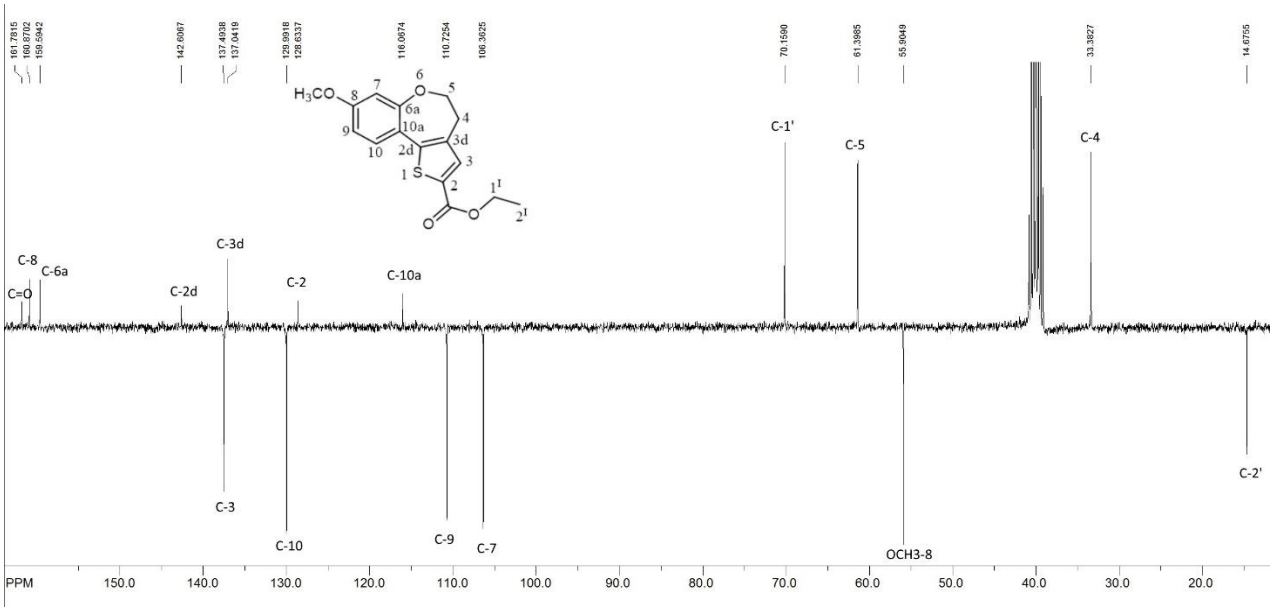
Slika 24. ^{1}H NMR spektar spoja **4** u DMSO-d_6 pri 300 MHz.



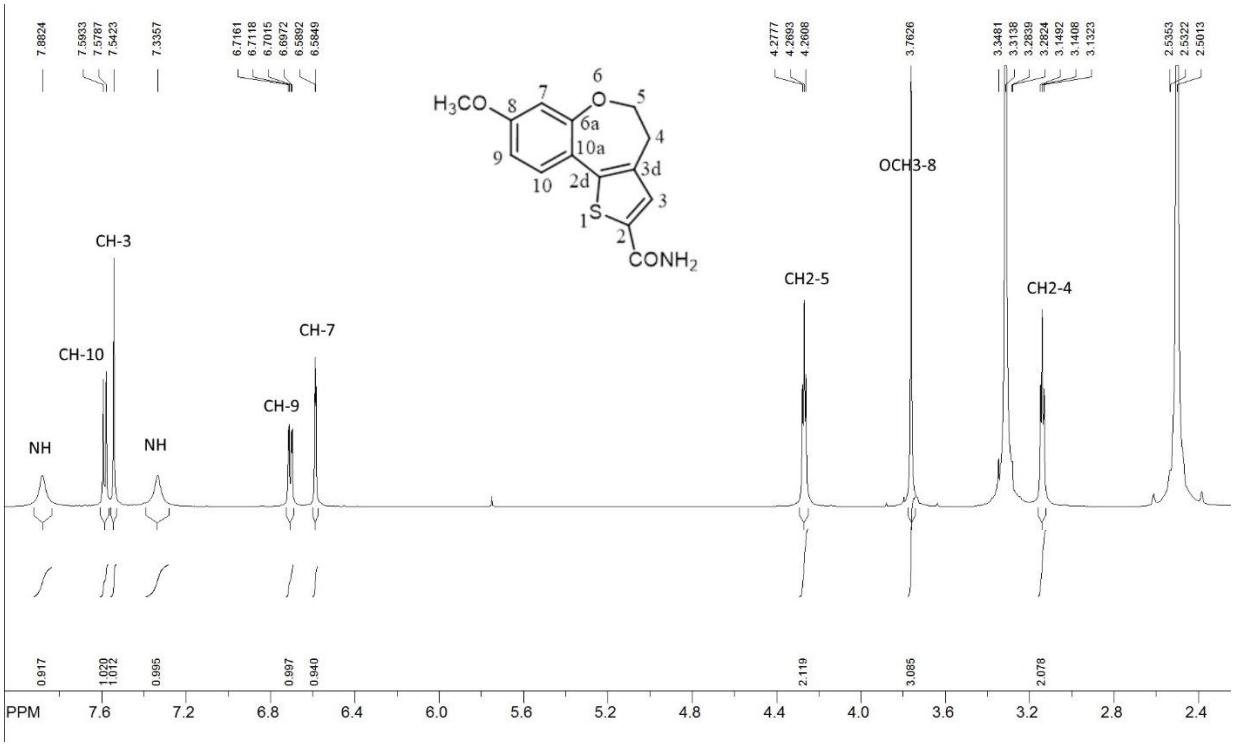
Slika 25. ^{13}C NMR spektar spoja **4** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



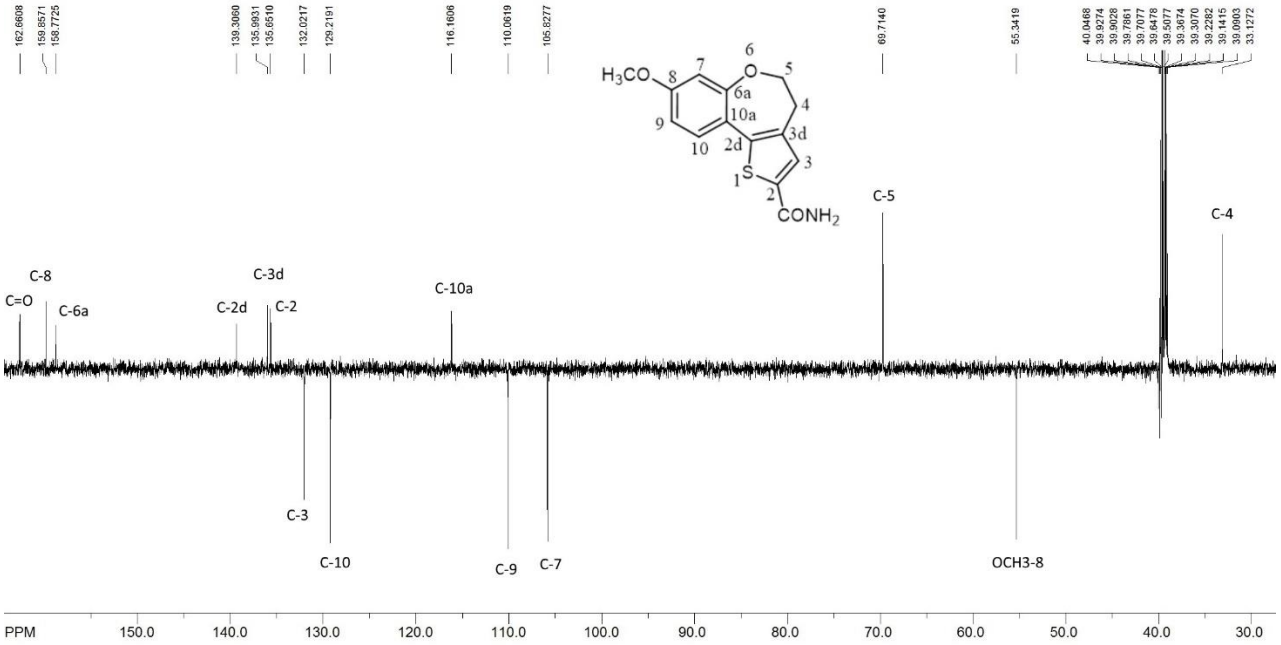
Slika 26. ^{1}H NMR spektar spoja **5** u DMSO-d_6 pri 300MHz.



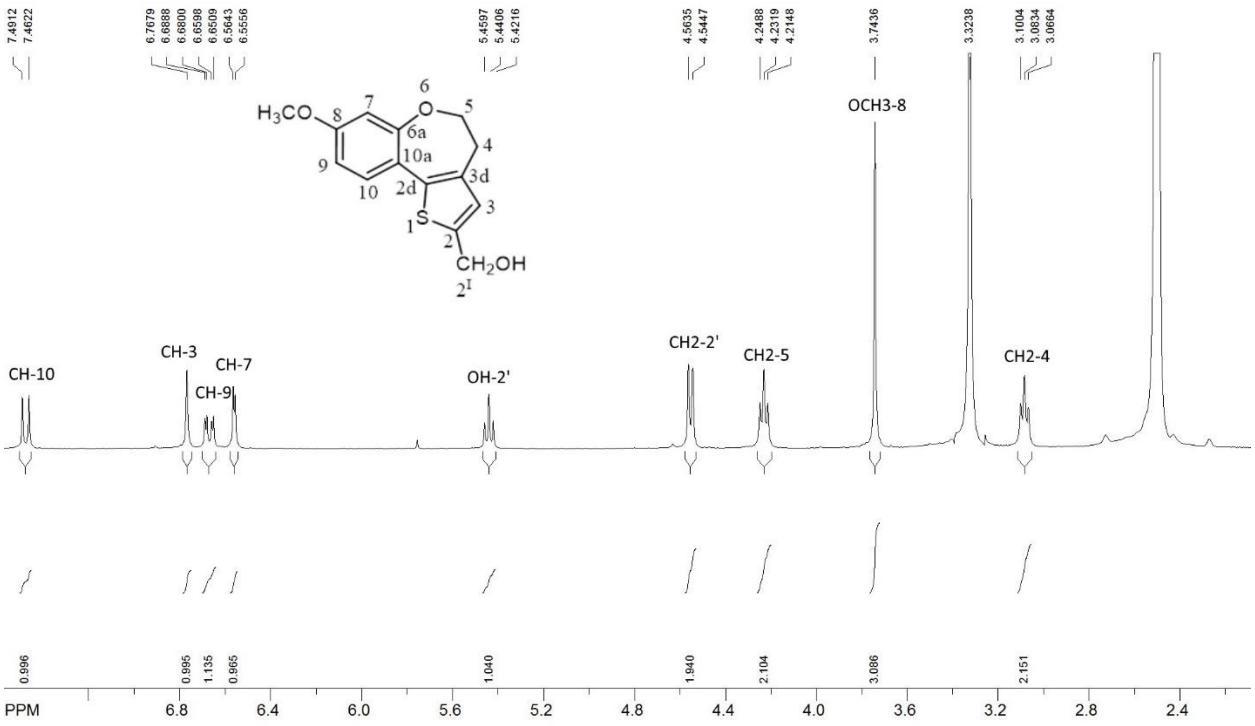
Slika 27. ^{13}C NMR spektar spoja **5** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



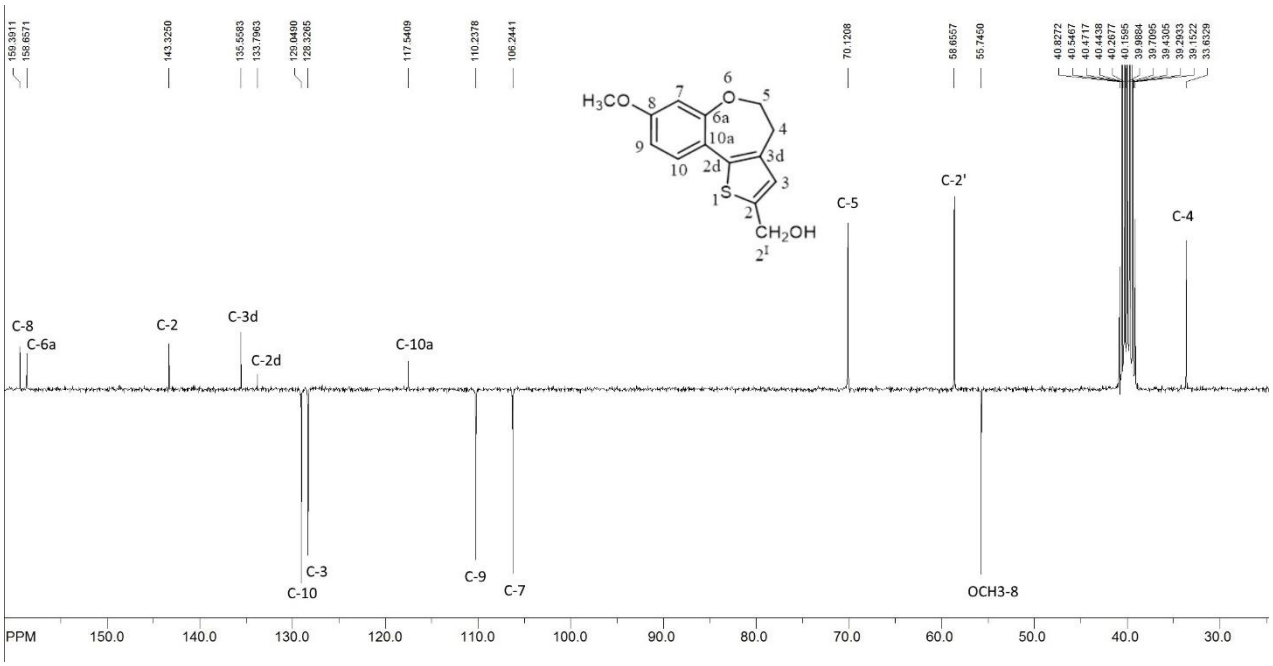
Slika 28. ^{1}H NMR spektar spoja **6** u DMSO-d_6 pri 600 MHz.



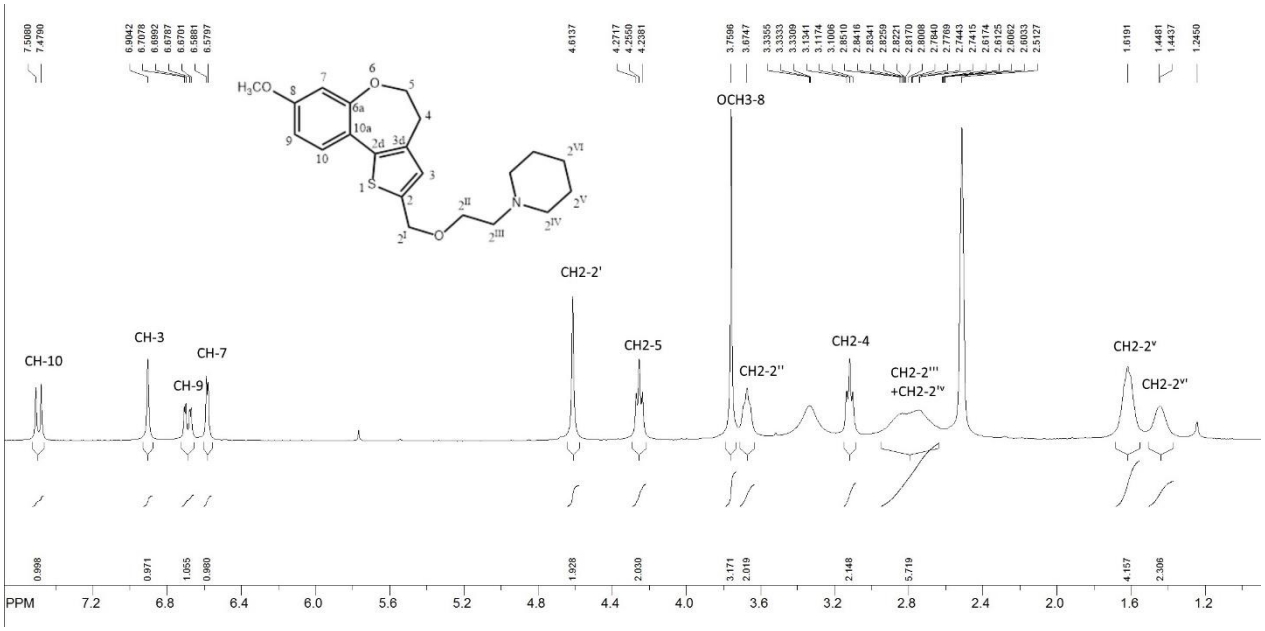
Slika 29. ^{13}C NMR spektar spoja **6** u DMSO-d_6 pri 150 MHz.



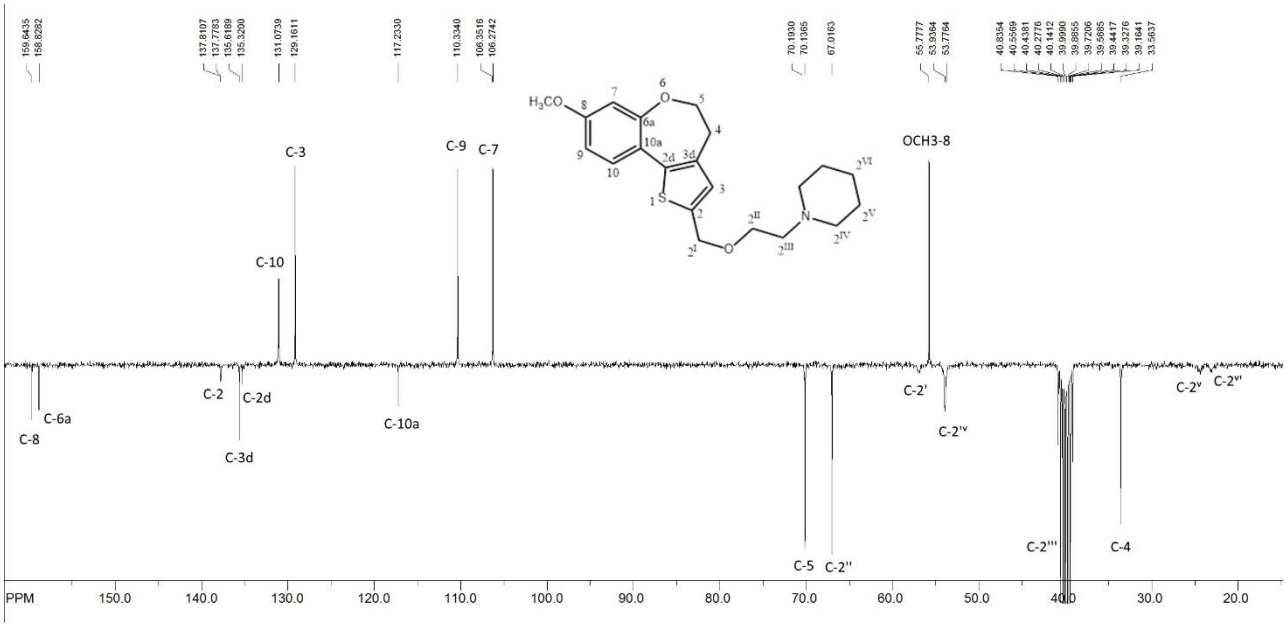
Slika 30. ^{1}H NMR spektar spoja **7** u DMSO-d_6 pri 300 MHz.



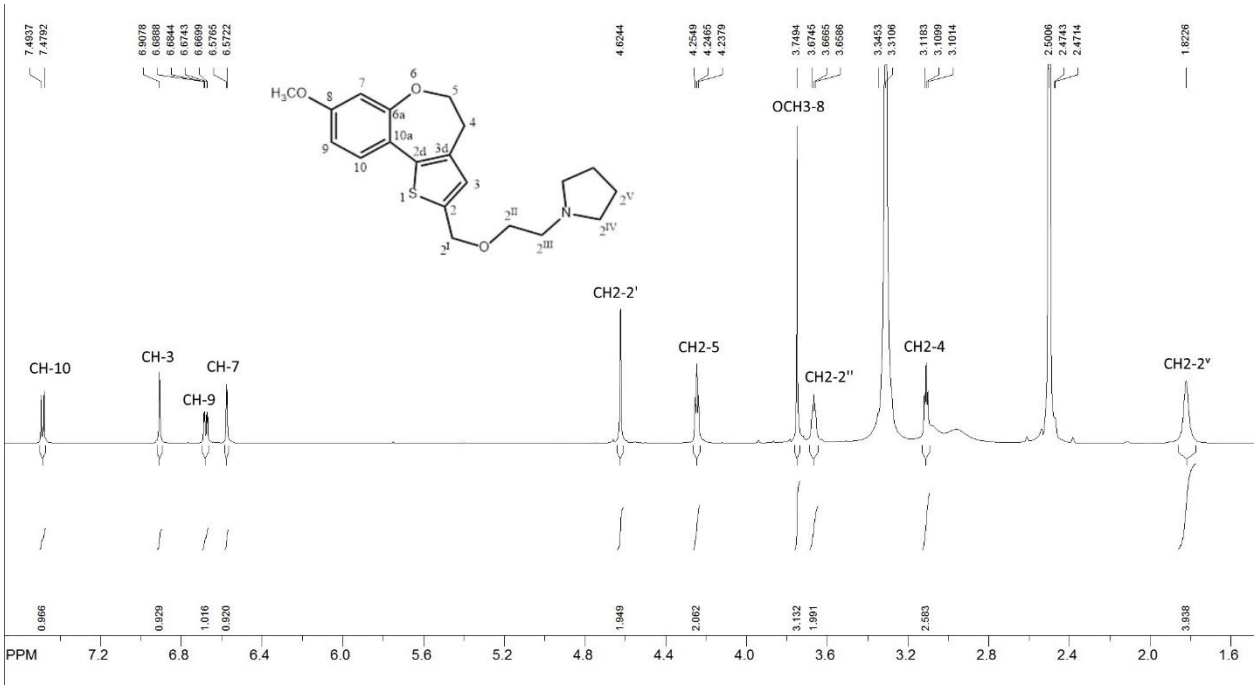
Slika 31. ^{13}C NMR spektar spoja **7** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



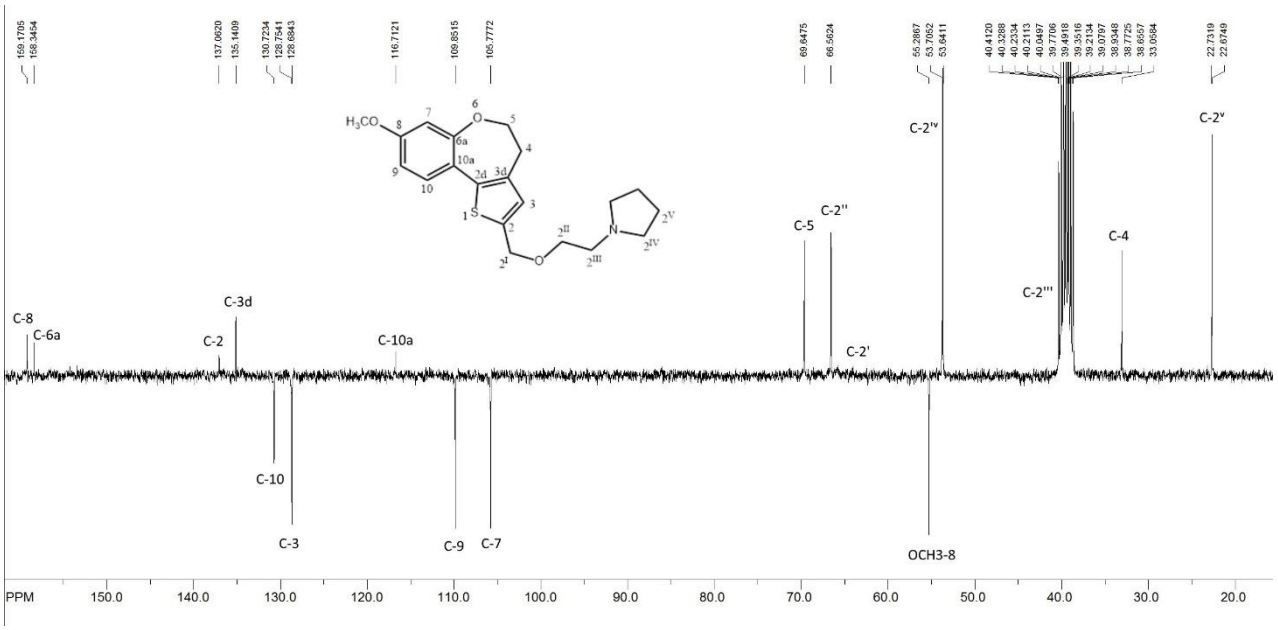
Slika 32. ^{1}H NMR spektar spoja **8a** u DMSO-d_6 pri 300 MHz.



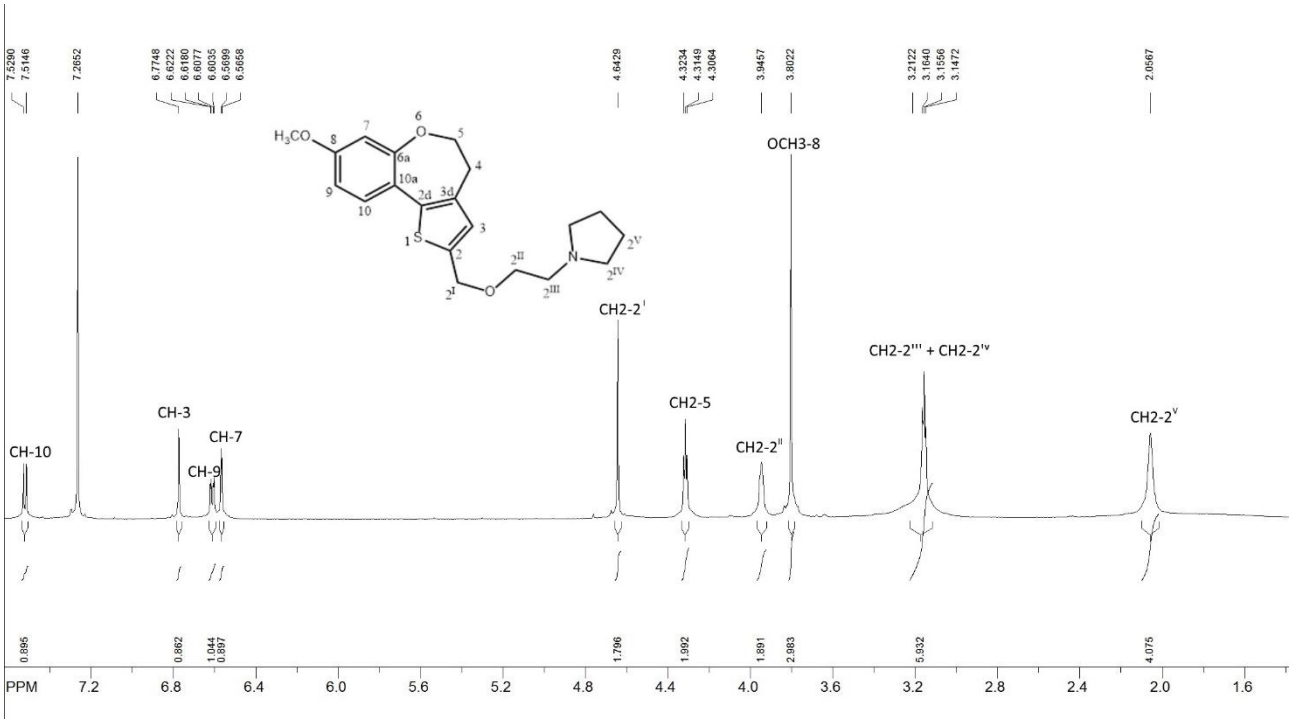
Slika 33. ^{13}C NMR spektar spoja **8a** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



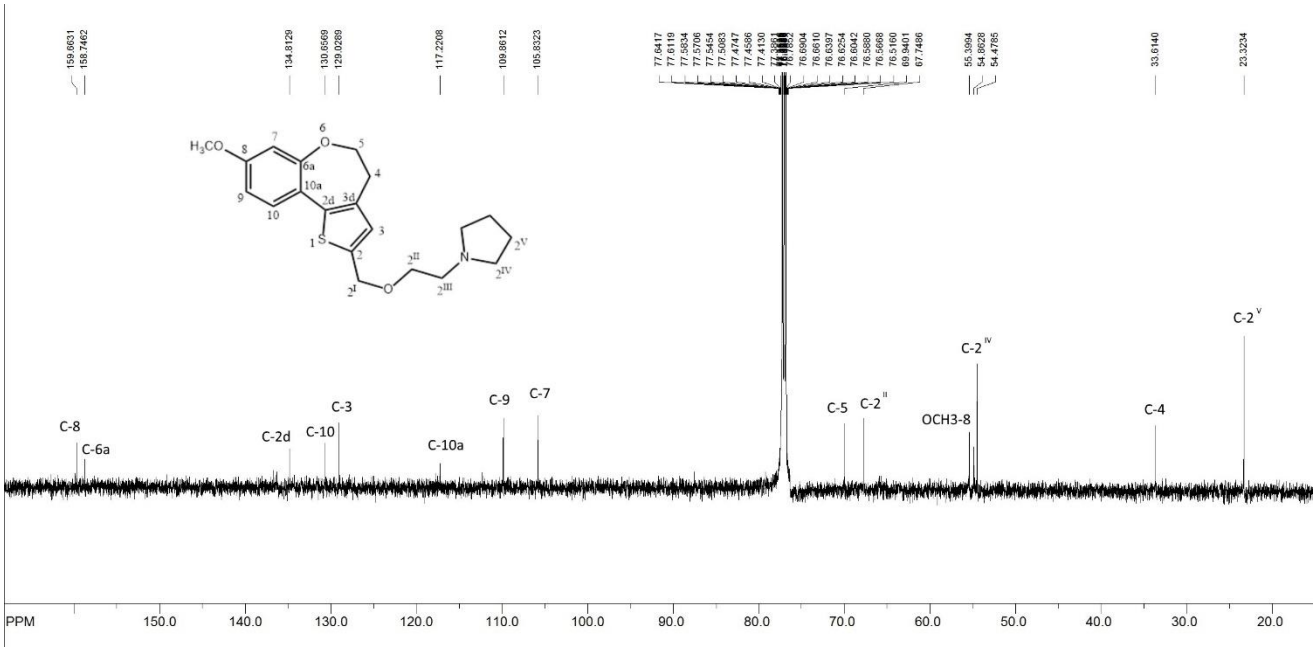
Slika 34. ^{1}H NMR spektar za spoj **8b** u DMSO-d_6 pri 600 MHz.



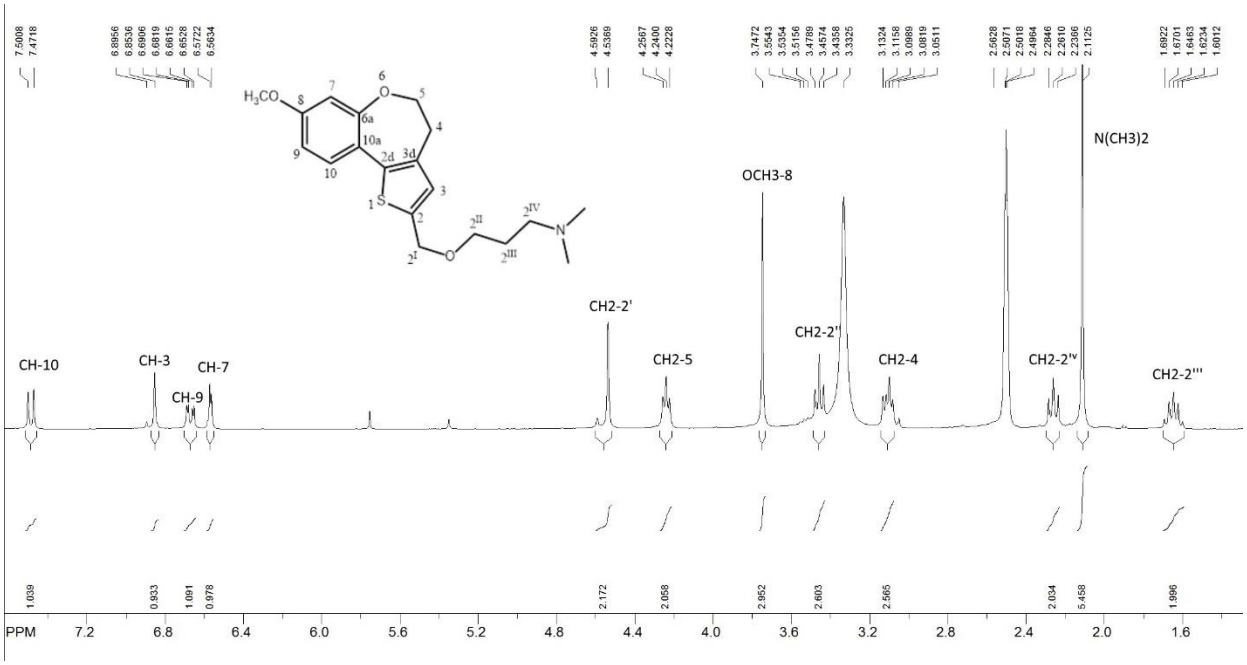
Slika 35. ^{13}C NMR spektar spoja **8b** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.



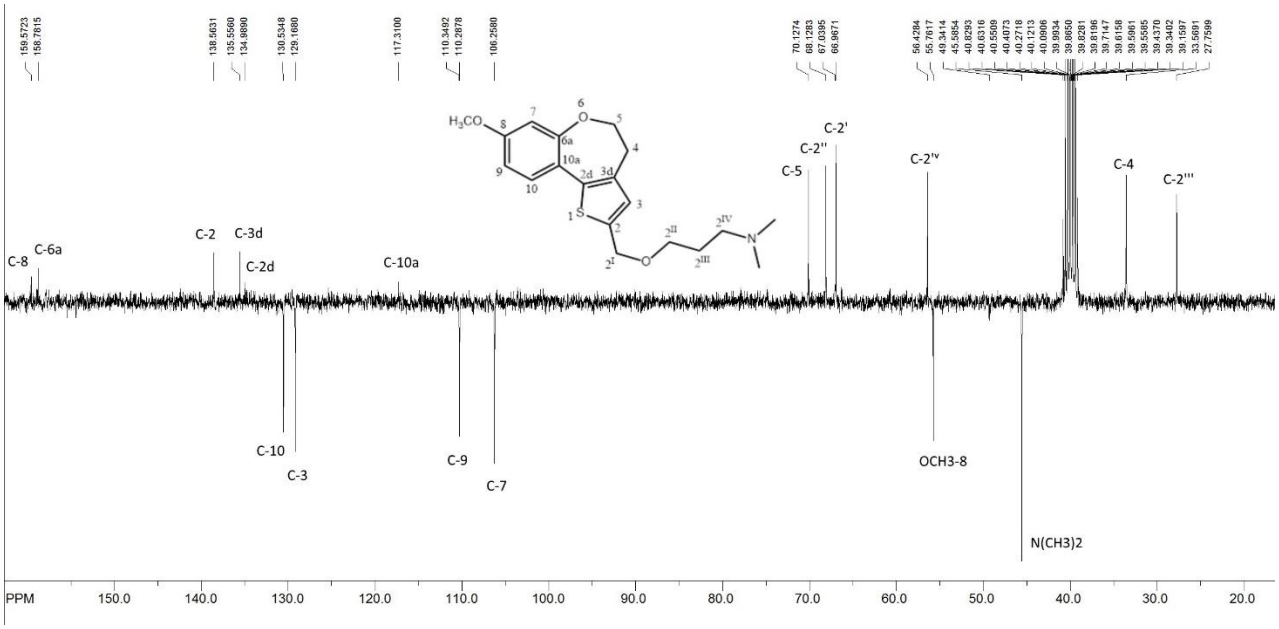
Slika 36. ^{1}H NMR spektar spoja **8b** u $CDCl_3$ pri 600 MHz.



Slika 37. ^{13}C NMR spektar spoja **8b** u $CDCl_3$ pri 150 MHz.



Slika 38. ^{1}H NMR spektar spoja **8c** u DMSO-d_6 pri 300 MHz.



Slika 39. ^{13}C NMR spektar spoja **8c** u DMSO-d_6 pri 75 MHz.