

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
Biomedicinos mokslų institutas
Farmacijos centras

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė
šaperono Hsp90 slopiklių paieškai

Studentas: Tomas Venslauskas

5 kursas, 2 grupė

Darbo vadovas: doc. dr. Algirdas Brukštus

parašas

Farmacijos centro vadovė: prof. dr. Jolanta Gulbinovič

parašas

Biomedicinos mokslų instituto direktorius prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas

parašas

Darbo įteikimo data: 2022-05-08 Registracijos Nr. _____

Studento elektroninio pašto adresas: tomas.venslauskas@mf.stud.vu.lt

2022 m.

TURINYS

SANTRAUKA.....	4
SUMMARY	6
PADĖKA	8
SANTRUMPOS.....	9
ĮVADAS	10
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	12
1 LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1 Šiluminio šoko baltymai ir jų funkcija žmogaus organizme	13
1.2 Hsp90 ir jo funkcija ląstelėje	15
1.3 Hsp90 reikšmė onkologinių ligų vystymuisi	18
1.4 Hsp90 slopikliai	19
1.4.1 N-galo domeno slopikliai.....	20
1.4.1.1 Geldanamycinai ir jo analogai.....	20
1.4.1.2 Radisikolis ir jo analogai	21
1.4.1.3 Rezorcinolis ir jo analogai	22
1.4.1.4 Benzamido grupę turintys junginiai.....	24
1.4.1.5 Purinai ir jų analogai.....	24
1.4.2 Vidurio domeno slopikliai	26
1.4.3 C-galo slopikliai.....	27
1.4.3.1 Novobicinas ir jo analogai	27
1.4.3.2 Kiti C-galo slopikliai	28
1.4.4 Kiti junginiai slopinantys Hsp90 veiklą.....	29
2 EKSPERIMENTINĖ DALIS	31
2.1 Tyrimo objektas	31
2.2 Junginių sintezių metu naudoti reagentai ir tirpikliai	31
2.4 5-(cikloalkil ar aril)-2,4-dihidroksibenzaldehidų sintezė.....	32

2.5 4-(1-aril-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė.....	33
2.6 4-(5-(4-aril)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolių sintezė	35
2.7 Susintetintų galutinių junginių tyrimai su baltymais	36
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	38
3.1 (2,4-dihidroksifenil)(fenil ar aril)ketonų sintezė.....	38
3.2 (2,4-dihidroksifenil)(fenil ar aril)ketonų redukavimas	40
3.3 Vilsmejerio-Hako pakeitimo reakcijos	41
3.4 Iminų sintezė.....	43
3.5 4-(1-aril-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-6-(cikloalkil)benzen-1,3-diolų ir 4-(1-aril-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-6-(aril)benzen-1,3-diolų sintezė	46
3.6 7-aril-1-(4-chlorofenil)- <i>H</i> -benzofuro[2,3- <i>d</i>]imidazol-6-olio išskyrimas.....	49
3.7 1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-feniletan-1-onų sintezė.	50
3.8 Etil- <i>E</i> -2-(1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-feniletiliden)hidrazin-1-karboksilatų sintezė.....	51
3.9 4-(cikloheksilmetil)-6-(5-fenil-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolių sitezė	52
3.10 Fluorescentinio poslinkio tyrimų rezultatai	53
4 IŠVADOS	56
DARBO TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	57
LITERATŪROS SĄRAŠAS	58

SANTRAUKA

Tomo Venslauskio magistro baigiamasis darbas „4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė šaperono Hsp90 slopiklių paieškai“. Mokslinis vadovas doc. dr. Algirdas Brukštus. Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Farmacijos centras. Vilnius 2022.

Darbo tikslas – 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė šaperono Hsp90 slopiklių paieškai.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti mokslinės literatūros šaltinių apžvalgą apie jau susintetintus Hsp90 slopinančius junginius.
2. Susintetinti naujus 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-cikloalkilbenzen-1,3-diolus ir 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolus.
3. Nusiųsti susintetintus 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-cikloalkilbenzen-1,3-diolus ir 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolus tyrimams su Hsp90, gautus rezultatus palyginti tarpusavyje ir su literatūroje prieinamais duomenimis.

Tyrimo objektas ir metodai. Magistro darbo objektas – naujų 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil)benzen-1,3-diolų ir 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolų, pasižyminčių Hsp90 šaperoną slopinančiu aktyvumu sintezė. Cheminių reakcijų pažangos vertinimas buvo atliekamas plonasluoksnės chromatografijos metodu (TLC). Junginių struktūros buvo įrodytos branduolių magnetinio rezonanso (BMR), didelės skyros masių spektrometrijos (HRMS) ir infraraudonųjų spindulių spektrometrijos metodais, buvo nustatomos junginių lydymosi temperatūros.

Rezultatai ir išvados. Magistrinio darbo metu buvo atlikta prieinamų literatūros šaltinių analizė apie anksčiau sintetintus Hsp90 šaperono slopiklius. Šie junginiai skirstomi pagal jų veikimo vietą – N-galo, vidurio ir C-galo domenų. Susintetinti šeši nauji junginiai pasižymintys Hsp90 šaperoną slopinančiu aktyvumu – keturi 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolai ir du 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil)benzen-1,3-diolai. Šie junginiai priskiriami N-galo domeno aktyviojo centro slopikliams dėl esančio jų struktūrose rezorcinolio fragmento. Du junginiai – 4-(cikloheksilmetil)-6-(1-(4-metoksifenil)-1*H*-imidazol-5-il)benzen-1,3-diolis (**8a**) ir 4-(1-(4-chlorfenil)-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (**8b**) turintys savo struktūroje cikloheksano fragmentą tyrimuose su *Trichinella spiralis* (sutrumpintai Ts) Hsp90 N-galo domenu pasižymėjo žemomis disociacijos konstantos (K_d) vertėmis bei selektyvumu šio organizmo šaperonui, dėl to buvo nuspręsta papildomai susintetinti analoginius junginius (junginiai **13a** ir **13b**) su tiadiazolo žiedu imidazolo žiedo vietoje. Žemiausiomis disociacijos

konstantos vertėmis (K_d) iš imidazolo fragmentą turinčių junginių pasižymėjo VT016 ir VT023 (TsHsp90N). Tiadiazolo fragmentą turinčių junginių K_d vertės buvo ~300-40000 kartų žemesnės palyginus su imidazolo žiedo fragmentą turinčių junginių K_d vertėmis (Hsp90 α N). Imidazolo žiedas pablogina rezorcinolio pagrindu sukurtų slopiklių K_d vertes palyginus su junginiais, kurie analoginėje padėtyje turi tiadiazolo žiedą.

SUMMARY

The topic of Master thesis by Tomas Venslauskas is "Synthesis of new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-(cycloalkyl- or aryl)benzene-1,3-dioles as potential inhibitors of Hsp90 chaperone". The supervisor of MSc thesis is Doc. Dr. Algirdas Brukštus. Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Pharmacy Center. Vilnius, 2022.

Aim of the research. Synthesis of new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-cycloalkylbenzene-1,3-dioles and 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-arylbenzene-1,3-dioles as potential inhibitors of Hsp90 chaperone.

Objectives of the research:

1. To conduct a literature review on existing Hsp90 inhibitors.
2. To synthesise new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-cycloalkylbenzene-1,3-dioles and 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-arylbenzene-1,3-dioles.
3. To submit new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-cycloalkylbenzene-1,3-dioles and 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-arylbenzene-1,3-dioles for experiments with Hsp90, and compare the results among themselves and with available data on existing compounds.

Objects and methodology of the research. The object of this master's thesis – synthesis of the new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-cycloalkylbenzene-1,3-dioles and 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-arylbenzene-1,3-dioles. Thin layer chromatography (TLC) was used to monitor the progress of reactions, nuclear magnetic resonance (NMR) and high resolution mass spectrometry (HRMS) were performed to evaluate and prove new compound structures, melting point apparatus was used to determine melting points.

Results and conclusions. The literature review on existing Hsp90 chaperone inhibitors was conducted. Hsp90 inhibitors were analysed and classified based on their binding sites – N-terminal, middle and C-terminal domain. Two new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-cycloalkylbenzene-1,3-dioles and four new 4-(1-aryl-1*H*-imidazol-5-yl)-6-arylbenzene-1,3-dioles were synthesised. These new compounds were categorized as N-terminal domain inhibitors due to resorcinol fragment in their structure. Two synthesised compounds containing cyclohexane fragments – 4-(cyclohexylmethyl)-6-(1-(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-5-yl)benzene-1,3-diole (**8a**) and 4-(cyclohexylmethyl)-6-(1-(4-chlorophenyl)-1*H*-imidazol-5-yl)benzene-1,3-diole (**8b**) shown low K_d values when tested with *Trichinella spiralis* (Ts) Hsp90 N-terminal domain, therefore two analog compounds containing thiadiazole ring instead of imidazole ring were synthesised (compounds **13a** and **13b**). VT016 and VT023 shown the best K_d values when compared with other imidazole ring containing compounds (TsHsp90N). Thiadiazole ring

containing compounds shown ~300-40000 times lower K_d values than imidazole ring containing compounds (Hsp90 α N). Imidazole ring worsens K_d values when compared with thiadiazole ring.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui doc. dr. Algirdui Brukštui už suteiktą galimybę dirbti jo vadovaujamoje laboratorijoje, visokeriopą pagalbą atliekant eksperimentus bei rašant baigiamąjį magistro darbą. Taip pat dėkoju doktorantėms – Paulinai Kaziukonytei bei Indrei Misiūnaitei už kasdienes patarimus, skirtą laiką ir perduotas žinias, kurios padėjo mano laboratorinių įgūdžių formavimui. Dėkoju ir visam 113 laboratorijos kolektyvui už bendradarbiavimą ir jaukios aplinkos sukūrimą.

SANTRUMPOS

17-AAG – 17-alilamno-17-demetoksi geldanamycinas
17-DMAG – 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoksigeldanamycinas
AHA1 – Hsp90 ATPazės aktyviklis
ATP, ADP – adenosino difosfatas, adenosino trifosfatas
BF₃OEt₂ – boro trifluorido eteratas
BMR, NMR – branduolių magnetinis rezonansas (angl. *Nuclear magnetic resonance*)
CHCl₃, CDCl₃ – chloroformas, deuteruotas chloroformas
DMF – dimetilforamidas
DMSO, DMSO-d₆ – deuteruotas dimetilsulfoksidas
EA – etilacetatas
EtOH – etanolis
GA – geldanamycinas
HEK293 – žmogaus embriono inkstų ląstelių linija
HOP – Hsp70/Hsp90 sujungiantis baltymas
HRMS – didelės našos masių spektrometrija (angl. *High resolution mass spectrometry*)
Hsp90 – šiluminio šoko baltymų šeima
HT-29 – storosios žarnos adenokarcinomos ląstelių linija
HTS – aukšto našumo atranka (angl. *High-throughput screening*)
HUGO – Žmogaus genomo organizacija (angl. *Human Genome Organization*)
IC₅₀ – slopiklio koncentracija, prie kurios 50% taikinio aktyvumo yra užslopinama
K_d – disocijacijos konstanta
MeOH – metanolis
NCI H23 – nesmulkių ląstelių plaučio vėžio ląstelių linija
POCl₃ – fosforo oksichloridas
RD – radisikolis
SOCl₂ – tionilchloridas
TLC – plonasluoksnė chromatografija (angl. *Thin layer chromatography*)
Tol – toluenas
TosMIC – toluensulfonilmetilo izocianidas
TsHsp90N – *Trichinella spiralis* Hsp90 N galo domena
LdHsp90N – *Leishmania donovani* Hsp90 N galo domenai
PfHsp90N – *Plasmodium falciparum* Hsp90 N galo domenai

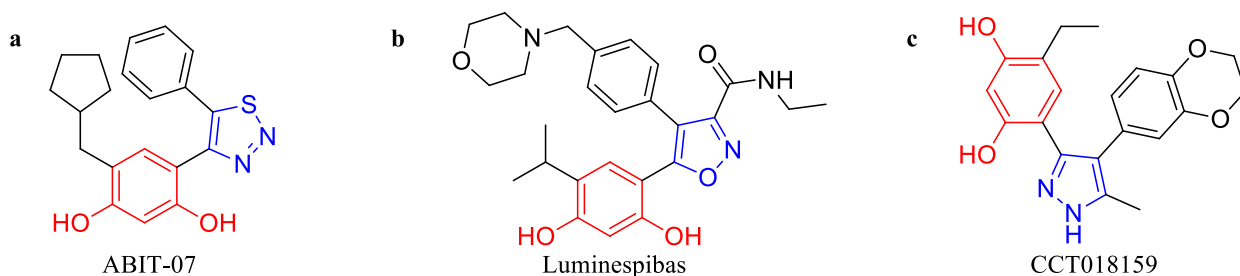
IVADAS

Hsp90 (angl. *Heat shock protein 90*) tai 90 kDa molekulinės masės šiluminio šoko baltymų šeimai priklausantis molekulinis šaperonas, kurio pagrindinis vaidmuo tai baltymų klientų homeostazės užtikrinimas ne tik streso, bet ir fiziologinėmis sąlygomis. Klaidinantis pavadinimas susijęs su jų atradimu. 1960 metais italų mokslininkas Ferruccio Ritossa pastebėjo, jog karštoje aplinkoje palikti mūsų chromosomai „ištinsta“. Šis reiškinys buvo susietas su genų aktyvinimu, kurio pasekmėje skatinama baltymų sintezė, apsauganti DNR nuo pažeidimo [1]. Šiluminis šokas skatina blogai susiklosčiusių baltymų „taisymą“ ar skaidymą į amino rūgštis. Nors šis procesas nėra gerai ištirtas, dalis mokslininkų bando juo pagrįsti pirčių sveikatą gerinantį efektą [2].

Šaperonai sutinkami pas visus eukariotus, dalyvauja ne tik normaliuose ląstelės procesuose, bet ir patologiniuose – virusinėse infekcijose, neurodegeneracinių bei vėžinių ligų atsiradime. Hsp90 tapo taikiniu naujų vaistų kūrimo, kai kurie iš jų – nuo įvairių vėžinių susirgimų ar psoriazės pateko į klinikinius tyrimus.

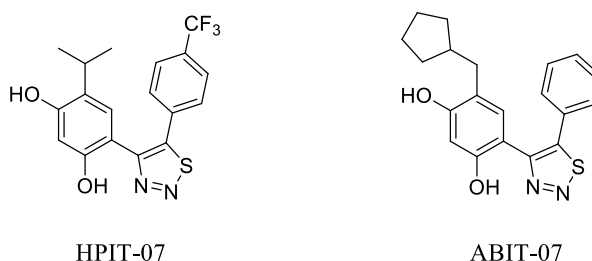
Hsp90 šaperono struktūrą galima suskirstyti į tris dalis – N-galo, vidurio ir C-galo domenų. Per ilgą laiką vieninteliu galimu inhibitorių taikiniu buvo laikomas N-galo domenas, kuriame yra kritinis šaperono veiklai regionas – ATP jungimosi kišenė, kurioje vyksta ATP hidrolizė. Jos užblokavimas trikdo baltymų brandinimą. Šaperono inhibavimas ypatingai stipriai paveikia greitai besidalijančias vėžines ląsteles. Natūralaus antibiotiko novobiocino tyrimai leido atrasti antrą Hsp90 veiklai įtakojantį regioną C-galo domene, kuris alosteriškai reguliuoja baltymo veiklą. Nors vidurio domene nėra aiškiai apibrėžto inhibitorių taikinio, galima surasti pavienius junginius kurie prisijungdami prie šios baltymo dalies slopina jo veiklą. Naujų inhibitorių bei taikinių atradimą pagreitina informacinių technologijų pažanga, kurios dėka galima simuliuoti molekules – baltymo ryšio susidarymą.

Rezorcino analogai (1 pav.) tai viena iš N-galo inhibitorių grupių. Šių junginių struktūros pagrindu yra rezorcino fragmentas ir kitas aromatinis žiedas, kuris turi būti atitinkamai nuo jo nutolęs. Ši atstumą bei erdvinę konformaciją užtikrina penkianaris heterociklinis žiedas – tiadiazolas, izoksazolas, pirazolas, imidazolas ar kiti.



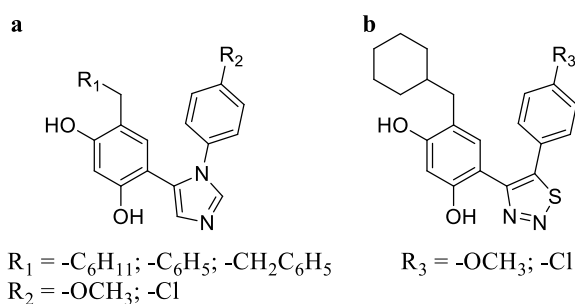
1 pav. Rezorcino analogai. Raudona spalva pažymėtas rezorcino fragmentas, mėlyna spalva pažymėtas: tiadiazolas (a), izoksazolas (b), pirazolas (c).

Vilniaus universiteto Chemijos fakulteto Organinės chemijos katedros 113 laboratorijos darbuotojai bei alumnai yra susintetinę eilę rezorcinolio pagrindo junginių su tiadiazolo ir imidazolo žiedais, kurie tyrimuose su baltymais parodė Hsp90 slopinantį aktyvumą. Geriausi šaperoną slopinančiu aktyvumu pasižymėjo junginiai turintys 6 padėtyje izopropilo ar ciklopentano grupes (2 pav.) [3].



2 pav. 4-izopropil-6-(5-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolis (HPIT-07) ir 4-(ciklopentilmetil)-6-(5-fenil-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolis (ABIT-07).

Nors literatūroje yra aprašyti analogiški junginiai su tiadiazolo ir imidazolo žiedais, jų įtaka Hsp90 slopiklių aktyvumui nėra ištirta. Magistrinio darbo metu buvo nuspręsta susintetinti naujus 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolus (3 pav.). Tyrimų su baltymais eigoje paaiškėjus, jog cikloheksilmetil grupė didina inhibitoriaus selektyvumą *Trichinella spiralis* kirmelės Hsp90 N-galo domenui, dėl to buvo nuspręsta papildomai susintetinti analogiškus junginius su tiadiazolo žiedu tam, kad išsiaiškinti žiedo įtaką junginių aktyvumui.



3 pav. Bendra 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų struktūra (**a**), bendra 4-(5-aril-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolų struktūra (**b**).

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė šaperono Hsp90 slopiklių paieškai.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti mokslinės literatūros šaltinių apžvalgą apie jau susintetintus Hsp90 slopinančius junginius.
2. Susintetinti naujus 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-cikloalkilbenzen-1,3-diolus ir 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolus.
3. Nusiųsti susintetintus 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-cikloalkilbenzen-1,3-diolus ir 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-arilbenzen-1,3-diolus tyrimams su Hsp90, gautus rezultatus palyginti tarpusavyje ir su literatūroje prieinamais duomenimis.

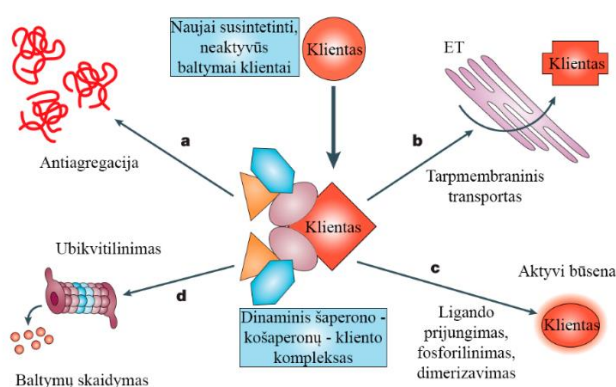
1 LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje bus apžvelgiama informacija pateikta aktualiuose moksliniuose šaltiniuose ir duomenų bazėse apie šiluminio šoko baltymų šeimą ir jų vaidmenį. Ypatinę dėmesį skiriama Hsp90 šaperono reikšmei žmogaus organizmui. Šaperono slopikliai skirstomi ir aptariami pagal tai, su kuriuo baltymo segmentu saveikauja – N-galo, vidurio ar C-galo domenais.

Mokslinės literatūros paieškai naudotasi PubMed, Google Scholar ir ResearchGate paieškų sistemomis, bei Hsp90Int.db, UniProt ir Reaxys duomenų bazėmis. Informacija apie aktualiai vykdomus klinikinius tyrimus kuriuose dalyvauja šaperono slopikliai gauta iš ClinicalTrials.gov internetinės svetainės.

1.1 Šiluminio šoko baltymai ir jų funkcija žmogaus organizme

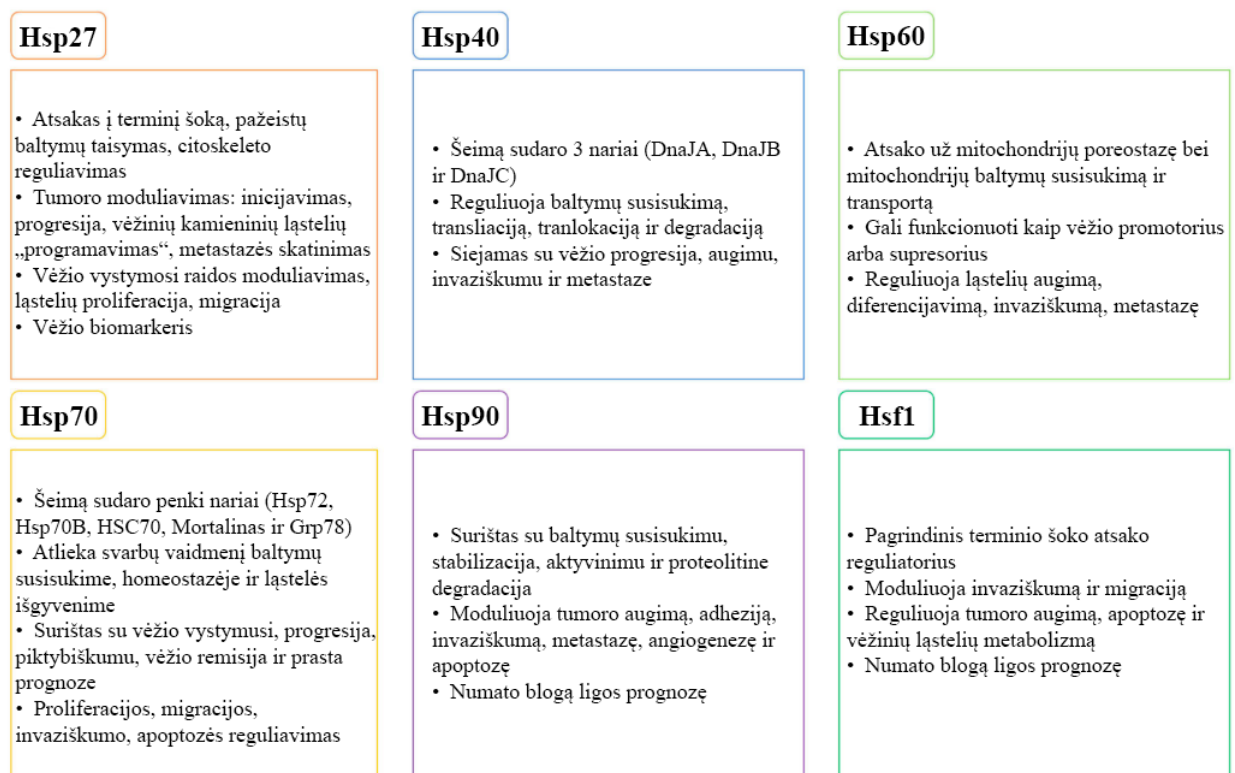
Šiluminio šoko baltymai (ang. *Heat shock protein*) tai molekuliniai šaperonai priskiriama konservatyvi baltymų klasė, sutinkama eukariotinėse ir prokariotinėse, normaliose ir vėžinėse ląstelėse, fiziologinėje ir streso būklėje. Jie užtikrina taisyklingą baltymų susisukimą, apsaugo nuo agregacijos, dalyvauja ląstelės metabolizme, „taiso“ klaidingai išlankstytus baltymus, dalyvauja jų transporte, kompleksų susidaryme ir skaidyme (4 pav.). Terminio ar dėl kitų priežasčių sukkelto streso atveju apsaugo juos nuo pažaidos, kuri galėtų pakeisti ląstelės baltymų struktūrą (denatūracija) ar atliekamą funkciją (taisyklingas baltymo išsivyniojimas). Terminio šoko baltymų genų transkripciją gali sukelti pH ar deguonies kiekio aplinkoje pokyčiai, įvairių cheminių medžiagų ar sunkiųjų metalų patekimas į ląstelę. Šaperonų aktyvumą moduliuoja pagalbiniai baltymai – košaperonai [4–6].



4 pav. Schematiškai atvaizduotos šaperonų funkcijos. Kliento prijungimas prie šaperono apsaugo jį nuo agregacijos (a), padeda patekti į kitas ląstelės dalis (b), palaiko jį meta-stabilioje būsenoje kuri gali būti aktyvinama (c). Funkcijos neatliekantys baltymai skaidomi proteosomų pagalba (d) [7].

Pagal aktualias HUGO (angl. *Human Genome Organisation* – Žmogaus genomo organizacijos) gaires, šie baltymai skirstomi pagal juos koduojančius šiluminio šoko genus. Išskiriamos šešios šeimos: HSPB (mažieji HSP), DNAJ (HSP40), HSPA (HSP70), HSPC (HSP90), HSPH (HSP 110) ir žmogaus šaperoninai (HSP60 ir CCT) [8].

Onkogenėzes metu, vėžinės ląstelės naudoja šaperonų apsauginiais mechanizmais, tokiu būdu skatinama proliferacija, migracija ir invazija. Kiaušidžių vėžio ląstelėse šaperoninai stabilizuoja mitochondrijų homeostazę, taip skatinama progresiją, krūtų bei plaučių vėžio ląstelėse Hsp70 slopina p53 baltymą, kuris atsako už apoptozės aktyvinimą. Hsp90 šaperonai sugeba stabilizuoti mutotą p53 baltymą, kuris nestabdo ląstelės augimo. Tam tikrais atvejais šaperonai pasižymi priešvėžinėmis savybėmis. HSP70 patekęs į plazminę membraną skatina priešvėžinį atsaką, o HSP60 sugrąžina taisyklingą mitochondrijų funkciją ir mažina reaktyvaus deguonies formų kiekį, mažindamas metastazės riziką (5 pav.) [6,9].



5 pav. Terminio šoko baltymų šeimų svarba vėžio vystymuisi [6].

Vėžinės ląstelės pastoviai keičia metabolinius ir ląstelės signalo perdavimo kelius, todėl yra priklausomos nuo šoko indukuojamų Hsp. Ženkliai padidėjusi koncentracija ar aktyvumas HSP90, HSP70 ir HSP27 dažnai sutinkami vėžinėse ląstelėse ir yra siejami su rezistentiškumu gydymui ir prasta ligos prognoze. Hipertermija, oksidacinis stresas, tirozino kinazės inhibitoriai, radiacija ar citotoksiniai vaistai dar paskatina šių baltymų sintezę [10].

ClinicalTrials.gov svetainėje pateikta informacija, jog šiuo metu klinikiniuose tyrimuose dalyvauja junginiai kurie aktyvina, slopina ar moduliuoja šiluminių baltymų veiklą. Kuriant šiuos junginius nebuvo atkreipto dėmesio į skirtumus tarp skirtingų baltymo izoformų – didžioji dauguma į klinikinius tyrimus patekę junginiai neselektyviai slopina Hsp90. Dėl šio reiškinio pacientams pasireikšdavo nepageidaujami reiškiniai, tokie kaip kardiotoksiškumas, kepenų ar akių pažeidimas [11,12]. Šiuo metu nėra užregistruoto jokio vaisto, kurio taikiniu būtų Hsp90. Selektivių junginių atradimas gali paspartinti šį procesą. Klinikiniuose tyrimuose taip pat dalyvauja ir skiepai nuo vėžio, kurių veiklioji medžiaga yra iš vėžiu sergančio paciento vėžinių ląstelių išgrynintas terminio šoko baltymo gp96 peptidų kompleksas. Dėl skirtumų, kuriais pasižymi skirtingų organizmų Hsp90, šio baltymo slopikliai tiriami parazitinių ligų – trichineliozės, leišmaniozės ar maliarijos gydymui.

1.2 Hsp90 ir jo funkcija ląstelėje

Hsp90 tai plačiausiai paplitusi terminio šoko baltymų šeima, sutinkama pas prokariotus ir visus eukariotus, pasižyminti aukštu struktūriniu konservatyvumu. *Escherichia coli* ir žmogaus Hsp90 sekos pasižymi 50% panašumu, nors dauguma bakterijų turi tik vieną baltymą koduojančio geno kopiją. Geno duplikavimas ir tolimesnės mutacijos evoliucijos raidoje lėmė šaperono izoformų atsiradimą [13]. Šiuo metu išskiriamos penkios baltymo izoformos, seniau buvo išskiriama ir šešta izoforma, kuri buvo dviejų genų himera. Trys iš jų ekspresuojamos nuolatos – citoplazmoje sutinkamas Hsp90β, endoplazminiame tinkle Grp94 ir mitochondrijose Trap-1. Hsp90α1 ir Hsp90α2 tai šoko indukuojamos izoformos sutinkamos citoplazmoje (1 lentelė) [14].

Bendra šios šaperonų šeimos funkcija tai baltymų homeostazės palaikymas baltymų-klientų teisingos erdvinės struktūros įgavimo užtikrinimas, nesusiklosčiusių baltymų agregacijos slopinimas, šoko sukeltų pasekmių mažinimas. Hsp90 "klientams" priskiriamos baltymų kinazės, transkripcijos faktoriai ir E3 ligazė, bendrai, virš 300 baltymų yra priklausomų nuo šios šaperonų šeimos. Taisyklingam šaperonų funkcionavimui yra būtini košaperonai. Tai pagalbiniai baltymai, kurie dalyvauja baltymų brandinime šaperono cikle [13,15,16].

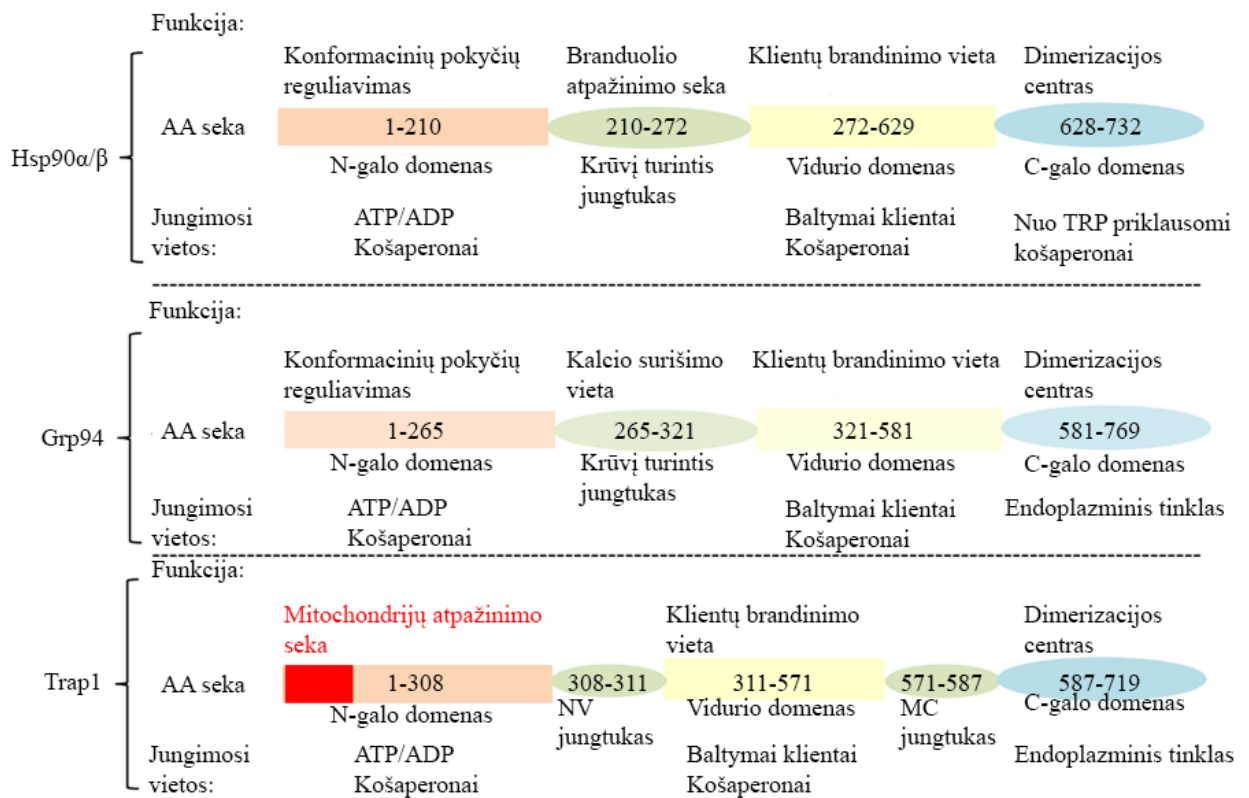
Pagrindinės baltymo izoformos tai Hsp90α (didelė dalis apžvalgininkų neišskiria Hsp90α1 ir Hsp90α2) ir Hsp90β. Šios izoformos atsirado dėl geno duplikacijos, jų amino rūgščių sekos 86% identiškos viso baltymo mastu, 89% identiškos N-galo domene. ATP jungimosi kišenėje šis panašumas dar didesnis, siekia 95% ir skiria jas tik 2 aminorūgštys. Struktūrinis giminingumas lemia atliekamų funkcijų panašumą, tačiau dėl skirtingų ekspresijos pobūdžių jos nėra vienodos [17,18].

1 lentelė. Žmogaus Hsp90 šeimos baltymai ir jų funkcija

Baltymo pavadinimas	Ekspresijos pobūdis	Vieta ląstelėje	Funkcija
Hsp90 α 1	Indukuojamas	Citoplazma	Baltymų brandinimas, struktūros palaikymas, apsauga nuo terminės pažaidos
Hsp90 α 2	Indukuojamas	Citoplazma	Baltymų brandinimas, struktūros palaikymas, apsauga nuo terminės pažaidos (specifinės funkcijos dar neatrastos)
Hsp90 β	Pastovus	Citoplazma	Baltymų-klientų transportas, baltymų brandinimas, citoskeleto stabilizavimas, signalo perdavimas
Grp94	Pastovus	Endoplazminis tinklas	Membraninių baltymų brandinimas, kalcio koncentracijos reguliavimas, dalyvauja ląstelių diferenciacijos, imunoglobulinų ir limfocitų baltymų brandinimo procesuose
Trap-1	Pastovus	Mitochondrijos	Ląstelės apsauga nuo oksidacinio streso ir mitochondrijų pažeidimo

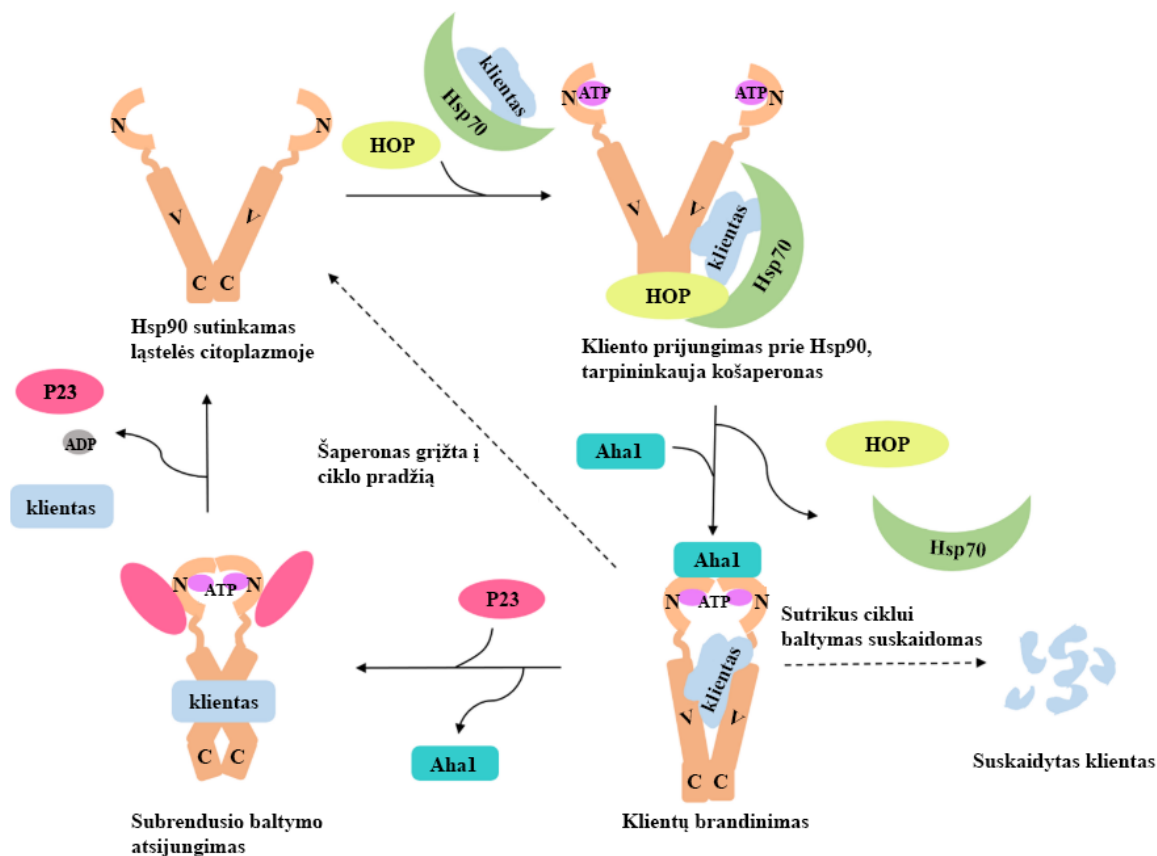
1 lentelė. Klasifikacija paremta UniProt [14] duomenimis, lentelės duomenys paremti šaltiniais [19–21].

Hsp90 šeimos baltymai sudaryti iš trijų pagrindinių dalių: N-galo domeno, vidurio domeno ir C-galo domeno (6 pav.). N-galo ir vidurio domenų jungia krūvį turintis jungtukas (Trap-1 turi papildomą jungtuką tarp vidurio domeno ir C-galo domeno). N-galo domene yra ATP jungimosi kišenė, kuri svarbi ATPaziniams aktyvumui. Pirmą atrastą bei naujai kuriamą šaperono slopiklių taikiau buvo būtent ši baltymo vieta. Krūvį turintis jungtukas suteikia baltymui lankstumą, kuris reikalingas tankiai užpildytoje citoplazmoje. Šiame domene sutinkama ir branduolio lokalizacijos seka (Hsp90 α ir Hsp90 β) ir kalcio surišimo vieta (Grp94). Vidurio domenai atlieka dvi pagrindines funkcijas: baltymų-klientų prijungimas ir ATPazinio aktyvumo moduliavimas ATP molekulės γ -fosfato prijungimo pagalba. C-galo domene yra kalmodulino jungimosi vieta ir dimerizacijos vieta. Taip pat sutinkama antra nukleotidų prijungimo vieta, kuri atsiveria patekus ATP į N-galo domeno kišenę. Prijungus nukleotidą alosteriškai reguliuojama šaperono veikla [17,22].



6 pav. Hsp90 šaperonų šeimos atstovų struktūrą, domenų funkcijų ir jungimosi vietų palyginimas [22].

Šaperono ATPazinis aktyvumas cikliška kartojasi (7 pav.). Funkcijos atlikimui yra būtina C-domeno dimerizacija – Hsp90α lengvai jungiasi, Hsp90β jungiasi su mažesniu veiksmingumu. Citoplazmoje sutinkami taip pat monomerai (α ir β) ir heterodimerai ($\alpha\beta$) [23]. Ciklas skirstomas į keturis etapus. Pirmajame etape Hsp70 atpažįsta ir prijungia dalinai susiklosčiusius baltymus, kurie per Hsp70/Hsp90 sujungiantį baltymą (*Hsp70/Hsp90 organising protein* – sutrumpintai HOP) prijungiami prie Hsp90. Taip stabilizuojama Hsp90 atvirosi konformacija, slopinamas ATPazinis aktyvumas. Sekančiame etape Hsp90 ATPazės aktyviklis (Aha1) prijungimas kartu su HOP ir Hsp70 atsijungimu skatina baltymo perėjimą į uždara aktyvią būseną, kurios metu vyksta baltymo-kliento modifikacija. Šis procesas stabilizuojamas prijungus P23 baltymą prie N-galo domeno. Paskutiniojo etapo metu vyksta ATP hidrolizė, nuo Hsp90 atsijungia P23 ir modifikuotas baltymas, šaperono ciklas kartojasi [21,22].



7 pav. Supaprastintas Hsp90 šaperono ciklo atvaizdavimas.

1.3 Hsp90 reikšmė onkologinių ligų vystymuisi

Vėžinių ląstelių Hsp90 skiriasi nuo sveikų ląstelių trimis mechanizmais – Hsp90 mRNR ir baltymų sintezės indukcija, baltymų aktyvinimu susijusiu su baltymų-klientų surišimu ar potransliaciniu modifikavimu ir ektopine Hsp90 padėtimi ląstelėje [12].

Hsp90 koncentracija vėžinėse ląstelėse yra 2-3 kartus aukštesnė palyginus su sveikomis ląstelėmis, kuriose šis baltymas sudaro 1-3% visų baltymų. Stresinės sąlygos, tokios kaip temperatūrų pokyčiai, maistinių medžiagų ar deguonies kiekio trūkumas, skatina šiluminio šoko faktoriaus (angl. *Heat shock factor 1*, sutrumpintai HSF1) suaktyvinimą, kuris patekęs į branduolį skatina Hsp90 ekspresiją. Nors aukšta šio baltymo koncentracija siejama su onkogeninių signalo perdavimo mechanizmų suaktyvėjimu, neskatina tumorogenezės sveikose ląstelėse. Tam tikruose organuose – šlapimo pūslėje, blužnyje, ar smegenyse natūraliai sutinkamas padidėjęs šaperono kiekis. Tai aiškinama tuo, kad Hsp90 savo struktūroje turi virš 30 regionų, kurie gali dalyvauti potransliacinės modifikacijos procese – vėžinėse ląstelėse esantis Hsp90 neturi būti indentiškas sveikose ląstelėse sutinkamai atmainai [1,12].

Potransliacinis Hsp90 modifikavimas, toks kaip acetilinimas ar fosforilinimas turi įtaką baltymo sekrecijai ir lokalizacijai ląstelėje. Galima šį baltymą sutikti ne tik anksčiau minėtose ląstelės dalyse, bet taip pat ir tarpląstelinėje erdvėje ar įvairių vėžinių ląstelių paviršiuje. Nors

tarpląstelinėje erdvėje ATP koncentracija labai maža, šaperonas sugeba atlikti dalį savo funkcijų ir be jo. Sims ir kitų atliktame tyrime paaiškėjo, kad krūties vėžiu sergančios pacientės ekstraląsteliniam matrikse sutinkamas Hsp90α aktyvina metaloproteinazę 2 be ATP pagalbos, kuris tik pagreitina šį procesą [24]. Šis proteolitinis fermentas skaido kolageną, lamininą, fibronektiną ir proteoglikanus, tokiu būdu didinamas invaziškumas ir skatinama metastazė [1,25].

Hsp90 jungiasi su ATP esant mažam afiniškumui, apie 40 kartų mažesniame palyginus su ADP [13], tai reiškia, kad šaperonas suaktyvėja tiksliai esant palankiam ATP:ADP koncentracijų santykiui ląstelėje. Pastebėta taip pat, kad vėžinių ląstelių ATPazinis aktyvumas ir ATP afiniškumas yra didesnis, dėl to net ir mažos N-galo domeno inhibitoriaus dozės veikia pakitusį baltymą žymiai stipriau palyginus su normaliu Hsp90 [1].

1.4 Hsp90 slopikliai

Dėl atliekamų funkcijų svarbos, šaperonas Hsp90 yra potencialiu priešvėžinių vaistų taikiniu, jo slopinimas galėtų užkirsti kelią auglio vystymuisi, progresijai ar metastazei. Naujai kuriami junginiai turi keletą privalumų, palyginus su plačiai klinikinėje praktikoje naudojamais priešvėžiniais vaistais. Hsp90 inhibitoriai sutrikdo baltymų-klientų modifikavimą, kurio pasekmėje šie nėra aktyvinami, sutrikdoma signalo perdavimo sistema. Šaperono ir proteasomų inhibitorių kombinacija skatina kauptis ląstelėje neaktyvintus baltymus, kurie turi citotoksiinį poveikį navikams. Bendra priešvėžinių vaistų savybė yra jų toksiskumas sveikiesiems audiniams. Aukštas vėžinių ląstelių Hsp90 jautrumas inhibitoriams leistų sumažinti nepageidaujamų reiškinių dažnį [26].

Hsp90 slopikliai skirstomi pagal jų veikimo vietą į N-galo domeno, vidurio domeno ar C-galo domeno. N-galo domeno slopikliai seniausieji atrasti ir dėl to plačiausiai ištirti, vidurio domene nėra ATP jungimosi vietos kuri galėtų būti vaistų taikiniu, dėl to žinomi tiksliai pavieniai šio domeno slopiklių pavyzdžiai. C-galo domene esanti kišenė atsiveria prie N-galo domeno prisijungus ATP ir su jos pagalba alosteriškai kontroliuojama baltymo veikla. Pirmos kartos šaperono slopikliai tai gamtinės kilmės junginiai, antros kartos tai sintezės keliu gautos molekulės.

Šiuo metu šaperonų slopikliai nėra naudojami klinikiniam gydymui. Viena iš priežasčių yra žinių apie Hsp90 trūkumas. Žmogaus organizme yra žinomi penki baltymai priklausantys šiai šeimai, jų visų struktūra bei atliekamos funkcijos yra panašios, tačiau kiekviena izoforma atlieka specifines funkcijas. Pirmieji atrasti ir kuriami inhibitoriai nebuvo analizuojami selektyvumo skirtingoms izoformoms atžvelgiu [27], dėl to jų poveikis siejosi su daugeliu nepageidaujamų reakcijų. Šios problemos sprendimu pasirodė rentgeno kristalografija, kurios dėka galima nustatyti baltymo ir su juo surišto inhibitoriaus struktūrą, atrasti skirtumus tarp kiekvienos izoformos ATP jungimosi kišenių. Didžiausiu skirtumu šiame regione pasižymi Grp94 dėl įsiterpusių penkių

aminorūgščių, kurios nesutinkamos kitose formose. Citozolinės Hsp90 atmainos pasižymi 95% identišku ATP jungimosi kišenėje, skiria jas 2 amino rūgštys – Ser52 ir Ile91 Hsp90 α ir Ala47 ir Leu86 Hsp90 β (analoginėje padėtyje esančios amino rūgštys). Huck ir kitų atliktame tyrime paaiškėjo, kad abiejų citozolinių izoformų ATP jungimosi kišenėje yra mažesnė kišenė, kurioje yra keturios vandens molekulės. Viena iš jų sugeba sudaryti vandenilinius ryšius su poline inhibitoriaus grupe ir su Hsp90 α serinu, kuris taip pat sudaro vandenilinį ryšį su slopikliu. Ši stabilizacija nevyksta Hsp90 β , nes alaninas nėra polinis, susidaro tik vienas vandenilinis ryšys vietoje trijų ryšių Hsp90 α izoformoje [18]. Prasčiausiai ištirti junginiai, kurie selektyviai inhibuoja Trap-1. Dėl struktūrinio panašumo su Grp94, kuriame junginiai nėra selektyvūs mitochondrijose sutinkamai izoformai. Galimu šios problemos sprendimo būdu yra padidinimas patekimo į organelę prijungus prie inhibitoriaus trifenilfosfonio darinį [28].

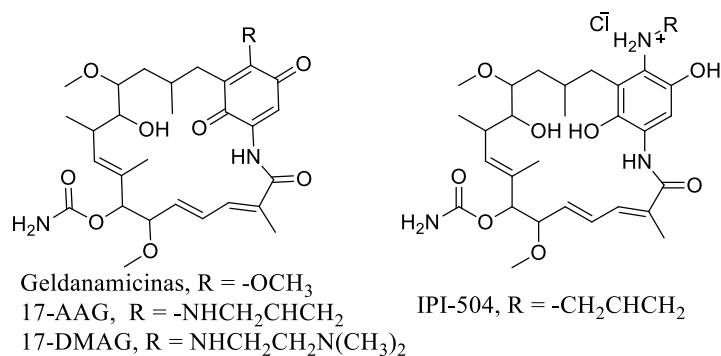
1.4.1 N-galo domeno slopikliai

Šių junginių veikimo principas pagrįstas konkurenciniu slopinimu. ADP prisijungimas prie šaperono vyksta su didesniu afiniškumu negu ATP prisijungimas ($ADP K_D \sim 10 \mu M$, $ATP K_D \sim 400 \mu M$), dėl to Hsp90 veiklai būtinas atitinkamas jų santykis ląstelėje [13]. Inhibitorių kūrimo metu ieškoma junginių, kurie pasižymės aukštesniu už ATP ir ADP afiniškumu, bei bus specifiniai tam tikrai baltymo izoformai.

1.4.1.1 Geldanamicinas ir jo analogai

Pirmas atrastas Hsp90 slopiklis buvo geldanamicinas (GA) – ansamicinams priklausantis benzochinono darinys, gaminamas *Streptomyces hygroscopicus* bakterijų (8 pav.). Dėl didelio toksiškumo šis junginys nebuvo tiriamas klinikiniuose tyrimuose, tačiau jo dėka paaiškintas vienas iš mechanizmų, kurie lemia šių junginių priešvėžinį poveikį. Inhibuotas šaperonas nesugeba stabilizuoti mutuo to termolabilaus p53 baltymo, kuris suskyla, ląstelės ciklas stabdomas ir gali būti aktyvinta pažeistos ląstelės apoptozė [16]. GA veikimo mechanizmui ir toksiškumui buvo esminė C-17 pozicija, kurią modifikavus buvo gauti saugesni bei stabilesni analogai [29].

Pirmu klinikinius tyrimus pasiekusiu Hsp90 slopikliu buvo geldanamicino analogas tanespamicinas, kitaip vadinamas 17-AAG (17-alilamno-17-demetoksi geldanamicinas). Šis junginys pasižymėjo mažesniu toksiškumu ir didesniu stabilumu palyginus su GA. 17-AAG buvo tiriamas monoterapijoje ar kombinuotame gydyme prieš krūties vėžį, įvairių rūšių leukemijas, limfomas, neoplazmas, melanomas. III klinikinių tyrimų etapą pasiekė kombinuotame gydyme su bortezomibu prieš daugybinių mielomą [30–32].



8 pav. Geldanamicinas ir jo analogai [16].

Anksčiau aptarti junginiai pasižymėjo prastu tirpumu vandenyje, dėl to buvo sukurtas antros kartos geldanamicino analogas, kuris gerai tirpo vandenyje – alvespimicinas (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoksigeldanamicinas, sutrumpintai 17-DMAG). Šis junginys buvo pranašesnis už 17-AAG didesniu bioprieinamumu ir mažesniu hepatotoksiškumu. Buvo tiriamas I ir II klinikinių tyrimų fazėje, tačiau šiuo metu dėl šalutinių poveikių, tyrimai nevykdomi [30,32].

Geldanamicino analoguose esanti benzochinono struktūra yra dalinai atsakinga už šių junginių hepatotoksiškumą. Metabolizavimo metu susidaro superoksido anijonas, kuris pažeidžia kepenis, didina oksidacinį stresą [33]. IPI-504 tai 17-AAG metabolizuota, aktyvi forma, jo struktūroje yra hidroksichinono fragmentas, kuris dėl sumažėjusio elektronų tankio žiede nesioksiduoja į benzochinoną. Dėl gero tirpumo vandenyje šis junginys galėjo būti skiriamas peroraliai ar švirkščiamas į veną [34].

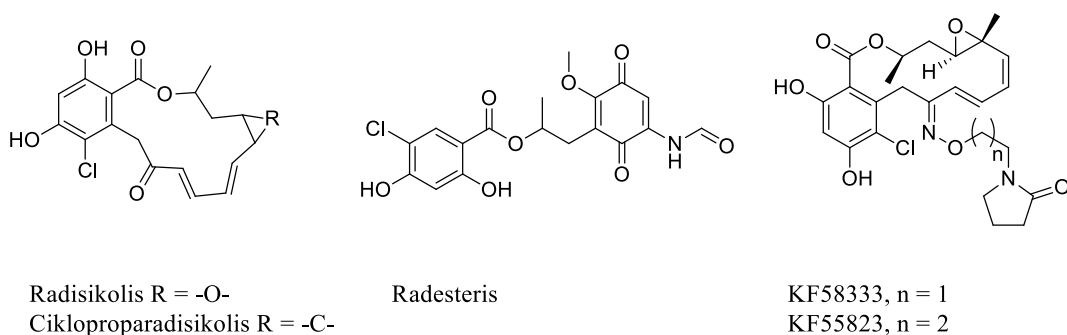
Nors 17-AAG (kombinuotame gydyme su borteomibu) ir IPI-504 sėkmingai užbaigė III klinikinių tyrimų, tolimesnis jų likimas nėra žinomas. Internetinėje straipsnių paieškos sistemoje pubmed stebimas sumažėjęs naujai rašomų straipsnių kiekis susijęs su geldanamicino analogais, galimai dėl jų toksinio poveikio. Šiuo metu šie junginiai nėra tiriami klinikiniuose tyrimuose.

1.4.1.2 Radisikolis ir jo analogai

Radisikolis (sutrumpintai RD), panašiai kaip ir geldamicinas, tai natūralios kilmės antibiotikas (9 pav.), kurį gamina *Monosporium bonorden* grybas. Šis junginys pasižymėjo aukštu afiniškumu Hsp90 ($K_d = 19$ nM), geru *in vitro* aktyvumu bei mažu toksiškumu *in vivo*, tačiau dėl dvigubųjų ryšių bei epoksido fragmento struktūroje yra greitai metabolizuojamas kepenyse. Ši problema buvo išspręsta kuriant analogus, kurie savo struktūroje turėjo ciklopropilo ir oksimo fragmentus [35].

KF55823 ir KF58333 ir pasižymi geromis antiproliferacinėmis savybėmis *in vitro*, geru priešvėžiniu poveikiu *in vivo* prieš krūties ir storosios žarnos vėžio ląsteles, bei mažu

hepatotoksiškumu, tačiau šie junginiai nebuvo tiriami klinikiniuose tyrimuose, galimai dėl ototoksinio poveikio [35].



9 pav. Radisikolis ir jo analogai.

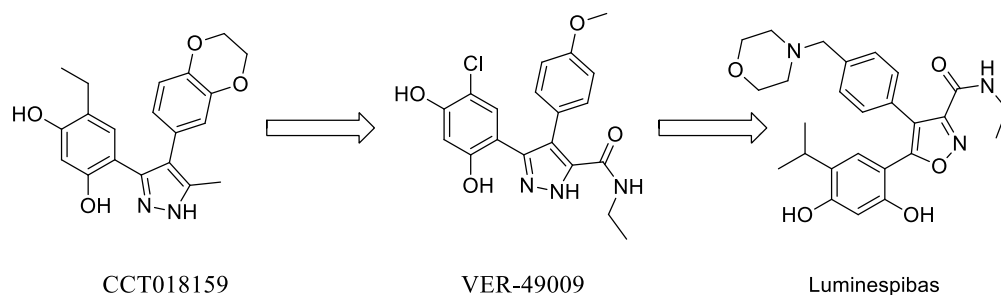
Sujungus GA benzochinono ir RD rezorcinolio žiedo darinius buvo gautas radesteris, kuris pasižymėjo geru aktyvumu prieš MCF7 linijos krūties vėžio ląsteles, bei sukėlė Hsp90 klientų ERBB2 receptoriaus ir c-Raf fermento degradaciją [35].

RD struktūros supaprastinimas atvėrė kelią naujų, sintetinių Hsp90 inhibitorių paieškai, kurių farmakoforu yra rezorcinolio fragmentas.

1.4.1.3 Rezorcinolis ir jo analogai

Radisikolio-Hsp90 komplekso tyrimas rentgeno kristalografijos metodu padėjo aptikti vandenilinius ryšius, kurie atsako už aukštą junginio afiniškumą šaperonui. Jungtis susidaro tarp rezorcinolio molekulės hidroksi grupių ir ATP jungimosi kišenėje esančių aminorūgščių (Asp93 ir Thr184). Pirmtako modifikavimo ir aukšto našumo atrankos metodų (angl. *High-throughput screening*, sutrumpintai HTS) pagalba buvo sukurti inhibitoriai, kurie yra pastoviai vystomi (10 pav.).

Penkiasdešimt šešių tūkstančių junginių analizė HTS pagalba padėjo identifikuoti CCT018159 (10 pav.), kurio ATPazinio aktyvumo $IC_{50} = 280$ nM, tačiau dėl mažo antiproliferacinio aktyvumo HCT116 ląstelių linijoje, buvo modifikuojamas. Pokyčiai buvo vykdomi rezorcinolio C6 padėtyje ir penkianaryje žiede, jungiančiame rezorcinolį su kitu aromatinio žiedu. Šiuo būdu buvo gautas VER-49009, pasižymintis aukštesniu antiproliferaciniu aktyvumu ir NVP-AUY922 (kitai vadinamas luminespibu). Luminsepibas buvo tiriamas I ir II klinikinių tyrimų stadijoje, tačiau dėl mažo junginio veiksmingumo vartojant maksimaliai toleruojamą dozę, junginys nebuvo tiriamas III klinikinių tyrimų stadijoje [15].

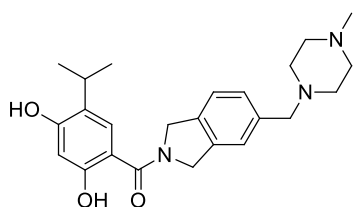


10 pav. Luminespibo atradimo schema.

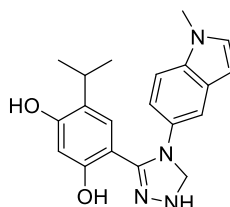
AT-13387, kitaip vadinamas onalespibu yra tiriamas I bei II klinikinių tyrimų fazėje kombinuotame gydyme prieš nesmulkių ląstelių plaučių karcinomą, krūties karcinomą, burnos ertmės karcinomą bei įvairias neoplazmų rūšis [32].

Ganetespibas (STA-9090) dalyvavo virš keturiasdešimtyje I-III klinikinių tyrimų stadijose kombinuotame bei monoterapiniame gydyme prieš įvairias vėžio rūšis, dalyvavo dviejuose III stadijos tyrimuose su docetakseliu prieš nesmulkių ląstelių plaučių karcinomą. Paviešinti vieno tyrimo rezultatai parodė, kad kombinuotoji terapija yra mažiau veiksminga už pačio docetakselio naudojimą [32].

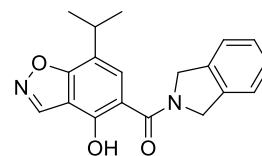
Rezorcinoolio pagrindu kuriamų junginių vystymas atvėrė duris selektyvių, skirtingoms Hsp90 baltymo izoformoms, inhibitorių atradimui. Khandelwal ir kiti ištyrė kristalines Hsp90 α ir Hsp90 β struktūras sujungtas su radisikoliu, gautų informacijų dėka pavyko jiems susintetinti junginį KUNB31 (11 pav.). Šio inhibitoriaus selektyvumas Hsp90 β yra 50 kartų didesnis už Hsp90 α . Tyrėjai atliko tyrimus su įvairiomis vėžinių ląstelių linijomis, tokiomis kaip NCI H23 (nesmulkių ląstelių plaučių vėžio), UC3 (šlapimo pūslės vėžio), HT-29 (storosios žarnos adenokarcinomos), gautas IC₅₀ vertes palygino su nevėžinės ląstelių linijos HEK 293 (žmogaus embriono inkstų ląstelės) IC₅₀, kurios buvo 14-30 kartų aukštesnės. Aktyvumas prieš Hsp90 β buvo patvirtintas tiriant Hsp90 klientų koncentracijas HT-29 linijos ląstelėse prieš ir 24 valandas po inkubacijos su KUNB31. Prie KUNB31 koncentracijos atitinkančios IC₅₀, nuo Hsp90 β priklausančių klientų (CDK4, CDK6, CXCR4, Akt-1) koncentracijos buvo sumažėję, nuo Hsp90 α ir GRp94 priklausančių klientų (Raf-1, ERK-5, survivino, integrino α) koncentracijos liko nepakitę. Pastebėta taip pat, kad Hsp90 β slopinimas nesukelia Hsp90 sintezės skatinimo, kas dažnai sutinkama pas neselektyvius slopiklius, tokius kaip geldanamycinas. Prie didesnių inhibitoriaus koncentracijų, Hsp27 ir Hsp70 koncentracijos padidėdavo [36]. KUNB31 struktūra buvo paviešinta 2018 metais, clinicaltrials.gov svetainėje nenurodoma numatomų tyrimų su šiuo junginiu, jo likimas yra nežinomas.



Onalespibas



Ganetespibas

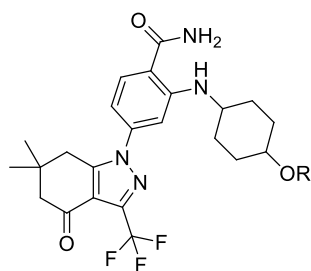


KUNB31

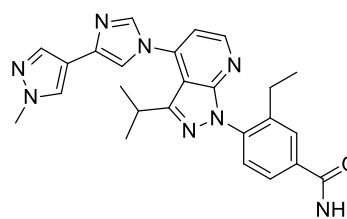
11 pav. Rezorcinolio analogai.

1.4.1.4 Benzamido grupę turintys junginiai

Benzamidai tai kita sintetinių Hsp90 slopiklių klasė. Junginiai su benzamidine grupe savo struktūra mėgdžioja ATP molekulėje esantį adeniną, sudarydami vandenilinius ryšius su Hsp90 aktyviuoju centru. Šios klasės atstovais yra SNX-5422, jo aktyvi forma SNX-2112 ir TAS-116 (12 pav.). SNX-2112 dėl polimorfinių kristalų formavimo, nebuvo tinkamas tolimesniam vystymui. Ši problema buvo išspręsta prijungus prie molekulės gliciną, kuris organizme lengvai atsiskyla, susidaro aktyvi junginio forma. Provaistas SNX-5422 buvo tiriamas pirmoje ir antroje klinikinių tyrimų stadijose, tačiau nėra informacijos apie tolimesnį jo likimą [32]. TAS-116 pasižymi selektyvumu citoplazmoje sutinkamoms izoformoms, nesukeldamas poveikio Grp94 ir Trap-1. Šis junginys nesukelia ototoksinio poveikio, su kuriuo siejami kiti neselektyvūs inhibitoriai [37]. TAS-116 tai pirmas Hsp90 slopiklis tirtas klinikiniuose tyrimuose, kuris neslopina visų baltymo izoformų [15].



SNX-2112, R = H
SNX-5422, R = -COCH₂NH₂



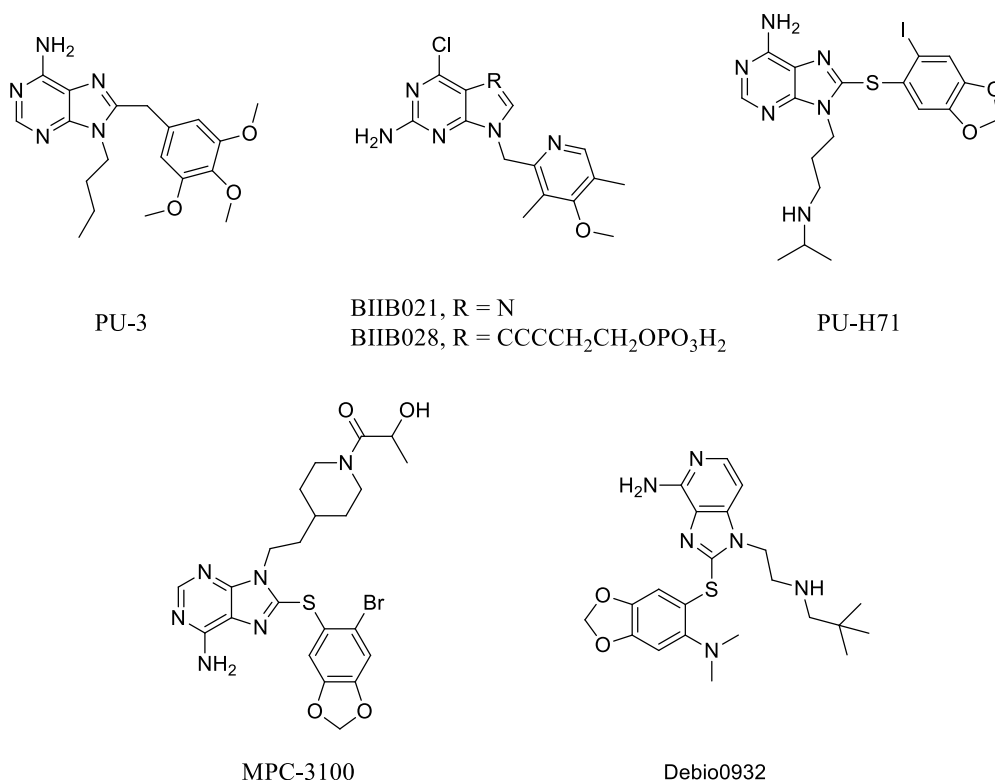
TAS-116

12 pav. Benzamido grupę turintys Hsp90 inhibitoriai.

1.4.1.5 Purinai ir jų analogai

Hsp90 N-galo slopiklių kūrimo principu yra jų panašumas į ATP (jo struktūroje esantis adeninas priklauso purinams). Purino pagrindu kuriami junginiai mėgdžioja C formos struktūrą, kurią įgauna GA ir RD prisijungimo prie šaperono metu. Jų struktūra susideda iš purino molekulės,

prie jos C8 anglies per anglies ar sieros prijungto aromatinio fragmento ir alkilo grupės prijungtos prie N3 ar N8 azoto (13 pav.). Pirmu purino fragmentą turinčiu inhibitoriumi buvo PU3. Šio junginio aktyvumas prieš tirtą onkogeninių ląstelių liniją buvo mažesnis nei geldanamicino, dėl to buvo ieškoma aktyvesnių junginių. Vienu iš jų buvo PU-H71. Jo N9 padėtyje esanti alkilo grupė betarpiškai nedalyvauja ryšių susidaryme, yra nukreipta į ATP jungimosi kišenės išėjimą. Šis junginys buvo tiriamas klinikiniuose tyrimuose kombinuotoje terapijoje su nab-paklitaksėliu ir ruksolitinibu prieš metastazinį krūties vėžį ir limfomas, taip pat vyksta atranka bei tyrimai monoterapijoje prieš limfomą, mielofibrozę ir mieloproliferacinę neoplazmą [32].



13 pav. Purino fragmentą turintys Hsp90 inhibitoriai.

HTS analizės pagalba buvo aptikti junginiai, kurie pasižymi selektyvumu Hsp90α/Hsp90β ir Grp94. Citozolinių izoformų inhibitoriai su trimetoksifenilo grupe prijungta prie C8 anglies pasižymėjo 3-5 kartų didesniu selektyvumu Hsp90α izoformai. PU-11 ir Hsp90α bei Hsp90β jungčių kristalinės struktūros analizė parodė esminį skirtumą dėl kurio šis junginys pasižymi aukštesniu selektyvumu vienai baltymo izoformai. Hsp90α ATP jungimosi vietoje turi mažesnę kišenę su keturiomis vandens molekulėmis, iš kurių viena sugeba sudaryti vandenilinius ryšius su poliniu serinu (Ser52). Hsp90β taip pat turi mažesnę kišenę su keturiomis vandens molekulėmis, tačiau dėl alanino (Ala47), esančio analogiškoje padėtyje kaip serinas, nesusidaro vandenilinis ryšys. Į Hsp90α ATP jungimosi kišenę patekęs PU-11 per NH₂ grupę sudaro vandenilinius ryšius

su serinu ir vandens molekule, įvyksta papildomas inhibitoriaus stabilizavimas, kuris nevyksta kitoje citozolyje sutinkamoje baltymo izoformoje. Serino vaidmuo šio proceso metu buvo patvirtintas atlikus Hsp90 α mutaciją, kurios metu Ser52 buvo pakeistas į Ala52. PU-11 afiniškumas mutuotai baltymo izoformai nesiskyrė nuo Hsp90 β afiniškumo (Hsp90 α Ala52 K_d = 4,2 μ M, Hsp90 β K_d = 4,2 μ M) [18].

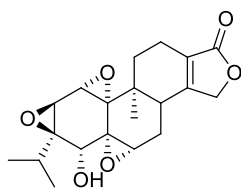
Penki purino dariniai dalyvavo klinikiniuose tyrimuose – BIIB021, BIIB028, MPC-3100, PU-H71 ir Debio0932. BIIB021 pateko į II klinikinių tyrimų stadiją, tačiau dėl silpno veiksmingumo, toksiškų reagentų panaudojimo gamybos metu ir sunkiai prieinamos intraveninės formos, šio vaisto vystymas nebuvo tęsiamas. Tos pačios mokslininkų grupės sukurtas antros kartos purino analogas BIIB028 2008 pateko į klinikinius tyrimus. Debio0932 ir MPC-3100 taip pat buvo klinikiniuose tyrimuose, tačiau dėl mažo veiksmingumo tyrimai nebuvo tęsiami [29].

1.4.2 Vidurio domeno slopikliai

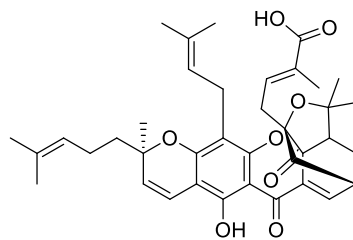
Vidurio domeno slopikliai tai mažiausiai ištirta Hsp90 slopiklių grupė, kuri gali būti perspektyvi naujų, tam tikrai izoformai specifinių junginių kūrimui (14 pav.). Vidurio domene yra baltymų klientų prisijungimo vieta, bei manoma, kad šiame domene esantis regionas gali prisijungti prie N-galo domeno prisijungusios ATP molekulės gama fosfatą, tokiu būdu kontroliuodamas šaperono aktyvumą [17].

Gamboginė rūgštis tai junginys gaunamas iš *Garcinia hanburyi* augalo. Šis junginys buvo tiriamas antroje klinikinių tyrimų stadijoje Kinijos Liaudies Respublikoje prieš nesmulkių ląstelių plaučių vėžį, tiesiosios žarnos ir plaučių vėžį. Šis poveikis buvo siejamas su Hsp90 slopinimu, tačiau tik 2016 metais Yin ir bendradarbiai pavyko tai įrodyti. Jų atliktame tyrime paaiškėjo, kad gamboginė rūgštis dešimt kartų lengviau rišasi su Hsp90 β palyginus su Hsp90 α , visiškai neinhibuoja mitochondrinės Trap-1 izoformos. Tyrimai su skirtingo ilgio Hsp90 β fragmentais leido identifikuoti junginio jungimosi vietą vidurio domene, kuri anksčiau nebuvo žinoma ir yra specifinė paralogui. Šio inhibitoriaus veikimo mechanizmas dar nėra ištirtas [38].

Kitu vidurio domenu slopikliu yra triptolidas. Jo veikimas pasižymi trimis mechanizmais – slopina ATP jungimąsi N-galo domene, sutrikdo Hsp90 β ir nuo ciklinų priklausomos ketvirtos kinazės komplekso susidarymą, stabdo ląstelės ciklą ir skatina programuotą mirtį.



Triptolidas



Gamboginė rūgštis

14 pav. Vidurio domeno slopikliai.

Vidurio domene nėra vieno, tiksliai apibrėžto taikinio, į kurį galėtų būti nukreipti inhibitoriai, tačiau manoma, kad tokiu regionu yra 350-436 aminorūgštys. *In silico* tyrimai padėjo Mak ir kitiems identifikuoti naujus junginius. Nors jų afiniškumas buvo mažas (K_d nuo 33 iki 500 μM), o selektyvumas palyginus su Hsp90 α tik 5-7 kartus didesnis, jų atradimas atveria duris į geresnį Hsp90 baltymų šeimos veiklos reguliavimo supratimą [39]. Šiuo metu vidurio domeno slopikliai nedalyvauja klinikiniuose tyrimuose.

1.4.3 C-galo slopikliai

C-galo domene išskiriami trys centrai: kalmodulino prijungimo centras, dimerizacijos centras ir nukleotidų jungimosi kišenė. Nukleotidų jungimosi kišenės atradimas yra susijęs su N-galo ir DNR girazės ATP jungimosi kišenių panašumu. Naujų N-galo slopiklių paieškoje dalyvavo novobiocinas, aminokumarinų klasės antibiotikas, kuris buvo gerai žinomu DNR girazės inhibitoriumi. Tyrimuose su GA ir RD paaiškėjo, kad novobiocinas konkuruoja su šiais junginiais dėl jungimosi su Hsp90, tačiau nei vienas iš jų negalėjo išstumti prisijungusio novobiocino. Vėlesni tyrimai įrodė, kad C-galo domene yra kita nukleotidų jungimosi kišenė, esanti arti Hsp90 dimerizacijos centro, kuri alosteriškai kontroliuoja N-galo domeno aktyvųjį centrą [16].

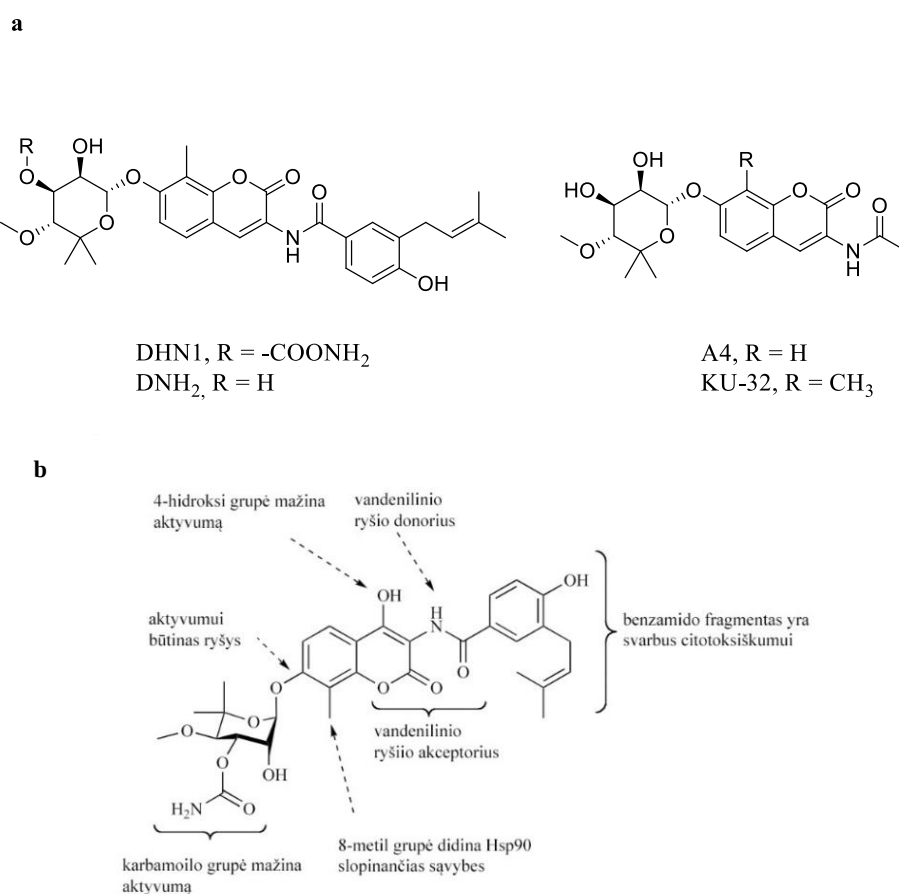
1.4.3.1 Novobiocinas ir jo analogai

Novobiocinas buvo pirmu atrastu junginiu, kuris alosteriškai kontroliuota Hsp90 veiklą (15a pav.). Jo veiksmingumas *in vitro* buvo mažas (IC_{50} SkBr3 krūties vėžio ląstelėse apie 700 μM), tačiau sugebėjo skatinti Hsp90 klientų degradavimą. Šio junginio bei jo analogų privalumu yra tai, jog, skirtingai nei N-galo domeno slopikliai, nesukelia terminio šoko atsako [40].

Struktūros-aktyvumo tyrimai leido atpažinti kritines grupes, kurios atsako už novobiocino aktyvumą (15b pav.). Pašalinus iš novobiocino 4-hidroksigrupę buvo gautas junginys DHN1 (IC_{50} ~7.5 μM), o pašalinus papildomai noviozės karbamoilo grupę buvo gautas DHN2 (IC_{50} ~0.5 μM). Tokiu būdu pavyko nustatyti būtinas C-galo domeno inhibitoriaus grupes: benzamido darinys

šoninėje grandinėje, kumarino centrinė dalis be 4-hidroksigrupės ir cukrus L-noviozės be karbamoilo struktūros [40].

Nors novobichinas ir dauguma jo analogų pasižymi Hsp90 slopinančiomis savybėmis, tam tikri junginiai skatina baltymo aktyvumą. KU-32 jungiasi prie aktyvaus centro C-galo domene, sukelia globalius šaperono struktūros pokyčius, kurie ne tik pagreitina ATP jungimąsi N-galo domene, bet ir skatina ATPazinį baltymo aktyvumą. Panašiomis savybėmis pasižymėjo ir A4, kuris indukavo Hsp90 1000-10000 kartų mažesnėse koncentracijose, palyginus su ta, prie kurios vyko baltymų klientų degradacija. Šie junginiai ir jų analogai dėl neuroprotekcinio savybių tiriami Alzheimerio ir Parkinsono ligų gydymui [29,40].



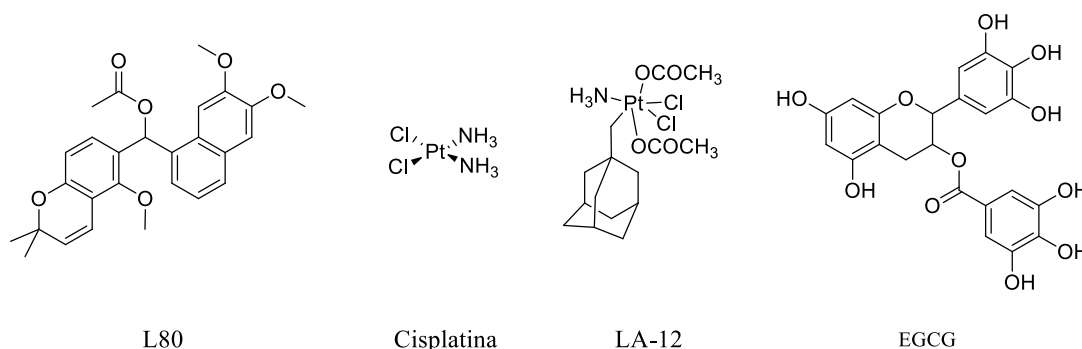
15 pav. Novobiocino analogai (**a**), novobiocino ir Hsp90 struktūros aktyvumo ryšys (**b**) [40].

1.4.3.2 Kiti C-galo slopikliai

Cisplatina tai chemoterapinis vaistas turintis savo struktūroje platina. Ji naudojama sėklidžių, kiaušidžių, šlapimo pūslės ir plaučių vėžio gydymui (16 pav.). Nors cisplatinos veikimas pagrinde siejamas su DNR replikacijos sutrikdymu, pastebėta, kad šis junginys jungiasi Hsp90 C-galo domeno nukleotido jungimosi kišenėje ir nesukelia terminio šoko atsako, kuris yra būdingas

N-galo domeno slopikliams. Cisplatinos analogas, LA-12, pasižymi didesniu afiniškumu Hsp90, geresniu farmakokinetiniu profiliu bei veiksmingumu prieš platesnį vėžinių ląstelių linijų spektrą [41].

L80 tai gamtoje sutinkamo flavonoido degelino analogas, kuris sukelia apoptozę ir pasižymi antiproliferacinėmis savybėmis *in vivo* ir *in vitro*, be sisteminio toksiškumo. Tikslus jo veikimo mechanizmas nėra aiškus [41].

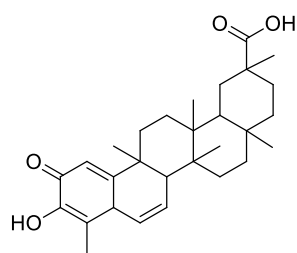


16 pav. C-galo domeno slopikliai.

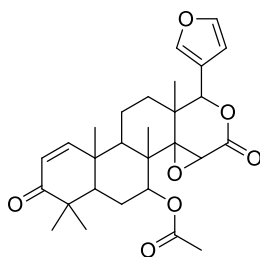
Epigalaktokatechin-3-galatas (sutrumpintai EGCG) tai polifenolinis junginys sutinkamas žalioje arbatoje, kuris pasižymi antioksidacinėmis, antimikrobinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis, slopina Hsp90 klientų aktyvumą. Jis panašiai jungiasi su šaperonu kaip ir novobiocinas. Šiuo metu vyksta tyrimai kurių tikslas nustatyti ar EGCG konkuruoja su novobiocinu ir cisplatiną dėl jungimosi su Hsp90 [16].

1.4.4 Kiti junginiai slopinantys Hsp90 veiklą

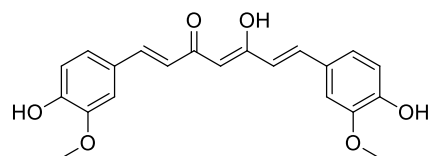
Hsp90 ir jo košaperonai yra būtini taisyklingam baltymų substratų brandinimui. Kai kurie gamtoje sutinkami junginiai sugeba sutrikdyti šaperono veiklą kitais mechanizmais, nei N-galo, vidurio ar C-galo domenų inhibitoriai. Celastrolis tai junginys išskiriamas iš augalo *Tripterygium wilfordii* šaknies. Jis trikdo Hsp90 ir Cdc37 sąveiką, kuri yra būtina kinazių brandinimui, nedarydamas įtakos kitų, nuo šaperono priklausomų, baltymų funkcionavimui (17 pav.). Jo veikimo mechanizmas nėra visiškai aiškus, manoma kad gali jungtis prie Cdc37 cisteino liekanų, pastebėta taip pat, kad celastrolis jungiasi prie C-galo domeno ir indukuoja baltymo oligomerizavimą [41]. Geduninas panašiu principu slopina sąveiką su p23 košaperonu, kuris stabilizuoja uždarą baltymo izoformą, be kurios didelė dalis klientų nepasiekia galutinės konformacijos. Kurkuminas, indiško kari prieskonio komponentas taip pat neigiamai įtakoja p23 košaperono ir Hsp90 sąveiką [16].



Celastrolis



Geduinas



Kurkuminas

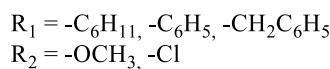
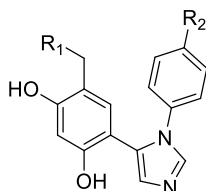
17 pav. Kiti Hsp90 inhibitoriai.

Nepriklausomai nuo veikimo mechanizmo, Hsp90 inhibitoriai tai junginių grupė turinti platų potencialą vėžinių ir kitų susirgimų gydymui. Optimalaus poveikio pasiekimui yra būtinas junginių selektyvumo kriterijų nustatymas, kuris leis geriau suvokti skirtingų baltymo izoformų reikšmę žmogaus organizmui.

2 EKSPERIMENTINĖ DALIS

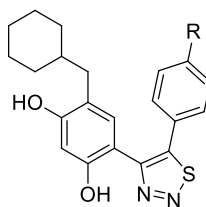
2.1 Tyrimo objektas

Šio magistrinio darbo metu buvo nutarta sintetinti junginius, su skirtingais pakaitais rezorcinolio fragmento 6 padėtyje ir prie imidazolo žiedo 1 padėties prijungtos fenilo grupės 4 padėtyje. Tai padaryta siekiant išaiškinti pakaitų įtaką farmakoforo išsidėstymui aktyviajame Hsp90 N-galo domeno centre (18 pav.).



18 pav. Bendra 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų struktūra.

Dėl selektyvumo, kuriuo pasižymėjo junginiai su $R_1 = -C_6H_{11}$ tyrimuose su TsHsp90N, buvo nuspręsta susintetinti papildomai du junginius su tiadiazolo žiedu (19 pav.).



19 pav. Bendra susintetintų junginių su tiadiazolo fragmentu struktūra.

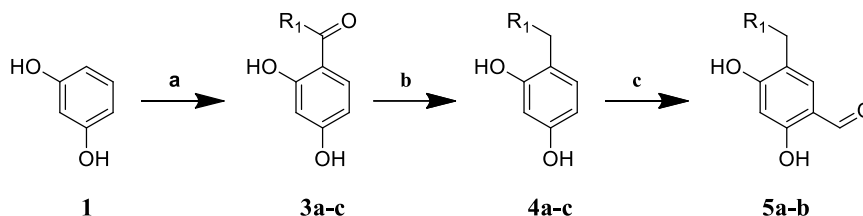
2.2 Junginių sintezių metu naudoti reagentai ir tirpikliai

Reagentai buvo įsigyti iš Fluorochem (Diždioji Britanija), Honeywell Fluka™ (Vokietija) ir Sigma-Aldrich (Vokietija) įmonių.

Reakcijose naudoti tirpikliai: metanolis (toliau – MeOH), etanolis (toiau – EtOH), dimetilforamidas (toliau – DMF), boro trifluorido eteratas (toliau – BF_3OEt_2), chloroformas (toliau $CHCl_3$), etilacetatas (toliau – EA) buvo įsigyti iš Eurochemicals (Lietuva) ir Honeywell Riedel-de-Haen™ (Vokietija).

2.4 5-(cikloalkil ar aril)-2,4-dihidroksibenzaldehydų sintezė

Tikslinių junginių sintezei pradiniai junginiai – 5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksibenzaldehydo, 5-benzil-2,4-dihidroksibenzaldehydo ir 2,4-dihidroksi-5-fenetilbenzaldehydo sintezė buvo atlikta, remiantis literatūroje nurodytomis metodikomis (20 pav.) [42–45].



20 pav. Bendra 5-(cikloalkil ar aril)-2,4-dihidroksibenzaldehydų sintezės schema. Reagentai ir sąlygos: (a) karboksirūgštis (**2a-c**, 2 lentelė), BF₃OEt₂, 80 °C, 4-5 val.; (b) NaBH₃CN, HCl, kamb. t., 24 val.; (c) POCl₃, DMF, kamb. t., 24 val; 50 °C, 4 val.; NaOH, 70 °C, 20 min.

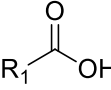
Pirmoje sintezės stadijoje (1 schema, **a**) komerciškai prieinamas rezorcinolis (benzen-1,3-diolis) buvo veikiamas viena iš trijų karboksi rūgščių – cikloheksankarboksi rūgštimi (**2a**), benzenkarboksi rūgštimi (**2b**) ar fenilacto rūgštimi (**2c**). Reakcijos tirpikliu ir kartu katalizatoriumi buvo BF₃OEt₂, reakcijos mišinys buvo kaitinamas 80 °C temperatūroje smėlio vonelėje 4-5 valandas. Po to BF₃OEt₂ perteklius buvo neutralizuotas natrio acetato vandeniniu tirpalu. Reakcijos mišinys buvo ekstrahuojamas etilacetatu, vėliau sukonzentruotas rotaciniu garintuvu, išskirtas kolonėlinės chromatografijos metodu, mobiliąja faze buvo Tol ir EA 30:1 ir 10:1 santykiu. Šių reakcijų metu susidarė cikloheksil(2,4-dihidroksifenil)metanonas (**3a**), 2,4-dihidroksibenzofenonas (**3b**) ir 1-(2,4-dihidroksifenil)-2-feniletan-1-onas (**3c**).

Antroje sintezės stadijoje (1 schema, **b**) buvo atliekama gautų ketonų (**3a-c**) redukcija. Reakcijų metu, junginių struktūrose esantis karbonilo grupės deguonis buvo pakeistas dviem vandenilio atomais. Junginiai **2a-c** buvo veikiami natrio cianoborohidridu į reakcijos mišinį lašinant 1 M HCl vandeninio tirpalo tokiu greičiu, kad pastoviai būtų rūgštinė terpė (raudona reakcijos mišinio spalva nuo į reakcijos mišinį pridėto 10 mg indikatoriaus metiloranžo). Reakcijai naudotas tirpiklis – metanolis, reakcija buvo vykdyta 24 valandas, kambario temperatūroje. Po to reakcijos mišinys buvo sukonzentruotas rotaciniu garintuvu, ekstrahuojamas EA, susidarę junginiai išgryninti kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuentu naudojant Tol ir EA 10:1 santykiu.

Trečios pradinio junginio sintezės stadijos metu (1 schema, **c**) su junginiais **4a-c** buvo vykdytos Vilsmejerio-Hako formilinimo reakcijos. Junginiai **4a-c** buvo veikiami POCl₃ ir DMF. Dimetilforamidas atliko du vaidmenis – tirpiklio ir reagento. Reakcija buvo vykdoma argono

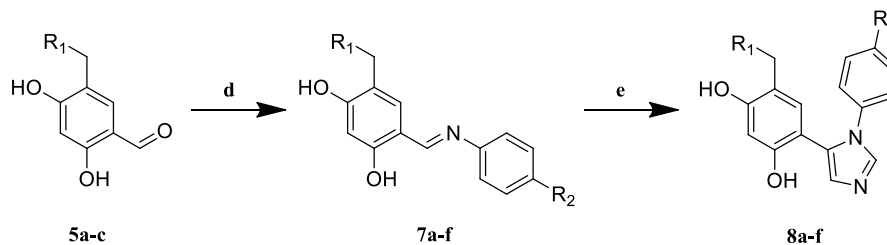
atmosferoje tam, kad apsaugoti reakcijos mišinį nuo galimo ore esančio deguonies poveikio. Po 20 valandų maišymo kambario temperatūroje, reakcijos mišinys dar buvo kaitinamas 50 °C 4 valandas, po to įpilus vandeninį NaOH tirpalą mišiniys buvo kaitinami 70 °C temperatūroje 20 min. Reakcijos mišinys buvo ekstrahuojamas EA ir H₂O mišiniu, sukonzentruotas rotaciniu garintuvu ir išskirtas kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuentu naudojant Tol ir EA 10:1 santykiu.

2 lentelė. Reakcijų metu naudotos karboksirūgštys bei gautų junginių **3a-c**, **4a-c**, **5a-c** išeigos.

	Reakcijoms naudotos karboksirūgštys 2a-c 	3a-c junginių išeigos	4a-c junginių išeigos	5a-c junginių išeigos
a	R1 = -C ₆ H ₁₁	46%	86%	64%
b	R1 = -C ₆ H ₅	40%	47%	49%
c	R1 = -CH ₂ C ₆ H ₅	49%	55%	45%

2.5 4-(1-aril-1H-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė

Tikslinių junginių sintezė buvo vykdoma dvejomis stadijomis. Pirmoje stadijoje iš pradinių junginių **5a-c** reakcijose su komerciškai prieinamais anilinais – 4-metoksianilinu (**6a**) ir 4-chloranilinu (**6b**) buvo gauti iminai **7a-f** (21 pav.). Antroje stadijoje iš susidariusių iminų buvo susintetinti junginiai su imidazolo žiedu, jungiančiu rezorcinolio fragmentą su aromatinio žiedu.

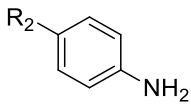


21 pav. 4-(1-aril-1H-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil- ar aril)benzen-1,3-diolų sintezė. Reagentai ir sąlygos: (d) anilinais (**6a** arba **6b**), EtOH, kamb. t., 24 - 48 val.; (e) TosMIC, K₂CO₃, MeOH, kamb. temp., 2 - 6 dienos.

Pirmoje (**d**) reakcijos stadijoje tirpikliu buvo etanolis, reakcija buvo vykdomos 24 – 48 valandas kambario temperatūroje. Po to TLC metodas parodė visišką pradinio junginio konversiją. Susidarę **7a**, **7c**, **7e**, junginių kristalai, buvo filtruojami ir džiovinami kambario temperatūroje (3 lentelė). **7b** ir **7f** junginiai išskirti rotaciniu garintuvu sukonzentravus reakcijos mišinį ir perkristalinius juos iš izopropanolio ir vandens mišinio. Gauti kristalai buvo filtruojami ir džiovinami kambario temperatūroje.

Susintetintų iminų išeigos siekė 67-92 % (3 lentelė). Geriausia išeiga pasižymėjo **7b** junginys, ji siekė 92%.

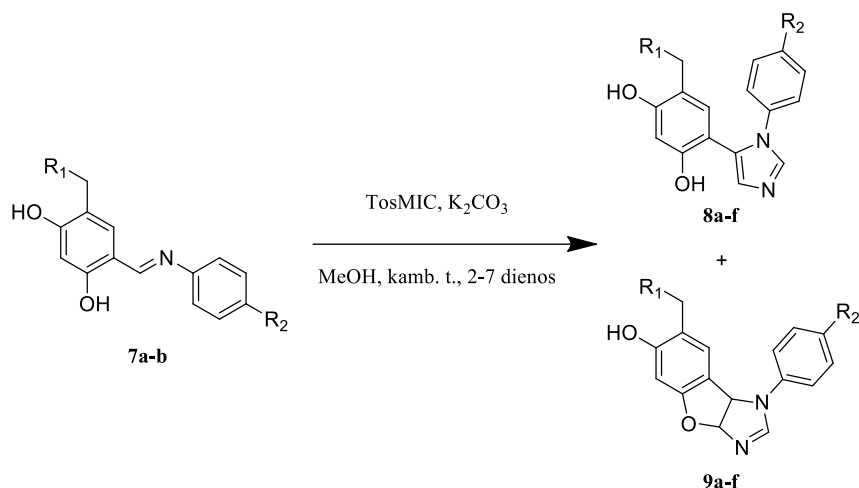
3 lentelė. Reakcijoms panaudoti anilinai (**6a-b**), bei gautų junginių **7a-f** ir **8a-f** išeigos.

	Reakcijoms naudoti aminai 6a-b 	7a-b junginių išeiga	8a-b junginių išeiga
a	R ₂ = -OMe	72%	56%
b	R ₂ = -Cl	92%	33%
		7c-d junginių išeiga	8c-d junginių išeiga
c	R ₂ = -OMe	89%	21%
d	R ₂ = -Cl	86%	39%
		7e-f junginių išeiga	8e-f junginių išeiga
e	R ₂ = -OMe	67%	36%
f	R ₂ = -Cl	90%	48%

Antroje galutinių junginių sintezės stadijoje (21 pav.), su gautais iminiais (**7a-f**) buvo vykdyta Van Leuseno reakcija. Imidazolas buvo gautas sumaišius **7a-f** junginį su tozilizocianidu (sutrumpintai – TosMIC) ir K₂CO₃ metanolyje kambario temperatūroje [46]. Tam kad pasiekti galimai aukščiausią išeigą, junginiai **7c-d** buvo maišomi šešias paras. **8d** junginys išsiskyrė kristalų pavidalu, kurie buvo filtruojami ir džiovinami kambario temperatūroje. Kiti reakcijų mišiniai buvo sukonzentruoti rotaciniu garintuvu ir ekstrahuojami vandens ir EA mišiniu, ir galutinai atskirti kolonėlinės chromatografijos būdu, mobiliąja faze naudojant CHCl₃ ir MeOH santykiu 30:1. Šios reakcijos metu susidarė ir pašaliniai junginiai **9a-f** (22 pav.). Jų bendras pavadinimas 1-(4-chloro)-7-(cikloalkil ar aril)-1*H*-benzofuro[2,3-*d*]imidazol-6-oliai (**9b**, **9d**, **9f**) ir 1-(4-metoksi)-7-(cikloalkil ar aril)-1*H*-benzofuro[2,3-*d*]imidazol-6-oliai (**9a**, **9c**, **9e**).

Susintetintų galutinių junginių išeigos siekė 14-58%. Aukščiausia išeiga – 58% buvo susintetintas 4-(cikloheksilmetil)-6-(1-(4-metoksifenil)-1*H*-imidazol-5-il)benzen-1,3-diolis (**8a**).

9d junginio išeiga siekė 11%, o **9a-c** ir **9e-f** junginių nepavyko atskirti nuo papildomų priemaišų, jų išeigos neviršijo 5%.



22 pav. Šalutinio produkto susidarymas (**9a-f**).

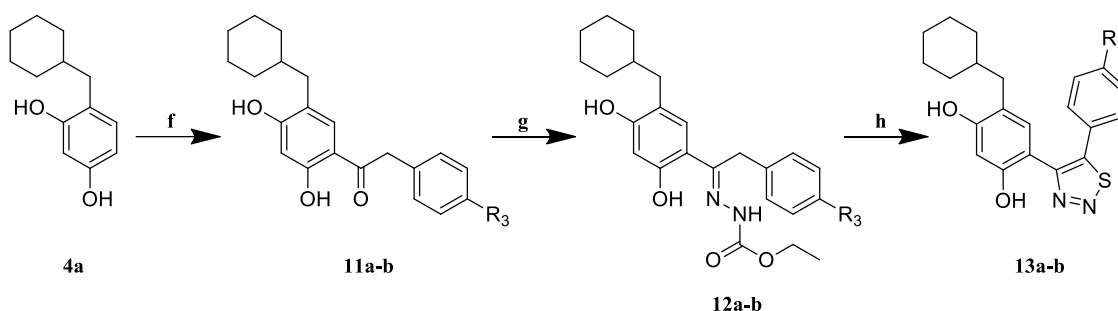
8a ir **8b** tyrimuose su TsHsp90N ir Hsp90αN (Hsp90α baltymo N galo domeno fragmentas) parodė gerą selektyvumą, buvo nuspręsta papildomai susintetinti du junginius su cikloheksano fragmentu, kurie vietoje imidazolo žiedo turėtų 1,2,3-tiadiazolo žiedą.

2.6 4-(5-(4-aril)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolų sintezė

Tikslinių junginių sintezė buvo vykdoma keturiais etapais, pagal literatūroje prieinamas metodikas (23 pav.) [3,47,48]. Pirmoje reakcijoje pradinis junginys 4-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (**4a**) buvo veikiamas viena iš dviejų karboksirūgščių – 2-metoksiacto rūgštimi (**10a**) ar 2-chlorfenilacto rūgštimi (**10b**). Reakcijos sąlygos atitiko 4 schemoje aprašytos reakcijos **a** sąlygas. 1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etan-1-onas (**11a**) išsiskyrė kristalų pavidalu, kurie buvo filtruojami ir plaunami petrolio eteriu, džiovinami kambario temperatūroje. 2-(4-chlorfenil)-1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)etan-1-onas (**11b**) buvo sukonzentruotas rotaciniu garintuvu, ekstrahuotas EA:H₂O mišiniu, galutinai atskirtas nuo priemaišų kolonėlinės chromatografijos metodu, elientu naudojant Tol:EA 30:1 mišinį.

Antrasis sintezės etapas vykdytas veikiant gautą atitinkamą ketoną (**10a-b**) etilkarbazatu verdančiame etanolyje 25 valandas (23 pav., **g**), reakciją katalizavo penki ledinės acto rūgšties lašai. Reakcijos eiga buvo stebima su TLC metodo pagalba. Susidarę kristalai buvo filtruojami ir plaunami šaltu izopropanoliu, džiovinami kambario temperatūroje. Filtratas buvo sukondensuotas rotacinio garintuvo pagalba, susidarę papildomi produkto kristalai buvo perkristalinti iš izopropanolio.

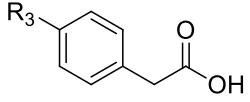
Trečiame etape su gautais junginiais (**12a-b**) buvo vykdoma Hurd-Mori ciklizacijos reakcija. Į ledo vonioje atšaldytą hidrazoną (**12a-b**) buvo lašinamas atšaldytas tionilo chloridas (sutrumpintai SOCl₂), po valandos maišymo ledo vonelė buvo pakeista alyvos vonele ir kaitinama 65 °C 2 valandas. Pasibaigus reakcijai, SOCl₂ buvo pašalintas distiliuojant traukos spintoje sumažintame slėgyje, liekana ekstrahuojama EA ir H₂O mišiniu, po to tikslinis reakcijos produktas buvo atskirtas kolonėlnės chromatografijos metodu, eliuentu naudojant Tol ir EA 10:1 santykiu. Gauti du galutiniai junginiai – 4-(cikloheksilmetil)-6-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolis (**13a**) ir 4-(5-(4-chlorfenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (**13b**).



23 pav. Bendra 4-(5-(4-aril)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-dolių sintezės schema: (f) karboksirūgštis (**10a-b**), BF₃OEt₂, 90 °C, 2 val.; (g) NH₂NHCO₂Et, CH₃COOH, EtOH, 78 °C, 48 val.; (h) SOCl₂, ledo vonia, 1 val., 65 °C, 2 val.

Galutinių junginių išeigos siekė 46 % (**13a**, 23 pav.) ir 72% (**13b**, 23 pav.).

4 lentelė. Reakcijoms panaudotos karboksirūgštys bei gautų junginių **11a-b**, **12a-b**, **13a-b** išeigos.

	Reakcijoms naudotos karboksirūgštys 10a-b 	11a-b junginių išeiga	12a-b junginių išeiga	13a-b junginių išeiga
a	R ₃ = -OMe	72%	58%	46%
b	R ₃ = -Cl	29%	46%	72%

2.7 Susintetintų galutinių junginių tyrimai su baltymais

Apytiksliai 10 mg kiekvieno iš aštuonių tikslinių junginių (**8a-f** ir **13a-b**) ir junginio **9c** buvo nusiūsta į Daumanto Matulio vadovaujamą Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyrių, kuriame buvo atliekamas fluorescentinio poslinkio

tyrimas su skirtingų žmogaus Hsp90 baltymo izoformomų bei kitų organizmų Hsp90 N-galo domenais.

3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Reakcijų eiga buvo stebima plonasluoksnės chromatografijos (angl. *Thin layer chromatography*, sutrumpintai TLC) metodu, naudojant TLC Silica gel 60 F254 plokšteles, stebint ultravioletinėje šviesoje ($\lambda = 254$ ir 365 nm) ar ryškinant vanilino, ar kalio permanganato tirpalais.

Gautų reakcijų mišinių atskyrimui naudotas kolonėlinės chromatografijos metodas. Kolonėlės buvo užpildytos Silica gel 60 A (0,035 - 0,070). Eliuentai buvo parenkami atsižvelgiant į reakcijų produktų savybes ir naudojami įvairių santykių Tol:EA ir CHCl_3 :MeOH tirpalai.

Junginių struktūros ir savybių nustatymui buvo užrašyti BMR spektrai, nustatyta junginių lydymosi temperatūra. Naudotas BRUKER ASCEND spektrometras, ^1H spektrai užrašyti 400 MHz dažnyje, ^{13}C spektrai užrašyti 100 MHz dažnyje, vidiniu standartu naudojant deuteruotų tirpiklių (CDCl_3 ir DMSO-d_6) likutines vertes. Masių spektrai užrašyti Agilent LC/MSD TOF skrydžio laiko spektrometru. IR spektrai užrašyti naudojant PERKIN-ELMER 1000 spektrometrą su UATR priedu. Junginių lydymosi temperatūros buvo nustatytos atvirose kapiliaruose prietaisu Stuart SMP10.

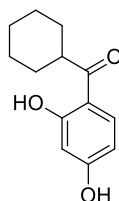
Literatūroje aprašytų junginių identifikavimui užteko ^1H BMR ir ^{13}C BMR spektrų užrašymo, kitų junginių identifikavimui ir aprašymui buvo papildomai užrašyti IR spektrai bei nustatytos lydymosi temperatūros.

BMR spektrų aprašymuose poslinkių reikšmės pateiktos δ skalėje milijoninėmis dalimis, naudoti žymėjimai: s – singletas, pl. s – platus singletas, d – dubletas, dd – dubletų dubletas, t – tripletas, k – kvadrupletas, m – multiplotas.

3.1 (2,4-dihidoksifenil)(fenil ar aril)ketonų sintezė

(Bendra metodika) Į 15 ml boro trifluorido eterato suberiamas rezorcinolis (1 ekv., **1**, 46 mmol) ir atitinkama karboksirūgštis (1 ekv., **2a-c**, 46 mmol). Reakcijos mišinys maišomas 5 valandas 80°C temperatūroje. Po to, į atšaldytą iki kambario temperatūros mišinį supilamas 60 ml 10% vandeninis NaOAc tirpalas ir dar maišoma 5 val. Mišinys ekstrahuojamas EA, surinkta organinė fazė nugarinama rotacinio garintuvo pagalba. Gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuuojama Tol:EA 30:1 (**3a** ir **3c**) arba 10:1 mišiniu (**3b**).

cikloheksil(2,4-dihidoksifenil)metanonas (**3a**)



Literatūroje nurodoma 70% išeiga [49].

Išeiga: 4,61 g (46%) gelsvų kristalų, lyd. t. 65-96 °C.

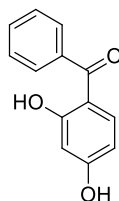
IR: $\nu_{\max}$ = 3300 (pl., OH); 1625 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 13,11 (s, 1H, OH); 7,69 (d, J = 9,6 Hz, 1H, ArH); 6,42 - 6,37 (m, 2H, ArH); 6,06 (pl. s., 1H, OH); 3,19 (tt, J = 11,7; 3,0 Hz, 1H, CH c-Hex); 1,90 – 1,81 (m, 4H, CH_2 c-Hex); 1,78 – 1,71 (m, 1H, CH_2 c-Hex); 1,61 – 1,48 (m, 2H, CH_2 c-Hex), 1,41 – 1,24 (m, 3H, CH_2 c-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 208,70; 165,91; 162,59; 132,31; 112,87; 107,79; 103,93; 45,20; 29,77; 25,96; 25,95.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 221,1170; $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$ apskaičiuota 221,1172.

2,4-dihidroksibenzofenonas (3b)



Literatūroje nurodoma 32% išeiga [49].

Išeiga: 3,96 g (40%) rudų kristalų, lyd. t. 107-109 °C.

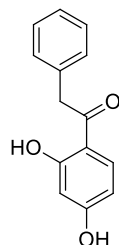
IR: $\nu_{\max}$ = 3194 (pl., OH); 1625 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 12,64 (s, 1H, OH); 7,67 – 7,44 (m, 6H, ArH); 7,18 (pl.s, 1H, OH); 6,4 (d, J = 2,4 Hz, 1H, ArH); 6,37 (dd, J = 8,9; 2,4 Hz, 1H, ArH).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 200,41; 166,25; 163,57; 138,30; 136,24; 131,66; 128,96; 128,46; 113,40; 107,96; 103,77; 31,14.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 215,0703; $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ apskaičiuota 215,0703.

1-(2,4-dihidroksifenil)-2-feniletan-1-onas (3c)



Literatūroje nurodoma 89% išeiga [49].

Išeiga: 5,14 g (49%) rožinių kristalų, lyd. t. 106-107 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3160 (pl., OH); 1620 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 12,70 (s, 1H, OH); 7,73 (d, J = 8,6 Hz, 1H, ArH), 7,35 -7,22 (m, 5H, ArH); 6,43 (pl. s., 1H, OH); 6,40 – 6,32 (m, 2H, ArH); 4,20 (s, 2H, CH_2).

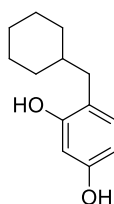
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 202,44; 165,67; 163,15; 134,38; 133,02; 129,46; 128,93; 127,28; 113,59; 108,25; 103,79; 44,96.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 229,0852; $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ apskaičiuota 229,0859.

3.2 (2,4-dihidroksifenil)(fenil ar aril)ketonų redukavimas

(Bendra metodika) Į maišomą ketono (1 ekv., **2a** 17,3 mmol, **2b** 17,1 mmol, **2c** 14,1 mmol) tirpalą 40 ml metanolio suberiamas natrio cianborhidridas (3 ekv.), 10 mg metiloranžo ir sulašinama 70 ml 1M HCl vandeninio tirpalo tokiu greičiu, kad pastoviai būtų rūgštinė terpė (raudona reakcijos mišinio spalva). Po 24 val. reakcijos mišinys praskiedžiamas 40 ml H_2O ir ekstrahuojamas EA. Surinkta organinė fazė sukonzentruojama rotacinio garintuvo pagalba. Gauta alyva atskiriama kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuuojant Tol:EA 10:1 mišiniu.

4-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (**4a**)



Literatūroje nurodoma 51% išeiga [49].

Išeiga: 3,06 g (86%) gelsvų kristalų, lyd. t. 113-114 °C.

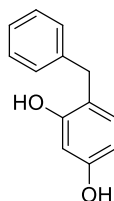
IR: ν_{max} = 3287 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 6,90 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 6,38 – 6,31 (m, 2H, ArH); 4,83 – 4,72 (m, 2H, OH); 2,4 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2); 1,73 – 1,59 (m, 5H, *c*-Hex); 1,56 – 1,43 (m, 1H, CH *c*-Hex); 1,26 – 1,09 (m, 3H, CH_2 *c*-Hex); 1,01 – 0,88 (m, 2H, CH_2 *c*-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 154,75; 154,58; 132,00; 119,40; 107,62; 102,96; 38,71; 37,38; 33,41; 26,68; 26,43.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 207,1377; $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$ apskaičiuota 207,1380.

4-benzilbenzen-1,3-diolis (**4b**)



Literatūroje nurodoma 60% išeiga [49].

Išeiga: 1,62 g (47%) rudų kristalų, lyd. t. 74-75 °C.

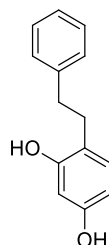
IR: $\nu_{\max}$ = 3409, 3328 (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 7,33 – 7,27 (m, 2H, ArH); 7,24 – 7,19 (m, 3H, ArH); 6,96 (s, J = 8,1 Hz, 1H, ArH); 6,37 (dd, J = 8,2; 2,4 Hz, 1H, ArH); 6,32 (d, J = 2,4 Hz, 1H, ArH); 4,79 (s, 2H, OH); 3,92 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 155,40; 154,78; 140,20; 131,77; 128,81; 128,69; 126,52; 119,50; 107,96; 103,48; 35,85.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 201,0905; $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2$ apskaičiuota 201,0910.

4-fenetilbenzen-1,3-diolis (4c)



Literatūroje nurodoma 78% išeiga [49].

Išeiga: 1,61 g (55%) rusvų kristalų, lyd. t. 125-126 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3408, 3374 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 7,22 – 7,18 (m, 2H, ArH); 7,16 – 7,08 (m, 3H, ArH); 6,4 (d, J = 8,1 Hz, 1H, ArH); 6,26 (dd, J = 8,2; 2,5 Hz, 1H, ArH); 6,22 (d, J = 2,4 Hz, 1H, ArH); 4,63 – 4,45 (m, 2H, OH); 2,84 – 2,67 (m, 4H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 154,96; 154,53; 142,05; 131,09; 128,64; 128,59; 126,17; 120,29; 107,88; 103,16; 36,63; 31,80.

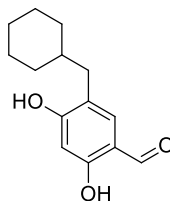
HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 215,1063; $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2$ apskaičiuota 215,1067.

3.3 Vilsmejerio-Hako formilinimo reakcijos

(*Bendra metodika*) Argono atmosferoje į kolbutę įpilama 5 ml dimetilforamido, kuris ledo vonioje šaldomas 20 min. Tada lėtai sulašinamas POCl_3 (3 ekv.) ir maišoma 20 min. Ankstesnėje reakcijoje gautas atitinkamas junginys (1 ekv., **4a** 12 mmol, **4b** 5 mmol, **4c** 7 mmol) ištirpinamas 5 ml DMF ir supilamas į reakcijos mišinį, kuris maišomas 1 val. Po to mišinio temperatūra pakeliama iki 50 °C ir maišoma 4 valandas. Po to į atvėsintą reakcijos mišinį įpilama 50 ml vandeninio 10% NaOH tirpalo ir kaitinama 70 °C 20 min. Po to atvėsintas mišinys rūgštinamas 10% HCl iki pH 2 ir paliekamas stovėti kambario temperatūroje 24 val., ekstrahuojamas EA,

organinė fazė sukonzentruojama rotaciniu garintuvu. Gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuuojant Tol:EA 20:1 mišiniu.

5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksibenzaldehydas (5a)



Išėiga: 1,78 g (64%) rusvų kristalų, lyd. t. 152-153 °C.

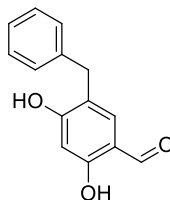
IR: $\nu_{\max}$ = 3388 (OH); 1623 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 10,68 (s, 1H, OH); 10,51 (s, 1H, OH); 9,85 (s, 1H, CHO); 7,26 (s, 1H, ArH); 6,33 (s, 1H, ArH); 2,28 (d, J = 7,0 Hz, 2H, CH_2); 1,55 (m, 5H, CH_2 c-Hex); 1,47 – 1,35 (m, 1H, CH c-Hex); 1,14 – 1,02 (m, 3H, CH_2 c-Hex); 0,90 – 0,78 (m, 2H, CH_2 c-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 191,04; 163,35; 161,39; 132,77; 120,04; 114,67; 101,88; 37,44; 36,47; 32,68; 26,15; 25,77.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 235,1313; $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3$ apskaičiuota 235,1329.

5-benzil-2,4-dihidroksibenzaldehydas (5b)



Išėiga: 0,56 g (49%) gelsvos spalvos kristalų, lyd. t. 85-86 °C.

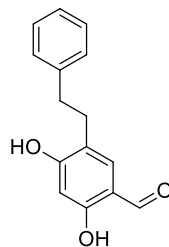
IR: $\nu_{\max}$ = 3337 (OH); 1700 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 11,31 (s, 1H, OH); 9,63 (s, 1H, CHO); 7,35 – 7,20 (m, 6H, ArH); 6,35 (s, 1H, ArH); 6,22 (pl.s, 1H, OH); 3,95 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 194,74; 163,14; 161,98; 139,38; 136,24; 128,90; 128,83; 126,75; 120,74; 115,44; 103,43; 35,33.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 229,0860; $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ apskaičiuota 229,0859.

2,4-dihidroksi-5-fenetilbenzaldehydas (5c)



Išėiga: 0,76 g (45%) baltų kristalų, lyd. t. 149-150 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3203 (OH); 1601 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 10,74 (pl. s, 2H, OH); 9,89 (s, 1H, CHO), 7,37 (s, 1H, ArH); 7,23 (m, 5H, ArH); 6,41 (s, 1H, ArH); 2,76 (m, 4H, CH_2).

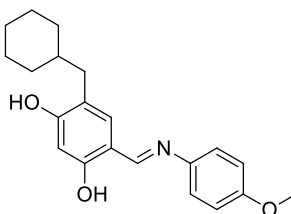
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 190,70; 163,28; 161,58; 141,84; 131,71; 128,31; 128,24; 125,77; 120,84; 114,79; 101,94; 35,25; 30,96.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 243,1029; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ apskaičiuota 243,1016.

3.4 Iminų sintezė

(Bendra metodika) Į 5 ml etanolio suberiamas atitinkamas ketonas (1 ekv.) ir atitinkamas anilinas (1 ekv., **5a** ir **6a** po 1 mmol, **5a** ir **6b** po 1 mmol, **5b** ir **6a** po 0,9 mmol, **5b** ir **6b** po 0,9 mmol, **5c** ir **6a** po 1 mmol, **5c** ir **6b** po 1 mmol). Reakcijos mišinys maišomas 24 val. jeigu susidaro kristalai, kitu atveju mišinys maišomas papildomas 24 val. Išsiskyrę kristalai filtruojami ir plaunami šaltu etanolio, džiovinami kambario temperatūroje. Nesusidarius kristalams (**7b** ir **7f**), reakcijos mišinys nurotuojamas, ir kristalinamas iš izopropanolio ir vandens mišinio. Išsiskyrę kristalai filtruojami, plaunami izopropanolio ir vandens mišiniu, džiovinami kambario temperatūroje.

(E)-4-(cikloheksilmetil)-6-(((4-metoksifenil)imino)metil)benzen-1,3-diolis (7a)



Išėiga: 242 mg (72%) žaliai-geltonų kristalų, lyd. t. 189-190 °C.

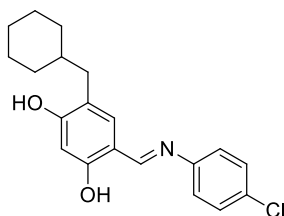
IR: $\nu_{\max}$ = 3274 (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 8,42 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$); 7,26 (d, J = 8,5 Hz, 2H, ArH); 7,00 (s, 1H, ArH); 6,93 (d, J = 8,5 Hz, 2H, ArH), 6,5 (s, 1H, ArH), 3,83 (s, 3H, OCH_3); 2,42 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2); 1,79 – 1,60 (m, 5H, CH_2 c-Hex); 1,59 – 1,47 (m, 1H, CH c-Hex); 1,23 – 1,12 (m, 3H, c-Hex); 1,02 – 0,87 (m, 2H, c-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 159,33; 158,55; 140,44; 134,83; 121,93; 119,44; 114,80; 112,77; 103,61; 55,70; 38,39; 37,30; 33,40; 26,72; 26,45; 17,25.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 340,1907; $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ apskaičiuota 340,1907.

(E)-4-(((4-chlorfenil)imino)metil)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (7b)



Išga: 316 mg (92%) geltonų kristalų, lyd. t. 138-140 °C.

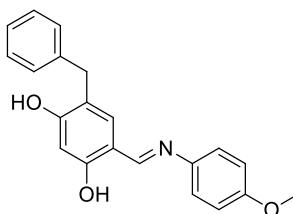
IR: ν_{max} = 3134 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO-d_6) δ : 13,01 (s, 1H, OH); 10,19 (s, 1H, OH); 8,76 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$); 7,46 (d, J = 8,1 Hz, 2H, ArH); 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2H, ArH); 7,23 (s, 1H, ArH); 6,35 (s, 1H, ArH); 2,41 – 2,30 (m, 2H, ArH); 1,76 – 1,41 (m, 6H, *c*-Hex); 1,22 – 0,97 (m, 5H, *c*-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ : 163,16; 160,84; 160,71; 147,42; 134,69; 130,13; 129,25; 122,82; 119,29; 111,51; 102,03; 37,57; 36,50; 32,70; 26,14; 25,76.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 344,1411; $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClNO}_2$ apskaičiuota 344,1412.

(E)-4-benzil-6-(((4-metoksifenil)imino)metil)benzen-1,3-diolis (7c)



Išga: 266 mg (89%) rudų kristalų, lyd. t. 157-158 °C.

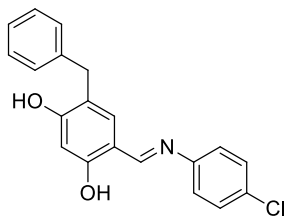
IR: ν_{max} = 3203 (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO-d_6) δ : 13,53 (s, 1H, OH); 10,28 (s, 1H, OH); 8,70 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$); 7,37 – 7,18 (m, 8H, ArH); 6,96 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 6,37 (s, 1H, ArH); 3,82 (s, 2H, CH_2); 3,76 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ : 161,13; 160,53; 159,67; 157,84; 141,25; 141,08; 134,05; 128,48; 128,17; 125,65; 122,10; 119,52; 114,56; 111,93; 102,22; 55,31; 34,42.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 334,1438; $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ apskaičiuota 334,1438.

(E)-4-benzil-6-(((4-chlorfenil)imino)metil)benzen-1,3-diolis (7d)



Išeiga: 262 mg (86%) plytų spalvos kristalų, lyd. t. 153-154 °C.

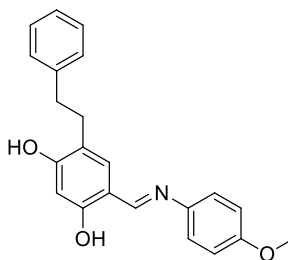
IR: $\nu_{\max}$ = 3230 (pl., OH); 1292 (NH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 13,09 (s, 1H, OH), 10,42 (pl.s., 1H, OH); 8,73 (s, 1H, CH=N); 7,45 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 7,35 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 7,31 – 7,13 (m, 6H, ArH); 6,39 (s, 1H, ArH); 3,82 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163,00; 161,27; 160,40; 147,31; 141,14; 134,38; 130,21; 129,25; 128,51; 128,20; 125,70; 122,86; 119,92; 111,81; 102,21; 40,15; 39,94; 39,73; 39,52; 39,31; 39,10; 38,89; 34,41.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 338,0942; $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$ apskaičiuota 338,0942.

(E)-4-(((4-metoskifenil)imino)metil)-6-fenetilbenzen-1,3-diolis (7e)



Išeiga: 232 mg (67%) žaliai-geltonų kristalų, lyd. t. 149-150 °C.

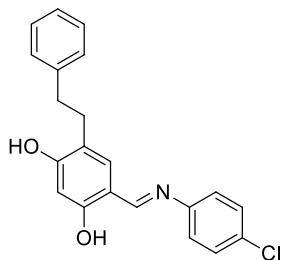
IR: $\nu_{\max}$ = 3306 (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 8,37 (s, 1H, CH=N); 7,37 – 7,30 (m, 3H, ArH); 7,27 (d, J = 8,8 Hz, 2H, ArH); 7,24 (d, J = 7,7 Hz, 3H, ArH); 7,00 (s, 1H, ArH); 6,98 (d, J = 8,7 Hz, 2H, ArH); 6,57 (s, 1H, ArH); 3,88 (s, 3H, OCH_3); 2,99 – 2,84 (m, 4H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 158,80; 158,57; 142,12; 133,94; 128,69; 128,50; 126,05; 121,81; 120,34; 114,84; 112,64; 103,84; 55,69; 36,31; 31,75.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 348,1593; $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ apskaičiuota 348,1594.

(E)-4-(((4-chlorfenil)imino)metil)-6-fenetilbenzen-1,3-diol (7f)



Išeiga: 316 mg (90%) oranžinių kristalų, lyd. t. 132-134 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3186 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 13,05 (s, 1H, OH); 10,39 (s, 1H, OH); 8,73 (s, 1H, CH=N); 7,46 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 7,35 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 7,32 – 7,14 (m, 6H, ArH); 6,39 (s, 1H, ArH); 2,87 – 2,71 (m, 4H, CH₂).

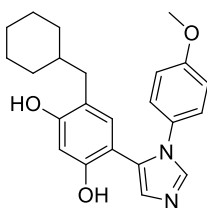
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163,00; 161,10; 160,62; 147,36; 141,91; 133,76; 130,20; 129,28; 128,28; 128,23; 128,21; 125,74; 122,81; 120,12; 111,64; 102,14; 35,42; 31,05.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 352,1099; $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$ apskaičiuota 352,1099.

3.5 4-(1-aril-1H-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil)benzen-1,3-diolų ir 4-(1-aril-1H-imidazol-5-il)-6-(aril)benzen-1,3-diolų sintezė

(Bendra metodika) Atitinkamas iminas (1 ekv., **7a** 0,44 mmol, **7b** 0,40 mmol, **7c** 0,65 mmol, **7d** 0,65 mmol, **7e** 0,44 mmol, **7f** 0,40 mmol) užpilamas 5 ml metanolio, suberiamas toluensulfonilmetilizocianidas (TosMIC, 1,5 ekv.) ir kalio karbonatas (K_2CO_3 , 2 ekv.), reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje (24 val. **7a-b** ir **7e-f**, 6 paras **7c-d**). Susidarę kristalai (**8d**) filtruojami ir plaunami vandens ir izopropanolio mišiniu, džiovinami kambario temperatūroje. Reakcijos mišinys nesusidarius kristalams (**8a-c** ir **8e-f**) ekstrahuojamas EA. Organinė fazė sukonzentruojama rotaciniu garintuvu. Gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuuojama CHCl_3 :MeOH 30:1 mišiniu.

4-(cikloheksilmetil)-6-(1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol-5-il)benzen-1,3-diolis – VT016 (8a)



Išeiga: 94 mg (56%) rudai gelsvų kristalų, lyd. t. 103-104 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3283 (pl., OH) cm^{-1} .

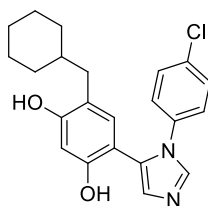
^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 9,13 (s, 1H, OH); 9,03 (s, 1H, OH); 7,72 (s, 1H, ArH); 7,06 (d, J

= 8,4 Hz, 2H, ArH); 6,90 (s, 1H, ArH); 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH); 6,40 (s, 1H, ArH); 6,28 (s, 1H, ArH); 3,69 (s, 3H, OCH₃); 2,10 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH₂); 1,59 – 1,47 (m, 3H, c-Hex); 1,41 – 1,31 (m, 2H, c-Hex); 1,29 – 1,17 (m, 1H, c-Hex); 1,05 – 0,94 (m, 3H, c-Hex) 0,73 – 0,58 (m, 2H, c-Hex).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 158,75; 156,33; 154,55; 137,72; 133,60; 130,60; 130,11; 128,63; 126,55; 117,88; 114,61; 107,17; 103,02; 55,70; 37,90; 37,14; 33,07; 26,68; 26,24.

HRMS (ESI): [M+H]⁺; rasta 379,2016; C₂₃H₂₆N₂O₃ apskaičiuota 379,2016.

4-(1-(4-chlorfenil)-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis – VT020 (8b)



Išga: 63 mg (48%) rudų kristalų, lyd. t. 240-241 °C.

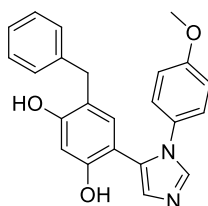
IR: $\nu_{\text{max}} = 3283$ (pl., OH) cm⁻¹.

¹H BMR (DMSO-d₆) δ : 9,25 (s, 1H, OH); 9,13 (s, 1H, OH); 7,90 (s, 1H, ArH); 7,45 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH); 7,20 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH); 6,98 (s, 1H, ArH), 6,47 (s, 1H, ArH), 6,33 (s, 1H, ArH); 2,16 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH₂); 1,66 – 1,51 (m, 3H, c-Hex); 1,46 – 1,36 (m, 2H, c-Hex); 1,30 – 1,22 (m, 1H, CH c-Hex); 1,11 – 1,02 (m, 3H, c-Hex); 0,78 – 0,65 (m, 2H, c-Hex).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 156,10; 153,90; 137,26; 136,08; 132,99; 131,70; 129,51; 129,07; 128,52; 126,20; 117,65; 106,26; 102,58; 37,41; 36,65; 32,59; 26,18; 25,77.

HRMS (ESI): [M+H]⁺; rasta 383,1520; C₂₂H₂₃ClN₂O₂ apskaičiuota 383,1521.

4-benzil-6-(1-(4-metoksifenil)-1*H*-imidazol-5-il)benzen-1,3-diolis - VT023 (8c)



Išga: 50 mg (21%) rudai gelsvų kristalų, lyd. t. 117-118 °C.

IR: $\nu_{\text{max}} = 3283$ (OH) cm⁻¹.

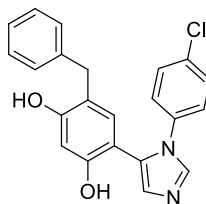
¹H BMR (DMSO-d₆) δ : 9,40 (s, 1H, OH); 9,16 (s, 1H, OH); 7,75 (s, 1H, ArH); 7,24 – 7,15 (m, 2H, ArH); 7,14 – 7,04 (m, 3H, ArH); 6,99 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, ArH); 6,95 – 6,87 (m, 3H, ArH); 6,60 (s, 1H, ArH); 6,34 (s, 1H, ArH); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,62 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 158,20; 155,72; 154,52; 141,38; 137,33; 132,82; 130,17; 129,57; 128,44; 128,29; 127,94; 125,86; 125,40; 117,93; 114,19; 107,21; 102,55; 55,32;

34,57.

HRMS (ESI): $[M+H]^+$; rasta 373,1547; $C_{23}H_{20}N_2O_3$ apskaičiuota 373,1547.

4-benzil-6-(1-(4-chlorfenil)-1H-imidazol-5-il)benzen-1,3-diolis – VT024.G (8d)



Išėiga: 63 mg (39%) rudai gelsvų kristalų, lyd. t. 133-134 °C.

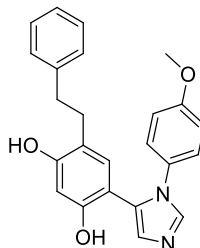
IR: $\nu_{\max}$ = 3291 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 9,45 (s, 1H, OH); 9,19 (s, 1H, OH); 7,87 (s, 1H, ArH); 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 2H, ArH); 7,24 – 7,09 (m, 5H, ArH); 7,03 (d, J = 7,4 Hz, 2H, ArH); 6,95 (s, 1H, ArH); 6,64 (s, 1H, ArH); 6,35 (s, 1H, ArH); 3,66 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 156,49; 154,79; 141,83; 137,77; 136,66; 133,14; 132,07; 129,99; 129,56; 129,15; 128,92; 128,47; 126,38; 125,91; 118,73; 107,34; 103,10; 35,03.

HRMS (ESI): $[M+H]^+$; rasta 377,1051; $C_{22}H_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$ apskaičiuota 377,1051.

4-(1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol-5-il)-6-fenetilbenzen-1,3-diolis – VT017 (8e)



Išėiga: 60 mg (36%) gelsvų kristalų, lyd. t. 210-211 °C.

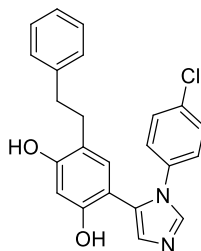
IR: $\nu_{\max}$ = 3259 (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 9,34 (s, 1H, OH); 9,03 (s, 1H, OH); 7,76 (s, 1H, ArH); 7,28 – 7,22 (m, 2H, ArH); 7,18 – 7,11 (m, 3H, ArH); 7,08 (d, J = 8,9 Hz, 2H, ArH); 6,92 (d, J = 8,8 Hz, 2H, ArH); 6,86 (s, 1H, ArH); 6,62 (s, 1H, ArH); 6,29 (s, 1H, ArH); 3,73 (s, 3H, OCH_3); 2,69 – 2,58 (m, 4H CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 158,14; 155,92; 154,09; 142,07; 137,25; 132,30; 130,45; 130,03; 128,31; 128,11; 125,60; 118,12; 114,11; 107,11; 102,44; 55,32; 40,15; 39,94; 39,73; 39,52; 39,31; 39,10; 38,89; 35,65; 30,90.

HRMS (ESI): $[M+H]^+$; rasta 387,1702; $C_{24}H_{22}N_2O_3$ apskaičiuota 387,1703.

4-(1-(4-chlorfenil)-1*H*-imidazol-5-il)-6-fenetilbenzen-1,3-diolis – VT021 (8f)



Išeiga: 75 mg (48%) gelsvų kristalų, lyd. t. 207-208 °C.

IR: $\nu_{\text{max}} = 3310$ (pl., OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 9,41 (s, 1H, OH); 9,04 (s, 1H, OH); 7,88 (s, 1H, ArH); 7,44 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, ArH); 7,28 – 7,22 (m, 2H, ArH); 7,19 – 7,12 (m, 5 H, ArH); 6,87 (s, 1H, ArH); 6,68 (s, 1H, ArH); 6,29 (s, 1H, ArH); 2,75 – 2,62 (m, 4H, CH_2).

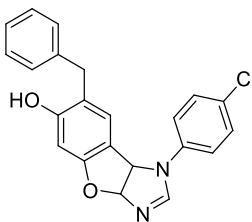
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.28, 153.84, 142.04, 137.21, 136.47, 132.26, 131.43, 130.06, 128.99, 128.43, 128.38, 128.10, 125.61, 125.52, 118.38, 106.75, 102.46, 35.57, 30.97.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 391,1207; $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ apskaičiuota 391,1208.

3.6 7-aril-1-(4-chlorofenil)-3a,8b-dihidro-1*H*-benzofuro[2,3-*d*]imidazol-6-olio išskyrimas

Paskutinėje **8c** junginio sintezės stadijoje susidarė kristalai, kurie buvo filtruojami, plaunami etilacetatu ir džiovinami kambario temperatūroje. Dėl santykinai nemažo jų kiekio buvo manoma, kad tai **8c** junginys. Junginys buvo paruoštas tolimesniems tyrimams su baltymais. Po BMR spektro analizės paaiškėjo, kad susidarę kristalai tai **9c** junginys. **8c** buvo išskirtas iš likusio filtrato.

7-benzil-1-(4-chlorofenil)-3a,8b-dihidro-1*H*-benzofuro[2,3-*d*]imidazol-6-olis (9d) – VT024



Išeiga: 40 mg (11%) baltų kristalų, lyd. t. 177-178 °C.

IR: $\nu_{\text{max}} = 3400$ (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO- d_6) δ : 8,02 (s, 1H, OH); 7,42 – 7,28 (m, 4H, ArH); 7,22 – 7,07 (m, 4H, ArH); 7,02 (d, $J = 7,3$ Hz, 2 H, ArH); 6,87 (s, 1H, ArH); 6,57 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH); 6,28 (s, 1H, ArH); 5,77 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, CH); 3,64 (s, 2H, CH_2).

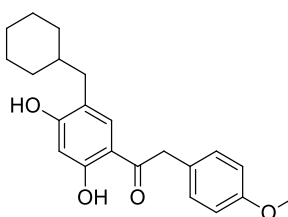
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 158,10; 152,50; 141,46; 136,83; 129,23; 128,45; 127,94; 126,64; 125,94; 125,39; 119,94; 118,33; 105,10; 96,93; 61,20; 34,95.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 377,1050; $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$ apskaičiuota 377,1051.

3.7 1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-feniletan-1-onų sintezė.

(Bendra metodika) 4-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis (1 ekv., **4a**) ir atitinkama karboksirūgštis (1,1 ekv., **10a** 5,5 mmol, **10b** 5,5 mmol) suberiama į kolbutę, įpilami 3 ml BF_3OEt_2 , mišinys maišomas ir kaitinamas alyvos vonelėje 90 °C 2 valandas. Po į atšalusį iki kambario temperatūros mišinį supilamas 60 ml 10% vandeninis NaOAc tirpalas, ir maišomas kambario temperatūroje dar 5 valandas. Reakcijos mišinys ekstrahuojamas etilo acetato ir vandens mišiniu, organinė fazė sukonzentruojama rotacinio garintuvo pagalba. Gauta alyva gryninama kolonėlinės chromatografijos metodu, eliuuojant Tol:EA 30:1 (**11b**) arba 10:1 mišiniu (**11a**).

1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etan-1-onas (**11a**)



Išga: 1,23 g (63 %) gelsvų kristalų, lyd. t. 134-136 °C.

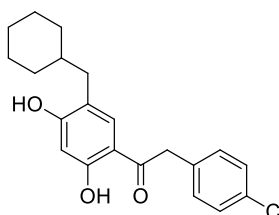
IR: ν_{max} = 3262 (OH); 1600 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 12,51 (s, 1H, OH); 7,51 (s, 1H, ArH); 7,18 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH); 6,87 (d, J = 8,6 Hz, 2H, ArH); 6,31 (s, 1H, ArH); 5,77 (pl. s, 1H, OH); 4,15 (s, 2H, CH_2); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 2,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2); 1,74 – 1,59 (m, 5 H, CH_2 c-Hex); 1,52 – 1,42 (m, 1H, CH c-Hex); 1,22 – 1,12 (m, 3H, CH_2 c-Hex); 0,97 – 0,86 (m, 2H, CH_2 c-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 202,61; 163,86; 161,14; 158,77; 133,54; 131,00; 130,50; 126,71; 119,35; 114,36; 113,25; 103,55; 55,41; 44,35; 38,30; 37,39; 33,31; 26,65; 26,40.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 355,1902; $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_4$ apskaičiuota 355,1904.

2-(4-chlorfenil)-1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)etan-1-onas (**11b**)



Išeiga: 0,53 g (29 %) geltonų kristalų, lyd. t. 178-180 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3275 (OH); 1628 (C=O) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 12,37 (s, 1H, OH); 7,46 (s, 1H, ArH); 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 2H, ArH); 7,20 (d, J = 8,5 Hz, 2H, ArH); 6,32 (s, 1H, ArH); 5,52 (s, 1H, OH); 4,18 (s, 2H, CH_2); 2,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2); 1,75 – 1,66 (m, 5H, CH_2 c-Hex); 1,52 – 1,41 (m, 1H, CH c-Hex); 1,21 – 1,11 (m, 3H, CH_2 c-Hex); 0,94 – 0,88 (m, 2H, CH_2 c-Hex).

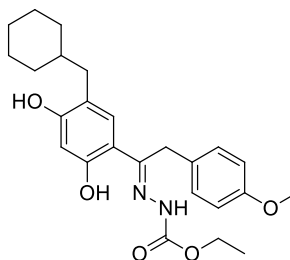
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 201,54; 163,94; 161,17; 133,34; 133,20; 133,15; 130,88; 129,02; 119,42; 113,23; 103,67; 44,48; 38,34; 37,41; 33,32; 26,63; 26,39.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 359,1392; $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClO}_3$ apskaičiuota 359,1408.

3.8 Etil-*E*-2-(1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-feniletilden)hidrazin-1-karboksilatų sintezė

(*Bendra metodika*) Atitinkamas ketonas (1 ekv., **11a** 2,26 mmol, **11b** 1,3 mmol) ir etilkarbazatas (1,6 mmol) suberiamas į kolbutę, įpilama 10 ml EtOH ir 5 lašai ledinės acto rūgšties. Mišinys virinamas 20 valandų. Susidarę kristalai filtruojami ir plaunami šaltu izopropanoliu. Rotaciniu garintuvu sukonzentruotas filtratas perkristalinamas iš izopropanolio. Gauti kristalai džiovinami kambario temperatūroje.

Etil-*E*-2-(1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)-2-(4-metoksifenil)etildien)hidrazin-1-karboksilatas (12a)



Išeiga: 0,58 g (58 %) baltų kristalų, lyd. t. 175-176 °C.

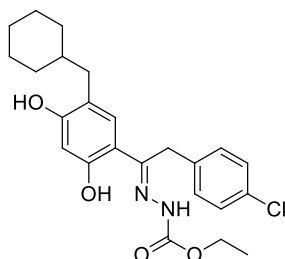
IR: $\nu_{\max}$ = 3556 (HN); 3218 (OH); 1700 (C=O); 1248 (C=N) cm^{-1} .

^1H BMR (DMSO-d_6) δ : 12,77 (s, 1H, OH); 10,88 (s, 1H, OH); 9,53 (s, 1H, NH); 7,04 – 7,00 (m, 3H, ArH); 6,79 (d, J = 8,5 Hz, 2H, ArH); 6,21 (s, 1H, ArH); 4,15 (k, J = 7,1 Hz, 2H, OCH_2); 4,10 (s, 2H, CH_2); 3,63 (s, 3H, OCH_3); 2,18 (d, J = 6,9 Hz, 2H, CH_2); 1,54 – 1,47 (m, 3H, c-Hex); 1,40 – 1,31 (m, 2H, c-Hex); 1,25 – 1,19 (m, 3H, CH_3); 1,05 – 0,66 (m, 4H, c-Hex); 0,75 – 0,64 (m, 2H, c-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ : 158,34; 157,76; 157,39; 154,19; 135,36; 130,79; 129,19; 128,28; 117,53; 113,96; 109,99; 102,95; 62,06; 61,13; 54,98; 37,40; 36,71; 32,60; 26,20; 25,76; 14,50.

HRMS (ESI): $[M+H]^+$; rasta 441,2384; $C_{25}H_{32}N_2O_5$ apskaičiuota 441,2384.

Etil-*E*-2-(2-(4-chlorfenil)-1-(5-(cikloheksilmetil)-2,4-dihidroksifenil)etildien)hidrazin-1-karboksilatas (12b)



Išėiga: 0,26 g (46 %) baltų kristalų, lyd. t. 119-200 °C.

IR: $\nu_{\max}$ = 3520 (HN); 3224 (OH); 1710 (C=O); 1291 (C=N) cm^{-1} .

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12,70 (s, 1H, OH); 10,94 (s, 1H, OH); 9,56 (s, 1H, NH); 7,29 (d, J = 8,1 Hz, 2H, ArH); 7,11 (d, J = 8,1 Hz, 2H, ArH); 6,94 (s, 1H, ArH); 6,22 (s, 1H, ArH); 4,20 – 4,10 (m, 2H, OCH_2); 2,16 (d, J = 6,6 Hz, 2H, CH_2); 1,58 – 1,42 (m, 4H, *c*-Hex); 1,32 – 1,27 (m, 2H, *c*-Hex); 1,22 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH_3); 1,03 – 0,95 (m, 3H, *c*-Hex); 0,71 – 0,63 (m, 2H, *c*-Hex).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 158,29; 157,46; 154,17; 143,44; 135,66; 130,91; 130,75; 129,97; 128,48; 117,58; 109,75; 102,99; 61,15; 60,11; 37,34; 36,64; 32,54; 26,18; 25,72; 14,48.

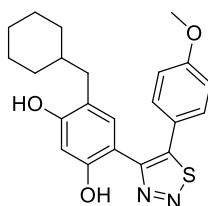
HRMS (ESI): $[M+H]^+$; rasta 445,1888; $C_{24}H_{29}\text{ClN}_2\text{O}_4$ apskaičiuota 445,1889.

3.9 4-(cikloheksilmetil)-6-(5-fenil-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolių sintezė

(*Bendra metodika*) Į kolbutę su 5 ml ledo vonioje atšaldytu tionilo chloridu (SOCl_2) suberiamas atitinkamas karboksilatas (1 ekv., **12a** 0,7 mmol, **12b** 0,5 mmol) ir maišoma 1 val. Po to ledo vonia pakeičiama alyvos vonia, mišinys kaitinamas 65 °C dvi valandas. Reakcijai pasibaigus, SOCl_2 nugarinamas traukos spintoje sumažintame slėgyje, gauta alyva ištirpinama 3 ml EtOH, įlašinami 3 lašai koncentruotos HCl rūgšties ir reakcijos mišinys virinamas dar 4 valandas. Tada reakcijos mišinys sukonzentruojamas rotacinio garintuvo pagalba, gauti **13a** kristalai filtruojami ir plaunami toluenu, filtratas nugarinamas ir perkristalinamas, **13b** kristalai atskiriami kolonėlinės chromatografijos metodo pagalba, eliuuojant Tol:EA 50:1 mišiniu.

4-(cikloheksilmetil)-6-(5-(4-metoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)benzen-1,3-diolis – VT029

(13a)



Išėiga: 119 mg (46%) gelsvų kristalų, lyd. t. 180-182 °C.

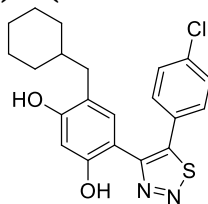
IR: ν_{max} = 3292 (OH); cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 7,36 (d, J = 8,2 Hz, 2H, ArH); 6,98 (d, J = 8,3 Hz, 2H, ArH); 6,85 (s, 1H, ArH); 6,54 (s, 1H, ArH); 5,1 (s, 1H, OH); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 2,16 (d, J = 7,1 Hz, 2H, CH_2); 1,69 – 1,58 (m, 3H, $c\text{-Hex}$); 1,57 – 1,48 (m, 2H, $c\text{-Hex}$); 1,32 – 1,21 (m, 1H, $c\text{-Hex}$); 1,13 – 1,06 (m, 3H, $c\text{-Hex}$); 0,80 – 0,64 (m, 2 H, $c\text{-Hex}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 160,92; 155,83; 155,71; 155,54; 149,72; 130,73; 130,71; 119,58; 118,84; 114,90; 108,27; 104,29; 55,43; 38,04; 37,06; 33,23; 26,52; 26,23.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 397,1580; $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ apskaičiuota 397,1580.

4-(5-(4-chlorfenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis – VT030 (13b)



Išėiga: 146 mg (72 %) gelsvų kristalų, lyd. t. 203-204 °C.

IR: ν_{max} = 3288 (OH) cm^{-1} .

^1H BMR (CDCl_3) δ : 9,66 (s, 1H, OH); 7,46 (d, J = 8,2 Hz, 2H, ArH); 7,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H, ArH); 6,71 (s, 1H, ArH); 6,54 (s, 1H, ArH); 4,90 (s, 1H, OH); 2,16 (d, J = 7,0 Hz, 2H, CH_2); 1,72 – 1,57 (m, 3H, $c\text{-Hex}$); 1,54 – 1,46 (m, 2H, $c\text{-Hex}$); 1,23 – 1,19 (m, 1H, $c\text{-Hex}$); 1,13 – 1,06 (m, 3H, $c\text{-Hex}$); 0,80 – 0,64 (m, 2H, $c\text{-Hex}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 156,24; 156,05; 155,79; 147,98; 136,24; 130,84; 130,72; 129,77; 126,42; 119,05; 107,84; 104,44; 38,08; 37,01; 33,21; 26,47; 26,20.

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$; rasta 401,1085; $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ apskaičiuota 401,1085.

3.10 Fluorescentinio poslinkio tyrimų rezultatai

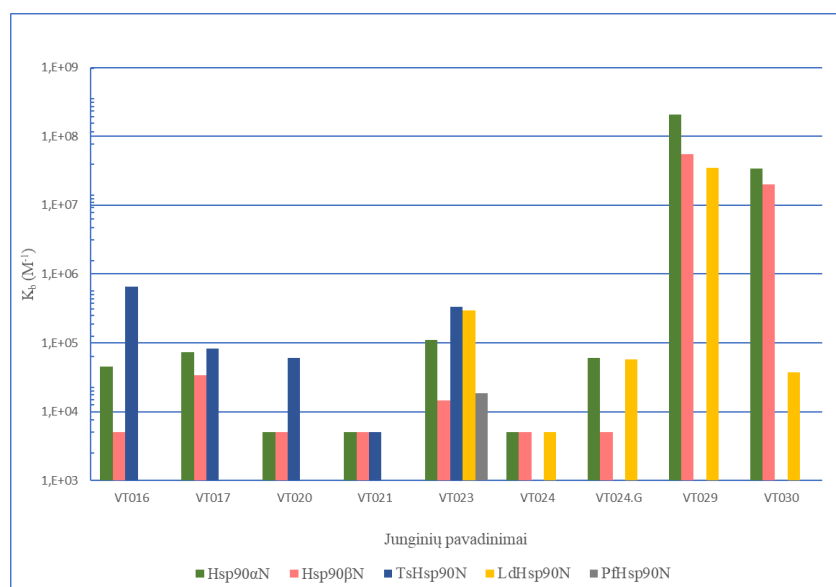
Pirmaisiais šiuo metodu ištirtais junginiais buvo VT016 (**8a**), VT017 (**8e**), VT020 (**8b**) ir VT021 (**8f**). Jie buvo tiriami su Hsp90 α N-galo domenu (Hsp90 α N), Hsp90 β N-galo domenu (Hsp90 β N), bei *Trichinella spiralis* Hsp90 N-galo domenu (TsHsp90N) (5 lentelė). VT021

junginio jungimosi konstantos K_b neviršijo 5000 M^{-1} (žemiausia išmatuojama vertė). VT017 junginio gautos K_b vertės skirtingoms žmogaus baltymo izoformoms dvigubai skiriasi, TsHsp90N K_b panašaus dydžio kaip Hsp90 α N K_b . VT020 junginio K_b vertės Hsp90 α N ir Hsp90 β N neviršijo 5000 M^{-1} , tačiau šis junginys pasižymėjo selektyvumu TsHsp90N baltymui (~12 kartų aukštesnė K_b vertė). VT016 junginio Hsp90 α N K_b vertė ~9 kartus aukštesnė už Hsp90 β N vertę. Šis junginys taip pat pasižymėjo aukščiausia K_b vertė tyrimuose su TsHsp90N iš keturių aptartų junginių. Dėl selektyvumo, kuriuo pasižymėjo cikloheksano fragmentą turintys junginiai (VT016 ir VT020), buvo nuspręsta susintetinti du analoginius junginius, kurių imidazolo žiedas pakeistas į tiadiazolo žiedą.

Antroje tyrimų dalyje dalyvavo anksčiau netirti junginiai su imidazolo žiedu – VT023 (8c) ir VT024.G (8d), galutinio junginio sintezės metu susidariusi priemaiša VT024 (9d) ir du junginiai su tiadiazolo žiedu – VT029 (13a) ir VT030 (13b). Junginiai buvo tiriami su Hsp90 α N, Hsp90 β N, ir *Leishmania donovani* Hsp90N, VT023 buvo papildomai tiriamas su *Plasmodium falciparum* Hsp90N (PfHsp90N) (5 lentelė). VT023 junginio Hsp90 α N K_b vertė ~7,5 kartų aukštesnė už Hsp90 β N vertę, LdHsp90N ir TsHsp90N K_b vertės panašios, apie 300000 M^{-1} , PfHsp90N K_b artimos Hsp90 β N vertėms. Visos VT024 junginio K_b vertės siekė 5000 M^{-1} . VT024.G junginio Hsp90 α N K_b vertė ~12 kartų aukštesnė už Hsp90 β N, LdHsp90N K_b vertė panaši į Hsp90 α N K_b vertę ~ 60000 M^{-1} . Junginiai su tiadiazolo žiedu pasižymėjo aukštesnėmis K_b vertėmis (išimtis VT030 LdHsp90N). VT029 junginio Hsp90 α N K_b vertė ~3,7 kartų aukštesnė palyginus su Hsp90 β N ir ~6 kartus aukštesnė palyginus su LdHsp90N. VT030 junginio Hsp90 α N K_b vertė ~1,7 karto aukštesnė už Hsp90 α N ir virš 900 kartų aukštesnė už LdHsp90 (24 pav.).

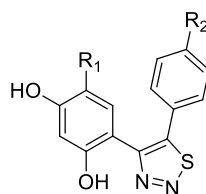
5 lentelė. Susintetintų junginių jungimosi su baltymais K_b vertės ir apskaičiuotos K_d vertės.

	Hsp90 α N		Hsp90 β N		TsHsp90N		LdHsp90N		PfHsp90N	
	$K_b (\text{M}^{-1})$	$K_d (\text{M})$	$K_b (\text{M}^{-1})$	$K_d (\text{M})$	$K_b (\text{M}^{-1})$	$K_d (\text{M})$	$K_b (\text{M}^{-1})$	$K_d (\text{M})$	$K_b (\text{M}^{-1})$	$K_d (\text{M})$
VT016	4,53E+04	2,21E-05	5,00E+03	2,00E-04	6,50E+05	1,54E-06	-	-	-	-
VT017	7,31E+04	1,37E-05	3,40E+04	2,94E-05	8,26E+04	1,21E-05	-	-	-	-
VT020	5,00E+03	2,00E-04	5,00E+03	2,00E-04	6,05E+04	1,65E-05	-	-	-	-
VT021	5,00E+03	2,00E-04	5,00E+03	2,00E-04	5,00E+03	2,00E-04	-	-	-	-
VT023	1,10E+05	9,09E-06	1,46E+04	6,85E-05	3,32E+05	3,01E-06	2,93E+05	3,41E-06	1,84E+04	5,43E-05
VT024	5,00E+03	2,00E-04	5,00E+03	2,00E-04	-	-	5,00E+03	2,00E-04	-	-
VT024.G	6,04E+04	1,65E-05	5,00E+03	2,00E-04	-	-	5,70E+04	1,75E-05	-	-
VT029	2,08E+08	4,80E-09	5,55E+07	1,80E-08	-	-	3,51E+07	2,85E-08	-	-
VT030	3,43E+07	2,91E-08	2,01E+07	4,98E-08	-	-	3,74E+04	2,67E-05	-	-



24 pav. Grafiškai atvaizduotos junginių K_b vertės.

Dažniau naudojama už jungimosi konstantą vertė yra disociacijos konstanta K_d : $K_b = 1/K_d$. Naujai kuriamų slopiklių K_d vertė turi būti žymiai žemesnė už ADP K_d ($\sim 10 \mu\text{M}$), tam kad esant mažai junginio koncentracijai (palyginus su ATP ir ADP koncentracijomis) ląstelėje kaip įmanoma didesnė junginio dalis būtų prisijungus prie baltymo. Devynios iš dvidešimt devynių K_d verčių (5 lentelė) tenkina šį reikalavimą. Žemiausiomis K_d vertėmis pasižymi VT029 (tyrimuose su Hsp90αN, Hsp90βN ir LdHsp90) ir VT030 (tyrimuose su Hsp90αN, Hsp90βN ir LdHsp90). Junginio HPIT-2, besiskiriančio nuo VT029 izopropilo grupė cikloheksilmetil grupės vietoje $K_d = 7,7 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ (Hsp90αN) ~ 6 kartus žemesnė už naujai susintetinto junginio K_d . Junginio HPIT-4, besiskiriančio nuo VT030 izopropilo grupė cikloheksilmetil grupės vietoje $K_d = 9,3 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ (Hsp90αN) ~ 31 kartą žemesnė už naujai susintetinto junginio K_d [3]. Junginio ICPD 26, besiskiriančio nuo VT029 chloro grupė cikloheksilmetil grupės vietoje $K_d = 4,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ $\sim 1,2$ karto aukštesnė už naujai susintetinto junginio (25 pav.) [50].



HPIT-2, $R_1 = -\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = -\text{OCH}_3$
 HPIT-4 $R_1 = -\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = -\text{Cl}$
 ICPD 26, $R_1 = -\text{Cl}$; $R_2 = -\text{OCH}_3$

25 pav. Kitų tyrėjų susintetinti slopikliai.

4 IŠVADOS

1. Atlikta literatūros šaltiniuose aprašomų junginių, pasižyminčių Hsp90 slopinančiu aktyvumu analizė. Analizuojami junginiai buvo skirstomi pagal jų veikimo mechanizmą į N-galo, vidurio, C-galo domeno ar kitais būtais slopinančius Hsp90 aktyvumą. Atkreiptas dėmesys į junginių struktūrinės savybes. Pagrindine priežastimi, dėl kurios Hsp90 slopikliai nėra vartojami klinikiniam gydymui žmonių, apie šaperonų funkcionavimą trūkumas. Slopiklių selektyvumo kriterijų nustatymas skirtingoms Hsp90 izoformoms leistų geriau suprasti šių baltymų svarbą sveikose ir pakitusiose ląstelėse, bei galėtų sumažinti nepageidaujamų reiškinių dažnį, dėl kurių Hsp90 inhibitoriai nenaudojami klinikiniam gydymui.
2. Susintetinti dvidešimt aštuoni junginiai, dvidešimt vienas iš jų – visiškai nauji junginiai, iki šiol literatūroje neaprašyti. Du junginiai – **13a** ir **13b** nepriklauso 4-(1-aril-1*H*-imidazol-5-il)-6-(cikloalkil)benzen-1,3-diolams. Tikslinių junginių išeigos buvo 21-72%. Aukščiausia iš jų – 72% išeiga susintetintas 4-(5-(4-chlorfenil)-1,2,3-tiadiazol-4-il)-6-(cikloheksilmetil)benzen-1,3-diolis.
Vykdant Van Leuseno imidazolų sintezę susidarė dar ir literatūroje neaprašytas šalutinis produktas – 7-benzil-1-(4-chlorofenil)-*H*-benzofuro[2,3-*d*]imidazol-6-olis (**9b**, kurio išeiga 11%.
3. Susintetinti junginiai buvo ištirti su Hsp90 šeimos baltymų N-galo domenais. Visi susintetinti junginiai pasižymėjo aukštesnėmis arba tokiomis pačiomis K_d vertėmis Hsp90 α N palyginus su Hsp90 β N. Rezorcinolio pagrindu kuriami inhibitoriai pasižymi aukštesniu selektyvumu Hsp90 α izoformos N-galo domenui palyginus su Hsp90 β izoformos N-galo domenu. Junginiai su tiadiazolo žiedu pasižymi žemesnėmis disociacijos konstantos vertėmis palyginus su analogiškais junginiais su imidazolo žiedu. Junginiai su metoksi grupe pasižymi žemesnėmis disociacijos konstantos vertėmis palyginus su analogiškais junginiais su chloru. Iš imidazolo žiedą turinčių junginių žemiausiomis K_d vertėmis pasižymėjo: Hsp90 α N VT017 ir VT016, Hsp90 β N VT017, iš tiadiazolo žiedą turinčių junginių, žemiausiomis K_d vertėmis pasižymėjo VT029. Palyginus gautas VT029 K_b vertes su literatūroje prieinamais šaltiniais galima daryti išvadą kad cikloheksilmetil grupė pagerina junginio K_d lyginant su chloru toje pačioje padėtyje, tačiau pablogina šią vertę lyginant su izopropilo grupe. Naujai susintetintų junginių su tiadiazolo žiedu K_d vertės panašaus dydžio kaip ir kitų tyrėjų sintetintų junginių K_d vertės.

DARBO TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Paulina Kaziukonytė, Kamilė Venskūnaitė, Tomas Venslauskas, Algirdas Brukštus; Synthesis of 1,5-disubstituted imidazoles as potential Hsp90 inhibitors. Tarptautinės studentų mokslinės konferencijos „Open Readings 2022“ pranešimų medžiaga, 2022, p. 404.
2. Tomas Venslauskas, Paulina Kaziukonytė, Algirdas Brukštus; Penkianario žiedo įtakos tyrimas rezorcinolio pagrindu kuriamų Hsp90 inhibitorių jungimosi savybėms. Studentų mokslinė konferencija „Chemija ir cheminė technologija 2022“ pranešimų medžiaga, 2022.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Birbo B, Madu EE, Madu CO, Jain A, Lu Y. Role of HSP90 in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 m. spalio 1 d.;22(19):10317.
2. Żychowska M, Półrola P, Chruściński G, Zielińska J, Góral-Półrola J. Effects of sauna bathing on stress-related genes expression in athletes and non-athletes. *Ann Agric Environ Med.* 2017 m.;24(1):104–7.
3. Kazlauskas E, Bruk A, Petrikas H, Petrikait V, Čikotienė L. thiadiazole Scaffold : Synthesis , Affinity and Effect on Cancer Cells. 2017 m.;1–11.
4. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat shock proteins as immunomodulants. T. 23, *Molecules.* MDPI AG; 2018.
5. Lund PA, John ER. The chaperone function: Meanings and myths. *Biol Extracell Mol Chaperones.* 2008 m.;291:23–44.
6. Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. T. 9, *Cells.* NLM (Medline); 2019. p. 60.
7. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005 m.;5(10):761–72.
8. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009 m.;14(1):105–11.
9. Tang H, Chen Y, Liu X, Wang S, Lv Y, Wu D, et al. Downregulation of HSP60 disrupts mitochondrial proteostasis to promote tumorigenesis and progression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016 m.;7(25):38822–34.
10. Jegu G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2013 m.;332(2):275–85.
11. Li L, Chen NN, You QD, Xu XL. An updated patent review of anticancer Hsp90 inhibitors (2013-present). 2020 m.;31(1):67–80.
12. Barrott JJ, Haystead TAJ. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J.* 2013 m.;280(6):1381–96.

13. Biebl MM, Buchner J. Structure, function, and regulation of the hsp90 machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 m.;11(9).
14. UniProt [Prieiga per internetą].
15. Zuehlke AD, Moses MA, Neckers L. Heat shock protein 90: Its inhibition and function T. 373, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* Royal Society Publishing; 2018.
16. Koren J, Blagg BSJ. The Right Tool for the Job: An Overview of Hsp90 Inhibitors. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer; 2020. p. 135–46.
17. Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease T. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2018.
18. Huck JD, Que NLS, Sharma S, Taldone T, Chiosis G, Gewirth DT. Structures of Hsp90 α and Hsp90 β bound to a purine-scaffold inhibitor reveal an exploitable residue for drug selectivity. 2019 m.;1–9.
19. Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2012 m.;1823(3):774–87.
20. Serapian SA, Sanchez-Martín C, Moroni E, Rasola A, Colombo G. Targeting the mitochondrial chaperone TRAP1: strategies and therapeutic perspectives. *Trends Pharmacol Sci.* 2021 m. liepos 1 d.;42(7):566–76.
21. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 m. birželio 1 d.;18(6):345–60.
22. Li L, Wang L, You QD, Xu XL. Heat Shock Protein 90 Inhibitors: An Update on Achievements, Challenges, and Future Directions. *J Med Chem.* 2020 m. kovo 12 d.;63(5):1798–822.
23. Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 2004 m.;562(1–3):11–5.
24. Sims JD, McCreedy J, Jay DG. Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90 α Assist in Matrix Metalloproteinase-2 Activation and Breast Cancer Cell Migration and

- Invasion. PLoS One. 2011 m.;6(4):18848.
25. Wysocka A, Gizinski S, Lechowski R. Metaloproteinazy macierzy - ich struktura oraz znaczenie. *Życie Weter.* 2014 m.;89(03).
 26. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 m.;38(3):226–56.
 27. Mishra SJ, Liu W, Beebe K, Banerjee M, Kent CN, Munthali V, et al. The Development of Hsp90 β -Selective Inhibitors to Overcome Detriments Associated with pan-Hsp90 Inhibition. 2021 m.;
 28. Lee C, Park HK, Jeong H, Lim J, Lee AJ, Cheon KY, et al. Development of a Mitochondria-Targeted Hsp90 Inhibitor Based on the Crystal Structures of Human TRAP1. *J Am Chem Soc.* 2015 m.;137(13):4358–67.
 29. Sanchez J, Carter TR, Cohen MS, Blagg BS. Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone HHS Public Access. *Curr Cancer Drug Targets.* 2020 m.;20(4):253–70.
 30. Gorska M, Popowska U, Sielicka-Dudzin A, Kuban-Jankowska A, Sawczuk W, Knap N, et al. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front Biosci.* 2012 m.;17:2269–77.
 31. Gorska M, Popowska U, Sielicka-Dudzin A, Kuban-Jankowska A, Sawczuk W, Knap N, et al. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front Biosci (Landmark Ed.* 2012 m.;17:2269–77.
 32. Home - ClinicalTrials.gov [Prieiga per internetą].
 33. Samuni Y, Ishii H, Hyodo F, Samuni U, Krishna MC, Goldstein S, et al. Reactive oxygen species mediate hepatotoxicity induced by the Hsp90 inhibitor geldanamycin and its analogs. *Free Radic Biol Med.* 2010 m.;48(11):1559–63.
 34. Hanson BE, Vesole DH. Retaspimycin hydrochloride (IPI-504): A novel heat shock protein inhibitor as an anticancer agent. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 m.;18(9):1375–83.
 35. Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone: Current Status. *Adv Cancer Res.* 2006 m.;95(06):323–48.
 36. Khandelwal A, Kent CN, Balch M, Peng S, Mishra SJ, Deng J, et al. Structure-guided design of an Hsp90 β N-terminal isoform-selective inhibitor. *Nat Commun.* 2018 m.

gruodžio 1 d.;9(1).

37. Biamonte MA, Van De Water R, Arndt JW, Scannevin RH, Perret D, Lee WC. Heat Shock Protein 90: Inhibitors in Clinical Trials. *J Med Chem*. 2009 m.;53(1):3–17.
38. Yim KH, Prince TL, Qu S, Bai F, Jennings PA, Onuchic JN, et al. Gambogic acid identifies an isoform-specific druggable pocket in the middle domain of Hsp90 β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 m.;113(33):E4801–9.
39. Mak OW, Chand R, Reynisson J, Leung IKH. Identification of Isoform-Selective Ligands for the Middle Domain of Heat Shock Protein 90 (Hsp90). *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 5333. 2019 m.;20(21):5333.
40. Donnelly A, Blagg B. Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide- binding Pocket. *Curr Med Chem*. 2008 m.;15(26):2702–17.
41. Garg G, Khandelwal A, Blagg BSJ. Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. 1-asis leid. T. 129, *Advances in Cancer Research*. Elsevier Inc.; 2016. 51–88 p.
42. Lu TM, Kuo DH, Ko HH, Ng LT. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Deoxybenzoins on Relaxing Effects of Porcine Coronary Artery. *J Agric Food Chem*. 2010 m.;58:10027–32.
43. Shimizu K, Kondo R, Sakai K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4- substituted resorcinols: Structure-activity investigations. *Planta Med*. 2000 m. gruodžio 31 d.;66(1):11–5.
44. Tang XY, Shi M. Vilsmeier-Haack reaction of 1-cyclopropyl-2-arylethanones. *J Org Chem*. 2008 m.;73(21):8317–20.
45. Chen D, Shen A, Li J, Shi F, Chen W, Ren J, et al. Discovery of potent N-(isoxazol-5-yl)amides as HSP90 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2014 m.;87:765–81.
46. Gracias V, Gasiecki AF, Djuric SW. Synthesis of Fused Bicyclic Imidazoles by Sequential Van Leusen/Ring-Closing Metathesis Reactions. *ChemInform*. 2005 m. lapkričio 29 d.;36(48).
47. Cikotiene I, Kazlauskas E, Matulienė J, Michailovienė V, Torresan J, Jachno J, et al. 5-Aryl-4-(5-substituted-2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90

- chaperone. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2009 m.;19(4):1089–92.
48. Kazlauskas E. Aryl-dihydroxyphenyl-thiadiadiazole binding to recombinant human Hsp90 [daktaro disertacija]. Vilnius [LT]: Vilniaus Universitetas; 2016;
 49. Reaxys [Prieiga per internetą].
 50. Daunoraitė D. Hsp90, kaip antiparazitinių slopiklių taikinio, termodinaminiai ir kristalografiniai tyrimai [magistro baigiamasis darbas]. Vilnius [LT]: Vilniaus Universitetas 2020;