

Aryyliamidien ja vastaavien yhdisteiden bioaktiiviset ominaisuudet

Milla Mattila



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO
UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ

LuK-tutkielma

Kemian laitos

Rakenne- ja synteesikemia

26.2.2020

Tiivistelmä

Amidit ovat yleisiä ja tärkeitä yhdisteitä biologisissa systeemeissä. Erityisesti aryyl- ja heteroaryyliamideilla on havaittu monenlaisia bioaktiivisia ominaisuuksia, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi kipulääkkeenä, kasvitieteessä ja syöpähoidoissa. Ne ovatkin tärkeitä synteettisiä ja luonnossa esiintyviä lääkeaineita, ja siksi kiinnostavia lääketieteellisessä ja orgaanisessa synteetitutkimuksessa.

Aryyliamideilla on useita syöpää torjuvia ominaisuuksia, joista merkittävin on erilaisten proteiinien ja entsyymien inhibointi. Useat aryylamidit toimivat tyrosiinikinaasi tai topoisomeraasi-inhibiittoreina, mutta myös muiden reseptoreihin ja biokemiallisiin mekanismeihin vaikuttavia yhdisteitä on löydetty. Eräs aryylamidien etu on niiden selektiivisyys, usealla yhdisteillä havaittiin hyvin tarkasti kohdistettuja vaikutuksia haluttuun solukkoon, mikä vähentää niiden haittavaikutuksia lääkeaineina.

Biologisessa ympäristössä vaikuttavilta yhdisteiltä vaaditaan tarkkaa rakennetta. Lääkeaine-amideille tyypillisiä ominaisuuksia ovat heterosykliset rengasrakenteet ja pysyvä kolmiulotteinen rakenne. Yleisiä heteroatomeja yhdisteissä ovat typen ja hapen lisäksi rikki, fluori ja kloori. Erityisesti entsyymeihin tai niiden reseptoreihin sitoutuville lääkeaineille on tärkeää, että ne pystyvät sitoutumaan juuri oikeaan tietynlaiseen sitoutumiskohtaan halutun lopputuloksen aikaansaamiseksi.

Esipuhe

Tutkielman aiheeksi valittiin aryyli- ja heteroaryyliamidien bioaktiiviset ominaisuudet. Tutkielman pääpainona olivat heteroaryyliamidit, mutta siinä sivuttiin myös muita rakenteeltaan samankaltaisia yhdisteitä. Aihetta rajattiin tarkemmin käsittelemään lääketieteellistä käyttöä, erityisesti syöpähoidoissa. Tutkielmaan liittyvä tutkimusprojekti tehtiin heteroaryyliamidien synteesioptimoinnista. Tutkielman kirjallisuutena on pääasiassa käytetty Google Scholar-hakupalvelun avulla löydettyjä verkkojulkaisuja. Lisäksi lähdemateriaalin etsimiseen on käytetty Web of Science -tietokantaa.

Tutkielma kirjoitettiin osana luonnontieteen kandidaatin tutkielmaa Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen rakenne- ja synteesikemian osastolla ja se suoritettiin vuosien 2017-2020 aikana. Projektin ja tutkielman ohjaajana toimi Juhani Huuskonen.

Tähän loppuun lausuisin vielä kiitokset ohjaajalleni, joka kaikkien kuluneiden vuosien jälkeen jaksoi avustaa projektini loppuun. Iso käsi myös hermoromahduksiani kestäneille ystäville ja kaikille niille, jotka kuuntelivat ja puhuivat minulle järkeä. Teidän ansiostanne sain vihdoin napattua itseäni niskavilloista ja kirjottiin tämänkin mörön pois päiväjärjestyksestä.

Milla Mattila

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Lyhenteet ja vierasperäiset sanat	v
1 Johdanto	1
2 Aryyliamideilla havaittuja bioaktiivisia ominaisuuksia	2
2.1 Monilääkeresistenssin torjunta	2
2.2 Solunsalpaus	2
2.3 Entsyymi-inhibiittorit	3
2.3.1 Tyrosiinikinaasi.....	3
2.3.2 Topoisomeraasi	4
2.4 Sytotoksisuus.....	4
2.5 Muita lääketieteessä hyödynnettäviä bioaktiivisia ominaisuuksia	5
3 Bioaktiivisuuden vaikuttavia rakenteellisia ominaisuuksia	5
3.1 Amidiryhmän merkitys.....	5
3.2 Rengasrakenteet.....	6
3.3 Amidiryhmän asema aromaattisessa rakenteessa	6
3.4 Substituentit.....	7
3.5 Metallikoordinaatio	7
4 Bioaktiivisia aryyliamideja	8
4.1 ROR-ydinreseptoriin kohdistuvat lääkeaineet.....	8
4.2 Syöpäsolujen sphingosini-1-fosfaattireseptoreja häiritsevät yhdisteet.....	8
4.3 GSK-3-inhiboivat asyyliaminopyridinit	9
4.4 Foolihapon antagonistit	10
4.5 Heteroaryyliamidit SMO-inhibiittoreina	11
4.6 Aryyliamidit FMS-inhibiittoreina	12
4.6.1 Syanokarboksamidit.....	12
4.6.2 Syanofuraanikarboksamidit	13
4.6.3 Bisamidit.....	13
4.6.4 Muut aryyliamidit	14
5 Muita bioaktiivisia yhdisteitä	14
5.1 Naftalimidijohdannaiset	14
5.2 Pyrrolijohdannaiset.....	15

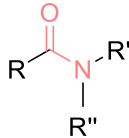
5.3 Metoksyloitu di(hetero)aryyliamiinit	16
6 Yhteenveto	17
TUTKIMUSPROJEKTI	18
Tiivistelmä.....	19
7 Johdanto.....	20
8 Kokeellisen työn kuvaus	20
9 Tulokset ja tulosten tarkastelu.....	25
10 Yhteenveto	26
11 Liitteet	26
12 Kirjallisuusluettelo.....	33

Lyhenteet ja vierasperäiset sanat

P-gp	P-glykoproteiini
ROR	Retinoiniinhapporeseptorit
TR-FRET	<i>Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer</i>
IC₅₀	Pitoisuus, jossa puolet reaktiosta estyy
S1P	Sphingosini-1-fosfaatti
T24	Ihmisen virtsarakon solukko
EC₅₀	50-prosenttisesti vaikuttava väkevyys
GSK-3	Glykogeenisyntaasikinaasi-3
FRα	α -folaattireseptori
HeLa	Ihmisen kohdunkaula syöpäsolukko
IGROV1	Ihmisen munasarjasyöpäsolukko
A2780	Ihmisen munasarjakarsinoomasolukko
Hh	<i>Hedgehog</i> signaalipolku
SMO	<i>Smoothened</i> reseptori
FMS	Tyrosiinikinaasin kuljettajaproteiini
KDR	Kinaasireseptori
NCI-H460	Ihmisen keuhkosyöpäsolukko, <i>vesikeuhko</i>
HCT15	Ihmisen peräsuolisolukko
HepG2	Ihmisen maksasyöpäsolukko

1 Johdanto

Amidit ovat amiinien ja aminohappojen ohella tärkeimpiä typpeä sisältäviä orgaanisia molekyyliä. Yksinkertaisimmillaan amidit ovat karboksyylihappojen johdannaisia, joissa hydroksyyli-ryhmä on korvautunut amiinilla (kuva 1). Tämä funktionaalinen ryhmä onkin nimeltään amidiryhmä, jota biokemiassa kutsutaan myös peptidisidokseksi sen kuullessa proteiinin pääketjuun. Amidit ovat yleisiä lääkeaineissa, esimerkiksi penisilliini ja parasetamoli sisältävät amidiryhmiä.



Kuva 1. Amidin perusrakenne

Aryyliamidit ovat monipuolinen joukko amideja, joissa ainakin yksi R-ryhmä on aromaattinen. Bisaryyli-, diaryyli- ja heteroaryyliamidit sisältävät biokemian ja lääketieteen kannalta kiinnostavia yhdisteitä niiden runsaiden ja monipuolisten bioaktiivisten ominaisuuksien ansiosta.

Bioaktiivisuudella tarkoitetaan elävässä organismissa tai kudoksessa tapahtuvaa spesifistä vaikutusta sen altistuessa bioaktiiviselle aineelle. Vaikutuksiin lukeutuu muun muassa fysiologiset responsit, aineiden siirtyminen tiettyyn kohdekudokseen, metaboliset vaikutukset ja suora kemiallinen vuorovaikutus biomolekyylin kanssa, kuten biotransformaatio ja biomarkerit. Yhdisteiden bioaktiivisuutta voidaan mitata sekä *in vivo*, *in vitro* ja *ex vivo*, mittauksessa tutkitaan mitä esimerkiksi mittaussolussa tapahtuu altistuksen aikana, syntyykö metaboliittia tai saadaanko kohteesta responsia.

Sekä luonnossa esiintyvillä, että laboratorioissa valmistetuilla amideilla on havaittu huomattavia bioaktiivisia ja biolääketieteellisiä ominaisuuksia. Ominaisuuksien hyödyntämistä on tutkittu niin maanviljelyksen, kuin lääketieteen saralla. Tietynlaisilla rakenteilla on havaittu selektiivisyyttä esimerkiksi kasvilajin mukaan, mikä on lisännyt mielenkiintoa myös hyvin spesifien sairauksien hoitoon.

Aryyliamidit ovat suhteellisen inertejä yhdisteitä, joka yhdessä selektiivisen toiminnan kanssa lisää niiden turvallisuutta lääkeainekäytössä. Useimmat aryyliamidit hajoavat elimistössä varsin vaarattomiksi yhdisteiksi ja poistuvat suhteellisen vaivattomasti.¹

2 Aryyliamideilla havaittuja bioaktiivisia ominaisuuksia

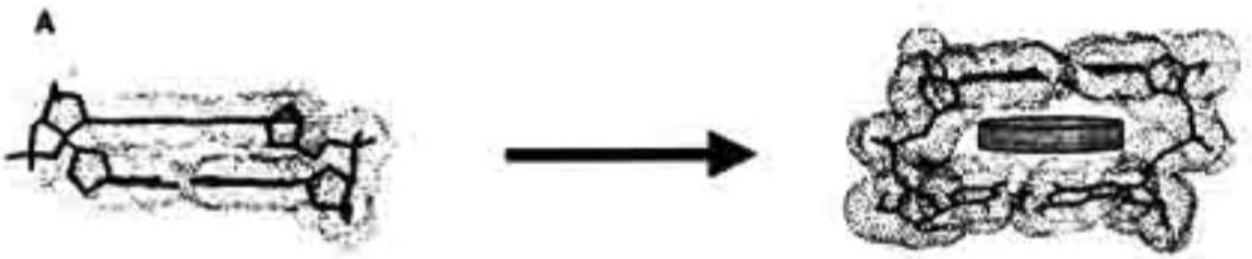
Useat amidien bioaktiiviset ominaisuudet tukevat niiden käyttöä syöpälääkityksissä. Niitä voidaan käyttää paitsi solunsalpauksessa, myös solukolle tärkeiden biokemiallisten prosessien inhibiittoreina. Monilla yhdisteryhmän jäsenet on havaittu varsin selektiivisesti epänormaalia solukkoa kohtaan, mikä lisääkin niiden kiinnostavuutta suhteellisen turvallisina lääkeaineina.¹

2.1 Monilääkeresistenssin torjunta

Eräs kemoterapian yleisimpiä ongelmakohtia on monilääkeresistenssi. Yleisin syy resistenssin kasvulle on P-glykoproteiinin (P-gp) määrän nousu soluissa. P-gp:n tehtävä on poistaa solusta vieraita yhdisteitä, mikä on aiheuttanut ongelmia lääkeaineiden käytössä. Ongelmaan ovat etsineet ratkaisua muun muassa Chen ja Zou, jotka ryhmineen valmistivat joukon podofyllotoxsisjohdannaisia, joista useiden havaittiin vähentävän lääkeaineresistenssiä syöpäsoluissa.²

2.2 Solunsalpaus

Rakenteilla, joissa esiintyy 2-4 aromaattista rengasta, on havaittu aiheuttavan solunsalpausta. Tasomaiset molekyylit pystyvät interkaloitumaan DNA-kaksoiskiarteeseen (kuva 2), muuttaen sen rakennetta. Interkalaatio edellyttää muutosta DNA:n sokeri-fosfaattirungon torsioikulmissa, jolloin aromaattiselle yhdisteelle syntyy oikeanlainen sitoutumispaikka. Samalla juosteessa voi esiintyä purkautumista ja vääntymistä, paikan syntyminen johtaa emäsparien erkaantumista ja kaksoiskiirteen pidentymiseen.³

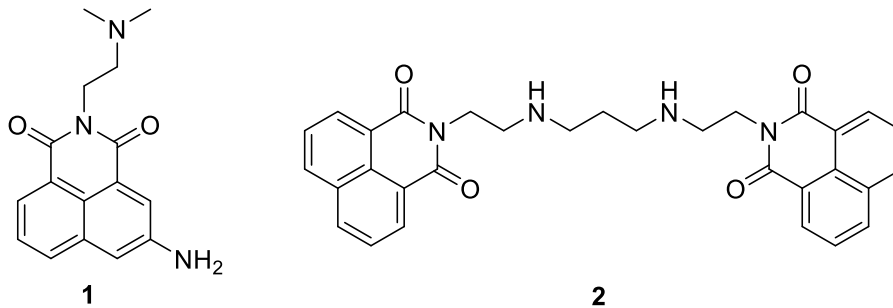


Kuva 2. Klassinen interkalaatiomalli, aromaattinen yhdiste DNA-dinukleotidissa¹

Muutos rakenteessa inhiboi DNA:n toimintaa ja samalla solujen jakautumista, erityisesti se häiritsee nopeasti jakautuvia soluja ja siksi solunsalpaajia käytetäänkin yleisesti syöpälääkkeenä. Tällaisia

¹ V.Luzzati, F.Masson, L.S. Lerman, Interaction of DNA and proflavine: A small-angle X-ray scattering study, *Journal of Molecular Biology*, **1961**

bioktiivia ominaisuuksia on havaittu esimerkiksi naftalimideilla, joista yleisimmin käytetyt ovat amonafide (1) ja elinafide (2) (kuva 3).⁴



Kuva 3. Amonafide ja elinafide

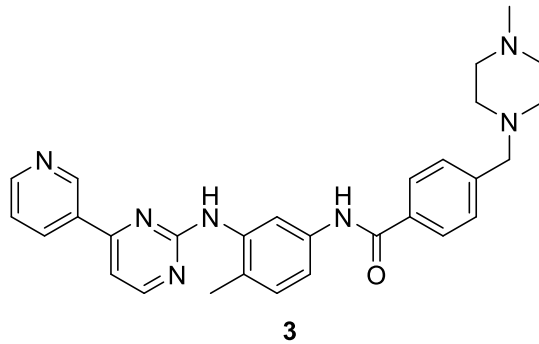
Kaksoiskierteen väliin kiilautumisen lisäksi DNA:n toimintaa voi inhiboida myös sen ulkopuolelle kiinnittyvillä molekyyleillä, jolloin proteiinivuorovaikutus häiriintyy.³

2.3 Entsyymi-inhibiittorit

Entsyymit ovat avainasemassa useissa biokemiallisissa prosesseissa. Entsyymit ovat tyypillisesti varsin herkkiä molekyylejä, jotka vaativat toimiakseen oikeanlaiset olosuhteet. Biologisina katalyytteinä niiden tehtävä on edesauttaa soluissa ja niiden ulkopuolella tapahtuvia kemiallisia prosesseja, jolloin niiden on oltava rakenteeltaan hyvin spesifejä. Entsyymien toiminta onkin altista inhiboinnille, joko olosuhteita tai yhdisteen kemiallista rakennetta manipuloimalla. Lääketieteessä ratkaisu on useimmiten jälkimmäinen, jottei muu kehon toiminta häiriintyisi.^{5,6} Useat syöpälääkkeet toimivatkin juuri entsyymi-inhibiittoreina, usein sitoutuen reseptoriin tai muuttamalla joko viestinaineen tai reseptorin rakennetta. Hoidoissa kohdennetaan monia eri entsyymejä ja reseptoreita, joista useat vaikuttavat solujakautumiseen tarvittavaan viestintään tai DNA:n toimintaan.

2.3.1 Tyrosiinikinaasi

Tyrosiinikinaasi-entsyymit ovat solujen ulkopuolisia välittäjäentsyymejä, jotka välittävät proteiinisäätelyssä välttämätöntä tietoa fosforylaation avulla. Mutaatiot ja muut poikkeavuudet näiden entsyymien reseptoreissa muuttavat myös proteiiniviestintää, jolloin seurauksena voi olla häiriö solun jakautumisen säätelyssä. Eräs tyrosiinikinaasi-inhibiittori on imatinibi (kuva 4), jota käytetään kroonisen myeloisen leukemian ja muiden syöpien hoidossa.⁷



Kuva 4. Imatinibi

2.3.2 Topoisomeraasi

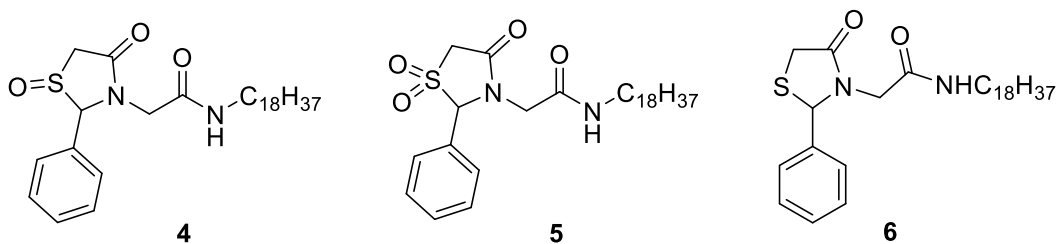
Topoisomeraasit ovat DNA:n toimivuuden kannalta tärkeitä entsyymejä, ne säätelevät kaksoiskierteen kiertymistä ja aukenemista. Eräs topoisomeraasin tehtävistä on estää kierteen aukenemista aiheuttavan jännityksen syntymistä.

Topoisomeraasi-inhibiitio häiritsee DNA:n toimintaa. Inhibiittori sitoutuu entsyymiin, jolloin se ei pysty enää sitoutumaan oikeaan vaikutusalueeseensa. Esimerkiksi akklarubisiini on tunnettu topoisomeraasi II -inhibiittori, joka estää sekä RNA:n että DNA:n toimintaa leukemiasoluissa, samankaltaisia ominaisuuksia on havittu myös aryylimideilla.⁸

2.4 Sytotoksisuus

Sytotoksisuudella tarkoitetaan yleisesti soluille myrkyllisyyttä tai soluja tuhoavaa ainetta. Perinteinen kemoterapia perustuu usein sytotoksisten aineiden käyttöön, soluja tuhoava vaikutus kohdentuu nopeasti jakautuviin syöpäsoluihin normaaleja soluja tehokkaammin.

Esimerkiksi Miller ryhmiseen suunnitteli ja syntetisoi ryhmän eturauhassyöpäsoluille sytotoksisia 2-aryyli-4-okso-thiazolidiini-3-yyli amideja (kuva 5).



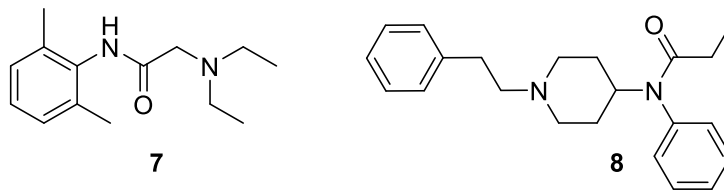
Kuva 5. Sytotoksisia amideja

Kolme sytotoksista yhdistettä osoittivat myös parempaa syöpäsoluselektiivisyyttä ryhmän aikaisemmin tutkimiin seriiniamidifosfaatteihin verrattuna.⁹

2.5 Muita lääketieteessä hyödynnettäviä bioaktiivisia ominaisuuksia

Syöpäsolujen lisäksi aryylamidit voivat inhiboida myös viruksia, bakteereja ja sienisoluja, tehden niistä vaihtoehdon taudinaiheuttajien vastaisessa taistelussa. Aryyliamideja voi hyödyntää myös antibioottina, joissa vaikutusta on huomattu *gram*-positiivisissa bakteereissa.⁹

Lidokaiini (7) ja fentanyyli (8) (kuva 6) ovat tunnettuja kipua lievittäviä, suhteellisen yksinkertaisia aryyliamideihin kuuluvia lääkeaineita. Lidokaiinia käytetään puudutusaineena ja fentanyyliä anestesian yhteydessä.



Kuva 6. Lidokaiini ja fentanyyli

3 Bioaktiivisuuteen vaikuttavia rakenteellisia ominaisuuksia

Biologiset systeemit ovat reagoidessaan yleisesti hyvin valikoivia molekyylien rakenteen suhteen, mikä vaikuttaa erityisesti vaatimukseen bioaktiivisten molekyylien sitoutumiskohtien suhteen. Molekyylien rakenne ja muoto ovat luonnollisesti avainasemassa hyvän bioaktiivisuuden saavuttamisessa, usein hyvinkin samankaltaiset molekyylit saavuttavat varsin eritasoisia tuloksia.¹⁰

Useat tutkimusryhmät ovat selvittäneet hienoisten erojen vaikutusta molekyylin toimintaan.

3.1 Amidiryhmän merkitys

Amidit ovat yleisiä biologisissa systeemeissä. Ne ovat yksi biologisten orgaanisten molekyylien perusrakenteista, DNA, RNA, peptidit ja proteiinit sisältävät kukin amidiryhmiä.

Amiineihin verrattuina ne ovat hyvin heikkoja emäksiä, eikä niillä ole merkittävää happo-emäsvuorovaikutusta veden kanssa. Amidiryhmä kykenee vetysidosten muodostumiseen, joita biologisissa systeemeissä esiintyy esimerkiksi reseptorien ja viestintäaineiden välillä. Amidisidos on todella stabiili monessa erilaisessa kemiallisessa ympäristössä. Pysyvyyden taustalla on amidien resonanssirakenne, joka tarjoaa kaksoissidosmaista lujutusta CO-N-sidokselle. Tasomainen rakenne

estää sidoksia kiertymästä, jolloin yhdiste jää tiettyyn asentoon, tehden siitä oivallisen reseptoritarkkoihin biologisiin prosesseihin.¹¹

3.2 Rengasrakenteet

Rengasrakenteiden määrällä ja koolla on vaikutusta muun muassa solunsalpauksessa (2.1), jossa oikeankokoinen rengassysteemi pystyy kiilautumaan DNA-kierteeseen. Erityisesti heterosykliset rakenteet ovat olleet tärkeässä asemassa lääkeainesynteesissä.^{3,12}

Typpeä sisältävät heterosyklit vaikuttavat fysiokemiallisiin ominaisuuksiin ja lääkeaineiden pK_a-arvoon. Esimerkiksi bentsimidatsolilähtöiset ovat yleisiä lääkesyntetiikassa, sen rakenne muistuttaa puriinia, joka tekee siitä yleisen osan syöpälääkemolekyylejä.¹³

3.3 Amidiryhmän asema aromaattisessa rakenteessa

Useissa tutkimuksissa on myös havaittu amidiryhmän ja substituentin välisen aseman olevan merkittävä tekijä bioaktiivisessa käyttäytymisessä. Esimerkiksi tulehduslääkkeenä toimivat amidit ovat usein *para*-asemaisia. Asemaa varioimalla on havaittu muutoksia paitsi aktiivisuuden tehossa, myös kohdemolekyyleissä. Joissain tapauksissa on *ortho*, *meta*, ja *para*-aseman variointi muuttanut molekyylin spesifisyyttä solutyypistä toiseen.¹⁴

Syöpälääkkeiksi sopivia heteroaryyliamideja tutkinut Yangin ryhmä havaitsi tutkimuksissaan *ortho*-metyylisubstituoidun yhdisteen huomattavasti muita vaihtoehtoja tehokkaammaksi. *Ortho*-aseman aiheuttaman torsioikulman aikaansaama muoto epäiltiin syyksi tehokkuuden kasvuun, kun oletetaan tutkittujen heteroaryyliamidien sitoutuvan samaan reseptoriin.¹⁵

Thioureapolymeerien bioaktiivisuutta tutkinut Wangin ryhmä havaitsi asylisten thioureoiden vaikuttavan solukasvuun kasvi- ja sienisoluisissa. Ryhmä valmisti joukon polymeerejä ja tutki niiden vaikutusta kasvi-, sieni- ja bakteerisoluihin.

Solukasvun häirinnällä havaittiin selektiivisyyttä riippuen amidiryhmän asemasta polymeeriketjussa. *Ortho*-asemainen polymeeri tehosti kasvua useissa kasvisoluissa, kuten riisissä. *Meta*-asema puolestaan inhiboi selektiivisesti ruohon ja sienisolujen kasvua, nostoen samalla riisin kasvua. Sen sijaan *Para*-asemaisella rakenteella ei huomattu vaikutuksia kasveihin.¹⁴

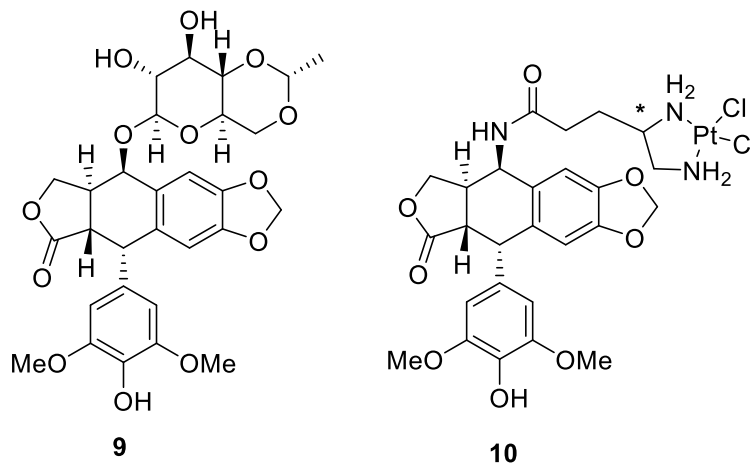
Erilaiset vaikutukset asemien välillä viittaavat yhdisteiden sitoutuvan erilaisiin reseptoreihin. Yangin ryhmän tutkimus tukee johtopäätöstä, ryhmien aseman olennaisin vaikutus liittyy biologisissa systeemeissä molekyylin lopulliseen muotoon.

3.4 Substituentit

Eri­laisien substituenttien vaikutusta bioaktiivisuuteen on sivuttu useissa tutkimuksissa. Zhu ryhmineen raporto­i elektroneja luovuttavien ryhmien lisäävän mytotoksisuutta tutkimissaan molekyy­leissä.¹⁶ Querozin ja Peixoton mukaan elektroneja luovuttavan metoksi-ryhmän läsnä­olo lisäsi bioaktiivisuutta syöpäsoluissa elektroneja vetäviin fluorisubstiuentteihin verrattuna,¹⁷ mutta eräät tutkimukset ovat osoittaneet fluorauksen nostavan sytotoksisuutta.¹⁸ Substituentti siis vaikuttaa yhdisteen bioaktiivisen käyttäytymiseen, mutta vaikutus on riippuvainen kohdesolusta, aktiivisuuden tyypistä ja aktiivisen yhdisteen muusta rakenteesta.

3.5 Metallikoordinaatio

Solukuolemaa voidaan ohjata esimerkiksi vaikuttamalla topoisomeraasin toimintaan (2.2.1). DNA:n hajottamisen stabilointi entsyymien avulla nostaa näiden inhibiittorilääkeaineiden tehokkuutta solussa. DNA:n hajoamista voidaan stabiloida esimerkiksi tiukemmalla entsyymi-lääkeaine-sitoutumisella. Eräs ratkaisu tähän on ollut koordinoituvan metallin lisääminen lääkkeen rakenteeseen. Esimerkiksi Li ja Chang suunnittelivat Pt²⁺:ta sisältävän lääkeaineen (kuva 7, yhdiste 9), jonka havaittiin sitoutuvan topoisomeraasiin vastaavaa platinatonta etoposidi-molekyyliä (yhdiste 10) tiukemmin ja täten auttavan DNA:n hajoamisen stabiloinnissa.¹⁹



Kuva 7. Etoposidi ja sen johdannainen etoplatin-N2β

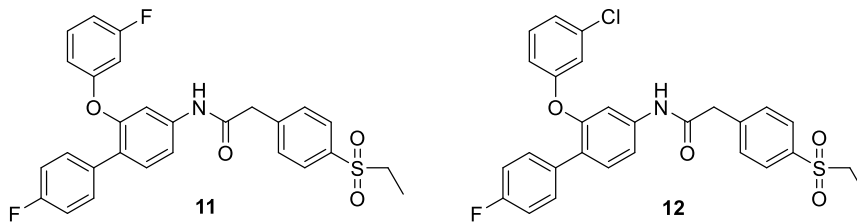
4 Bioaktiivisia aryyliamideja

Aryyliamidien monipuoliset lääketieteelliset ja bioaktiiviset ominaisuudet ovat keskiössä useissa kemian ja biokemian tutkimuksissa, sovelluksia löytyy erityisesti entsyymi-inhiboinnin saralla (2.3). Luvussa esitellään joitakin erilaisiin rakenteisiin ja lähtöaineisiin perustuvia kiinnostavia aryyliamideja.

4.1 ROR-ydinreseptoriin kohdistuvat lääkeaineet

Solun ytimien reseptorit ovat tärkeitä transkriptioon osallistuvia, ligandisäädelyjä proteiineja. Ne ovat myös tärkeä kohdeluokka lääketieteessä. Yksi luokkaan kuuluvista proteiiniyhdistelmästä on retinoiniinhapporeseptorit (ROR) α , β ja γ . Tutkimuksissa on huomattu reseptorien säätelyn olevan mahdollista myös synteettisillä ligandeilla, avaten mahdollisuuksia lukuisien sairauksien hoitoon. Lääkeaineet ovat siis ROR-sitoutuvia lääkinnällisiä ligandeja.

Glenmarkin heterobiaryyliamidijohdannaiset (kuva 8) 11 ja 12 toimivat ROR γ -modulaattoreita. Yhdisteitä tutkittiin TR-FRET-kokeella, joissa niiden IC₅₀-arvoiksi saatiin <50 nmol/L.²⁰

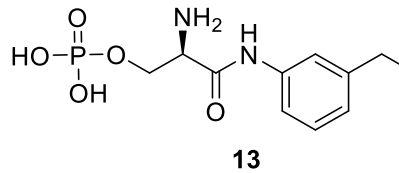


Kuva 8. Glenmarkin ROR γ -modulaattorit

4.2 Syöpäsolujen sphingosini-1-fosfaattireseptoreja häiritsevät yhdisteet

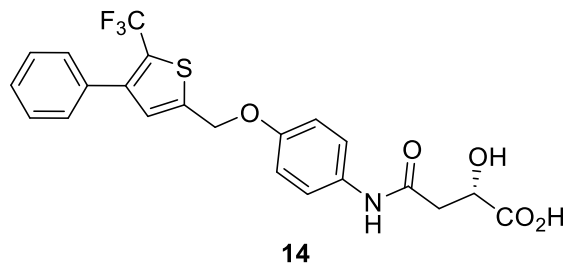
Sphingosini-1-fosfaatti (S1P) on laajoja bioaktiivisia ominaisuuksia omaava lipidi. S1P on tärkeässä asemassa useiden erilaisten solujen jakautumisessa, mikä tekee siitä mielenkiintoisen kohteen syöpälääketutkimuksessa. S1P vaikuttaa viittä erilaista G-proteiinia sisältävien reseptorien kautta, joiden toiminnan hallitulla estämisellä saatetaan syövän jakautumista estää selektiivisesti.

Useat aryyliamidi-rakenteen sisältävät yhdisteet ovat kilpailukykyisiä S1P1 -ja S1P3-reseptorien estämisessä. S1P:n biologian tutkimuksessa avuksi käytetyistä aryyliamideista VPC23019 (kuva 9) on osoittanut erityisen suurta aktiivisuutta S1P1-reseptorin aktivoinnin estämisessä kääntämällä prosessissa olennaisen SEW 2871-yhdisteen vaikutuksen, jolloin solumigraatio ja kalsiumin kulkeutuminen T24-soluissa estyy. VPC23019:a on muokattu hiiliketjua lyhentämällä, jolloin vastaavia vaikutuksia on havaittu myös S1P3-reseptoreissa.²¹



Kuva 9. VPC23019

Daiichi Sankyon aminoalkoholeihin keskittynyt tutkimusryhmä raportoi kahden yhdisteen inhiboivan S1P1-reseptorin toimintaa. Aryyliamidi 14 (kuva 10) osoitti *in vitro* -tutkimuksissa matalia EC₅₀ arvoja. Tutkimukset jatkuvat lääkeaineen turvallisuuden takaamiseksi.²²

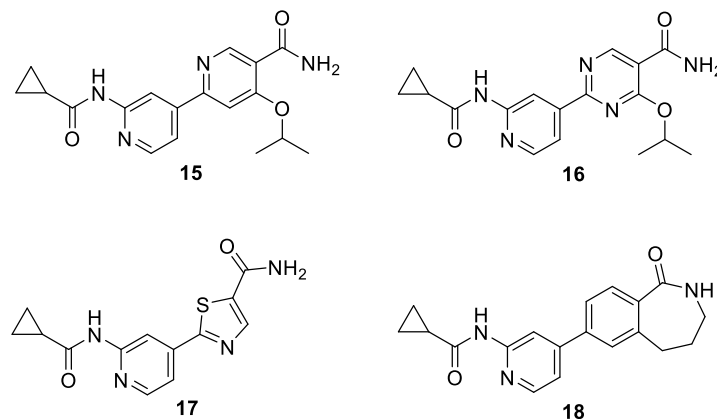


Kuva 10. S1P1-inhiboiva aryyliamidi

4.3 GSK-3-inhiboivat asyyliaminopyridinit

GSK-3 eli glykogeenisyntaasikinaasi-3-entsyymi vastaa treoniini ja seriini-aminohappojen fosfaattiryhmän kinaasista. GSK-3:lla on havaittu merkittävä rooli usean sairauden, mukaan lukien kaksisuuntaisen mielialahäiriön, diabeteksen ja syövän kehittymisessä. Entsyymien inhibointi on usean lääkeainetutkimuksen tavoite.

Prasanna ja Han ryhmineen suunnittelivat laajan sarjan aryyliamidiosan sisältäviä GSK-3-inhibiittoreita, joista valikoitu neljä erityisen tehokasta yhdistettä (kuva 11).



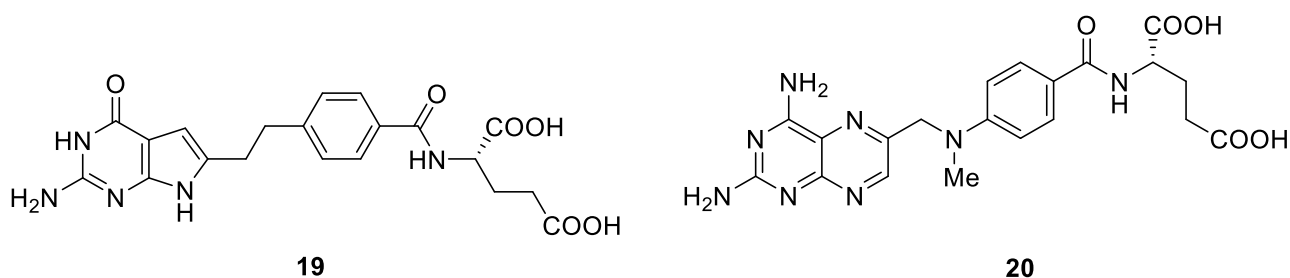
Kuva 11. GSK-3-inhibiittoreita

Useat aikaisemmat GSK-inhibiittorit ovat olleet ATP-kilpailullisia, jotka on havaittu puutteellista spesifiteettiä haluttuun kinaasiin. Tutkimusryhmän tavoitteena olikin luoda ei-kilpailullinen inhibiittori.

Jokainen kuvan 8 lääkeaine sisältää hydrofobisen rengasrakenteen, jonka tarkoitus on parantaa viereiseen sitoutuneen happiatomin sijoittumista GSK-3:n aktiiviseen keskukseen nähden. Happi muodostaa vetysidoksen entsyymiin sivuketjun kanssa, jolloin fosforylaation eteneminen pTau-proteiinissa pysähtyi. Tulokset ovat lupaavia syöpäkasvainten kasvun estämisessä ja Alzheimerin taudin pysäyttämisessä.²³

4.4 Foolihapon antagonistit

Useat syöpähoidoissa käytetyt lääkkeet kohdistuvat foolihappojen toimintaan. Pemetreksed (PMX) ja metotreksaatti (MTX) ovat kaupallisesti saatavia foolihapon antagonisteja (kuva 12). Näiden yhdisteiden ongelma on kuitenkin niiden korkea myrkyllisyys ja varsin yleinen resistenssi.

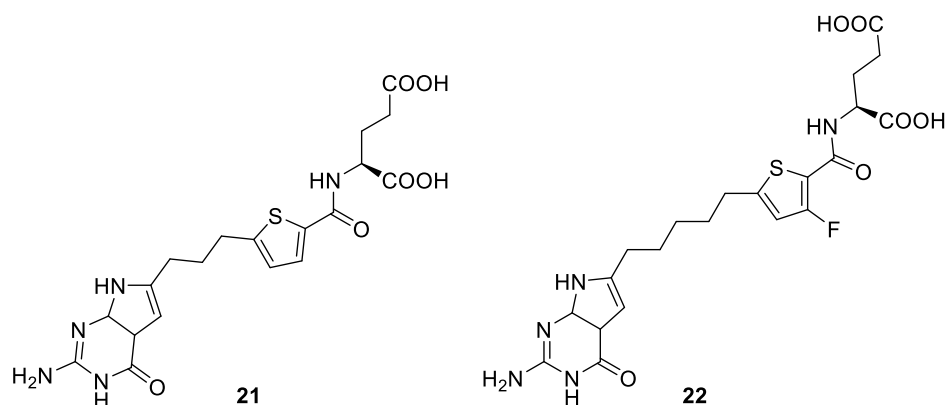


Kuva 12. Pemetreksed ja metotreksaatti

Terveessä solukossa α -folaattireseptorit ($FR\alpha$) sijaitsevat suoniston pinnalla verenkierron tavoittamattomissa. Sen sijaan syöpäsolukossa $FR\alpha$:ja löytyy myös verenkierron kautta saavutettavissa paikoissa, mikä tekee niistä oivallisen kohteen syöpäsolujen selektiivisessä torjunnassa. Ganjee ryhmineen valmisti joukon PMX/MTX-mekaniikkaa hyödyntäviä yhdisteitä, joilta aikaisempien lääkkeiden ongelmakodit on väistetty. Lähtökohdaksi valittiin joukko aikaisempaa HeLa-solujen jakautumista vastustavia yhdisteitä, joiden fluoratut vastineen osoittivat jakautumista estäviä ominaisuuksia myös IGROV1- ja A2780-soluissa.

Lupaavien *in vitro* -testien jälkeen tutkimuksia jatkettiin *in vivo* -kokeilla, johon valikoitiin yhdiste 21, joka oli aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu tehokkaimmaksi pyrrolo[2,3-d]pyrimidiinjohdannaiseksi ja fluorattu yhdiste 22 (kuva 13). Kokeessa yhdiste 22 havaittiin tehokkaammaksi syöväntorjijaksi käytettäessä ekvitoksista annostusta, joskin sen annostuskoko oli

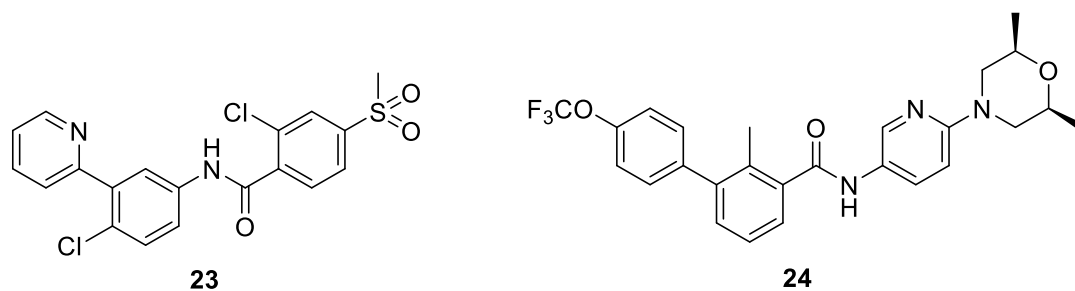
tällöin suurempi kuin yhdisteellä 21. Kummallakaan yhdisteellä ei havaittu pysyviä haitallisia vaikutuksia koe-eläimissä.¹⁸



Kuva 13. *In vivo* -kokeeseen valitut yhdisteet

4.5 Heteroaryyliamidit SMO-inhibiittoreina

Hedgehog-viestintä on tärkeä reitti alkionkehityksessä, se hallinnoi muun muassa solunjakautumista ja alkion rakennetta. Useiden syöpien syntysyyksi on havaittu epänormaali Hh-signaali, jota on lääketieteessä vastustettu vaikuttamalla smoothened-reseptoriin (SMO), joka on eräs Hh-reitin tärkeimmistä proteiineista. SMO-inhibiittorit vismodegib ja sonidegib (kuva 14) ovat hyväksytyjä ihosyöpälääkkeitä.¹⁵

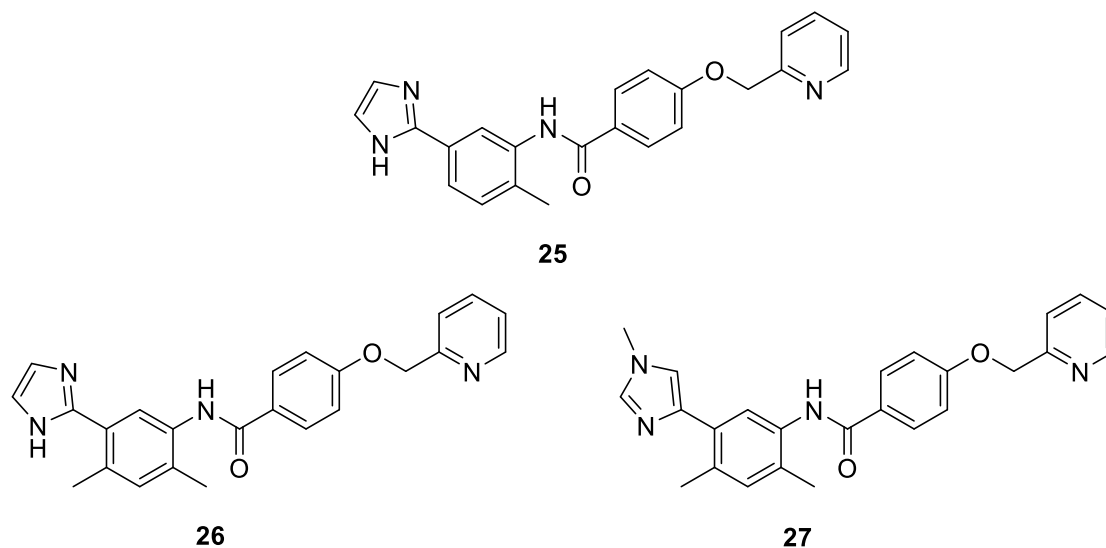


Kuva 14. Vismodegib ja sonidegib

Yang ryhmä syntetisoi SMO-inhiboivan heteroaryyliamidin (kuva 15, yhdiste 25), jolla huomattiin lupaavia bioaktiivisia ominaisuuksia Hh-viestinnän estämisessä hiiren syöpäsolukossa. Jatkotutkimuksissa kuitenkin havaittiin lääkeaineen olevan huomattavasti tehottomampi ihmisolukossa.²⁴

Ryhmä jatkoi tutkimusta rakenteen parissa tavoitteenaan muokata yhdisteestä myös ihmiskäyttöön sopivan lääkeaineen. Tuloksena oli joukko *ortho*-substituoituja heteroaryyliamideja, *o*-

metyylisubstituentti edesauttoi molekyylin muodon asettumista bioaktiivisesti otollisimpaan muotoon.



Kuva 15. Yangin ryhmän SMO-inhibiittorit, 24 ja 25 o-substituoituja amideja

Kaksi yhdistettä (kuva 15, yhdisteet 26 ja 27) osoittivat erinomaista aktiivisuutta *in vivo*-testeissä, suun kautta nautittuna ne osoittivat 42% ja 43% heikentyntä kasvaimen kasvua. Vaikutukset olivat vertailukelpoisia sekä koe-eläin, että ihmisolukossa, joissa kumpikin yhdiste osoitti erinomaista sitoutumista SMO:hon.¹⁵

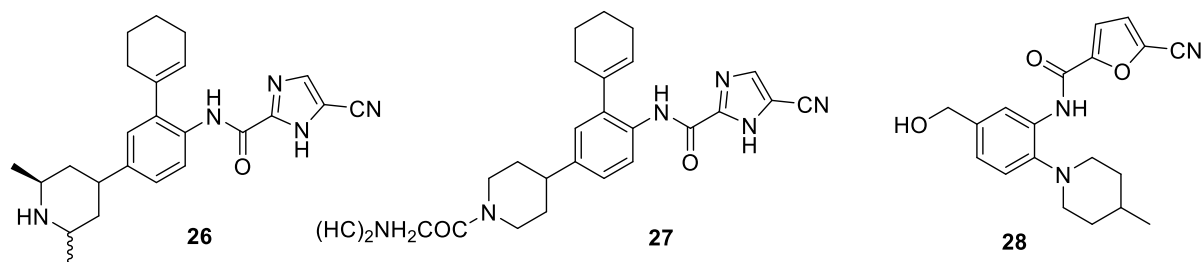
4.6 Aryyliamidit FMS-inhbiittoreina

FMS-proteiini on yksi tyypin III tyrosiinikinaasi (2.3.1). Se edesauttaa osteoklastisten solujen jakautumista ja sen yli-ilmentymisellä on havaittu olevan yhteyksiä useaan eri sairauteen, mukaan lukien syöpä, osteolyysi ja tulehdussairaudet. FMS-inhibointia on näin ollen tutkittu vaihtoehtona näiden sairauksien hoitamiseen.

Useita FMS-kinaasi-inhibiittoreina toimivia aryyli- ja heteroaryyliamideja on valmistettu. Näihin kuuluu muun muassa syanokarboksamideja, syanofuraanikarboksamideja ja bisamideja.²⁵

4.6.1 Syanokarboksamidit

Johnson & Johnson -yhtiön tutkimusryhmä on tutkinut suurta joukkoa syanoimidatsolikarboksamideja ja niiden käyttöä FMS-kinaasi-inhibiittoreina. Yhdisteen 26 (kuva 16) cis-muodon trifluorietikkahapposuolalle mitattiin *in vitro* -entsyymikokeessa 0,2 nM IC₅₀ -arvo, trans-muodolle 0,4. Yhdiste 27 osoitti suunkautta nautittuna merkittävää FMS-inhibiitiota, vähentäen syöpään yhdistettävää osteoklastia ja mahdollisesti syöpäkasvainten solunjakautumista.^{25,26}



Kuva 16. Johnson & Johnsonin FMS-inhibiittorit

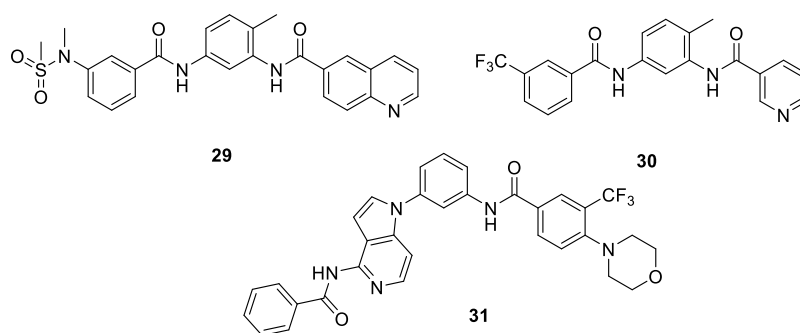
4.6.2 Syanofuraanikarboksamidit

Sama tutkimusryhmä on myös tutkinut syanofuraanikarboksamideja FMS-inhibiittoreina. Yhdiste 28 (kuva 16) osoitti korkeaa selektiivisyyttä 25 eri kinaasin joukossa. 25 valittiin lähtöaineeksi jatkotutkimusta varten, metyyliiryman korvaaminen hydroksyytylipiperatsinyylillä ja piperidinyylillä nostivat yhdisteen aktiivisuutta.²⁷

4.6.3 Bisamidit

Eräiden diaminofenyyl-bisamidien on seulonnoissa huomattu kykenevän FMS-inhibointiin. Yhdiste 29 (kuva 17) oli joukosta tehokkain. Rakennetta muokattiin korvaamalla kinoliinirengas muilla bisyklisillä rakenteilla, mikä ei vaikuttanut yhdisteen bioaktiivisiin ominaisuuksiin. Yhdistettä alettiin kehittämään paremmin liukenevaan muotoon korvaamalla rengasrakenne 3-pyridiinillä, joista osa, kuten yhdiste 30, osoitti suurempaa FMS-aktiivisuutta.

Yhdiste 31 on tehokas ja selektiivinen FMS-kinaasi-inhibiittori. Inhibointitehokkuudeksi FMS- ja KDR-kinaaseille mitattiin 90% ja 71%.²⁵

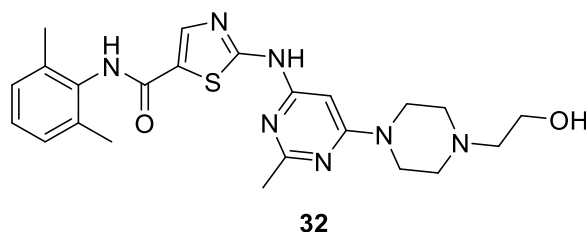


Kuva 17. Bisamidi-FMS-inhibiittoreita

4.6.4 Muut aryylimidit

Luvussa 2.3.1 esitelty imatinibi (kuva 4) on yleisessä käytössä oleva FMS-inhibiittori, jonka vaikutus näkyy osteoklastien ohjattuna solukuolemana. Imatinibilla on havaittu myös muita antiosteoklastisia ominaisuuksia ja sillä on epäilty olevan vaikutusta jopa kypsän vaiheen osteoklastien torjumisessa FMS-inhibiition kautta. Luusairauksien, lisäksi imatinibia voidaan käyttää myös suoliston kasvainten ja leukemian torjumisessa.

Uudempia FMS-inhibiittoreita on löydetty syanopyrrolikarboksamideista ja diaryylimideista. Tyrosiinikinaasi-inhibiittori dasatinibi (kuva 15) on käyttökelpoinen usean eri solun kinaasin estossa, FMS mukaan lukien. Dasatinibi sitoutuu tyrosiinikinaasientsyymiin ja vähentää näin sen toimintakykyä. Kuten imatinibi, dasatinibi on yleisessä käytössä kroonisen myeloosin ja akuutin lymfoblastisen leukemian hoidossa.²⁵



Kuva 18. Dasatinibi

5 Muita bioaktiivisia yhdisteitä

Aryylimidien bioktiivisuuteen verrattavia ominaisuuksia esiintyy myös useilla samankaltaisilla yhdisteillä. Yhteistä aikaisemmin esiteltyjen molekyylien kanssa näillä on usein hyvinkin monimutkaiset aromaattiset rakenteet, heterosyklit ja typpi. Tällaisia yhdisteitä esiintyy paitsi aromaattisia ryhmiä sisältävillä amideilla, myös amiineilla ja niiden johdannaisilla.

5.1 Naftalimidijohdannaiset

Li ryhmiseen syntetisoi joukon molekyyliä, joissa naftalimidi -rakennetta yhdisteltiin furaani-, pyrasiini-, imidatsoli- ja thiofaani-rengsrakenteisiin. Osa uusista molekyyleistä osoitti nousutta solunsalpausta amonafideen (kuva 3) verattuna. Ryhmä on myös kiinnostunut yhdisteiden käyttömahdollisuuksista topoisomeraasi II (2.3.2) ja solukasvun inhibiittorina.

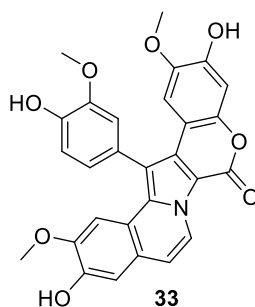
Emäksisen sivuketjun havaittiin tutkimuksissa olevan ratkaisevassa asemassa syöpäketjujen inhiboinnissa. Syöpäsolujen kasvua estivät tehokkaimmin sivuketjut, joiden typpi on erotettu

rengasrakenteen tyyppistä kahdella metyleenyksiköllä ja joiden substituenttina on joko pyrrolidiini tai dimetyyliamiini. Lisäksi havaittiin bioaktiivisuuden olevan korkeimmillaan rakenteilla, joissa sivuketju on kiinnittynyt amidiryhmään nähden *meta*-asemaan.⁴

5.2 Pyrrolijohdannaiset

Heterosyklisillä yhdisteillä, joissa on kaksi vastakkaisissa asemassa olevaa aromaattista ryhmää, on havaittu paljon bioaktiivisia ja biolääketieteellisiä ominaisuuksia. Erityisesti merikasveista löytyneitä alkaloideja on tutkittu paljon lääkeaineena.

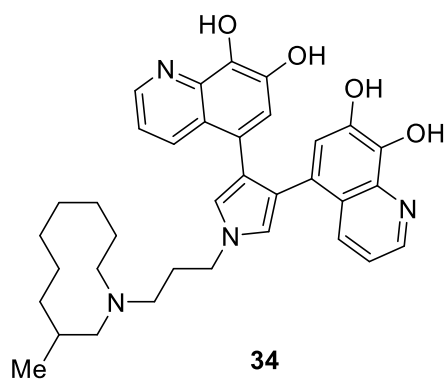
Lähes jokainen *lamellariineihin* kuuluva alkaloidi on osoittanut tutkimuksissa sytotoksisuutta useaa erilaista syöpäsolua vastaan. Lamellarin D (kuva 19) on tunnettu topoisomeraasi-inhibiittori ja usealla ryhmän yhdisteellä on havaittu lääkeresistenssin pienentäviä vaikutuksia. Lamellarinien laajoihin lääketieteellisiin sovelluksiin kuuluu myös käyttö antibioottina ja HIV-1 inhibiittorina.



Kuva 19. Lamellarine D

Lamellarinien kanssa samankaltaisia sytotoksisia ominaisuuksia on myös *halitulilla* (kuva 20) ja potentiaalisilla antibiooteilla, stroniamideilla.

Synteettisiä pyrrolijohdannaisia voidaan käyttää syöpälääkkeinä, mutta myös virtsarakon tulehdusten ja astman hoidossa, myös mahdollisuuksia diabeteksen hoitoon on tutkittu.²⁸



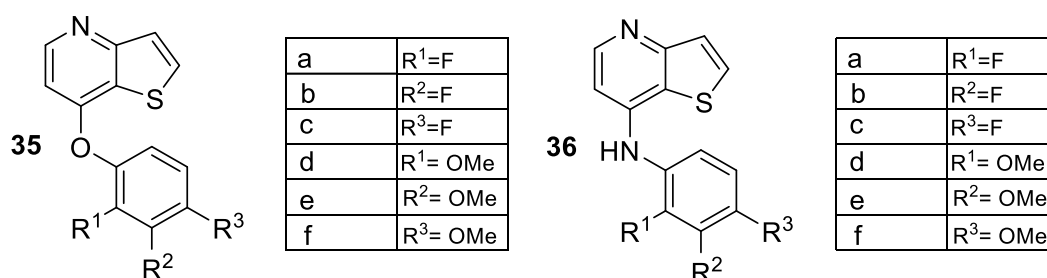
Kuva 20. Halitulin

5.3 Metoksyloitu di(hetero)aryyliamiinit

Queiroz ja Peixoto syntetisoivat ryhmän di(hetero)aryylieettereitä ja di(hetero)aryyliamiineja (kuva 21). Molekyylien vaikutusta tutkittiin NCI-H460, HCT15, HepG2 ja HeLA -soluissa.

Aryyliamiineista suurinta biaktiivisuutta syöpäsoluissa osoittivat molekyylit 3d ja 3e. *Orto*- ja *meta*-substituoiduilla metyloiduilla rakenteilla havaittiin huomattavasti matalampi GI₅₀-arvo syöpäsoluissa, terveeseen solukkuon verrattaessa. *Para*-substituoidun yhdisteen 3f GI₅₀-arvot olivat lähempänä toisiaan ja fluorattujen yhdisteiden arvot olivat kaiken kaikkiaan korkeammat.

GI₅₀-konsentraatiolla mitattaessa yhdisteet aiheuttivat dramaattisia muutoksia NCI-H460-solujen solusyklissä, johtuen ohjattuun solukuolemaan.



Kuva 21. Syntetisoidut molekyylit

Orto- ja *meta*-yhdisteet osoittivat siis selkeää selektiivisyyttä syöpäketjujen kasvun inhibointiin olematta kuitenkaan välittömän vaarallisia terveelle solulle. Yhdisteiden hepatoksisuutta on kuitenkin tutkittava lisää ennen laajempaa lääketieteellistä käyttöä.¹⁷

6 Yhteenveto

Aryyliamidit ja erityisesti heteroaryyliamidit tarjoavat monipuolisia vaihtoehtoja erilaisten sairauksien torjumiseen. Huomionarvoinen piirre näillä yhdisteillä on niiden kyky toimia usean eri entsyymiin ja entsyymireseptorin inhibiittorina. Koska myös elimistön omat peptidit ovat amidiyhdisteitä, ovat amidit yleisesti hyvä lähtökohta inhibiittoryhdisteiden kehittämiseen. Entsyymeillä on jo itsellään hyvin spesifi vaikutus, joten niiden toimintaa estämällä voidaan saada tarkkoja haluttuja vaikutuksia, jolloin mahdollisten sivuvaikutusten mahdollisuus pienenee. Lisäksi amidit ovat karboksyylihapojohdannaisiksi varsin inertejä, eivätkä ne täten tyypillisesti reagoi elimistössä odottamattomin tavoin.

Syövän torjunnassa aryyliamidien yleisimmät mekanismit ovat topoisomeraasi- ja tyrosiinikinaasi-inhibiitio. Tyypillinen inhibiittori sitoutuu joko itse entsyymiin tai sen reseptoriin, jolloin kyseisen molekyyli muuttuu kykenemättömäksi hoitamaan oikeaa tehtäväänsä. Useat syöväntorjunta-amidit vaikuttavat myös fosforylaatioon, foolihapon tai viestittäjälipidien toimintaan.

Reseptoreihin sitoutuminen edellyttää molekyyliltä hyvin tarkkaa rakennetta. Monimutkaiset rengasrakenteet ja suurehkot sivuketjut ovat sängen yleisiä bioaktiivisilla aryyliamideilla. Sitoutuminen on usein riippuvaista sitoutumiskohtien paikallisesta elektronitiheydestä, jota useassa molekyylissä on saatu toimintakykyiseksi heteroatomien avulla. Hapen ja typen lisäksi yleisiä heteroatomeja ovat kloori, rikki ja fluori.

Suurin osa aryyliami-lääkkeistä torjuu syöpäsolukkoa estämällä niiden solujakautumista. Osa lääkeaineista myös tuhoaa solukkoa ohjatun solukuoleman kautta. Entsyymi-reseptori-vaikuttajien lisäksi lääkeaineet voivat olla myrkyllisiä syöpäsolukolle tai purkaa niiden DNA:ta kiilautamalla kaksoiskierteen väliin.

Syöpien lisäksi bioaktiivisia aryyliamideja käytetään muun muassa tulehdus- ja kipulääkkeinä, anestesian yhteydessä ja esimerkiksi Alzheimerin taudin ja diabeteksen torjumisessa.

Aryyliamidien bioaktiivisten ominaisuuksien tutkimus on hyvin laajaa. Monet tutkimusryhmät ja lääkeyhtiöt ovat julkaisseet raportteja ja patenteja mahdollisista lääkeaineista. Amidien monipuolisuus ja helposti saavutettava myrkyttömyys tekevätkin niistä oivallisen kehityskohteen lääketieteen tutkimuksissa.

Kokeellinen osa

Heteroaryyliamidien synteesioptimointia mikroaaltouunilämmityksellä

Tiivistelmä

Työn tarkoituksena oli optimoida eräiden heteroaryyliamidien synteesiä. Synteeseissä käytettiin dietyylimalonaattia, joka reagoi vaihtoesteröinti-reaktiolla toisena lähtöaineena käytettyjen pyridiini- ja aniliinijohdannaisten kanssa. Tavoitteena oli valmistaa yhdisteitä, joissa vain toinen dietyylimalonaatin päistä reagoi, jonka jälkeen vapaaseen päähän voitiin liittää jokin toinen ryhmä, tuloksena heteroaryyliamidi.

Neljästä käytetystä lähtöaineesta vain yhdellä, 3-aminopyridiinillä saatiin aikaan kiinteä tuote, jolle halutunlainen jatkoreaktio oli mahdollinen. 2-aminopyridiini saatiin reagoimaan halutusti, mutta siitä syntynyt tuote liukeni ylijääneeseen dietyylimalonaattiin eikä siksi ollut käyttökelpoinen. Sen sijaan aniliinijohdannaisilla ei saatu aikaan tilannetta, jossa ne olisivat reagoineet vain kerran dietyylimalonaatin kanssa.

Tutkimus suoritettiin LuK-tutkimusprojektina Jyväskylän yliopistossa keväällä 2017.

7 Johdanto

Eräät heteroaryyliamidit ja samankaltaiset yhdisteet ovat tutkimuksissa osoittaneet bioaktiivisuutta jota voidaan hyödyntää esimerkiksi ohjatussa solukuolemassa. On myös havaittu, että vaikka osa näistä yhdisteistä kykenee syöpäketjujen pilkkomiseen, ovat ne osoittautuneet myös suhteellisen vaarattomaksi normaalille solukolle.¹⁷

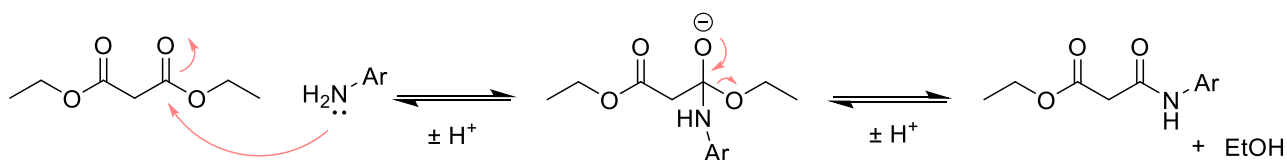
Vaihtoesteröinti on reaktio, jossa esterin orgaaninen ryhmä vaihdetaan toiseen orgaaniseen ryhmään (kuva 1). Esteri reagoi tyypillisesti katalyytin avustamana alkoholin kanssa, jolloin alkoholi liittyy esterin karbonyylihiileen, ja vanha orgaaninen ryhmä irtoaa korvautuen alkoholin ryhmällä. Jos reaktiossa käytetään alkoholin sijasta amiinia, saadaan lämmittäessä tuotteena amideja.²⁹

Mikroaaltouunilämmitystä voidaan käyttää reaktioseosten lämmitykseen perinteisten lämmitysmenetelmien (mantteli, öljyhaude jne.) sijasta. Mikroaallot lämmittävät reagensseja sisältä päin, jolloin energiaa ei kulu astian lämmittämiseen ja lämpeneminen on nopeampaa. Reaktioaika on mikroaaltoreaktoria käytettäessä tyypillisesti lyhyempi ja saannot ovat usein parempia.³⁰

8 Kokeellisen työn kuvaus

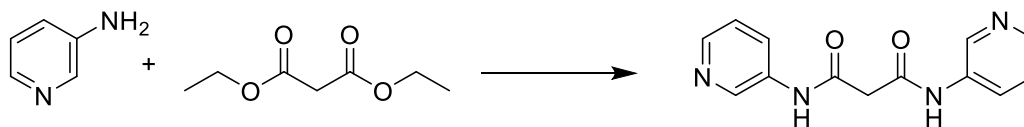
Kaikki työn reaktiot tehtiin lämmittämällä tarvittavia lähtöaineita CEM Discover -mikroaaltouunireaktorissa Synergy-ohjelmaa käyttäen.

Reaktioiden (kuva 1) etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti, seurantaan käytettiin silikageelipintaisia TLC-levyjä, eluentina 20% etyyliasettaatti + heksaani. Saostuneille kiinteille tuotteille mitattiin sulamispiste Stuart melting point SMP30-sulamispistemittarilla, ja niiden rakenne selvitettiin mittaamalla niille ¹H NMR -ja ¹³C NMR-spektrit Bruker AV 300 FT NMR -spektrometrillä.



Kuva 1. Yleinen mekanismi työssä suoritetuille synteeseille

8.1 N^1, N^3 -di(pyridin-3-yl)propanidiamidi

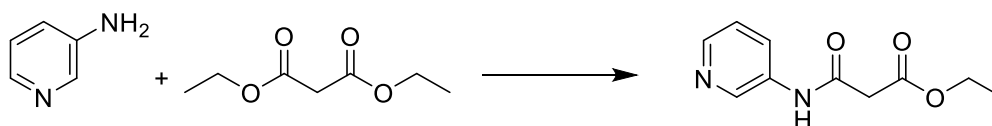


Kuva 2. Synteesi 1

0,475 ml dietyylimalonaattia ja 0,338 g 3-aminopyridiiniä liuotettiin 1ml tolueenia, seosta lämmitettiin 2×10 minuuttia $120\text{ }^\circ\text{C}$. TLC-levyllä havaittiin seoksen sisältävän ainakin kolmea yhdistettä, jotka vertailun perusteella todettiin kahdeksi lähtöaineeksi ja tuotteeksi. 2. yritys: 1ml tolueenia liuotettiin 0,475 ml dietyylimalonaattia ja 0,500 g 2-aminopyridiiniä, seosta lämmitettiin 20 minuuttia $120\text{ }^\circ\text{C}$ ja 10 minuuttia $140\text{ }^\circ\text{C}$. Saostunut kiinteä tuote suodatettiin ja kuivattiin. Saanto oli 0,476 g (59%), sulamispiste $220\text{-}222\text{ }^\circ\text{C}$ (kirjallisuusarvo $215\text{ - }218\text{ }^\circ\text{C}$).

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 3.56$ (2H, s, C(=O)-CH₂), 7.36 (2H, Py-H₅, dd, $J = 8,3; 8,3$ Hz), 8.04 (2H, Py-H₆, d, $J = 9,4$ Hz), 8.28 (2H, Py-H₄, dd, $J = 4,62$ Hz), 8.75 (2H, Py-H₂, d, $J = 2,3$ Hz) 10.39 (2H, s, NH).

8.2 Etyyli 3-okso-3-[(pyridin-3-yl)amino]propiaonaatti



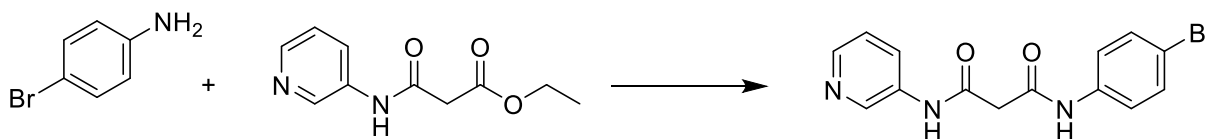
Kuva 3. Synteesi 2

2 ml dietyylimalonaattia ja 0,50 g 3-aminopyridiiniä liuotettiin 1ml tolueenia, seosta lämmitettiin 3×50 minuuttia $90\text{ }^\circ\text{C}$ mikroaaltouunireaktorissa. TLC-levyn mukaan kiteytynyt tuote sisälsi kolmea yhdistettä. Seos liuotettiin pieneen määrään 5:1 etyyliasettaatti-etanoli-seosta ja tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Pylväs pakatiin silikageelillä ja ajoliuksena käytettiin 20% etyyliasettaatti + heksaania.. Ylimääräinen liuotin haihdutettiin tuotteesta rotavaporissa. Saanto oli 0,250 g (28%) valkoista kiinteää jauhetta. Sulamispiste $118\text{-}121\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.20$ (3H, CH₃, dt, $J = 12$ Hz), 3.49 (2H, s, C(=O)-CH₂), 4.08 (2H, O-CH₂, m), 7.35 (1H, Py-H₂, m), 8.02 (1H, Py-H₃, d, $J = 6$ Hz) 8.28 (1H, Py-H₁, t, $J = 3$ Hz) 8.71 (1H, Py-H₆, s), 10.37 (1H, NH, s).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 13.96, 43.45, 60.65, 123.64, 126.07, 135.41, 140.69, 144.47, 164.63, 167.37$.

2.3. N^1 -(4-bromofenyyl)- N^3 -(pyridin-3-yl)propanidiamidi

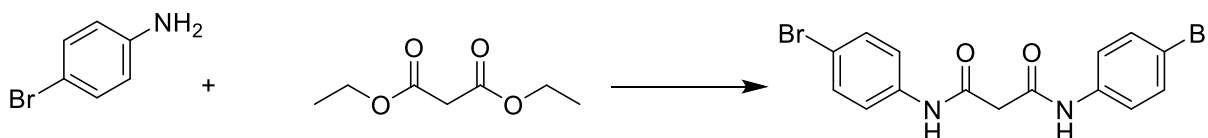


Kuva 4. Synteesi 3

0,1 g kohdan 2.2 tuotetta ja 0,15 g 4-bromoaniliinia liotettiin 1 ml tolueenia ja seosta lämmitettiin 20 minuuttia $130\text{ }^\circ\text{C}$, kiteytynyt tuote suodatettiin ja kuivattiin. Saanto oli 0,320g (40%).

^1H NMR (300 MHz, DMSO): 3.54 (2H, s, C(=O)-CH₂), 7.36 (1H, Py-H₂, m), 7.50 (4H, Py-H₂, q, $J = 3$ Hz), 8.05 (1H, Py-H₃, d, $J = 3$ Hz), 8.28 (1H, Py-H₁, d, $J = 3$ Hz), 8.74 (1H, Py-H₆, s), 10.29 (1H, Ph-NH, d, $J = 6$ Hz), 10.38 (1H, Py-NH, d, $J = 6$ Hz).

8.4 N^1, N^3 -bis(4-bromofenyyl)propanidiamidi



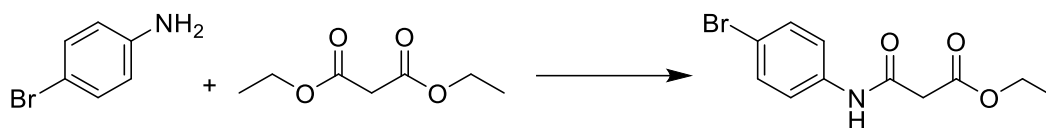
Kuva 5. Synteesi 4

0,75g 4-bromoaniliinia ja 0,380 ml dietyylimalonaattia liuotettiin 1 ml tolueenia. Seosta lämmitettiin 2×10 minuuttia $140\text{ }^\circ\text{C}$. Jäähdytyksen jälkeen muodostunut sakka suodatettiin ja kuivattiin. Saanto oli 0,368 g (36%) sulamispiste $267\text{-}270\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 3.46$ (2H, C(=O)-CH₂, d, $J = 7,2$ Hz), 7.51 (8H, Ph, ddd, $J = 2,4; 6,0; 11,7$ Hz) 10.29 (2H, NH, s).

^{13}C NMR: $\delta = 13.96, 60.55, 113.4, 119.54, 138.19, 147.96, 151.65, 166.11$.

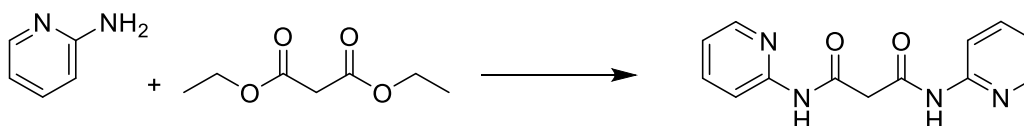
8.5 Etyyli 3-(4-bromoaniliini)-3-oksopropionaatti



Kuva 6. Synteesi 5

0,5 g 4-bromoaniliinia ja 1,5 ml dietyylimalonaattia liuotettiin 1 ml tolueenia ja lämmitettiin 30 minuuttia 100 °C, TLC-levyllä seoksessa havaittiin vain 1-bromoaniliinia, joten lämmitystä jatkettiin 2 x 30 min 100 °C. Jäähdytyksen jälkeen muodostunut sakka suodatettiin ja kuivattiin. TLC-levyllä seoksesta erottui kaksi yhdistettä, jotka spektrissä paljastuivat reagoimattomaksi 1-bromoaniliiniksi ja kohdan 1.4 synteesissä valmistetuksi kahdesti reagoineeksi tuotteeksi.

8.6 *N*¹,*N*³-di(pyridin-2-yl)propanidiamidi



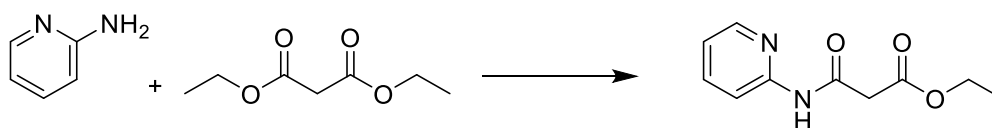
Kuva 7. Synteesi 6

0,338 g 2-aminopyridiiniä ja 0,5 ml dietyylimalonaattia liotettiin 1 ml tolueenia, seosta lämmitettiin 20 minuuttia 130 °C ja muodostunut kiteytymä suodatettiin. Saanto 0,202g (24%) sulamispiste 239-241°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 3.66 (2H, C(=O)-CH₂, s), 7.12 (2H, Py-H₃, s, *J* = 7,37 Hz), 7.79 (2H, Py-H₅, t, *J* = 7,54 Hz), 8.07 (2H, Py-H₄, d, *J* = 8,31 Hz), 8.32 (2H, Py-H₂, d, *J* = 4,86 Hz), 10.36 (2H, NH, s).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 60.55, 113.34, 119.54, 138.19, 147.96, 151.65, 166.11.

8.7 Etyyli 3-okso-3-[(pyridin-2-yl)amino]propionaatti

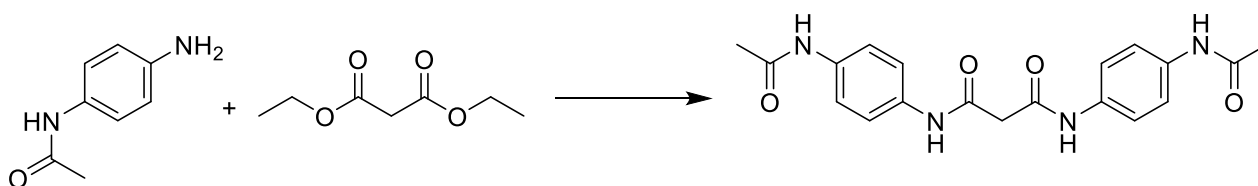


Kuva 8. Synteesi 7

0,5 g 2-aminopyridiiniä ja 2 ml dietyylimalonaattia liuotettiin 1 ml tolueenia ja seosta lämmitettiin 120 minuuttia 100 °C. TLC-levyllä erottui kolme eri yhdistettä. Seos jätettiin kiteytymään jääkaappiin yön ylitse, jonka jälkeen sakka eroteltiin liuoksesta. Kiinteä sakka osoittautui TLC-levyllä synteesin 6 kahdesti reagoineeksi tuotteeksi, liuoksesta erottuneet kaksi yhdistettä oletettiin reagoimattomaksi 2-aminopyridiiniksi ja tavoitteena olleeksi kerran reagoineeksi tuotteeksi.

Tolueeni poistettiin seoksesta rotavaporilla, jonka jälkeen tuote yritettiin kiteyttää haihduttamalla dietyylimalonaattia typpivirrassa. Tuote yritettiin myös saostaa lisäämällä siihen dietyylieetteriä ja laimeaa suolahappoa, mutta kiteytymää ei syntynyt tälläkään keinolla.

8.8 *N*¹,*N*³-bis(4-asetamidifenyyl)propanidiamidi

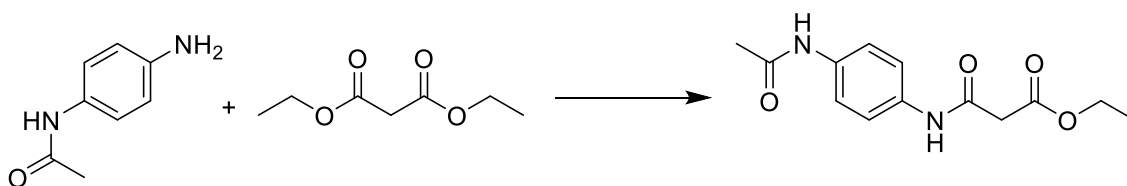


Kuva 9. Synteesi 8

0,5 g 4-aminoasetanilidia ja 0,5 ml dietyylimalonaattia liotettiin 1 ml tolueenia, seosta lämmitettiin 20 minuuttia 120 °C, jonka jälkeen kiteytynyt tuote suodatettiin. Saanto 0,436 g (38%), sulamispiste 295-297°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 2.01 (6H, CH₃, s), 3.30 (2H, C(=O)-CH_A, s), 3.42 (1H, C(=O)-CH_B, s), 7.50 (8H, Ph, s), 9.84 (2H, Ph-NH, s), 10.05 (2H, CH₂C(=O)NH, s).
¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 13.99, 60.53, 119.35, 119.45, 134.00, 134.15, 134.93, 165.08, 167.90.

8.9 Etyyli 3-(4-asetamidianiliini)-3-oksopropionaatti



Kuva 10. Synteesi 9

0,25 g 4-aminoasetaniliinia ja 1,0 ml dietyylimalonaattia liotettiin 1 ml tolueenia, seosta lämmitettiin 30 minuuttia 90 °C, jonka jälkeen kiteytynyt tuote suodatettiin. TLC-levyllä seoksesta erottui vain reagoimaton 1-aminoasetaniliini, joten seosta lämmitettiin vielä 30 minuuttia 110 °C. Suodatettu vaaleanpunertava sakka osoittautui spektrissä reagoimattomaksi lähtöaineeksi.

9 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Kaikki tutkimuksissa käytetyt reagenssit reagoivat dietyylimalonaatin kanssa, mutta vain aminopyridiineillä saatiin aikaan kerran reagoanut tuote. Kerran reagoimatta tuotetta yritettiin valmistaa laskemalla lämpötilaa ja pidentämällä reaktioaikaa, mutta aniliinijohdannaisia käytettäessä lopputuloksena saatiin aina joko kahdesti reagoanut tuote tai pelkkää lähtöainetta. Kynnys reagoimatta jättämisen ja kahdesti reagoimisen välillä näyttäisi olevan niin pieni, että sellaisten olosuhteiden löytäminen, jossa reaktio tapahtuisi vain kerran, on hankalaa.

Toinen projektissa ilmennyt ongelma oli onnistuneiden reaktioiden saattaminen loppuun. Lämmityksen jälkeen seokseen jäi melko paljon reagoimattomia lähtöaineita myös sellaisissa tapauksissa, joissa halutun tuotteen saamiseksi toista lähtöainetta oli käytetty ylimäärin. Reaktion jatkamisessa riski sille, että jo kerran reagoanut tuote reagoisi uudestaan, jolloin haluttu tuote muuttuisi kahdesti reagoineeksi sivutuotteeksi.

Haluttuja heteroaryyliamiineja saatiin valmistettua vain yhden reaktion avulla 3-aminopyridiiniä käytettäessä valmistetusta tuotteesta, johon 4-bromoaniliinin liittämisen ketjuun onnistui hyvin. Tämä osoittaisi, ettei kerran reagoineen tuotteen reaktio uuden lähtöaineen kanssa ole ongelma sen jälkeen, kun on saatu aikaan reaktioon sopiva molekyyli.

10 Yhteenveto

Vaikka tutkimuksessa tavoiteltujen valmiiden heteroaryyliamidien syntetisointi jäikin vähäiseksi, saatiin siitä kuitenkin tietoa vastaavien synteesien kokeilua varten. Tarvittavien välituotteiden syntetisoinnissa aminopyridiinit toimivat aniliinijohdannaisia paremmin, joten jatkossa synteesiä kannattanee koettaa vastaavien yhdisteiden pohjalta.

Madaltamalla lämpötilaa ja pidentämällä reaktioaikaa voidaan edesauttaa kerran tapahtuvaa reaktiota dietyylimalonaattimolekyyliä kohden, mutta ylimäärää dietyylimalonaattia käytettäessä tulisi huomioida tuotteen mahdollinen liukeneminen siihen, jollei luotettavaa saostuskeinoa ole käytettävissä.

11 Liitteet

Liite 1. Synteesin 1 NMR-spektrit

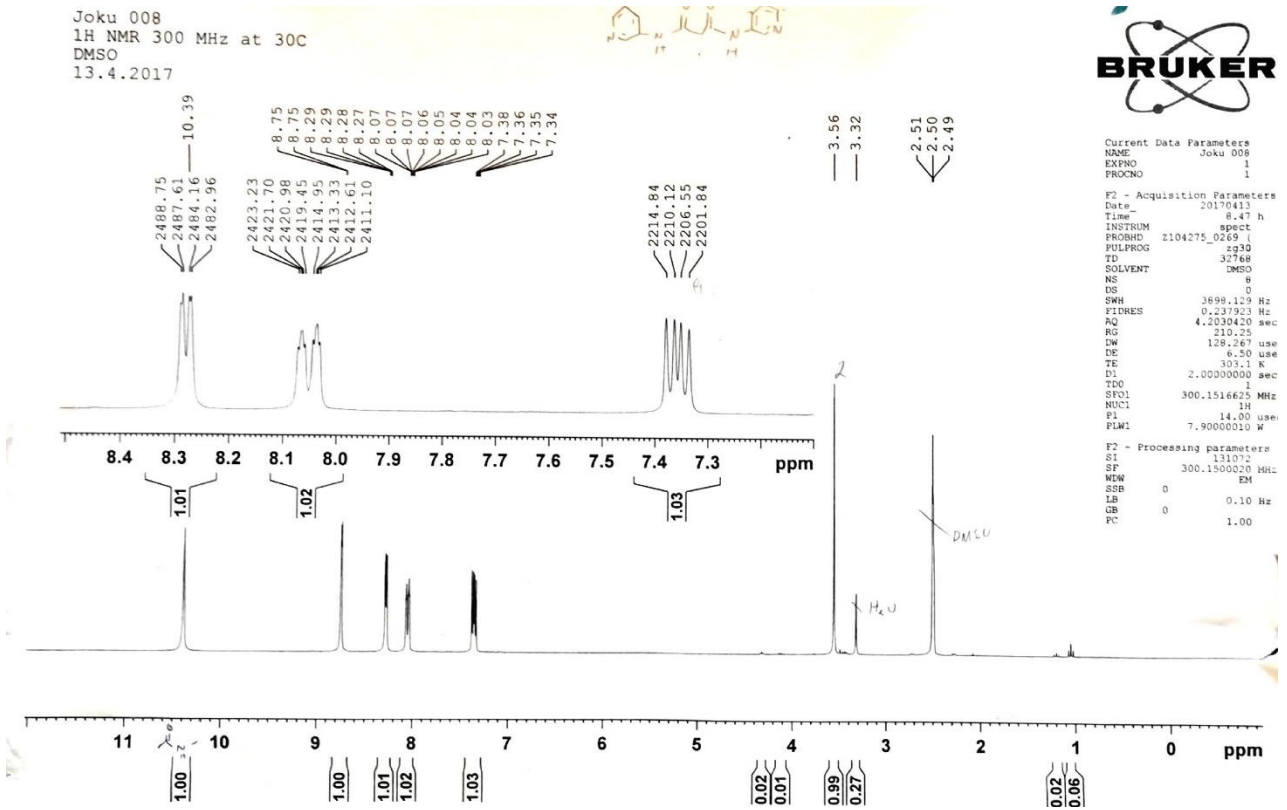
Liite 2. Synteesin 2 NMR-spektrit

Liite 3. Synteesin 3 NMR-spektrit

Liite 4. Synteesin 4 NMR-spektri

Liite 5. Synteesin 6 NMR-spektrit

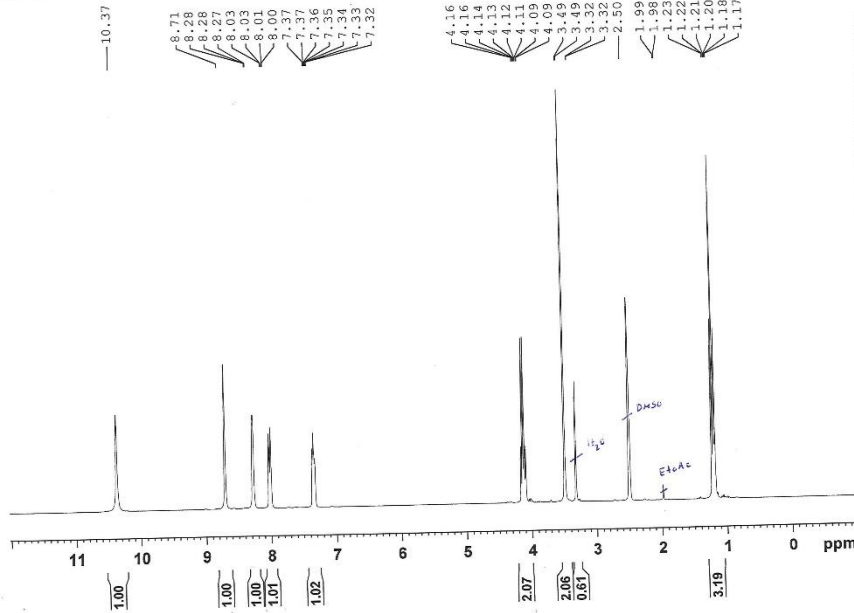
Liite 6. Synteesin 8 NMR-spektrit



Kuva 10. Yhdiste 1 (1H 300 MHz)

LIITE 2

Joku 001
 1H NMR 300 MHz at 30C
 DMSO
 21.3.2017



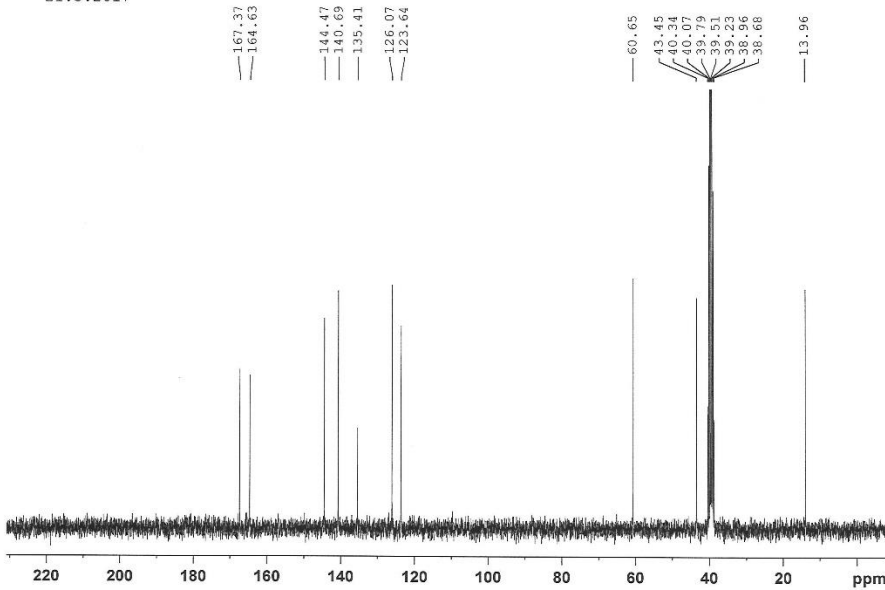
Current Data Parameters
 NAME Joku 001
 EXPHO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20170321
 Time 8.09 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z104275_0269 ()
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 8
 DS 0
 SWH 3898.129 Hz
 FIDRES 0.237923 Hz
 AQ 4.2030420 sec
 RG 151.8
 DW 128.267 usec
 DE 6.50 usec
 TE 303.2 K
 D1 2.0000000 sec
 TD0 1
 SF01 300.1516625 MHz
 NUC1 1H
 P1 14.00 usec
 PLW1 7.90000010 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 300.1500031 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Kuva 11. Yhdiste 2 (1H 300 MHz)

Joku 001
 13C NMR 300 MHz at 30C
 DMSO
 21.3.2017

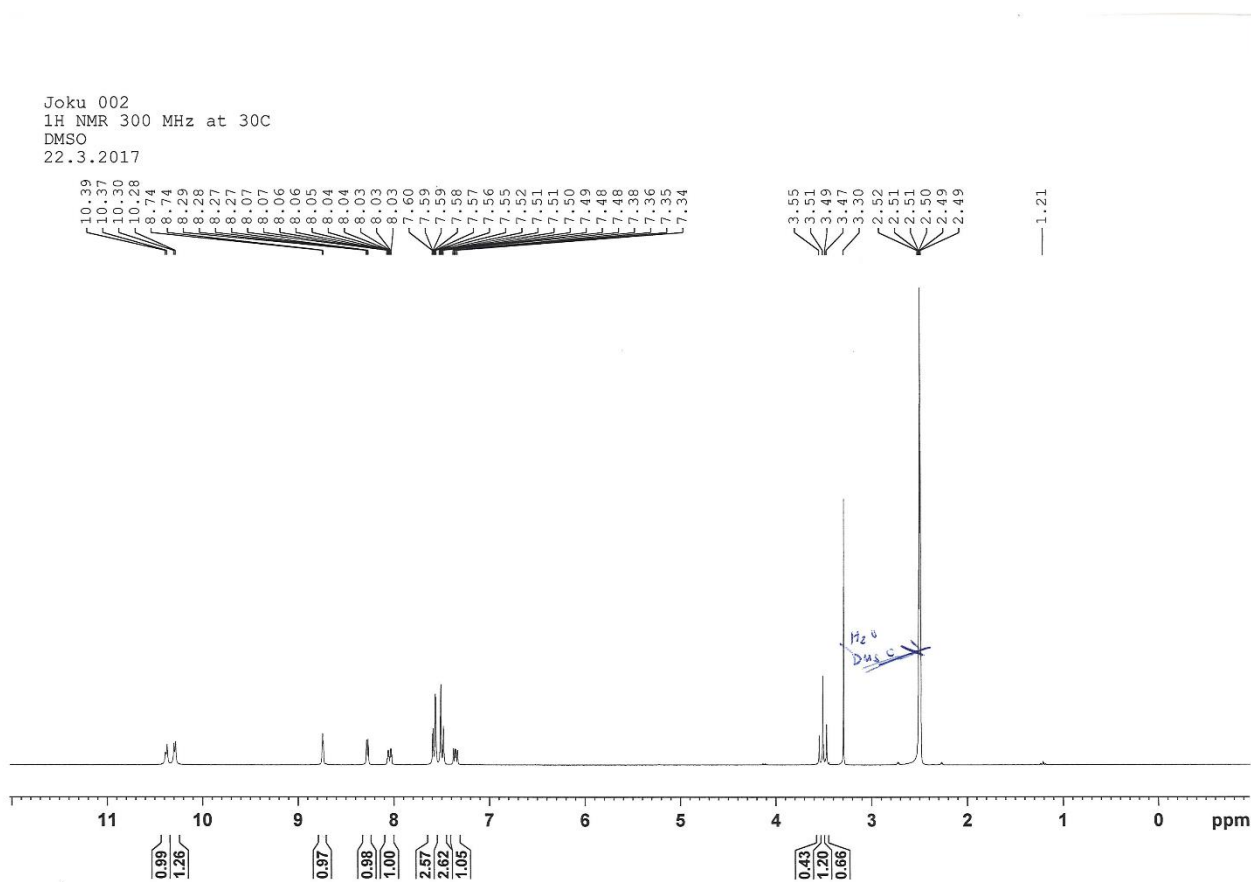


Current Data Parameters
 NAME Joku 001
 EXPHO 100
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20170321
 Time 8.22 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z104275_0269 ()
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 130
 DS 0
 SWH 18028.846 Hz
 FIDRES 0.550197 Hz
 AQ 1.6175317 sec
 RG 210.25
 DW 27.733 usec
 DE 6.50 usec
 TE 303.2 K
 D1 2.0000000 sec
 D11 0.0300000 sec
 TD0 1024
 SF01 75.4812305 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 31.98900032 W
 SF02 300.1530015 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 90.00 usec
 PLW2 7.90000010 W
 PLW12 0.15019999 W
 PLW13 0.12166000 W

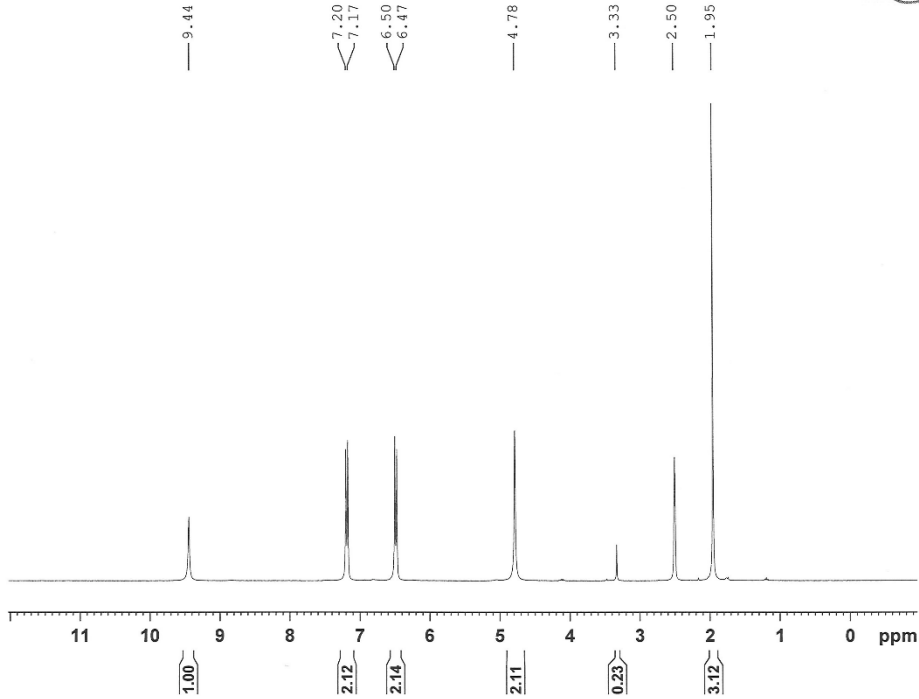
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 75.4728164 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Kuva 12. Yhdiste 2 (13C 300 MHz)



Kuva 13. Yhdiste 3 (1H 300 MHz)

Joku 007
 1H NMR 300 MHz at 30C
 DMSO
 10.4.2017

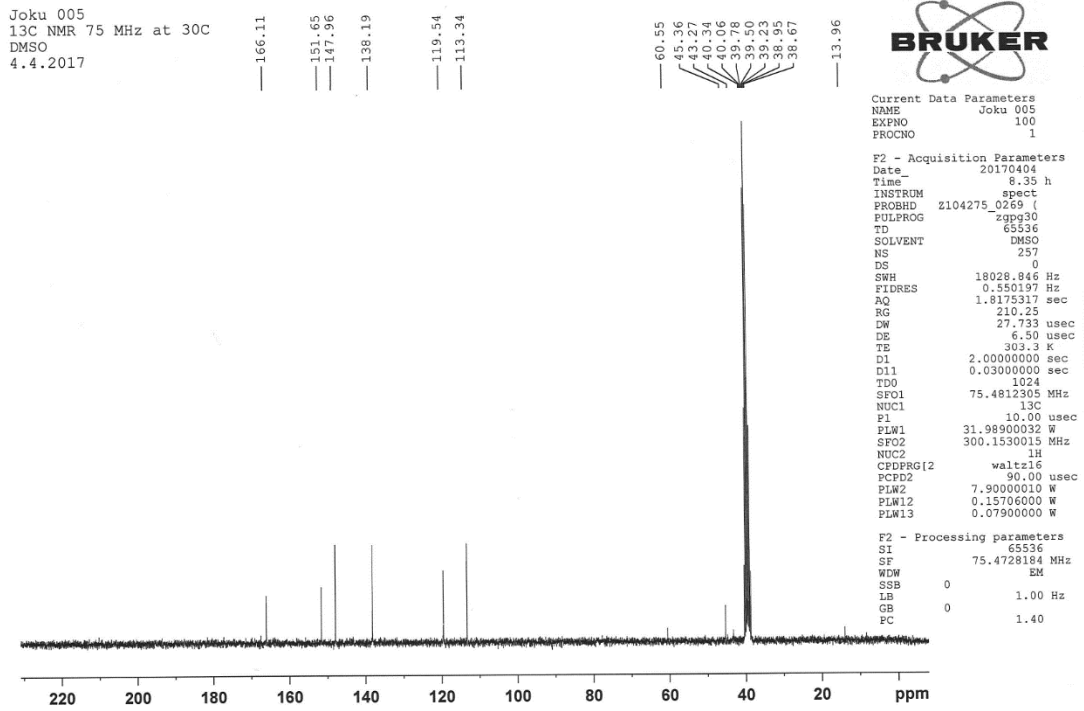


Current Data Parameters
 NAME Joku 007
 EXPNO 1
 PROCNO 1

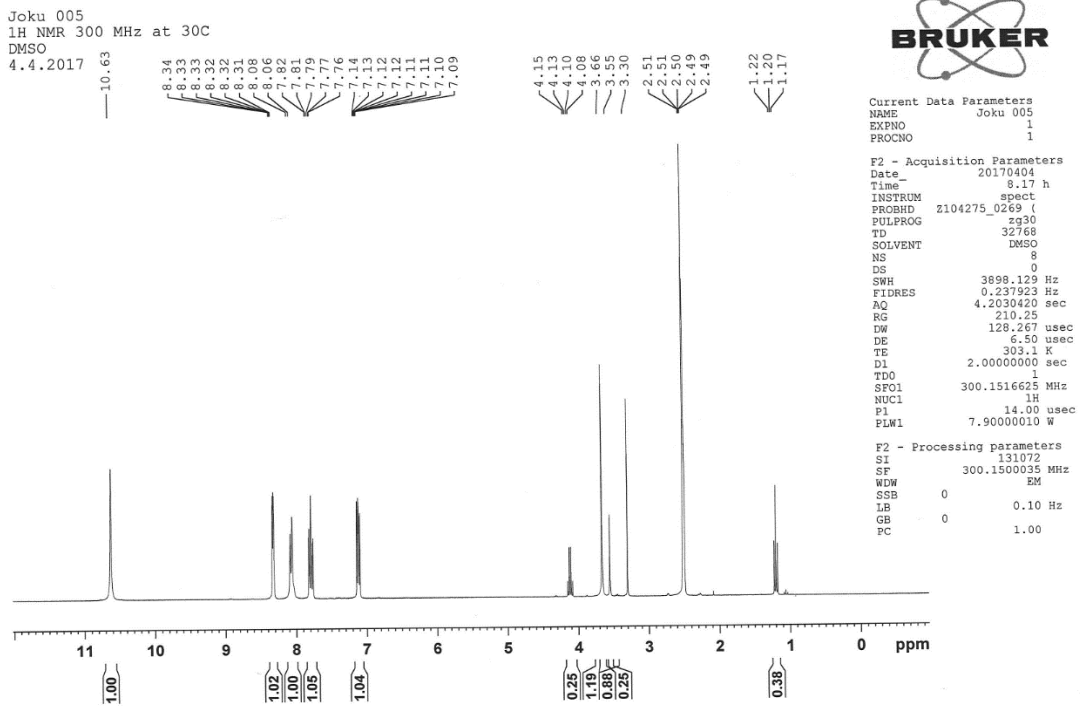
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170410
 Time 9.00 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z104275_0269 ()
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 4
 DS 0
 SWH 3898.129 Hz
 FIDRES 0.237923 Hz
 AQ 4.2030420 sec
 RG 166.71
 DW 128.267 usec
 DE 6.50 usec
 TE 303.1 K
 D1 2.00000000 sec
 TDO 1
 SFO1 300.1516625 MHz
 NUC1 1H
 P1 14.00 usec
 PLW1 7.90000010 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 300.1500012 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

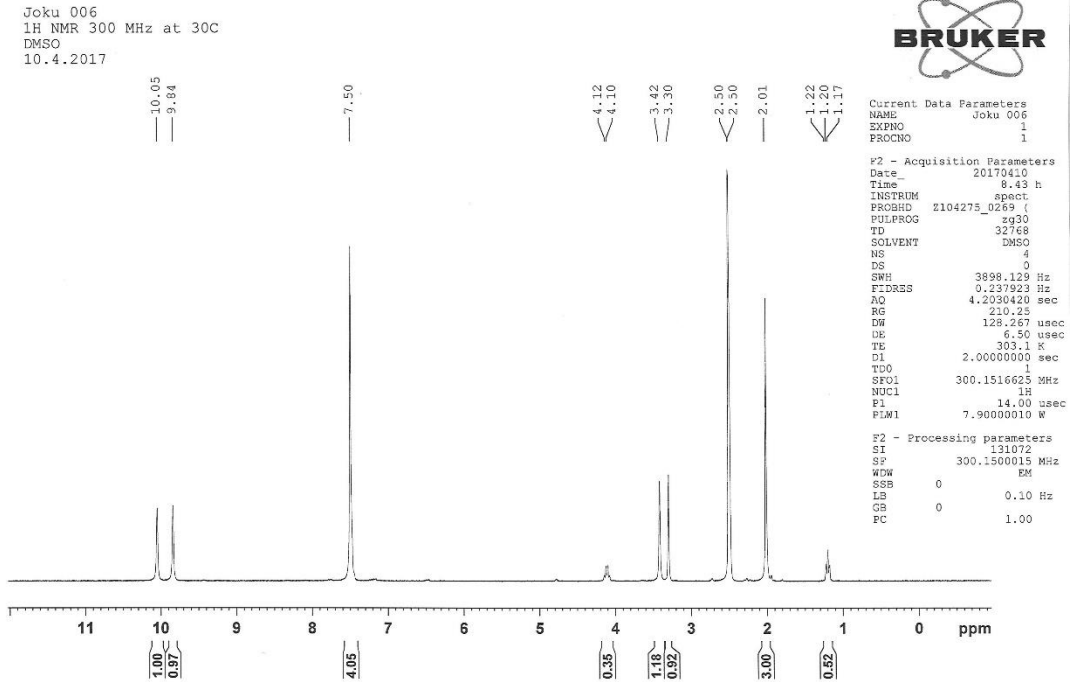
Kuva 14. Yhdiste 4 (1H 300 MHz)



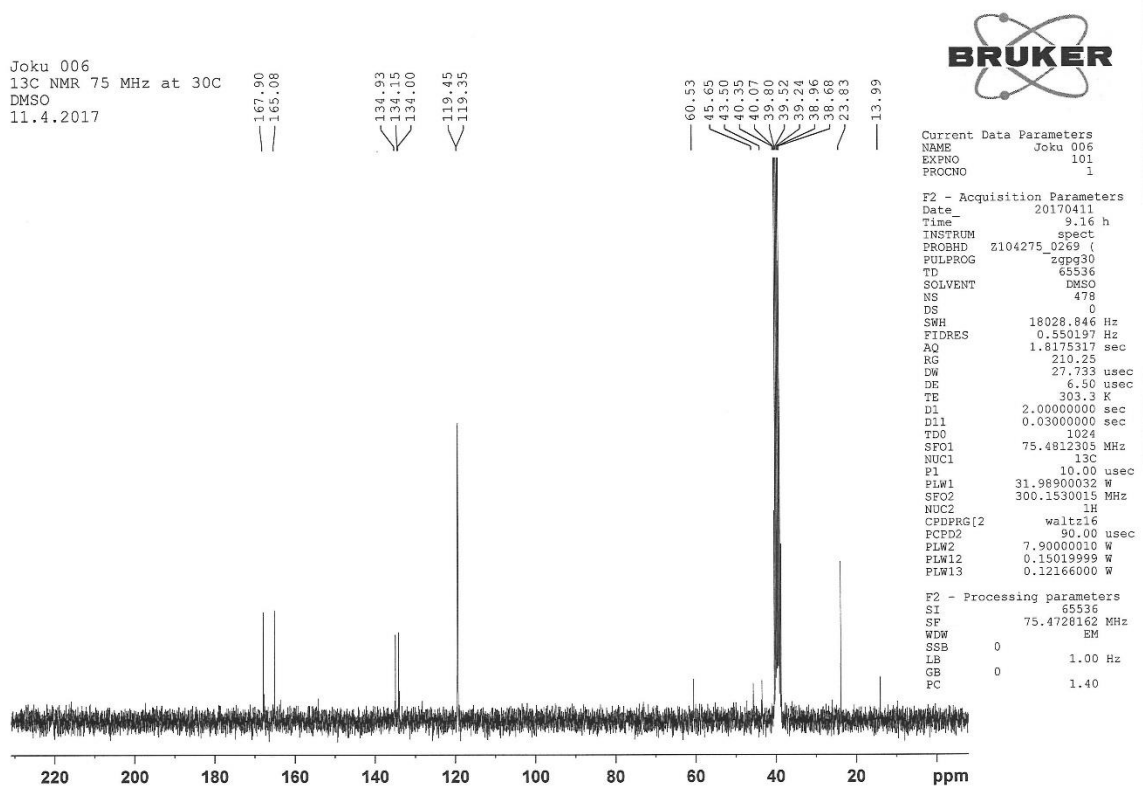
Kuva 15. Yhdiste 6 (1H 300 MHz)



Kuva 15. Yhdiste 6 (13C 300 MHz)



Kuva 16. Yhdiste 8 (1H 300 MHz)



Kuva 17. Yhdiste 8 (13C 300 MHz)

12 Kirjallisuusluettelo

1. Segneanu, A.; Velciov, S. M.; Olariu, S.; Cziplé, F.; Damian, D. ja Grozescu, I., Bioactive Molecules Profile from Natural Compounds. Teoksessa: *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal*, InTech, 2017.
2. Cheng, W. H.; Cao, B.; Shang, H.; Niu, C.; Zhang, L. M.; Zhang, Z. H.; Tian, D. L.; Zhang, S.; Chen, H. ja Zou, Z. M., Synthesis and evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 85, 498–507.
3. Brana, M. F.; Cacho, M.; Gradillas, A.; de Pascual-Teresa, B. ja Ramos, A., Intercalators as Anticancer Drugs, *Curr. Pharm. Des.*, **2001**, 7.
4. Li, F.; Cui, J.; Guo, L.; Qian, X.; Ren, W.; Wang, K. ja Liu, F., Molecular design, chemical synthesis, and biological evaluation of "4-1" pentacyclic aryl/heteroaryl-imidazonaphthalimides, *Bioorganic Med. Chem.*, **2007**.
5. Berg, J. M. (Jeremy M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. ja Stryer, L., *Biochemistry*, W.H. Freeman, 2002.
6. Murphy, J. M.; Farhan, H. ja Evers, P. A., Bio-Zombie: The rise of pseudoenzymes in biology, *Biochem. Soc. Trans.*, **2017**.
7. Deininger, M. W. N. ja Druker, B. J., Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib, *Pharmacol. Rev.*, **2003**, 55, 401–423.
8. Benchokroun, Y.; Couprie, J. ja Larsen, A. K., Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, 49, 305–313.
9. Gududuru, V.; Hurh, E.; Dalton, J. T. ja Miller, D. D., Synthesis and antiproliferative activity of 2-aryl-4-oxo-thiazolidin-3-yl- amides for prostate cancer, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2004, ss. 5289–5293.
10. Porter, J.; Payne, A.; Whitcombe, I.; de Candole, B.; Ford, D.; Garlish, R.; Hold, A.; Hutchinson, B.; Trevitt, G.; Turner, J.; Edwards, C.; Watkins, C.; Davis, J. ja Stubberfield, C., Atropisomeric small molecule Bcl-2 ligands: Determination of bioactive conformation, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 1767–1772.
11. Mahesh, S.; Tang, K. C. ja Raj, M., Amide bond activation of biological molecules,

Molecules, **2018**, *23*.

12. Benchokroun, Y.; Couprie, J. ja Larsen, A. K., Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *49*, 305–313.
13. Barasa, L. ja Yoganathan, S., An efficient one-pot conversion of carboxylic acids into benzimidazoles via an HBTU-promoted methodology, *RSC Adv.*, **2018**, *8*, 35824–35830.
14. Wang, W. H.; Zhong, H.; Guo, D. F. ja Liu, G. Y., Synthesis and Bioactivity of poly N-phenylene-N'-aroylthiourea, *Appl. Mech. Mater.*, **2013**, *341–342*, 351–354.
15. Yang, B.; Hird, A. W.; Bodnarchuk, M. S.; Zheng, X.; Dakin, L.; Su, Q.; Daly, K.; Godin, R.; Hattersley, M. M.; Brassil, P.; Redmond, S.; John Russell, D. ja Janetka, J. W., Heteroarylamide smoothed inhibitors: Discovery of N-[2,4-dimethyl-5-(1-methylimidazol-4-yl)phenyl]-4-(2-pyridylmethoxy)benzamide (AZD8542) and N-[5-(1H-imidazol-2-yl)-2,4-dimethyl-phenyl]-4-(2-pyridylmethoxy)benzamide (AZD7254), *Bioorganic Med. Chem.*, **2020**, *28*, 115227.
16. Zhu, L.-F.; Hou, Z.; Zhou, K.; Tong, Z.-B.; Kuang, Q.; Geng, H.-L. ja Zhou, L., Synthesis, bioactivity and structure–activity relationships of new 2-aryl-8-OR-3,4-dihydroisoquinolin-2-iums salts as potential antifungal agents, *26*, 2016.
17. Queiroz, M.-J. R. P.; Peixoto, D.; Calhelha, R. C.; Soares, P.; dos Santos, T.; Lima, R. T.; Campos, J. F.; Abreu, R. M. V.; Ferreira, I. C. F. R. ja Vasconcelos, M. H., New di(hetero)arylethers and di(hetero)arylamines in the thieno[3,2-b]pyridine series: Synthesis, growth inhibitory activity on human tumor cell lines and non-tumor cells, effects on cell cycle and on programmed cell death, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *69*, 855–862.
18. Ravindra, M.; Wilson, M. R.; Tong, N.; O'Connor, C.; Karim, M.; Polin, L.; Wallace-Povirk, A.; White, K.; Kushner, J.; Hou, Z.; Matherly, L. H. ja Gangjee, A., Fluorine-Substituted Pyrrolo[2,3- d]Pyrimidine Analogues with Tumor Targeting via Cellular Uptake by Folate Receptor α and the Proton-Coupled Folate Transporter and Inhibition of de Novo Purine Nucleotide Biosynthesis, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, 4228–4248.
19. Wang, Y. R.; Chen, S. F.; Wu, C. C.; Liao, Y. W.; Lin, T. S.; Liu, K. T.; Chen, Y. S.; Li, T. K.; Chien, T. C. ja Chan, N. L., Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry, *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, 10861–10871.

20. Zhang, Y.; Luo, X. Y.; Wu, D. H. ja Xu, Y., ROR nuclear receptors: Structures, related diseases, and drug discovery, *Acta Pharmacol. Sin.*, **2015**, *36*, 71–87.
21. Watters, R. J.; Wang, H.; Sung, S.; Loughran, T. P. ja Liu, X., Targeting Sphingosine-1-Phosphate Receptors in Cancer, **2011**, 810–817.
22. Buzard, D. J.; Thatte, J.; Lerner, M.; Edwards, J. ja Jones, R. M., Recent progress in the development of selective S1P1 receptor agonists for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2008**, *18*, 1141–1159.
23. Sivaprakasam, P.; Han, X.; Civiello, R. L.; Jacutin-Porte, S.; Kish, K.; Pokross, M.; Lewis, H. A.; Ahmed, N.; Szapiel, N.; Newitt, J. A.; Baldwin, E. T.; Xiao, H.; Krause, C. M.; Park, H.; Nophsker, M.; Lippy, J. S.; Burton, C. R.; Langley, D. R.; Macor, J. E. ja Dubowchik, G. M., Discovery of new acylaminopyridines as GSK-3 inhibitors by a structure guided in-depth exploration of chemical space around a pyrrolopyridinone core, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 1856–1863.
24. Yang, B.; Hird, A. W.; Russell, D. J.; Fauber, B. P.; Dakin, L. A.; Zheng, X.; Su, Q.; Godin, R.; Brassil, P.; Devereaux, E. ja Janetka, J. W., Discovery of novel hedgehog antagonists from cell-based screening: Isosteric modification of p38 bisamides as potent inhibitors of SMO, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 4907–4911.
25. El-Gamal, M. I.; Anbar, H. S.; Yoo, K. H. ja Oh, C. H., FMS Kinase Inhibitors: Current Status and Future Prospects, *Med. Res. Rev.*, **2013**, *33*, 599–636.
26. Manthey, C. L.; Johnson, D. L.; Illig, C. R.; Tuman, R. W.; Zhou, Z.; Baker, J. F.; Chaikin, M. A.; Donatelli, R. R.; Franks, C. F.; Zeng, L.; Crysler, C.; Chen, Y.; Yurkow, E. J.; Boczon, L.; Meegalla, S. K.; Wilson, K. J.; Wall, M. J.; Chen, J.; Ballentine, S. K.; Ott, H.; Baumann, C.; Lawrence, D.; Tomczuk, B. E. ja Molloy, C. J., JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia, *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, *8*, 3151–3161.
27. Meegalla, S. K.; Wall, M. J.; Chen, J.; Wilson, K. J.; Ballentine, S. K.; DesJarlais, R. L.; Schubert, C.; Crysler, C. S.; Chen, Y.; Molloy, C. J.; Chaikin, M. A.; Manthey, C. L.; Player, M. R.; Tomczuk, B. E. ja Illig, C. R., Structure-based optimization of a potent class of arylamide FMS inhibitors, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 3632–3637.
28. Bellina, F. ja Rossi, R., Synthesis and biological activity of pyrrole, pyrroline and pyrrolidine

derivatives with two aryl groups on adjacent positions, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 7213–7256.

29. Clayden, J.; Greeves, N. ja Warren, S. G., *Organic Chemistry*, 2. painos, Oxford University Press, Oxford, 2012.
30. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L. ja Rousell, J., The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 279–282.