

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Syntetické štúdie vedúce k látkam interagujúcim s CAR
receptormi

Hradec Králové, 2018

Norbert Palša

Pod'akovanie

Chcel by som sa poďakovať svojmu školiteľovi, PharmDr. Marcelovi Špulákovi, Ph.D. a konzultantke Mgr. Zuzane Ranii Brožovej z Katedry organickej a bioorganickej chémie, pracovníkom NMR analýzy Katedry organickej a bioorganickej chémie, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Jane Maříkovej, paní Ive Vencovskej za zmeranie IR spektier, skupine prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. z Katedry farmakológie a toxikológie za vykonanie biologického testovania a v neposlednom rade rodine a blízkym za podporu a trpezlivosť.

Prehlasujem, že diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Norbert Palša

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Norbert Palša

Školiteľ: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Názov diplomovej práce: Syntetické štúdie vedúce k látkam interagujúcim s CAR receptormi

CAR ako jeden z xenobiotických nukleárných receptorov ovplyvňuje rad xenobiotických, ako aj telu vlastných metabolických dejov cestou expresie génov metabolických enzýmov. Keďže doteraz nebol objavený striktný CAR agonista, ktorý by neovplyvňoval aj príbuzné receptory, je snaha o nájdenie takejto zlúčeniny.

Diplomová práca bola zameraná na syntézu derivátov chinazolínu, ktoré boli po predchádzajúcej príprave 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-olu, ako modelovej molekuly ligandu CAR, nádejnou skupinou látok s potenciálnym aktivačným účinkom na CAR – konkrétnymi syntetizovanými látkami boli amidy karboxylových kyselín pripravené reakciou s 2-aminobenzonitrilom, deriváty chinazolín-4-olu, chinazolín-4-tiolu, 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Norbert Palša

Supervisor: PharmDr. Marcel Špulák, PhD.

Title of the Diploma Thesis: Synthetic studies leading to CAR receptor agonists

CAR, which belongs to the family of xenobiotic nuclear receptors, affects xenobiotic and endogenic metabolic processes via metabolic enzyme genes expression. Since up to this day there is no available agonist which would activate CAR strictly without having an effect on similar nuclear receptors, thus, the effort to find such a compound is still ongoing.

The aim of this diploma thesis was the synthesis of quinazoline derivatives, which, after previous preparation of 2-(3-methoxyphenyl)quinazoline-4-ol, a CAR agonist model compound, proved to be a promising group of chemical species with potential CAR activation effect – target compounds included amides of carboxylic acids via reaction with 2-aminobenzonitrile, derivatives of quinazoline-4-ol, quinazoline-4-thiol, 4-methoxyquinazoline and 3-methyl-3,4-dihydroquinazoline-4-one.

OBSAH

Pod'akovanie	2
ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
OBSAH	5
1. ÚVOD	7
1.1. Konštitutívny androstanový receptor (Constitutive Androstane Receptor, CAR, NR1I3)	8
1.1.1. Stavba	11
1.1.2. Aktivácia CAR	14
1.1.3. Funkcie CAR v organizme	17
1.2. Ligandy konštitutívneho androstanového receptora	23
1.2.1. CITCO	28
1.2.2. 2,4-disubstituované chinazolíny	30
2. CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE	32
3. TEORETICKÁ ČASŤ	34
3.1. Príprava chloridu karboxylovej kyseliny	34
3.2. Syntéza <i>N</i> -(2-kyanofenyl)arylamidov	35
3.3. Cyklizácia amidov na substituované chinazolín-4-oly	36
3.4. Syntéza derivátov chinazolín-4-tiolu	37
3.5. Syntéza derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu	38
4. MATERIÁLY A METÓDY	39
5. DISKUSIA A VÝSLEDKY	40
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	48
6.1. Syntéza <i>N</i> -(2-kyanofenyl)arylamidov	48
6.1.1. <i>N</i> -(2-kyanofenyl)-4-(metylsulfanyl)benzamid	48
6.1.2. <i>N</i> -(2-kyanofenyl)-4-(<i>terc</i> -butyl)benzamid	50
6.1.3. <i>N</i> -(2-kyanofenyl)-4-(trifluórmetoxy)benzamid	51
6.1.4. <i>N</i> -(2-kyanofenyl)-3-fluórbenzamid	52
6.1.5. 3-bróm- <i>N</i> -(2-kyanofenyl)-izonikotínamid	53
6.2. Príprava derivátov 4-hydroxychinazolínu	55
6.2.1. 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-ol	55
6.2.2. 2-[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]chinazolín-4-ol	57
6.2.3. 2-[4-(trifluórmetoxyl)fenyl]chinazolín-4-ol	58
6.2.4. 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ol	59
6.2.5. 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ol	61

6.3.	Príprava derivátov 4-sulfonylchinazolínu	62
6.3.1.	2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-tiol.....	62
6.3.2.	2-[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]chinazolín-4-tiol	64
6.3.3.	2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-tiol.....	66
6.3.4.	2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-tiol.....	68
6.3.5.	2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-tiol	70
6.4.	Príprava derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu 71	
6.4.1.	2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]-4-metoxychinazolín	71
6.4.2.	2-[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]-4-metoxychinazolín a 2[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]-3- metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón	73
6.4.3.	2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]-4-metoxychinazolín a 2-[4- (trifluórmetoxy)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón.....	75
6.4.4.	2-(3-fluórfenyl)-4-metoxychinazolín a 2-(3-fluórfenyl)-3-metyl-3,4- dihydrochinazolín-4-ón.....	77
6.4.5.	2-(3-brómpyridín-4-yl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón	79
7.	ZÁVER	80
8.	ZOZNAM OBRÁZKOV A SCHÉM.....	82
9.	ZOZNAM TABULIEK	84
10.	ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK	85
11.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	88

1. ÚVOD

Táto diplomová práca je súčasťou širšieho výskumu zameraného na hľadanie nových zlúčenín, ktoré by mohli byť špecifickými ligandmi CAR receptora. Je známe, že tento receptor ovplyvňuje metabolizmus mnohých xenobiotík, no doteraz sa medzi jeho ligandmi nepodarilo nájsť zlúčeniny, ktoré by mali afinitu výlučne k CAR receptoru a neovplyvňovali iné nukleárne receptory¹. Takéto látky by mali potenciál presnejšie vysvetliť funkcie CAR receptora, ako aj stať sa cieľom ďalších štúdií zlúčenín pôsobiacich na tento receptor.

1.1. Konštitutívny androstanový receptor (Constitutive Androstane Receptor, CAR, NR1I3)

Ľudský CAR receptor (NR1I3, hCAR) bol prvýkrát objavený v roku 1994, kedy bol aj vďaka jeho nezisteným fyziologickým ligandom označený ako sirotsky resp. „orphan“ receptor MB67^{1,2}. Patrí do superrodiny nukleárných receptorov, konkrétne do podrodiny 1 – podobné receptoru tyroidného hormónu, pričom je to tretí člen skupiny I – podobné receptoru vitamínu D (Tab. 1). V tejto skupine sa okrem neho nachádza aj VDR (NR1I1, Vitamin D Receptor) a PXR (NR1I2, Pregnane X Receptor)^{1,2}. Okrem hCAR a jeho ďalších 24 splice variantov boli analogicky objavené aj príklady CAR v iných živočíšnych druhoch – experimentálne boli napríklad objavené mRNA varianty CAR v tkanivách potkanov (rCAR WT – wild type – a ďalších 5 splice variantov SV1-5 nachádzajúcich sa v potkanej pečeni, rCAR WT exprimovaná v pečeni a tenkom čreve, rCAR SV5 v pečeni a pľúcach)³, myši (mCAR a 5 splice variantov v pečeni)⁴ a iných druhoch^{5,6}.

Väzba špecifických malých ligandov spúšťa konformačné zmeny nukleárných receptorov, pričom táto umožňuje ďalšiu väzbu kofaktorov a cis-regulačných promótorových sekvencií DNA, nazývaných aj HRE (hormone response element), čím spúšťajú transkripciu rôznych génov⁷. Tieto receptory spolu s mnohými ďalšími receptormi a proteínmi označujeme ako transkripčné faktory. Niektoré z génov regulujú metabolizmus xenobiotických látok – xenobiotické metabolické enzýmy a transportné molekuly niektorých liečiv – receptory, ktorých aktivácia reguluje expresiu týchto génov, označujeme pojmom „xenobiotické receptory“, resp. „xenosenzory“. Vďaka tomu bol v roku 1998 CAR zaradený medzi xenosenzory, kde zaujal miesto popri PXR a AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor)⁸, ktorý, ale, radíme do rodiny helix-loop-helix transkripčných faktorov⁹.

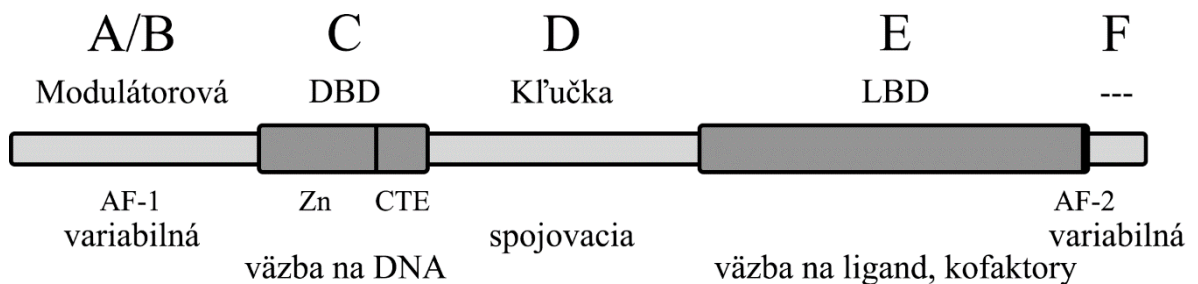
Tab. 1: Rozdelenie nukleárných receptorov^{10,11}

	Podrodina	Skupina	Člen			
			NRNC ¹⁰	Skratka	Meno	
1	Thyroid Hormone Receptor-like	A	Thyroid hormone receptor	NR1A1	TR α	Thyroid Hormone Receptor- α
				NR1A2	TR β	Thyroid Hormone Receptor - β
	B	Retinoic acid receptor	NR1B1	RAR α	Retinoic Acid Receptor- α	
			NR1B2	RAR β	Retinoic Acid Receptor- β	
			NR1B3	RAR γ	Retinoic Acid Receptor- γ	
	C	Peroxisome proliferator-activated receptor	NR1C1	PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor- α	
			NR1C2	PPAR- β/δ	Peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ	
			NR1C3	PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ	
	D	Rev-ErbA	NR1D1	Rev-ErbA α	Rev-ErbA α	
			NR1D2	Rev-ErbA β	Rev-ErbA β	
	F	RAR-related orphan receptor	NR1F1	ROR α	RAR-related orphan receptor- α	
			NR1F2	ROR β	RAR-related orphan receptor- β	
			NR1F3	ROR γ	RAR-related orphan receptor- γ	
	H	Liver X receptor-like	NR1H3	LXR α	Liver X receptor- α	
			NR1H2	LXR β	Liver X receptor- β	
			NR1H4	FXR	Farnesoid X receptor	
			NR1H5	FXR- β	Farnesoid X receptor- β	
	I	Vitamin D receptor-like	NR1I1	VDR	Vitamin D receptor	
			NR1I2	PXR	Pregnane X receptor	
			NR1I3	CAR	Constitutive androstane receptor	
X	NRs with two DNA binding domains	NR1X1	2DBD-Nr α			
		NR1X2	2DBD-NR β			
		NR1X3	2DBD-NR γ			
2	Retinoid X Receptor-like	A	Hepatocyte nuclear factor-4	NR2A1	HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor-4- α
				NR2A2	HNF4 γ	Hepatocyte nuclear factor-4- γ
	B	Retinoid X receptor	NR2B1	RXR α	Retinoid X receptor- α	
			NR2B2	RXR β	Retinoid X receptor- β	
			NR2B3	RXR γ	Retinoid X receptor- γ	
	C	Testicular receptor	NR2C1	TR2	Testicular receptor 2	
			NR2C2	TR4	Testicular receptor 4	

		E	TLX/PNR	NR2E1	TRX	Homologue of the Drosophila tailless gene
				NR2E3	PNR	Photoreceptor cell-specific nuclear receptor
		F	COUP/EAR	NR2F1	COUP- TFI	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I
				NR2F2	COUP- TFII	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II
				NR2F6	EAR-2	V-erbA-related
3	Estrogen receptor-like	A	Estrogen receptor	NR3A1	ER α	Estrogen receptor- α
				NR3A2	ER β	Estrogen receptor- β
	B	Estrogen related receptor	NR3B1	ERR α	Estrogen related receptor- α	
			NR3B2	ERR β	Estrogen related receptor- β	
			NR3B3	ERR γ	Estrogen related receptor- γ	
	C	3-ketosteroid receptors	NR3C1	GR	Glucocorticoid receptor	
			NR3C2	MR	Mineralocorticoid receptor	
NR3C3			PR	Progesterone receptor		
NR3C4			AR	Androgen receptor		
4	Nerve growth factor IB-like	A	NGFIB/NURR1/ NOR1	NR4A1	NGFIB	Nerve growth factor IB
				NR4A2	NURR1	Nuclear receptor related 1
				NR4A3	NOR1	Neuron-derived orphan receptor 1
5	Steroidogenic factor-like	A	SF1/LRH1	NR5A1	SF1	Steroidogenic factor 1
				NR5A2	LRH1	Liver receptor homolog 1
6	Germ cell nuclear factor-like	A	GCNF	NR6A1	GCNF	Germ cell nuclear factor
0	Miscellaneous	B	DAX/SHP	NR0B1	DAX1	Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene 1
				NR0B2	SHP	Small heterodimer partner

1.1.1. Stavba

hCAR je bielkovina exprimovaná hlavne v hepatocytoch a bunkách tenkého čreva. Jej hlavná izoforma hCAR1 (CAR1, hCAR SV1, hCAR WT) pozostáva z 348 aminokyselín¹, ktoré sú usporiadané do štruktúrnych celkov – domén – plniacich špecifické funkcie. Všeobecne obsahujú nukleárne receptory variabilné domény (A/B, D a F) a domény, vďaka ktorým interagujú s ich špecifickými ligandmi a DNA (C – DBD, E – LBD)². Dĺžka aminokyselín domén NR v rámci hCAR1 v poradí od N do C konca je: 7 aminokyselín (1-7) A/B domény, 76 aminokyselín (8-83) C domény – DBD (DNA-binding domain), 19 aminokyselín (84-102) D domény – kľučky a 246 aminokyselín (103-348) E domény – LBD (ligand binding domain). F doména, ktorá je ďalšou možnou variabilnou doménou nukleárných receptorov, sa v CAR nenachádza¹².



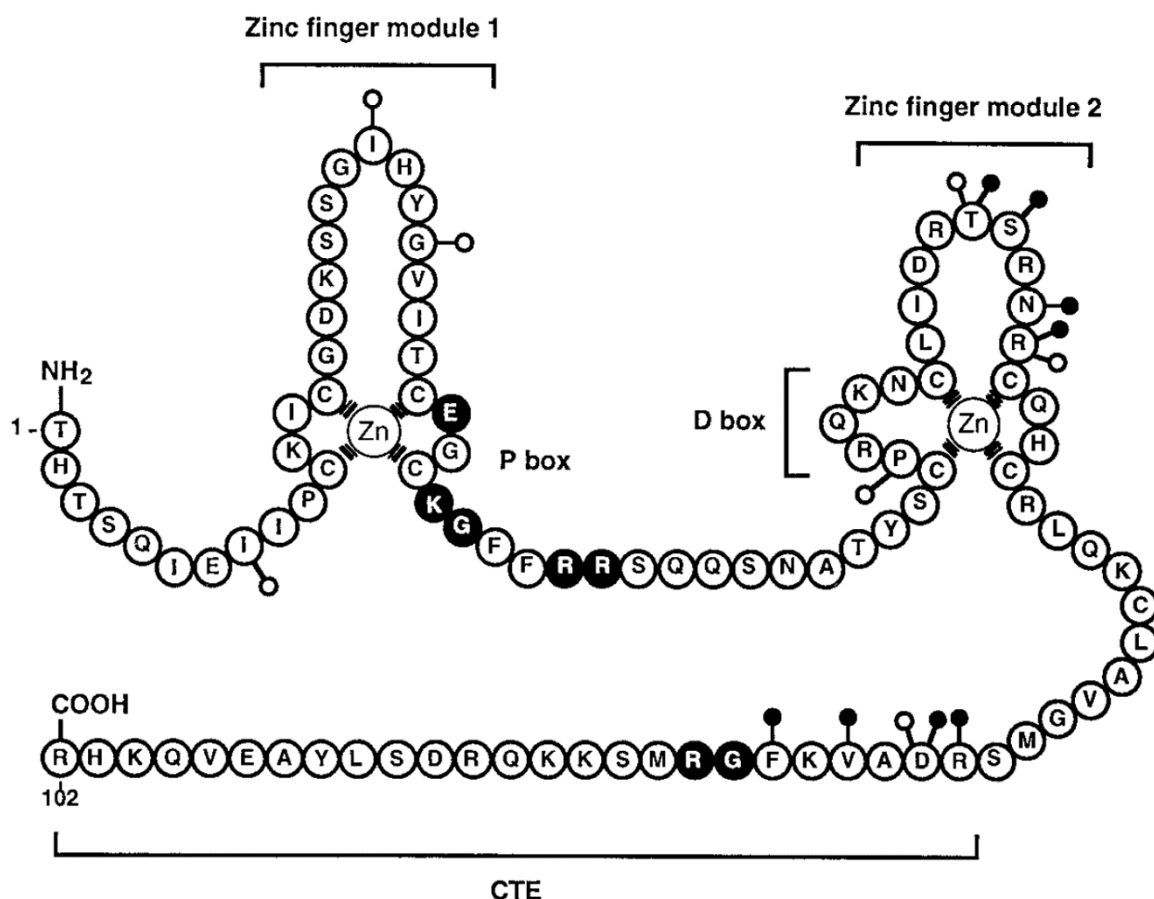
Obr. 1: Obecná štruktúra nukleárných receptorov – domény².

Modulátorová doména (A/B doména)

Modulátorová doména, ktorá je často označovaná ako doména A/B, v rámci nukleárných receptorov vykazuje najväčšiu variabilitu dĺžky aj primárnej sekvencie aminokyselinového reťazca. Často obsahuje transkripčnú aktivačnú funkciu AF-1, ktorá je nezávislá na prítomnosti ligandu.

C doména (DBD)

DBD je doména rozpoznávajú špecifické sekvencie promótorovej DNA. Obsahuje podštruktúry viažuce zinok, ktorých oblasť je v nukleárných receptoroch kódovaná 66-70 aminokyselinami, a oblasť CTE (carboxy-terminal extension) zložená z približne 25 aminokyselín. DBD bola neskôr rozdelená na subdomény, ktoré rozlišujú jednotlivé kľúčové sekvencie (P-box) a determinanty dimerizácie (D-, DR-box). CTE zase poskytuje receptoru miesta kontaktu proteín-DNA a proteín-proteín².



Obr. 2: Stavba DBD domény orphan nukleárných receptorov. Vyznačené sú obe podštruktúry domény viažuce zinok, P a D box a oblasť CTE. Čiernou farbou sú zvýraznené časti, ktoré priamo interagujú s DNA, zatvorené a otvorené symboly označujú miesta dimerizácie².

D kľučka

D kľučka je doména spájajúca DBD a LBD. Nukleárne receptory sa líšia v jej dĺžke a zložení aminokyselín. Umožňuje receptorom ohýbať sa v tejto časti až o 180 stupňov. D kľučka ľudskeho CAR obsahuje nefunkčnú oblasť NLS1 (nuclear localization signal 1, aminokyseliny 100-110) zachádzajúca do LBD, ktorá v CAR receptoroch iných druhov pomáha pri translokácii do jadra.

E doména (LBD)

Doména interagujúca s ligandmi, obsahuje hydrofóbne „vrecká“, ktorých aminokyseliny nekovalentne interagujú s ligandmi a kofaktormi na základe ich priestorovej štruktúry. Aktivácia závislá na ligande je tiež ovplyvňovaná miestom AF-2 (aktivačná funkcia 2), ktorá sa nachádza na C-konci LBD, pričom ovplyvňuje väzbu koaktivátorov^{2,13}. Okrem toho obsahuje LBD oblasť NLS2 (nuclear localization signal 2) dôležitú pri translokácii. Rôznymi štiepeniami génu kódujúceho CAR vznikajú odlišné

splice varianty, ktoré sa líšia v dĺžke, aminokyselinovom zložení a pozíciou stop kodónov génov kódujúcich LBD². Takéto variácie sú prítomné aj u iných druhov, napríklad u potkanov, ktorých splice varianty rCAR boli zmapované v predchádzajúcej štúdii³. Rozdielne splice varianty CAR vykazujú iné vlastnosti ako tzv. CAR WT – „wild type“ – napríklad chýbajúcu zmenu konštitúcie pri aktivácii, alebo inú afinitu k ligandom¹⁴.

F variabilná doména

Koncová variabilná doména, ktorá sa medzi nukleárnymi receptormi líši aminokyselinovým zložením. V CAR sa nenachádza.

Výskyt

hCAR je exprimovaný prevažne hepatocytmi a bunkami tenkého čreva¹. Na rozdiel od príbuzného pregnanového X receptora (Pregnane X Receptor, PXR, NR1I2) sa nachádza v cytoplazme, odkiaľ je po jeho aktivácii ligandom transportovaný do jadra translokáciou¹⁵.

1.1.2. Aktivácia CAR

CAR môže byť aktivovaný priamo alebo nepriamo. Mechanizmy týchto spôsobov aktivácie sa významne odlišujú aj napriek tomu, že záverečná fáza je u oboch podobná (Obr. 3).

Priama aktivácia – väzba ligandu

CAR tvorí v cytoplazme za normálnych podmienok komplex s dvoma proteínmi – HSP90 (heat-shock protein 90) a CCRP (cytoplazmatický CAR retenčný proteín). Tento komplex je navyše stabilizovaný v neaktívnom stave pomocou proteínu HSP70 (heat-shock protein 70). Po naviazaní hydrofóbného ligandu sa z komplexu odštiepuje CCRP a HSP90 a takto aktivovaný CAR-ligand prechádza do jadra translokáciou, kde tvorí heterodimér s RXR. Na dimér RXR/CAR sa následne viaže SRC1 (nuclear receptor coactivator 1) a GRIP1 (GR-interacting protein 1) v mieste XRS bohatom na leucínové zvyšky (xenochemical response signal). Takto vytvorený komplex sa viaže na HRE a následne aktivuje expresiu cieľového génu¹⁶.

Nepriama aktivácia

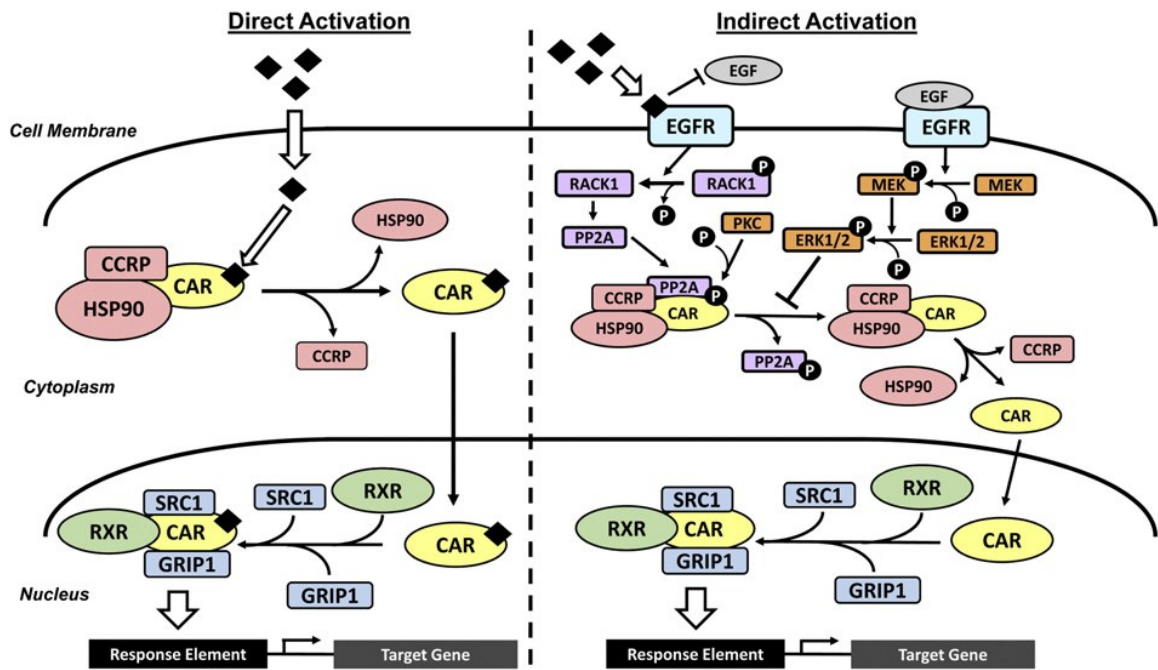
CAR môže byť aktivovaný aj nepriamo bez prítomnej väzby CAR s ligandom, teda konštitutívne. Aktivácia CAR kaskádou, počas ktorej sa ligand viaže na iný receptor spúšťajúci ďalšie reakcie zakončené aktiváciou CAR, jeho translokáciou a následnou transaktiváciou cieľového génu, je popísaná nižšie.

Aminokyselinový zvyšok Thr38 CAR je v cytoplazme fosforylovaný enzýmom PKC (proteínkináza C), následná defosforylácia Thr38 pomocou PP2A (proteínfosfatáza 2A) dôležitá pre nukleárnu translokáciu môže byť inhibovaná enzýmom ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) po predchádzajúcej aktivácii signálnej dráhy EGFR (receptor epidermálneho rastového hormónu) – keď sa fenobarbitalu podobný ligand naviaže na EGFR, inhibuje signál sprostredkovaný EGF (epidermálny rastový hormón), čo má za následok defosforyláciu RACK1 (receptor aktivovanej C-kinázy 1) v mieste Tyr52. To následne umožní naviazanie PP2A na komplex CAR:HSP90:CCRP, kde defosforyluje zvyšok aminokyseliny Thr38 CAR a takto indukuje jeho nukleárnu translokáciu a aktiváciu vytvorením komplexu s RXR, GRIP1, SRC1 v jadre, naviazaním na PBREM (PB responsive enhancer module) miesto cieľového génu na DNA a následnou expresiou tohto cieľového génu^{16,17}.

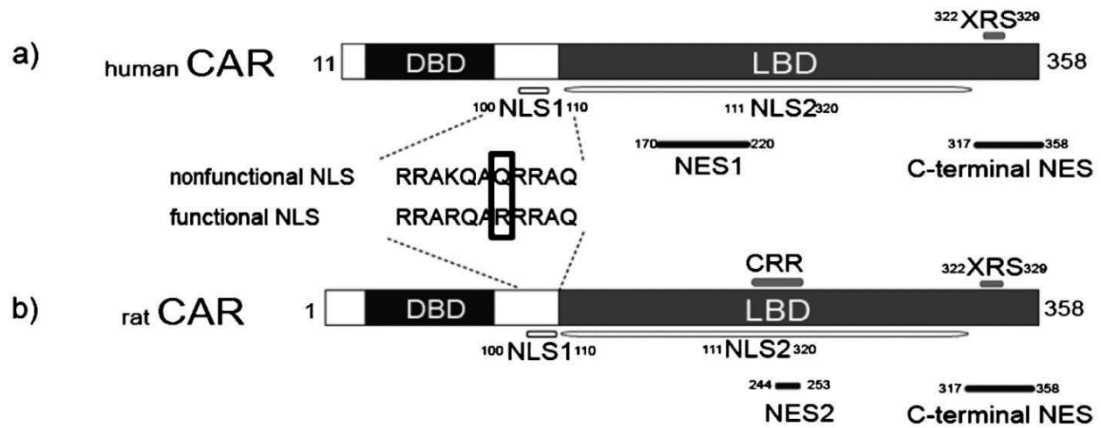
Nukleárna translokácia

Dôležitým krokom aktivácie CAR je jeho nukleárna translokácia. Keďže sa CAR primárne vyskytuje v cytoplazme, musí sa presunúť do jadra, aby mohol ďalej aktivovať PBREM. Translokácia bola v minulosti prvýkrát pozorovaná v štúdiu v roku 1999, pri ktorej bolo zistené, že sa CAR primárne nachádza v cytoplazme a následne už hodinu po aplikácii fenobarbitalu je prítomný v jadre¹⁸. Na translokáciu CAR má vplyv množstvo proteínov. Napríklad pri štúdiu zameranej na inhibítory PP2A bolo zistené, že kyselina okadaová inhibuje akumuláciu mCAR v jadre potlačením translokácie, z čoho vyplýva, že PP2A je jedným z génov, ktoré ju regulujú¹⁹. Súbežnou štúdiou bolo dokázané, že translokácia je nezávislá na funkcii AF-2 a je regulovaná oblasťou XRS (motív zložený z 30 aminokyselín bohatý na leucínové zvyšky)²⁰. Inou štúdiou bolo zistené, že fenobarbital nemá vplyv na XRS, takže je síce dôležitý pre translokáciu, no nespráva sa ako NLS (nuclear localization signal) závislý na fenobarbitale²¹. Taktiež sa predpokladá, že enzým GRIP1 je dôležitý pre udržanie CAR v jadre²² a PBP (PPAR-binding protein) reguluje translokáciu aj kvôli tomu, že bola nájdená korelácia medzi stratou PBP u PBP knockout myši a zhoršením fenobarbitalom indukovanej nukleárnej translokácie²³, no tieto dohady je ešte potrebné overiť²⁴.

Možný mechanizmus tejto translokácie je nasledovný: v hepatocytoch je funkcia NLS2 (aminokyseliny 111-320) potlačovaná CRR (cytoplasmic retention region, aminokyseliny 220-258, miesto väzby CCRP) a XRS (Obr. 4), a teda sa CAR nachádza v cytoplazme. Stimulácia ligandom a koaktivátorom indukuje aktiváciu atypického NLS2 v LBD cestou aktivácie XRS a zároveň indukuje supresiu CAR oblasťou CRR. CAR putuje cytoplazmou pomocou mikrotubúl, importín IPO13 rozpoznávajúc NLS2 aktivuje jadrový pór, ktorým CAR prechádza do jadra. Na druhej strane bolo zistené, že v rakovinových hepatocytoch je CAR spontánne prenášaný do jadra vďaka neustálemu potlačovaniu NLS2 oblasťou XRS a chýbajúcej funkcii CRR²⁵. Zároveň sa predpokladá, že okrem už spomenutej defosforylácie Thr38 je pre jadrovú translokáciu pri nepriamej aktivácii CAR dôležitá taktiež defosforylácia aminokyselinového zvyšku Ser202 CAR, ktorá sa nachádza blízko CRR²⁶.



Obr. 3: Priama a nepriama aktivácia CAR¹⁶



Obr. 4: Lokalizácia oblastí regulujúcich translokáciu CAR do jadra – hCAR sa od rCAR okrem iného líši nefunkčnosťou NLS1 oblasti, čo je zapríčinené nahradením arginínu (R) v rCAR za glutamín (Q) v hCAR²⁵.

1.1.3. Funkcie CAR v organizme

CAR zohráva dôležitú úlohu pri regulácii I. a II. fázy metabolizmu, transporte liečiv, ako aj pri metabolizme endogénnych látok, hlavne žlčových kyselín, bilirubínu, steroidných hormónov, hormónov štítnej žľazy a mastných kyselín. Ide predovšetkým o up-reguláciu, teda indukuje expresiu génov, ktoré tieto procesy ovplyvňujú.

CAR a metabolizmus xenobiotík

Xenobiotiká sú farmakologicky, endokrinologicky alebo toxikologicky aktívne látky cudzieho pôvodu, medzi ktoré patria napríklad liečivá a ich metabolity, priemyselné chemikálie, ako sú napríklad syntetické pesticídy, herbicídy, toxíny, napríklad polutanty životného prostredia, rastlinné metabolity. Ich metabolizmus spočíva v zvýšení ich hydrofility, znížení biologickej aktivity a následnom vylúčení z tela. Tento metabolizmus delíme na fázy – I. fáza oxidačno-redukčná, II. fáza konjugačná, prípadne III. fáza modifikačná a exkretčná.

Aktivácia CAR ovplyvňuje expresiu génov kódujúcich metabolické enzýmy I. fázy metabolizmu ako sú enzýmy cytochróm P450 monooxigenázového systému (napríklad CYP2B6, CYP2B10, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A1), NADPH-CYP reductáza, a metabolické enzýmy II. fázy metabolizmu – transferázy (napr. enzýmy skupín UGT, SULT a iné). Ďalej ovplyvňuje aktivácia CAR taktiež gény transportných proteínov, napríklad ABCB1, ABCC2, ABCG5, ABCG8, SLC21A6. Taktiež bolo okrem iného preukázané, že potlačením funkcie CAR u CAR-null myší sa zvýšila indukcia myších génov *Cyp4a10* a *Cyp4a14* fenobarbitalom, čo ukazuje na to, že CAR plní v tele rôzne úlohy, teda indukuje jednu skupinu a potláča expresiu inej skupiny pečenej metabolických enzýmov²⁷.

Ukázalo sa, že dlhodobé podávanie aktivátorov CAR spôsobuje hepatomegáliu a nádory pečene potkanov cestou negenotoxickej akcie, pravdepodobne pomocou indukcie bunkovej proliferácie a potlačovaním apoptózy^{28,29}.

CAR a metabolizmus bilirubínu

Bilirubín je telu vlastná látka vznikajúca metabolizmom hemu starých červených krviniek pomocou enzýmu hem oxidázy-1, za vzniku biliverdínu IXa, oxidu uhoľnatého a železa. Následnou oxidáciou enzýmom bilirubín reduktáza vzniká z biliverdínu IXa bilirubín. Bilirubín je vychytávaný pečňovým transportným proteínom SLC21A6 (OATP2, OATPC, LST1) sínusoidálneho povrchu hepatocytov. Po vstupe do bunky je viazaný na enzýmy GSTA1/2 (glutatión S-transferáza α -1/2) a následne je konjugovaný s glukuronovou kyselinou pomocou enzýmu UGT1A1 (uridín-5'-difosfát glukuronosyltransferáza 1A1), pričom sa v ďalšom kroku vylučuje do žlče kanálikovou membránou vďaka prenášaču MRP2 (cMOAT, ABCC2)^{30,31}.

Nahromadenie bilirubínu v CNS spôsobuje neuropatie a encefalopatie. Jeho akumulácia taktiež spôsobuje žltáčku³⁰ a novorodeneckú žltáčku. Na základe zdokumentovaného efektu fenobarbitalu na zníženie hladiny bilirubínu a expresie génov spojených s jeho metabolizmom (UGT1A1, MRP2, SLC21A6 a GSTA1), ktoré sú taktiež aktivované CAR receptorom, bolo dokázané, že aktivácia CAR preukázateľne pozitívne ovplyvňuje odbúravanie bilirubínu u myší, tým pádom je vhodným cieľom ďalších štúdií zaoberajúcich sa chorobami spojenými s nahromadením a zhoršením metabolizmu bilirubínu, ako je už spomenutá žltáčka a novorodenecká žltáčka, ktorej sprievodným javom a možným faktorom je aj znížená expresia CAR u novorodencov^{32,33,34}. Medzi rizikové faktory týchto chorôb patrí napríklad familiárna hyperbilirubinémia, pri novorodeneckej žltáčke aj vysoký gestačný vek a kojenie^{32,33}.

CAR a metabolizmus žľových kyselín

Dôležitú úlohu v detoxikácii žľových kyselín zohráva sulfatácia. Ich nahromadenie môže viesť k rôznym patologickým stavom, ako je cholestáza, poškodenie pečene, či rakovina hrubého čreva³⁰. Nedávna štúdia zameraná na hepatotoxicitu lithocholovej kyseliny (LCA) preukázala, že CAR je dôležitým faktorom ovplyvňujúci metabolizmus LCA. SULT2A9 patriaca do skupiny sulfotransferáz katalyzuje prenos sulfonylovej skupiny z molekuly 3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfátu (PAPS) na akceptorovú molekulu LCA za vzniku sulfátového alebo sulfamátového derivátu, čím sa znižuje jej cytotoxicita³⁰. Okrem toho bol objavený inhibičný účinok fenobarbitalu a TCPOBOP na expresiu génov *Cyp7a1* a *Cyp8b1* u myší. Tieto gény zohrávajú kľúčovú úlohu v metabolizme žľových kyselín³⁵.

Podľa inej štúdie znižuje aktivácia CAR koncentráciu žlčového cholesterolu a zabraňuje vzniku žlčových kameňov (cholesterol gallstone disease, CGD). Nižšia hodnota žlčníkového cholesterolu bola u CAR aktivovaných myši z veľkej časti pripísaná potlačenej expresii génov ABCG5 (ATP-binding cassette sub-family G member 5) a ABCG8 (ATP-binding cassette sub-family G member 8). Aktivácia CAR taktiež podporila konverziu cholesterolu na žlčové kyseliny zvýšením expície CYP7A1, ktorý je taktiež limitujúcim enzýmom v biosyntéze žlčových kyselín. Aktivácia CAR zlepšila reabsorpciu žlčových kyselín zvýšením expície transportérov žlčových kyselín ASBT (apical sodium – bile acid transporter) a OST α/β (basolateral organic solute transporter α/β) v tenkom čreve. U CAR aktivovaných myši taktiež došlo k zlepšeniu hepatickej steatózy. Okrem toho aktivácia CAR ochránila myši proti ochoreniu CGD citlivým na pečenný X receptor α (liver X receptor α -sensitized CGD) potlačením expície ABCG5 a ABCG8. Celkovo hrá CAR dôležitú úlohu pri udržiavaní homeostázy cholesterolu, žlčových kyselín a triglyceridov, pričom sa zdá byť sľubným terapeutickým cieľom na prevenciu alebo liečbu CGD³⁶.

CAR a metabolizmus hormónov

Štúdia z roku 2000 skúmala vplyv steroidných látok na CAR. Ten môže byť aktivovaný ako odozva aktivácie väzobného miesta NR1 (nuclear response element 1) oblasti PBREM (phenobarbital-responsive enhancer module) génu CYP2B fenobarbitalom u myši. Zo sledovaných látok bolo preukázané, že CAR cestou NR1 a indukcie *Cyp2b10* HepG2 buniek aktivujú 17 β -estradiol a estrón. Naopak progesterón a androgény túto aktivitu potlačovali. Estriol, estetrol, estradiolsulfát a dietylstilbestrol nevykazovali žiadnu aktivitu na NR1. U ľudského CAR sa nepodarilo túto aktivitu v experimentálnych podmienkach preukázať³⁷. Okrem tejto iná štúdia dokázala inhibičný účinok 3 α -androstanolu na CAR³⁸.

CAR ovplyvňuje aktivitu CYP2B, ktorý metabolizuje androgény aj estrogény a UGT1A1, pomocou ktorého sa metabolity estrogénov konjugujú s glukuronovou kyselinou, čo môže mať za následok zvýšenie katalýzy steroidných hormónov^{34,37}. CAR môže taktiež ovplyvňovať sulfatáciu transaktiváciou PAPS syntázy 2 (3'-fosfoadenozín-5'-fosfosulfátsyntáza 2) a indukciou SULT2A1^{27,39}.

Glukokortikoidy majú stimulačný efekt na CAR, pričom tento efekt platí aj opačne, keďže CAR zosilňuje signalizáciu GR (glukokortikoidový receptor, NR3C1). Tým pádom

môžu zosilňovať aktivačný účinok na ich cieľové gény, čo bolo dokázané pre rôzne izoformy CYP⁴⁰. Na niektoré gény cytochrómov má taktiež vplyv PXR, čo poukazuje na to, že tieto receptory môžu pracovať spoločne^{24,41}.

Medzi tyroidné hormóny (TH) patria tyroxín (T4) a trijódtyronín (T3), tvorené štítnou žľazou a metabolizované periférnymi tkanivami. Táto sekrécia je regulovaná cestou hypotalamus-hypofýza-štítna žľaza, ktorá je nasledovná: hypotalamus vylučuje TRH (thyroid-releasing hormone), ktorý stimuluje tvorbu TSH (tyroideu stimulujúci hormón) v adenohypofýze. Tento hormón nakoniec stimuluje tkanivo štítnej žľazy k tvorbe a sekrécii TH. Tvorba TH je regulovaná mechanizmom negatívnej spätnej väzby, ktorý je citlivý na hladiny TH. Hlavným hormónom tvoreným štítnou žľazou je T4, pričom sa predpokladá, že slúži ako prekursor biologicky aktívneho T3. Väčšina T3 je tvorená dejodizáciou vonkajšieho kruhu (outer ring deiodination, ORD) T4 v periférnych tkanivách⁴².

Základnými prvkami periférneho metabolizmu TH je dejodizácia a konjugácia glukuronovej kyseliny alebo sulfátu, pričom ORD aktivuje TH premenou T4 na T3, dejodizácia vnútorného kruhu (IRD) inaktivuje TH premenou T4 a T3 na neaktívne metabolity 3,3',5'-trijódtyronín a 3,3'-dijódtyronín. Existujú tri dejodinázy dôležité pre metabolizmus TH označené ako D1, D2, D3. D1, ktorý je exprimovaný v pečeni a je predpoklad, že reguluje systémové hladiny TH, dokáže aktivovať aj inaktivovať TH prostredníctvom ORD ako aj IRD T4 a T3. D2 je aktivujúcim enzýmom schopným katalyzovať len ORD TH, kdežto D3 je inaktivujúcim enzýmom, ktorý dokáže len katalyzovať IRD TH. Do konjugácie TH je zapojená glukuronidácia alebo sulfatácia fenolickej hydroxylovej skupiny, ktorá zvyšuje rozpustnosť TH vo vode a uľahčuje vylučovanie močou alebo žľachou. Sulfatácia taktiež urýchljuje inaktiváciu TH, hlavne teda T3, keďže IRD sulfonovaných TH enzýmom D1 je zrýchlená 40-200x, a naopak ORD sulfonovaného T4 je úplne blokováná⁴².

Enzýmy uridín-5'-difosfát glukuronosyltransferáza (UGT; fenolová/bilirubínová UGT1A1, androsterónová UGT2B1) a sulfotransferáza (SULT; fenolová SULT1A1, hydroxysteroidová SULT2A1, cytosolická SULT1C1, estrogénová SULT1E1) ovplyvňujú glukuronidáciu a sulfatáciu TH. Indukcia týchto enzýmov fenobarbitalom a inými xenobiotikami zvyšuje metabolizmus TH a znižuje sérové hladiny TH u zvierat a ľudí. Chronická liečba fenobarbitalom spôsobuje nádory štítnej žľazy u potkanov, čo je

pravdepodobne dôsledkom znížených sérových hladín TH s následným zvýšením sérovej hladiny TSH, ktorý stimuluje rast štítnej žľazy a v konečnom dôsledku vzniká nádor⁴².

CAR ovplyvňuje indukciu hepatálneho metabolizmu ako odpoveď na fenobarbital a iné xenobiotiká, takže strata funkcie CAR u myši viedla v pečeni ku kompletnej absencii indukcie CYP2B10 spôsobenej fenobarbitalom a jemu podobnými induktormi, čím sa znížila schopnosť metabolizovať liečivá. Potom, čo sa ukázalo, že CAR ovplyvňuje expresiu enzýmov I. a II. fázy xenobiotického metabolizmu, bola uskutočnená štúdia zameraná na potvrdenie alebo vyvrátenie hypotézy, že negatívny efekt fenobarbitalu na sérové hladiny TH sú závislé na jeho schopnosti nepriamo aktivovať CAR. Výsledkom tejto štúdie bolo, že aplikácia fenobarbitalu, ako aj TCPOBOP viedla u myši k zníženiu sérových hodnôt TH, čo bolo sprevádzané zvýšením hladiny TSH a proliferácie folikulárnych buniek štítnej žľazy spôsobenými schopnosťou CAR indukovať expresiu UGT a SULT enzýmov dôležitých pre metabolizmus a exkréciu TH⁴².

CAR a metabolizmus lipidov

Na úlohu CAR v metabolizme lipidov bolo zameraných viacero štúdií. Niektoré hovoria o CAR ako o faktore znižujúcom obezitu a zvyšujúcom indukciu β -oxidázy^{43,44}, iné o ňom tvrdia, že je prolipogénny⁴⁵. U leptín deficitných (ob/ob) myši alebo tých kŕmených vyšším množstvom tuku bolo preukázané, že aktivácia CAR zvyšuje hepatickú steatózu represiou génov lipogenézy, ako sú *Sdc1* (stearyl-CoA desaturase 1), *Srebp-1c* (sterol regulatory element-binding protein 1c) a *Acc* (acetyl-CoA carboxylase)^{43,46}. Iná štúdia ukázala na to, že expresia enzýmov lipogenézy ľudských hepatocytov je pravdepodobne up-regulovaná pomocou atypickej S14 (thyroid hormone-responsive spot 14 protein, THRSP)^{47,48}. Ďalšie práce ukazujú na HNF-4 (hepatický nukleárny faktor-4, NR2A1), ktorý patrí medzi nukleárne receptory, ako iný regulátor expresie génov metabolizmu lipidov, pričom bolo preukázané, že CAR kompetitívne potláča transaktiváciu HNF-4 viazaním sa na DR1 miesto promotora *Cyp7a1*, *Cyp8b1* a *Pepck*, čím vedie k zníženiu metabolizmu lipidov a glukózy u myši⁴⁹⁻⁵¹. CAR taktiež down-reguluje gény kódujúce CPT (carnitine palmitoyltransferase), ECI (enoyl-CoA isomerase), ktoré sa podieľajú na β -oxidácii mastných kyselín^{27,52}. Aktivácia CAR indukovala up-reguláciu génov lipogenézy, ako je napr. *Fasn*, enzým zodpovedný za predĺženie reťazca mastných kyselín *Elovl6* (elongation of long-chain fatty acids family member 6) a *Gpat* (glycerol-3-phosphate acyltransferase), ktorý skladá mastné kyseliny do triacylglycerolu⁴⁸.

Aktivácia CAR pomocou TCPOBOP pozitívne reguluje gény zapojené do hepatickej glykolýzy ako aj lipogenézy a indukuje steatózu v myšej pečeni. CAR reguluje expresiu Pnpla3 v hepatocytoch myši aj ľudí. Ďalšie štúdie podporných mechanizmov ukázali na to, že CAR nekoná priamou reguláciu transkripcie Pnpla3 alebo cestou receptora LXR (Liver X Receptor)⁴⁸.

CAR a metabolizmus glukózy

Aktivácia CAR výrazne znižuje sérové hladiny glukózy a zlepšuje glukózovú toleranciu a inzulínovú senzitivitu. Taktiež zmierňuje hyperglykémiu potlačovaním produkcie glukózy a stimuláciou príjmu a použitia v pečeni. Glukoneogenetické gény PEPCK-1 (fosfoenolpyruvátkarboxykináza-1) a G6P (glukóza-6-fosfatáza) boli v štúdiu potlačené liečbou TCPOBOP u ob/ob (nedostatok leptínu) myši, pričom u ob/ob CAR^{-/-} (nedostatok leptínu a chýbajúci gén CAR v oboch alelách) myši sa tento efekt nedostavil⁴³. Ďalším proteínom regulujúcim expresiu PEPCK-1 a G6P je FOXO1 (forkhead box protein 1). CAR fyzicky blokuje väzbu FOXO1 na IRS (insuline response sequences), čím potláča expresiu PEPCK-1 a G6P^{24,53,54}. Tieto zistenia spolu s výsledkami štúdií zameranými na účinky aktivácie CAR na metabolizmus lipidov naznačujú, že aktivácia CAR zlepšuje stav pri diabete druhého typu a je tým pádom vhodným terapeutickým cieľom v jeho liečbe⁴³.

1.2. Ligandy konštitutívneho androstanového receptora

Látky, ktoré vykazujú aktivitu na CAR radíme medzi agonistov, alebo antagonistov. Ak sa jedná o aktivátory, tie sú ďalej rozdelené medzi priamych a nepriamych aktivátorov CAR. Typickým priamym aktivátorom CAR je CITCO (6-(4-chlórphenyl)imidazo[2,1-*b*]tiazol-5-karbaldehyd-*O*-(3,4-dichlórbenzyl)oxím; priamy selektívny hCAR, aktivátor hPXR) alebo TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichlórpyridyloxy)]benzén; priamy selektívny aktivátor mCAR), typickým nepriamym aktivátorom CAR je fenobarbital, ktorý patrí medzi klasické indukory CYP2B.

Okrem týchto zlúčenín sa na CAR viažu rôzne látky, ako sú napríklad molekuly steroidnej štruktúry (3 α ,5 α -androstan-3-ol – prvý identifikovaný ligand, aktivátor mCAR³⁸, 5 β -pregnan-3,20-dión), retinové kyseliny (9-*cis*-retinová kyselina, ktorá bola ako jedna z prvých látok identifikovaná ako ligand heterodiméru RXR/CAR^{1,55}), klotrimazol, chlórpromazín, *o,p'*-DDT, metoxychlór a uhl'ovodíky ako napríklad 2,3,3',4',5',6-hexachlór-bifenyl a iné. Viac príkladov je uvedených v tabuľke (Tab.2). Štruktúry ligandov sú zobrazené v tabuľke (Tab. 3).

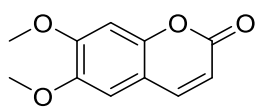
Tab. 2: Vybrané ligandy CAR

Agonisti	
Priame aktivátory	
6,7-dimetyleskuletín ⁵⁶	
amiodarón ⁵⁷	
artemisinín ⁵⁸	
CITCO ⁵⁹	Priamy aktivátor hCAR
cypermetrín ⁶⁰	
efavirenz ⁶¹	
FL81 (5-(3,4-dimetoxybenzyl)-3-fenyl-4,5-dihydroizoxazol) ⁶⁰	
karbamazepín ⁶¹	
metoxychlór ^{60,62}	
nevirapín ⁶¹	
<i>o,p'</i> -DDT ⁶⁰	
permetrín ⁶⁰	
sulfonamidy ⁶³	
TCPOBOP ⁶⁴	Priamy aktivátor mCAR
deriváty tiazolidín-4-ónu ⁶³	
kyselina valproová ⁶⁵	
Nepriame aktivátory	
2,3,3',4',5',6-hexachlór-bifenyl ¹⁸	
baicaleín ⁶⁶	
fenobarbital ⁶⁷	Typický nepriamy aktivátor
fentyoín ⁶⁸	Nepriamy aktivátor
galangín ⁶⁶	
chlórpromazín ^{18,61}	

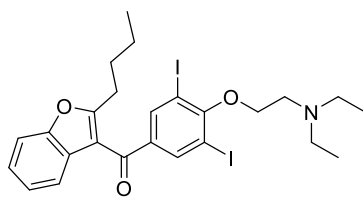
	chrysin ⁶⁶	
Aktivátory bez popísaného mechanizmu aktivácie		
	cyklofosfamid ⁶¹	
	dehydroepiandrosterón ⁶⁹	
	kyselina ellagová ⁷⁰	
	mifepristón ⁷¹	
	nikardipín ⁷²	
	NF49 (7-(acetoxo)-6-(p-metoxifenyl)pyrolo-[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepín) ⁷³	Derivát 6-arylpyrolo[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepínu
	NF51 (7-(dimetylkarbamoyloxy)-6-(p-metoxifenyl)pyrolo-[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepín) ⁷³	Derivát 6-arylpyrolo[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepínu
	NF115 (7-(hexánoyloxy)-6-fenylpyrolo-[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepín) ⁷³	Derivát 6-arylpyrolo[2,1- <i>d</i>][1,5]benzotiazepínu
	octicizer (2-ethylhexyldifenylfosfát) ⁷²	Organofosfát, zmäkčovadlo
	5 β -pregnandión ⁷⁴	
	reserpín ⁶¹	
	<i>trans</i> -resveratrol ⁷⁰	Antioxidant
	telmisartán ⁷²	
	tolnaftát ⁷²	
	troglitazón ⁶¹	
Antagonisti		
	3,17 β -estradiol	Aktivátor mCAR
	androstanol ^{38,74}	
	3 α -androsteno ³⁸	
	alyl izotiokyanát ⁵⁷	
	etínylestradiol ^{63,75}	
	klotrimazol ⁷⁴	Inverzný agonista
	meklizin ⁷⁶	Inverzný agonista hCAR, agonista mCAR
	nigramid J ⁷⁷	Inverzný agonista hCAR
	kyselina okadaová ¹⁸	Inhibitor PPA2 – translokácia
	PK-11195 (1-(2-chlórfenyl)- <i>N</i> -metyl- <i>N</i> -(1-metylpropyl)-3-izochinolínkarboxamid) ⁷⁸	Selektívny inhibitor hCAR
	S07662 (<i>N</i> -[(2-metyl-3-benzofuranyl)metyl]- <i>N'</i> -(2-tienylmetyl)močovina) ⁷⁹	Inverzný agonista hCAR
	T0901317 (<i>N</i> -[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluór-2-hydroxypropán-2-yl)fenyl]- <i>N</i> -(2,2,2-trifluóretyl)benzénsulfonamid) ⁸⁰	Inverzný agonista CAR

Tab. 3: Štruktúry ligandov CAR

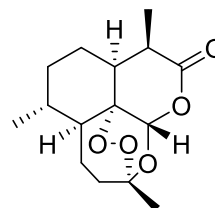
Agonisti:



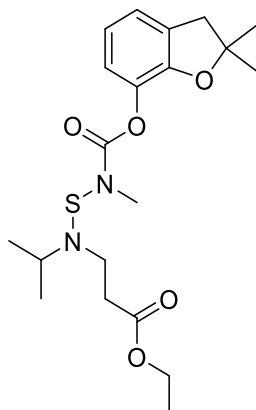
6,7-dimetylesculetin



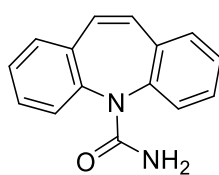
amiodarón



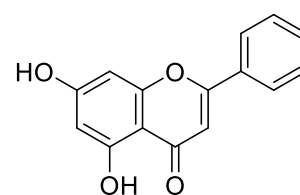
artemisinín



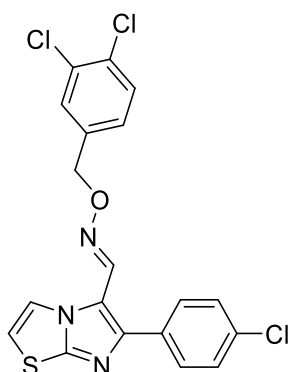
benfurakarb



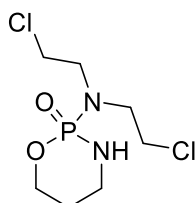
karbamazepín



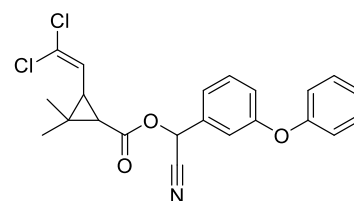
chrysin



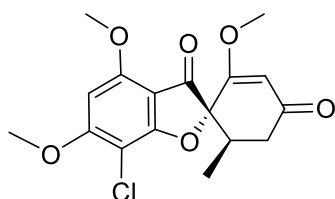
CITCO



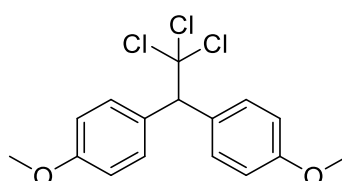
cyklofosfamid



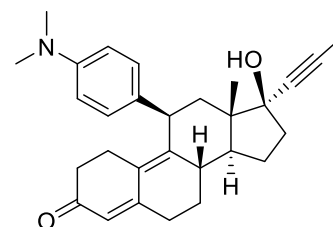
cypermetrín



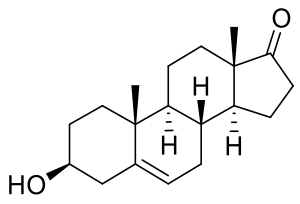
griseofulvín



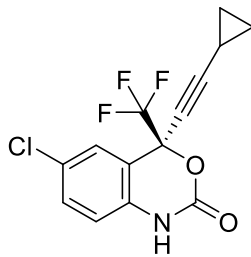
metoxychlór



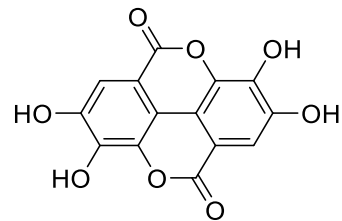
mifepristón



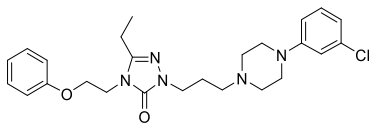
dehydroepiandrosterón



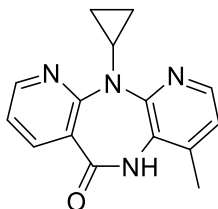
efavirenz



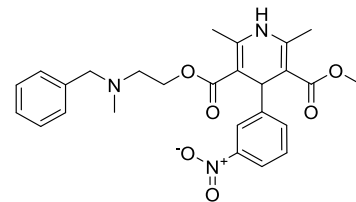
kyselina ellagová



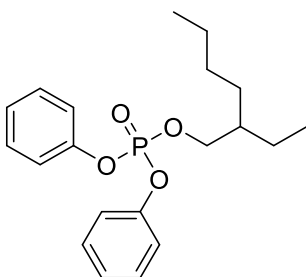
nefazodón



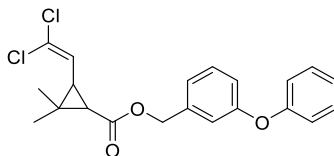
nevirapín



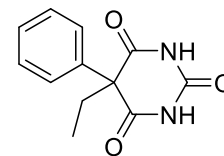
nikardipín



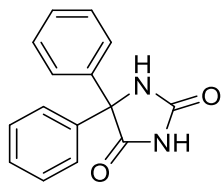
octicizer



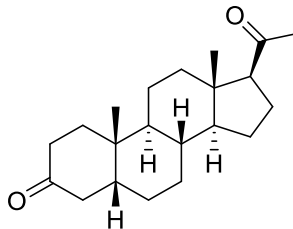
permetrín



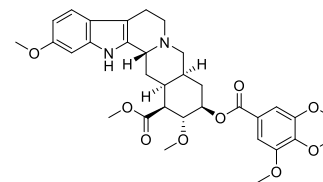
fenobarbital



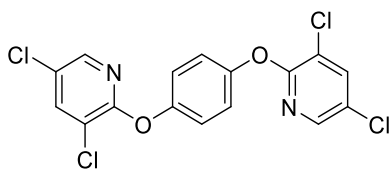
fentyoín



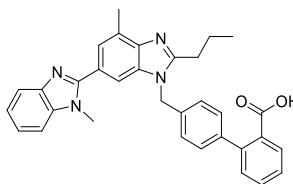
pregnandión



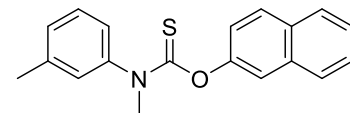
reserpín



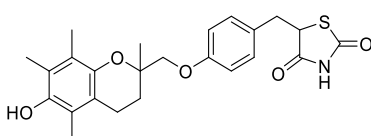
TCPOBOP



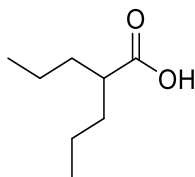
telmisartán



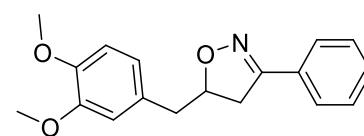
tolnaftát



troglistazón

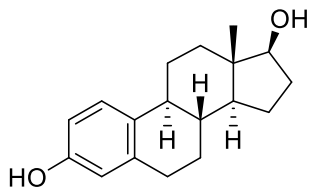


kyselina valproová

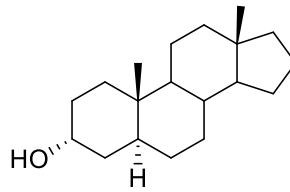


FL81

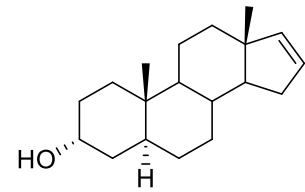
Antagonisti:



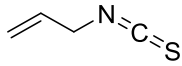
estradiol



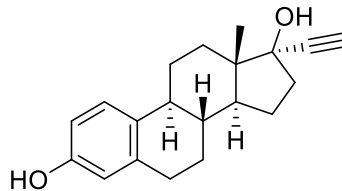
androstanol



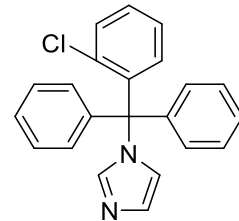
androstenol



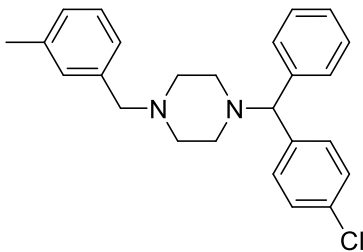
allyl izotiokyanát



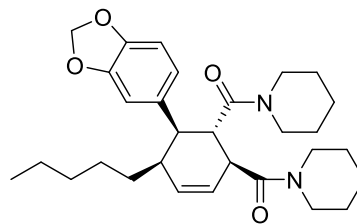
etínylestradiol



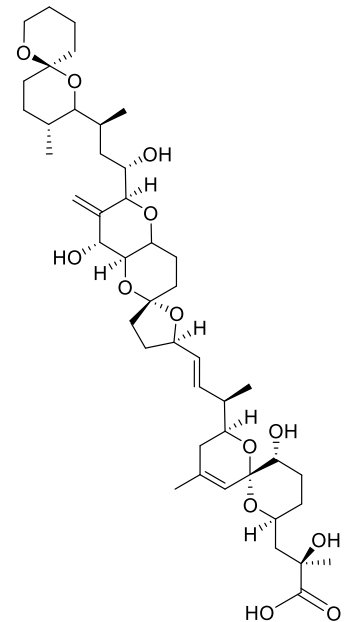
klotrimazol



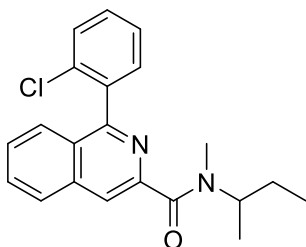
meklízín



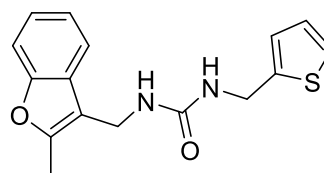
nigramid J



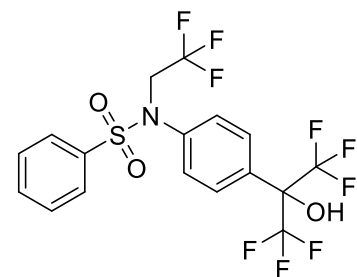
kyselina okadaová



PK-11195

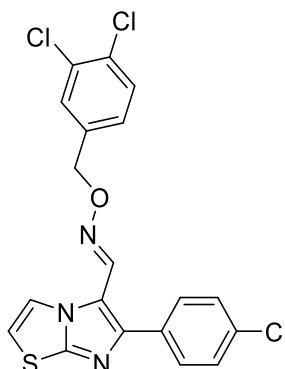


S07662



T0901317

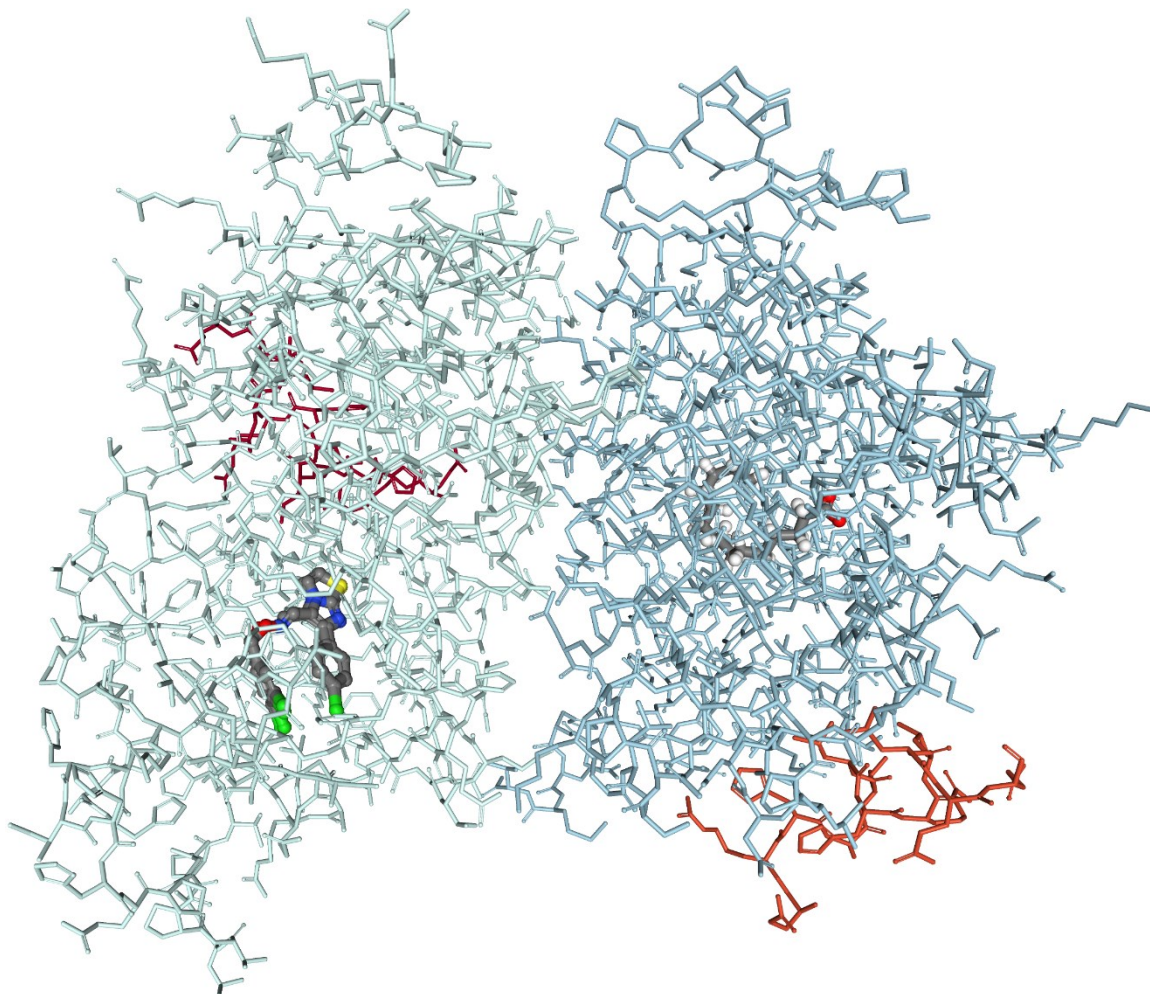
1.2.1. CITCO



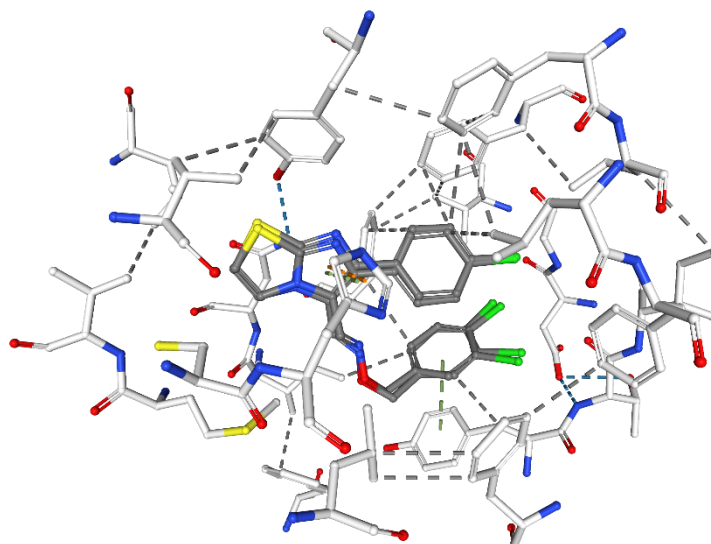
Obr. 5: CITCO – 6-(4-chlórfenyl)imidazo[2,1-b]tiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlórbenzyl)oxim.

V roku 2003 bol prvýkrát identifikovaný selektívny agonista hCAR receptoru – CITCO (Obr. 5). Táto látka dokáže priamo aktivovať hCAR a zároveň nevykazuje afinitu k mCAR. Okrem hCAR, ale taktiež vykazuje aktivačný účinok na hPXR. EC_{50} v testovaní CAR aktivity bola približne 25 nM, EC_{50} v testovaní hPXR aktivity bola približne 3 μ M, teda selektivita CITCO k hCAR je viac ako 100x väčšia ako jeho selektivita k hPXR. Oba tieto receptory aktivujú CYP2B6 a CYP3A4 gény, no hCAR má väčší aktivačný efekt na gén CYP2B6 ako CYP3A4, hPXR zase aktivuje expresiu oboch génov približne rovnako⁸¹.

V súčasnosti je teda snaha o nájdenie špecifického agonistu ľudského CAR receptoru s vysokou afinitou k tomuto receptoru. CITCO, ktorý má vyššiu afinitu k ľudskému CAR receptoru a nevykazuje aktivačný účinok na myšiu CAR receptor, je, ale, taktiež aktivátorom PXR.



Obr. 6: CAR/RXR α heterodimér s naviazanými ligandmi – CITCO (vľavo) a kyselina pentadekánová (masťná kyselina, vpravo) – a koaktívátormi – SRC-1 peptidy (označené červenou farbou)^{12,82,83}.

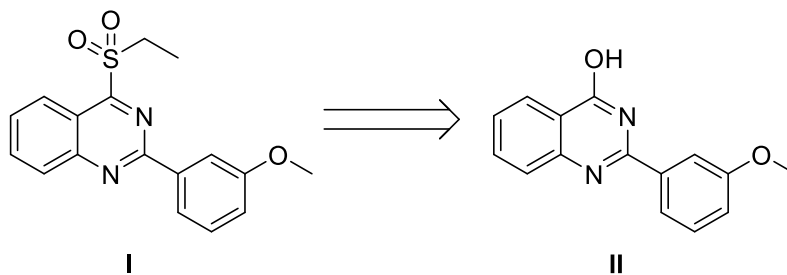


Obr. 7: Interakcie väzobného miesta LBD domény CAR receptoru s molekulou CITCO (šedá štruktúra). Modré prerušované čiary – vodíkové väzby, šedé prerušované čiary – hydrofóbne interakcie, oranžové prerušované čiary - Pi interakcie^{12,82,83}.

1.2.2. 2,4-disubstituované chinazolíny

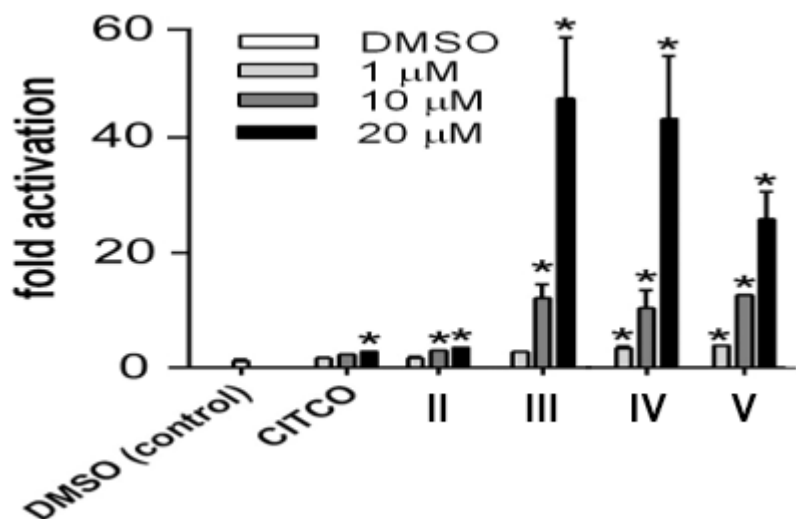
V minulosti boli na Katedre anorganickej a organickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové syntetizované v rámci projektu vývoja nových antimykobakteriálnych zlúčenín deriváty chinazolínu, predovšetkým s fragmentom alkylsulfanylu v polohe 4 a substituovaného fenylu v polohe 2. Pri náhodnom skríningu na afinitu k CAR receptoru, vykonanom výskumnou skupinou prof. Pávka, bolo zistené, že jedná z testovaných látok, t. j. 4-etylsulfonyl-2-(3-metoxyfenyl)chinazolín (**I**) vykazovala veľmi sľubnú interakciu s vyššie zmieneným receptorom. Po revízií testovanej štruktúry bolo, ale, zistené, že pri pokuse o oxidáciu v pôvodnej sérii 4-alkylsulfanylderivátov došlo pri použití peroxidu vodíka ako oxidačného činidla k oxidatívnej desulfurácii etylsulfonylového zvyšku. Tým pádom štruktúra látky odpovedá 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-olu (**II**) (Obr. 8). Táto zlúčenina bola syntetizovaná de novo⁸⁴ a po overení jej štruktúry bolo opätovne vykonané hodnotenie biologickej aktivity, kde sa potvrdila jej afinita k CAR receptoru.

Biologická aktivita bola testovaná na MZ-Hep1 bunkovej línii. Týmto testovaním bolo preukázané, že 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-ol (**II**) má ako potenciálny agonista hCAR receptora podobný účinok na hCAR, ako má CITCO. Okrem hCAR, ale, aktivoval aj PXR a AhR⁸.

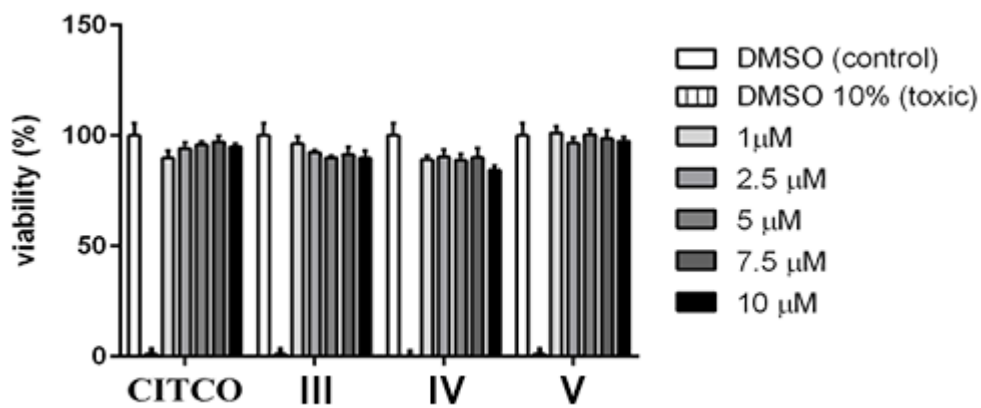


Obr. 8: korekcia štruktúry na 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-ol.

Následne boli syntetizované deriváty odvodené od zmieneného skeletu pomocou jednoduchých reakcií (2-(3-metoxyfenyl)-4-metoxychinazolín (**III**), 2-(3-metoxyfenyl)-3,4-dihydrochinazolín-4-tión (**IV**) a 2-(3-metoxyfenyl)-4-metylsulfanylchinazolín (**V**)), ktoré vykazovali ešte vyššiu afinitu k CAR receptoru⁸ (Obr. 9), ďalej bola taktiež testovaná ich toxicita na HepG2 bunkovej línii s negatívnym výsledkom⁸ (Obr. 10), vďaka čomu sa stali predlohovými látkami pre syntézu ďalších zlúčenín.



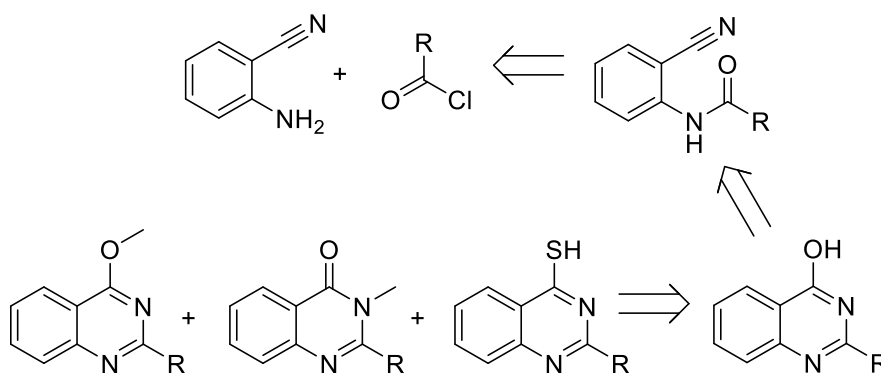
Obr. 9: Testovanie biologickej aktivity ($p(ER\alpha)_3$ -luc gene reporter assay) prvej série derivátov na CAR receptor⁸



Obr. 10: Testovanie toxicity (MTS viability assay) prvej série derivátov na HepG2 bunkách⁸

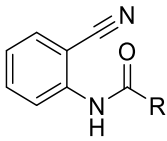
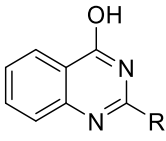
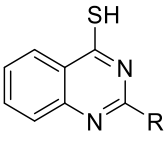
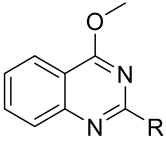
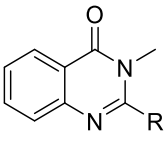
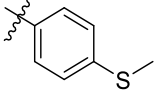
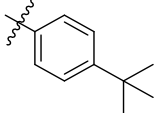
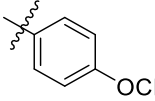
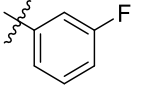
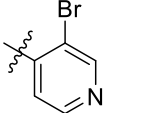
2. CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce bolo syntetizovať deriváty chinazolínu založené na obmene štruktúry predlohovej molekuly 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-olu (**II**), ktorá má dokázaný aktivačný účinok na CAR receptor. Zamýšľané obmeny zahŕňali predovšetkým náhradu 3-metoxyfenylu za aromatický kruh, ktorý by mal na sebe naviazanú elektróndonorovú alebo elektrónakceptorovú skupinu, prípadne heterocyklus. S každou z týchto látok boli vykonané reakcie vedúce k derivátom, u ktorých bola hydroxylová skupina v polohe 4 chinazolínu zamenená za skupiny metoxylovú, sulfanylovú, prípadne k derivátom 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu. Zo schémy retrosyntetického postupu vyplýva, že cieľové deriváty chinazolínu je možné pripraviť reakciou 2-aminobenzonitrilu s príslušnými chloridmi aromatických karboxylových kyselín a následnou cyklizáciou (Sch. 1).



Sch. 1: Plánované syntézy

Tab. 4: Zoznam pripravovaných produktov a im priradené kódy

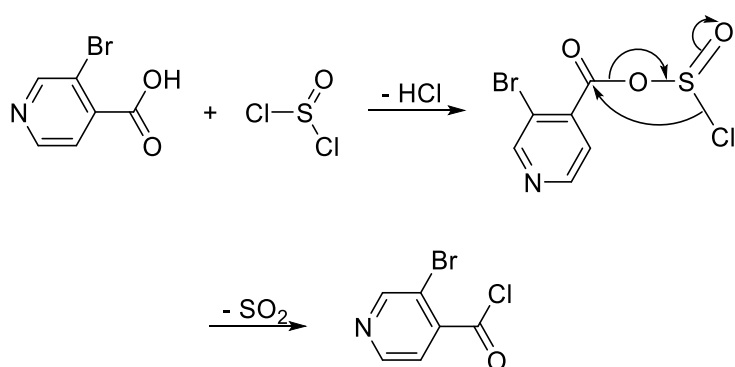
Derivát R					
	CHP032A	CHP032B	CHP032C	CHP032Da	CHP032Db
	CHP035A	CHP035B	CHP035C	CHP035D1	CHP035D2
	CHP037A	CHP037B	CHP037C	CHP037D1	CHP037D2
	CHP038A	CHP038B	CHP038C	CHP038D1	CHP038D2
	CHP042A	CHP042B	CHP042C	CHP042D1	CHP042D2

3. TEORETICKÁ ČASŤ

V tejto kapitole sú popísané mechanizmy reakcií, ktoré slúžili k príprave cieľových zlúčenín.

3.1. Príprava chloridu karboxylovej kyseliny

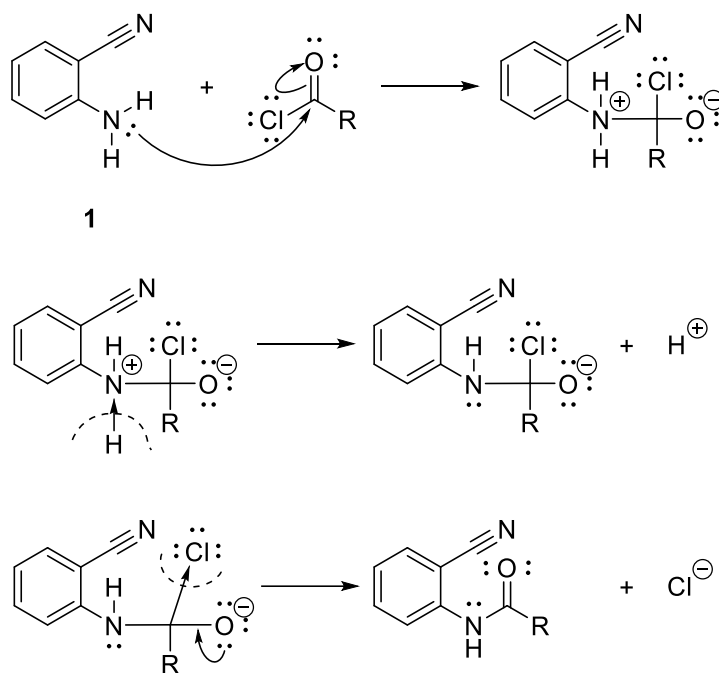
Tento krok bol potrebný pre karboxylové kyseliny v prípade, že ich chloridy, ktoré by boli inak použité ako východiskové látky (Sch. 1) pre novú sériu, neboli komerčne dostupné. Táto reakcia bola použitá len raz na syntézu chloridu kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej⁸⁵ (Sch. 2).



Sch. 2: Mechanizmus prípravy chloridu kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej

3.2. Syntéza *N*-(2-kyanfenyl)arylamidov

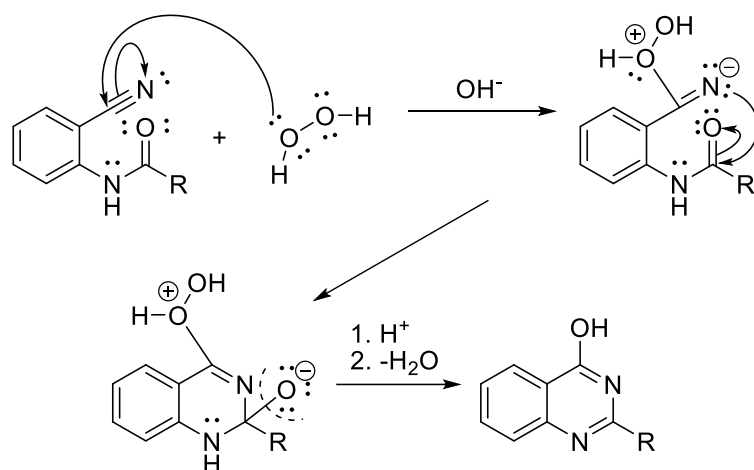
Nasledovala príprava amidov reakciou chloridov aromatických karboxylových kyselín s 2-aminobenzonitrilom (**1**), za vzniku *N*-(2-kyanfenyl)arylamidov. Mechanizmus tejto reakčnej konverzie⁸⁶ je popísaný v nižšie uvedenej schéme (Sch. 3). Ako rozpúšťadlo bol zvolený bezvodý pyridín, ktorý ako báza vyvážoval z reakčného prostredia chlorovodík. Produkty týchto reakcií slúžili ako reaktanty cyklizácie na deriváty chinazolínu.



Sch. 3: Mechanizmus vzniku aromatického amidu

3.3. Cyklizácia amidov na substituované chinazolín-4-oly

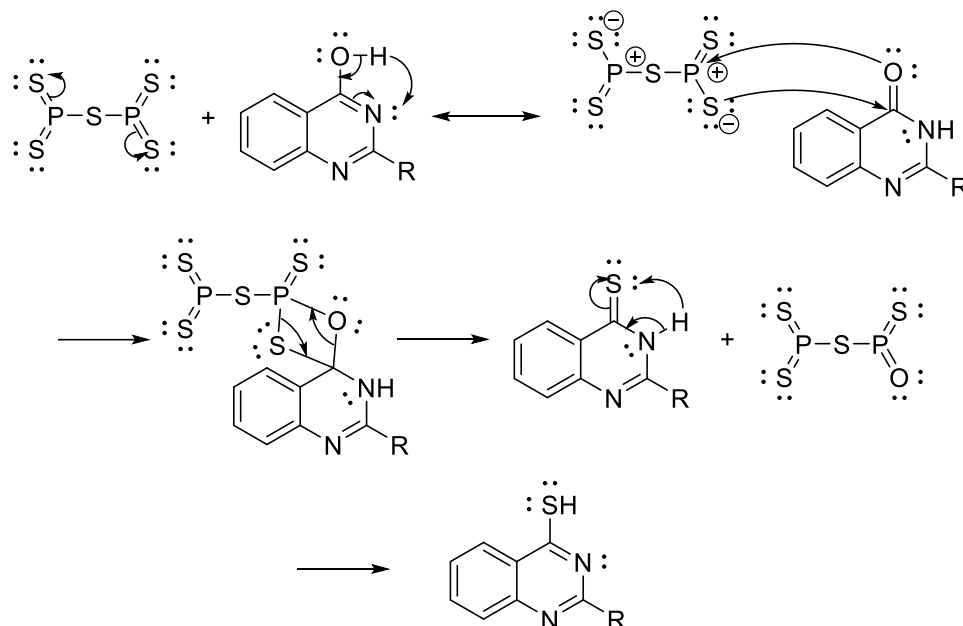
Cyklizácia vedúca k chinazolínom bola vykonaná v prostredí peroxidu vodíka a hydroxidu sodného. Reakcia bola ukončená pridaním zriedenej kyseliny chlorovodíkovej⁸⁴ (Sch. 4).



Sch. 4: Mechanizmus cyklizácie amidov

3.4. Syntéza derivátov chinazolín-4-tiolu

Ďalším typom obmeny je substitúcia hydroxylovej skupiny derivátov chinazolín-4-olu za vzniku derivátov chinazolín-4-tiolu.

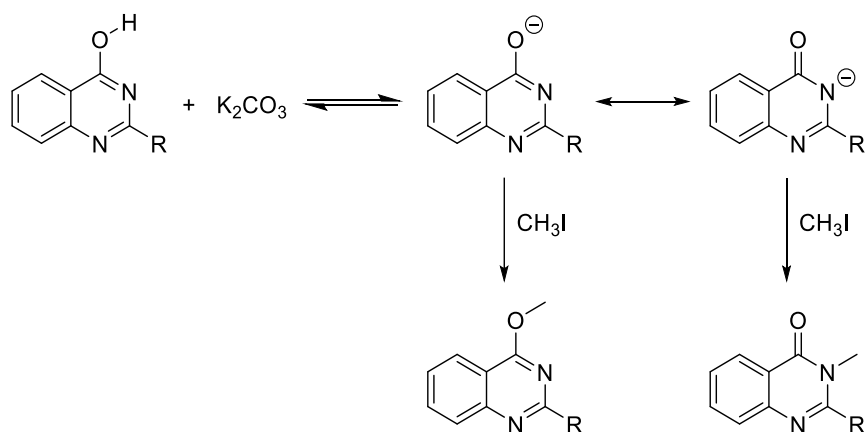


Sch. 5: Mechanizmus substitúcie

Predpokladaný mechanizmus (Sch. 5) vedie k tvorbe intermediátu chinazolín-4-olu s pentasulfidom difosforečným⁸⁷, ktorého následným štiepením vzniká v polohe 4 chinazolínu tiolová skupina a výsledným produktom je derivát chinazolín-4-tiolu.

3.5. Syntéza derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu

Posledným typom uskutočnených reakcií je metylácia derivátov chinazolín-4-olu, pri ktorej sa v bázičkom prostredí (uhličitan draselný) uvoľňuje z chinazolín-4-olu príslušný nukleofil, ktorý atakuje molekulu jódmetánu. Tieto reakcie viedli k tvorbe dvoch izomérov či už metylovaných na atóme kyslíka, alebo na atóme dusíka⁸⁸ (Sch. 6). Oba izoméry boli separované, ak to podmienky dovolili, pomocou rozdeľovacieho chromatografického stĺpca.



Sch. 6: Mechanizmus metylácie

4. MATERIÁLY A METÓDY

Všetky východiskové látky boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich Inc. a používané bez ďalšieho čistenia, rozpúšťadlá boli zakúpené od firmy Penta, s.r.o. TLC chromatografia bola vykonaná na hliníkových TLC doskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) s detekciou pod UV lampou ako stacionárna fáza, mobilnou fázou boli hexán, etylacetát, resp. metanol v rôznych pomeroch. Stacionárnou fázou kolóny rozdeľovacieho chromatografického stĺpca bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán-etylacetát v rôznych pomeroch. Farba bola určená subjektívne proti kontrastnému pozadiu.

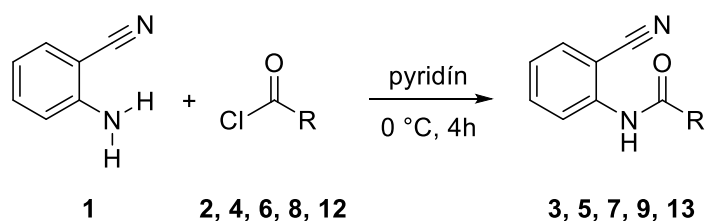
LRMS-APCI/ESI analýza prebiehala na prístroji AGILENT 500 od firmy Agilent Technologies s APCI sondou alebo ESI sondou, pričom rozpúšťadlom a mobilnou fázou bol metanol pre MS. Výsledné spektrá boli spracovávané a vyhodnocované softvérom VARIAN MS Workstation od firmy Varian, Inc. ako m/z relatívna intenzita molekulových hmotností vyjadrená v percentách intenzity hlavného píku.

NMR analýza bola uskutočnená na spektrometri VARIAN VNMR S500 (500 MHz pre ¹H NMR a 125 MHz pre ¹³C NMR) od firmy Varian, Inc. Chemické posuny boli zmerané ako hodnoty δ v parts per million (ppm) a nepriamo vzťahnuté k tetrametylsilánu (TMS) ako štandardu pomocou zostatkového signálu rozpúšťadla (chloroform-*d*₃ a dimetylsulfoxid DMSO-*d*₆). Výsledné spektrá boli vyhodnocované softvérom MestReNova 12 od firmy Mestrelab Research S.L. ako chemické posuny signálov v ppm, typy signálov, prípadne *J* konštanty a frekvenčný rozsah v Hz. Signály sú označené ako „s“ – singlet, „d“ – dublet, „t“ – triplet, „dd“ – dublet dubletu, „tdd“ – triplet dubletu dubletu a „m“ – multiplet.

IR analýza bola vykonaná na prístroji NICOLET 6700 FT-IR vybavenom ATR s použitím kryštálu germánia.

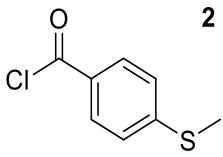
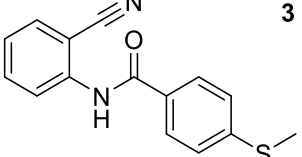
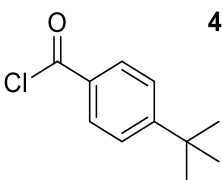
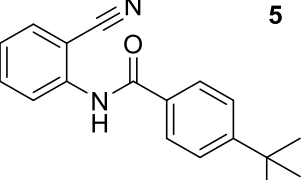
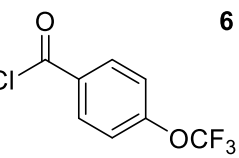
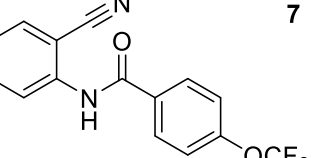
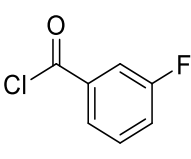
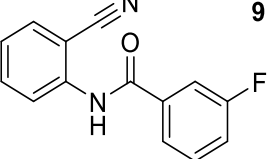
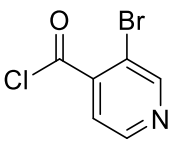
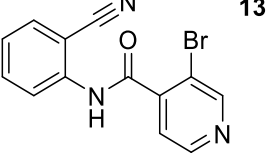
5. DISKUSIA A VÝSLEDKY

Prvou skupinou produktov boli *N*-(2-kyanfenyl)amidy karboxylových kyselín, ktoré boli výsledkom reakcie východiskových látok – chloridov karboxylových kyselín – s 2-aminobenzonitrilom (**1**) v prostredí pyridínu. V jednom prípade nebol východiskovou látkou chlorid, ale karboxylová kyselina – 3-brómpyridín-4-karboxylová kyselina (**10**) – ktorá bola pred vlastnou reakciou prevedená na chlorid chloráciou pomocou tionylchloridu (**11**) (kvantitatívny výťažok reakcie – 100%), ktorého prebytok bol po chlorácii oddestilovaný, následne bol vzniknutý chlorid (**12**) použitý v amidačnej reakcii podobne, ako ostatné chloridy (Sch. 7): 2-aminobenzonitril (**1**) bol rozpustený v potrebnom množstve pyridínu pri 0°C a následne bola táto zmes za neustáleho miešania pri 0°C pridávaná k ekvivalentným množstvám východiskových chloridov, v tomto prípade chlorid kyseliny 4-(metylsulfanyl)benzoovej (**2**), chlorid kyseliny 4-*terc*-butylbenzoovej (**4**), chlorid kyseliny 4-(trifluórmetoxy)benzoovej (**6**), chlorid kyseliny 3-fluórbenzoovej (**8**) a predchádzajúcou chloráciou vzniknutý chlorid kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej (**12**). Reakcie ďalej prebiehali pri 0°C po dobu 4 hodín, po skončení reakcie boli zvyškové rozpúšťadlá odparené na rotačnej vákuovej odparke. Prvými produktmi, ktoré vznikli, boli teda amidy, konkrétne *N*-(2-kyanfenyl)-4-(metylsulfanyl)benzamid (**3**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(*terc*-butyl)benzamid (**5**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(trifluórmetoxy)benzamid (**7**), *N*-(2-kyanfenyl)-3-fluórbenzamid (**9**) a 3-bróm-*N*-(2-kyanfenyl)-izonikotínamid (**13**). Výťažky reakcií sú zaznamenané v Tab. 5. U pripravených amidov sa objavil charakteristický signál aromatickej amidovej skupiny.



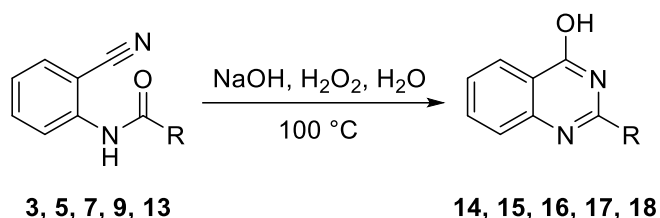
Sch. 7: Prvá skupina reakcií – syntéza amidov

Tab. 5: Výťažky produktov prvej skupiny reakcií - amidov

Východisková látka	Produkt	Výťažok	Výťažok (%)
 <p>2</p>	 <p>3</p>	3,455 g	100 %
 <p>4</p>	 <p>5</p>	5,741 g	81 %
 <p>6</p>	 <p>7</p>	0,378 g	43 %
 <p>8</p>	 <p>9</p>	4,740 g	100 %
 <p>12</p>	 <p>13</p>	3,108 g	42 %

Druhou skupinou produktov boli deriváty chinazolín-4-olu, ktoré vznikli cyklizáciou predtým pripravených amidov. K jednotlivým amidom – *N*-(2-kyanfenyl)-4-(metylsulfanyl)benzamid (**3**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(*tert*-butyl)benzamid (**5**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(trifluórmetoxy)benzamid (**7**), *N*-(2-kyanfenyl)-3-fluórbenzamid (**9**) a 3-bróm-*N*-(2-kyanfenyl)-izonikotínamid (**13**) – bol pridaný hydroxid sodný v navážkach spomenutých v experimentálnej časti. K týmto reakčným komponentom bol postupne pridávaný 30% vodný roztok peroxidu vodíka a destilovaná voda v množstvách uvedených v experimentálnej časti a takto pripravená reakčná zmes bola zahriata na 100 °C, pričom reakcie ďalej prebiehali pri tejto teplote po dobu 24 hodín pod refluxom (Sch. 8). Výslednými produktmi tejto skupiny reakcií boli deriváty chinazolín-4-olu,

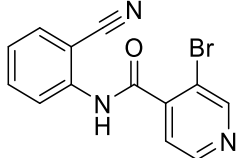
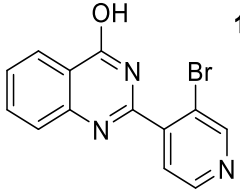
2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**14**), 2-[4-(*terc*-butyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**15**), 2-[4-(trifluórmetyoxyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**16**), 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ol (**17**) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ol (**18**). Výťažky reakcií sú zaznamenané v Tab. 6. V ^{13}C NMR spektrách bol signál uhlíka nitrilovej skupiny nahradený za signál novovytvoreného uhlíka 4 chinazolínu



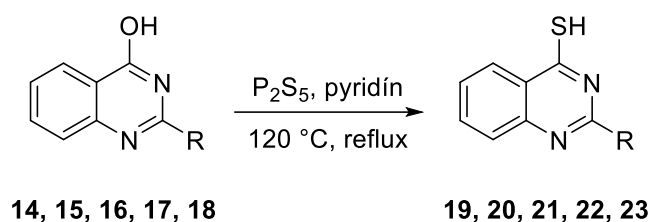
Sch. 8: Druhá skupina reakcií – syntéza derivátov chinazolín-4-olu

Tab. 6: Výťažky produktov druhej skupiny reakcií – derivátov chinazolín-4-olu

Reaktant	Produkt	Výt'azok	Výt'azok (%)
<p style="text-align: right;">3</p>	<p style="text-align: right;">14</p>	2,001 g	52 %
<p style="text-align: right;">5</p>	<p style="text-align: right;">15</p>	2,578 g	46 %
<p style="text-align: right;">7</p>	<p style="text-align: right;">16</p>	0,128 g	34 %
<p style="text-align: right;">9</p>	<p style="text-align: right;">17</p>	3,863 g	95 %

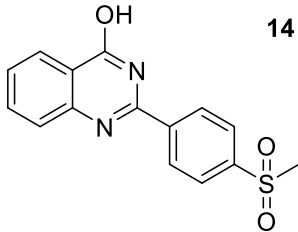
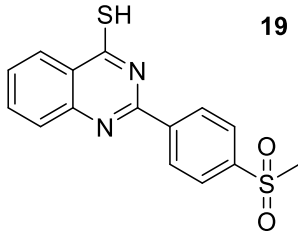
 13	 18	2,935 g	93 %
--	--	---------	------

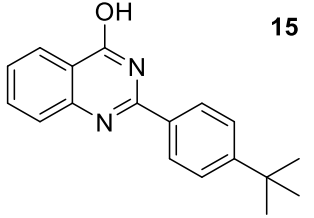
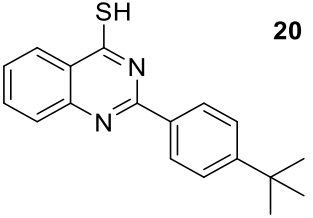
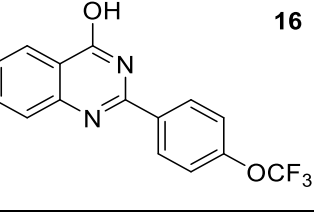
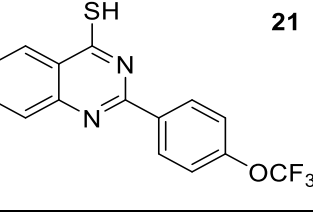
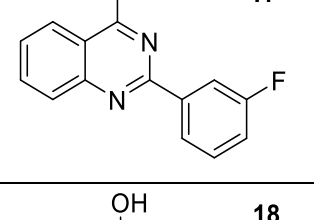
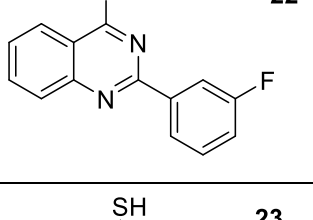
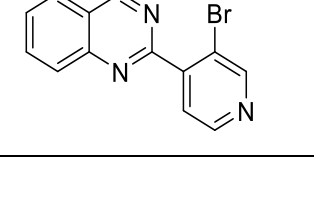
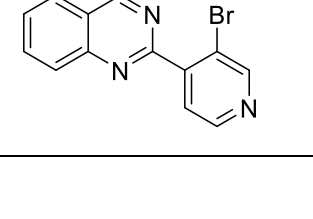
Tretou skupinou produktov boli deriváty chinazolín-4-tiolu, ktoré vznikli substitúciou hydroxylovej skupiny derivátov chinazolín-4-olu za tiol. K navážkam derivátov chinazolín-4-olu – (**14-18**), bolo po malých častiach pridávané ekvimolárne množstvo sulfidu fosforečného rozpusteného v pyridíne. Reakcie týchto zmesí prebiehali 4-5 hodín pri teplote 120 °C pod refluxom (Sch. 9). Syntetizovaných bolo päť derivátov chinazolín-4-tiolu, konkrétne 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-tiol (**19**), 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-tiol (**20**), 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-tiol (**21**), 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-tiol (**22**) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-tiol (**23**). Výťažky reakcií sú zaznamenané v Tab. 7. Štruktúra príslušných tiolov bola potvrdená NMR, MS a IR spektrami.



Sch. 9: Tretia skupina reakcií – syntéza derivátov chinazolín-4-tiolu

Tab. 7: Výťažky produktov tretej skupiny reakcií – derivátov chinazolín-4-tiolu

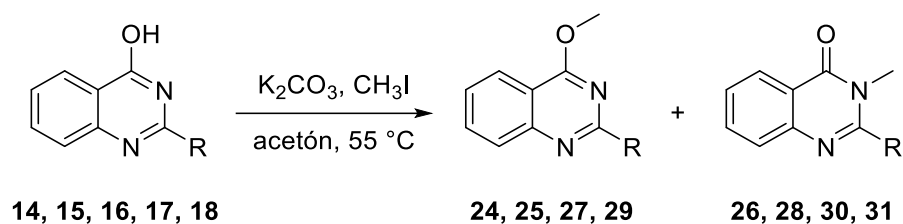
Reaktant	Produkt	Výtťažok	Výtťažok (%)
 14	 19	0,336 g	52 %

 <p>15</p>	 <p>20</p>	0,437 g	41 %
 <p>16</p>	 <p>21</p>	0,035 g	67 %
 <p>17</p>	 <p>22</p>	0,577 g	54 %
 <p>18</p>	 <p>23</p>	0,403 g	38 %

Poslednou skupinou produktov boli deriváty 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu. Východiskovými látkami ich syntéz boli deriváty chinazolín-4-olu z druhej skupiny reakcií. Syntézy prebiehali nasledovne (Sch. 10): k jednotlivým navážkam derivátov chinazolín-4-olu – 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**14**), 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**15**), 2-[4-(trifluórmetyloxy)fenyl]chinazolín-4-ol (**16**), 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ol (**17**) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ol (**18**) – bol pridaný uhličitan draselný a následne jódmetán. Reakcie prebiehali v prostredí acetónu pri teplote 55 °C po dobu 4 hodín. Výsledné produkty boli od seba oddelené rozdeľovacím chromatografickým stĺpcom, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán-etylacetát v pomeroch 9:1 alebo 8:2. Produktmi týchto syntéz boli štyri deriváty 4-metoxychinazolínu – 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]-4-metoxychinazolín (**24**), 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]-4-metoxychinazolín (**25**), 2-[4-(trifluórmetyloxy)fenyl]-4-metoxychinazolín (**27**) a 2-(3-fluórfenyl)-4-metoxychinazolín (**29**) – a štyri deriváty 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu – 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (**26**), 2-[4-(trifluórmetyloxy)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (**28**), 2-(3-

fluórfenyl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (**30**) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (**31**). O výsledku *O*- (**24, 25, 27, 29**) verus *N*- (**26, 28, 30, 31**) alkylácie rozhodovala poloha signálu metylu v ^{13}C NMR spektrách⁸⁸. Výťažky reakcií sú zaznamenané v Tab. 8.

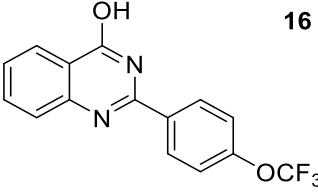
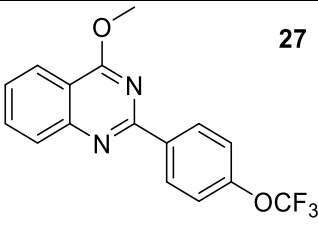
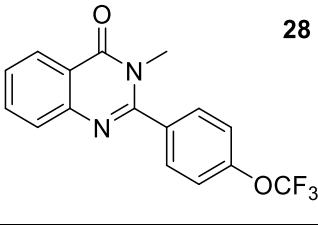
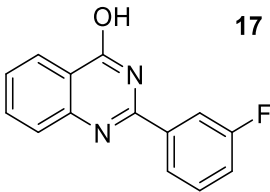
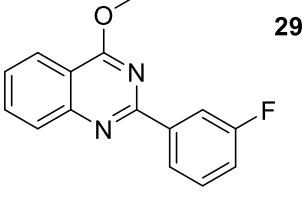
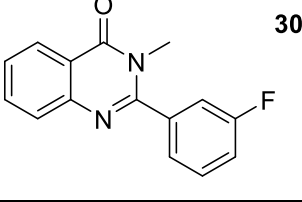
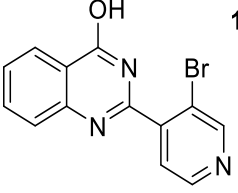
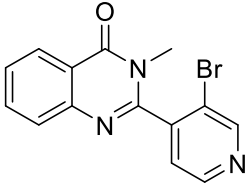
Izoméry 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (CHP032Db) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)-4-metoxychinazolín (CHP042D1) sa nepodarilo odizolovať v dostatočnej kvalite.



Sch. 10: Štvrtá skupina reakcií – syntéza derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu

Tab. 8: Výťažky produktov štvrtej skupiny reakcií – derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu

Reaktant	Produkt	Výtťažok	Výtťažok (%)
<p style="text-align: right;">14</p>	<p style="text-align: right;">24</p>	0,223 g	38 %
<p style="text-align: right;">15</p>	<p style="text-align: right;">25</p>	0,252 g	48 %
	<p style="text-align: right;">26</p>	0,173 g	33 %

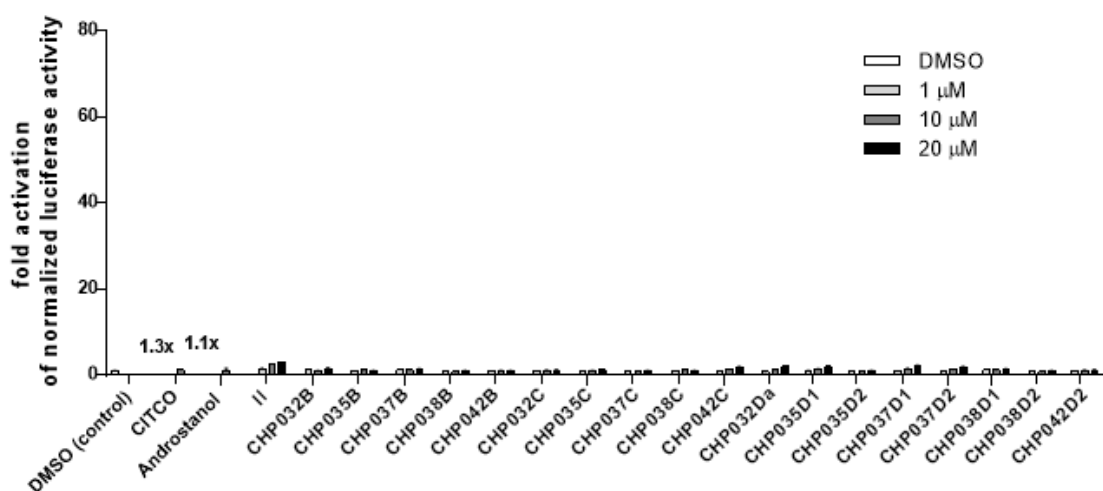
 <p>16</p>	 <p>27</p>	0,028 g	54 %
	 <p>28</p>	0,019 g	36 %
 <p>17</p>	 <p>29</p>	0,523 g	49 %
	 <p>30</p>	0,480 g	45 %
 <p>18</p>	 <p>31</p>	0,237 g	45 %

Testovanie biologickej aktivity

Všetky látky okrem skupiny *N*-(2-kyanfenyl)arylamidov boli testované na Katedre farmakológie a toxikológie v doteraz nepublikovanej štúdií, ktorá mala za úlohu zistiť aktivačný účinok syntetizovaných zlúčenín na CAR receptor. Metódou tohto testovania bolo gene reporter assay, ktorá spočíva v tom, že do ľudskej HepG2 hepatokarcinómovej bunky je vložený reportérový plazmid p(ER₆)₃-tata-luc obsahujúci tri sekvencie ER6 zahŕňajúce miesta pre väzbu hCAR, TATA box (viažu sa naň bazálne transkripčné faktory a RNA polymeráza II) a reportérový gén luciferázy. Okrem tohto plazmidu je do tejto bunky vložený expresný plazmid pre hCAR. hCAR po inkubácii a následnej aktivácii testovanou látkou ovplyvňuje expresiu reportérového enzýmu, čím sa zvýši koncentrácia

luciferázy. To má po pridaní luciferínu za následok zmenu luminiscencie – luciferín je aktivovaný enzýmom luciferáza na oxyluciferín, pričom táto reakcia spôsobuje luminiscenciu⁸⁹.

Testovanie prebiehalo proti vzorkám s kontrolnými látkami, ktorými boli CITCO, androstanol a predlohová molekula 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-olu (**II**) a tiež proti slepej vzorke obsahujúcej rozpúšťadlo DMSO v koncentrácii 0,1 %. Syntetizované látky boli testované v koncentráciách 1 μ M, 10 μ M a 20 μ M. Graf (Obr. 11) bol vztiahnutý ako násobky aktivácie luciferázovej aktivity relatívne ku kontrole.



Obr. 11: Testovanie biologickej aktivity ($p(ER\delta)_3$ -luc gene reporter assay) syntetizovaných derivátov

Z výsledkov testovania vyplýva, že žiadna z pripravených látok nevykázala vyšší aktivačný účinok na hCAR ako predlohovú molekulu (**II**).

6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

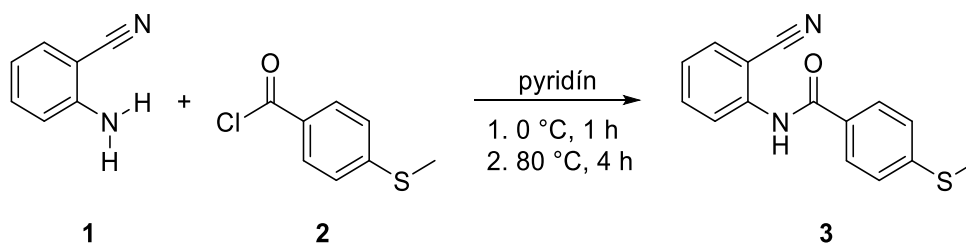
6.1. Syntéza *N*-(2-kyanofenyl)arylamidov

6.1.1. *N*-(2-kyanofenyl)-4-(metylsulfanyl)benzamid

Postup prípravy:

K navážke chloridu kyseliny 4-(metylsulfanyl)benzoovej (**2**) (2,003 g, 10,7 mmol) bol postupne pridávaný 2-aminobenzonitril (**1**) (1,364 g, 11,5 mmol) rozpustený v pyridíne (15 ml). Exotermická reakcia prebiehala jednu hodinu pri teplote 0 °C, neskôr bola zmes zahriata na 80 °C po dobu ďalších 4 hodín. Vzniknutá zrazenina (**3**) bola odfiltrovaná a premytá dietyléterom (25 ml), zvyšok rozpúšťadiel bol odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote 60°C dosucha.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 3,455 g, 100 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₂N₂OS

Molekulová hmotnosť: 268,33

Charakteristika:

Biela amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.69 (s, 1H, NH), 8.05 (tdd, *J* = 6.6, 1.8, 0.9 Hz, 2H, Ar), 8.01 – 7.94 (m, 2H, Ar), 7.86 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.59 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, Ar), 7.45 – 7.37 (m, 2H, Ar), 2.54 (s, 3H, SCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 146.0, 142.2, 140.7, 133.9, 129.5, 128.6, 127.3, 127.0, 125.1, 117.2, 109.6, 14.3.

LRMS (ESI): *m/z* relativna intenzita 291.1 [M+Na]⁺ (100), 261.0 (3), 249.1 (4), 240.2 (2), 236.1 (5), 225.0 (5), 213.0 (3), 200.3 (5), 189.0 (6), 175.1 (4), 165.2 (1), 155.1 (2), 139.1 (5), 129.1 (6), 121.1 (3), 102.3 (5).

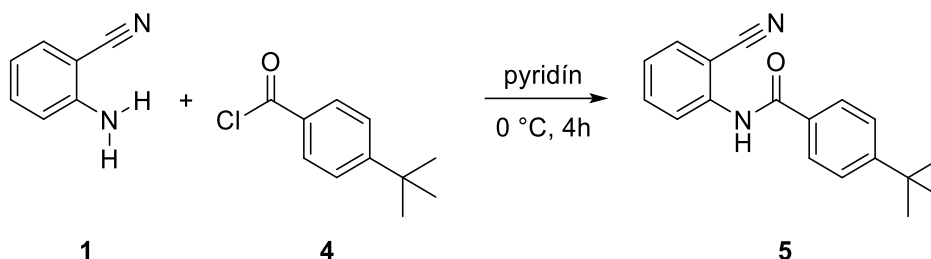
IR (ATR-Ge): 1014, 1091, 1117, 1160, 1192, 1242, 1257, 1291, 1315, 1400, 1435, 1486, 1515, 1540, 1558, 1598, 1652, 1746, 2223, 3066, 3296 cm⁻¹.

6.1.2. *N*-(2-kyanofenyl)-4-(*tert*-butyl)benzamid

Postup prípravy:

K navážke chloridu kyseliny 4-*tert*-butylbenzoovej (**4**) (4,97 ml, 25,4 mmol) bol postupne pridávaný 2-aminobenzonitril (**1**) (3,220 g, 27,2 mmol), ktorý bol rozpustený v pyridíne (40 ml). Reakcia prebiehala 4 hodiny pri teplote 0 °C. Produkt (**5**) bol získaný po odparení zvyškového pyridínu pomocou rotačnej vákuovej odparky pri 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 5,741 g, 81 %

Sumárny vzorec: C₁₈H₁₈N₂O

Molekulová hmotnosť: 278,36

Charakteristika:

Oranžová amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.71 (s, 1H, NH), , 8.61 – 8.57 (m, 1H, Ar), , 7.99 – 7.96 (m, 2H, Ar), 7.86 – 7.84 (m, 1H, Ar), 7.75 – 7.70 (m, 1H, Ar), 7.63 – 7.53 (m, 2H, Ar), 7.43 – 7.38 (m, 1H, Ar), 1.31 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.6, 155.3, 142.0, 133.9, 133.2, 128.0, 127.4, 127.0, 126.4, 125.5, 117.2, 109.6, 34.9, 31.1.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 279.1 [M+H]⁺ (100), 261.1 (3), 242.3 (2), 230.3 (1), 223.1 (6), 206.2 (2), 161.1 (21), 145.1 (4), 105.1 (1).

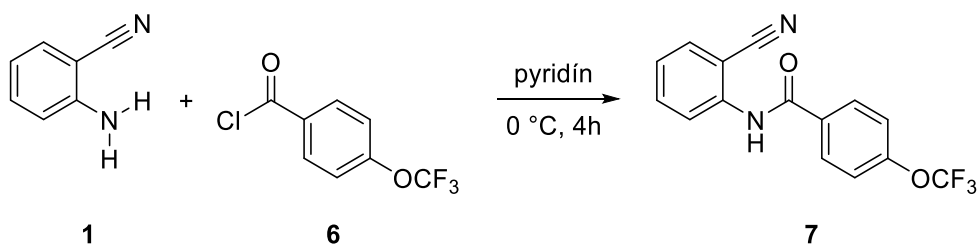
IR (ATR-Ge): 1023, 1134, 1163, 1198, 1248, 1274, 1316, 1361, 1395, 1448, 1477, 1510, 1536, 1581, 1612, 1604, 1656, 2224, 2967, 3033, 3224 cm⁻¹.

6.1.3. *N*-(2-kyanofenyl)-4-(trifluórmetyloxy)benzamid

Postup prípravy:

K navážke chloridu kyseliny 4-(trifluórmetyloxy)benzoovej (**6**) (0,45 ml, 11,1 mmol) bol pridaný 2-aminobenzonitril (**1**) (1,410 g, 11,9 mmol) rozpustený v pyridíne (7 ml). Reakcia prebiehala pri teplote 0 °C po dobu 4 hodín. Produkt (**7**) – zrazenina – bol získaný po filtrácii, premytí dietyléterom (20 ml) a po odparení zvyšku rozpúšťadiel pomocou rotačnej vákuovej odparky pri teplote 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,378 g, 43 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₉F₃N₂O₂

Molekulová hmotnosť: 306,24

Charakteristika:

Žltá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.91 (s, 1H, NH), 8.94 – 8.91 (m, 2H, Ar), 8.19 – 8.14 (m, 1H, Ar), 8.08 – 8.02 (m, 2H, Ar), 7.90 – 7.86 (m, 1H, Ar), 7.61 – 7.54 (m, 2H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.6, 146.0, 142.2, 134.0, 133.3, 132.8, 130.5, 127.3, 127.1, 126.7, 121.0, 119.1 (q, *J* = 256.5 Hz), 117.1, 108.7.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 329.1 [M+Na]⁺ (100), 307.1 [M+H]⁺ (73), 242.3 (5), 230.3 (6), 225.2 (3), 203.1 (2), 189.1 (3), 181.1 (1), 171.2 (4), 161.1 (3), 152.1 (1), 145.1 (3), 136.1 (5), 136.1 (5), 129.1 (6), 119.1 (6), 113.1 (3), 102.2 (4).

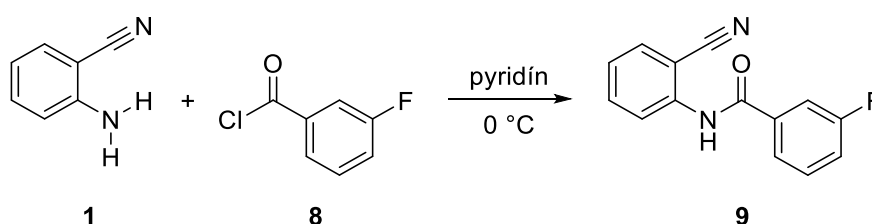
IR (ATR-Ge): 1018, 1112, 1165, 1207, 1245, 1316, 1439, 1493, 1503, 1520, 1605, 1655, 1687, 2233, 3257 cm⁻¹.

6.1.4. *N*-(2-kyanofenyl)-3-fluórbenzamid

Postup prípravy:

K navážke chloridu kyseliny 3-fluórbenzoovej (**8**) (1,92 ml, 15,8 mmol) bol pridávaný 2-aminobenzonitril (**1**) (2,002 g, 16,9 mmol) rozpustený v pyridíne (11 ml). Reakcia prebiehala pri teplote 0 °C po dobu 4 hodín. Vzniknutá zrazenina (**9**) bola po filtrácii premytá dietyléterom (20 ml) a zvyškové rozpúšťadlá boli následne odparené pomocou rotačnej vákuovej odparky pri teplote 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 4,740 g, 100 %

Sumárny vzorec: C₁₄H₉FN₂O

Molekulová hmotnosť: 240,24

Charakteristika:

Žltlooranžová amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.87 (s, 1H, NH), 8.94 – 8.90 (m, 1H, Ar), 8.07 – 8.03 (m, 1H, Ar), 7.90 – 7.86 (m, 1H, Ar), 7.86 – 7.81 (m, 1H, Ar), 7.77 – 7.72 (m, 1H, Ar), 7.66 – 7.57 (m, 1H, Ar), 7.52 – 7.47 (m, 1H, Ar), 7.47 – 7.41 (m, 1H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.5, 162.2 (d, *J* = 244.7 Hz), 142.3, 136.0, 133.7 (d, *J* = 85.3 Hz), 131.0 (d, *J* = 8.0 Hz), 127.3, 127.2, 126.8, 124.3 (d, *J* = 2.8 Hz), 119.3 (d, *J* = 21.1 Hz), 117.1, 114.9 (d, *J* = 22.9 Hz), 109.7

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 263.1 [M+Na]⁺ (11), 242.3 [M+H]⁺ (100), 237.1 (5), 223.1 (1), 186.3 (8), 146.1 (1), 123.1 (3), 100.3 (5).

IR (ATR-Ge): 1003, 1025, 1068, 1092, 1162, 1203, 1268, 1314, 1383, 1449, 1458, 1488, 1530, 1567, 1590, 1605, 1635, 1711, 2213, 2618, 3069, 3219, 3334 cm⁻¹.

Namerané spektrá sa zhodujú so záznamom v literatúre⁹⁰

6.1.5. 3-bróm-N-(2-kyanofenyl)-izonikotínamid

Postup prípravy:

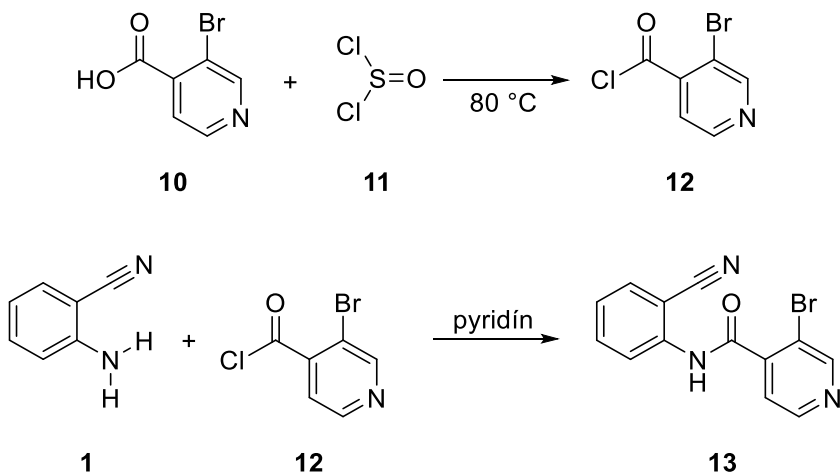
Príprava medziproduktu:

K navážke kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej (**10**) (5,002 g, 24,8 mmol) bol pridaný tionylchlorid (**11**) (50 ml, 0,689 mol). Reakčná zmes bola zahriata na 80°C po dobu 5 hodín, pričom chlorácia prebiehala pod refluxom. Zvyšný tionylchlorid bol následne oddestilovaný dosucha, pričom vznikla hnedá pevná zrazenina chloridu kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej (**12**) (5,456 g, 24,8 mmol)

Vlastná reakcia:

Chlorid kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej (**12**) (5,456 g, 24,8 mmol) reagoval s roztokom 2-aminobenzonitrilu (**1**) (2,930 g, 24,8 mmol) v pyridíne (25 ml). Reakcia prebiehala pri 0°C po dobu 4 hodín. Produkt (**13**) bol premytý dietyléterom (20 ml) a zvyškové rozpúšťadlá boli odparené pomocou rotačnej vákuovej odparky pri teplote 60 °C.

Schéma reakcií:



Výtazok reakcie: 3,108 g, 42 %

Sumárny vzorec: C₁₃H₈BrN₃O

Molekulová hmotnosť: 302,13

Charakteristika:

Žltastá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.06 (s, 1H, NH), 8.91 (s, 1H, Ar), 8.73 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar), 7.93 – 7.88 (m, 1H, Ar), 7.80 – 7.76 (m, 1H, Ar), 7.70 – 7.62 (m, 2H, Ar), 7.49 – 7.44 (m, 1H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.6, 152.1, 149.1, 144.9, 139.1, 134.3, 133.7, 127.1, 126.4, 123.2, 117.3, 116.8, 108.4.

LRMS (APCI): *m/z* (relativna intenzita) 302.2 [M+H]⁺ (100), 282.4 (2), 224.1 (6), 75.1 (1).

IR (ATR-Ge): 1021, 1033, 1083, 1099, 1132, 1164, 1179, 1246, 1265, 1287, 1305, 1399, 1445, 1479, 1528, 1581, 1605, 1686, 2221, 3077 cm⁻¹.

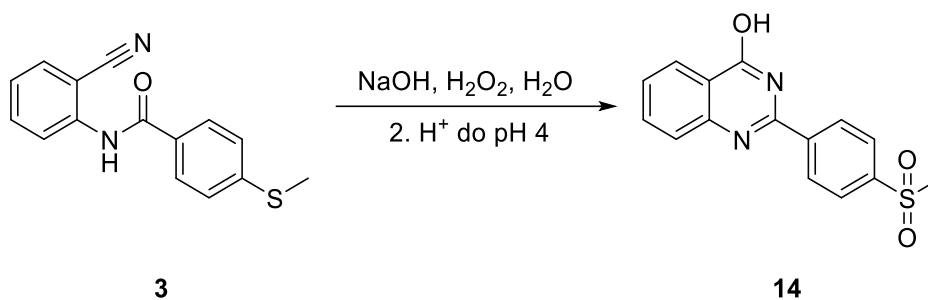
6.2. Príprava derivátov 4-hydroxychinazolínu

6.2.1. 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-ol

Postup prípravy:

K vzniknutému *N*-(2-kyanofenyl)-4-metylsulfanylbenzamidu (**3**) (3,432 g, 12,8 mmol) bol pridaný hydroxid sodný (15,843 g, 0,406 mol) a 30 % vodný roztok peroxidu vodíka (25 ml, mmol) a táto zmes bola zahriata na 100 °C po dobu 4 hodín. Následne bola okyslená kyselinou chlorovodíkovou do pH 4 a doplnená vodou (100 ml). Vzniknutá zrazenina (**14**) bola prefiltrovaná pomocou vákuovej vývevy, premytá vodou (25 ml) a vysušená v prostredí vákua.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 2,001 g, 52 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₂N₂O₃S

Molekulová hmotnosť: 300,33

Charakteristika:

Biela amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.76 (s, 1H, OH), 8.43 – 8.37 (m, 2H, Ar), 8.20 – 8.07 (m, 3H, Ar), 7.89 – 7.74 (m, 2H, Ar), 7.59 – 7.52 (m, 1H, Ar), 3.31 (s, 3H, SCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3, 151.2, 148.6, 143.1, 137.5, 134.9, 129.9, 129.0, 128.2, 127.3, 126.1, 125.3, 121.4, 43.5.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 301.1 [M+H]⁺ (100), 284.3 (1), 254.0 (15), 222.0 (14), 151.0 (5), 121.1 (1), 95 (3), 91.0 (5).

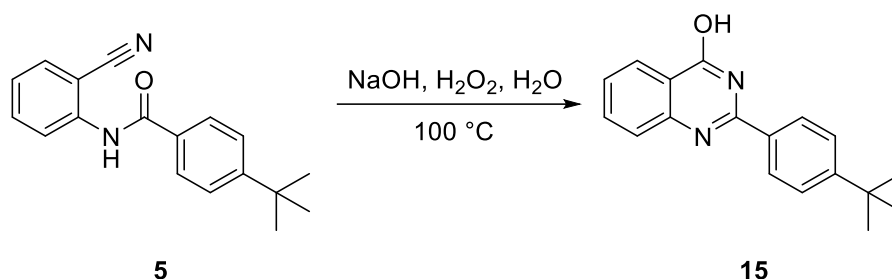
IR (ATR-Ge): 1020, 1092, 1120, 1152, 1189, 1243, 1293, 1317, 1343, 1400, 1418, 1448, 1471, 1484, 1514, 1560, 1599, 1659, 3033 cm^{-1} .

6.2.2. 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-ol

Postup prípravy:

K zmesi *N*-(2-kyanofenyl)-4-(*tert*-butyl)benzamidú (**5**) (5,720 g, 20,6 mmol) a hydroxidu sodného (23,010 g, 0,575 mol) bol postupne pridávaný 30% vodný roztok peroxidu vodíka (34 ml, 0,333 mol) a voda (142 ml). Reakcia prebiehala pod refluxom pri teplote 100 °C po dobu 24 hodín. Vytvorená zrazenina (**15**) bola prefiltrovaná, premytá vodou a vysušená v prostredí vákua.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 2,578 g, 46 %

Sumárny vzorec: C₁₈H₁₈N₂O

Molekulová hmotnosť: 278,36

Charakteristika:

Biela amorfná látka; t.t. v literatúre 239-242 °C⁹¹

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.6 (s, 1H, OH), 8.16 – 8.09 (m, 2H, Ar), 7.88 – 7.79 (m, 2H, Ar), 7.58 – 7.53 (m, 2H, Ar), 7.53 – 7.47 (m, 2H, Ar), 1.30 (d, *J* = 17.1 Hz, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.6, 155.9, 154.6, 134.9, 130.2, 129.4, 127.8, 126.7, 126.1, 125.7, 125.6, 121.1, 35.0, 31.2.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 279.1 [M+H]⁺ (100), 264.1 (8), 223.0 (4), 207.1 (5), 179.1 (3), 139.1 (1), 117.0 (3), 91.0 (8).

IR (ATR-Ge): 1015, 1022, 1135, 1145, 1188, 1242, 1267, 1289, 1300, 1316, 1342, 1364, 1424, 1445, 1471, 1485, 1555, 1598, 1610, 1672, 2970, 3065 cm⁻¹.

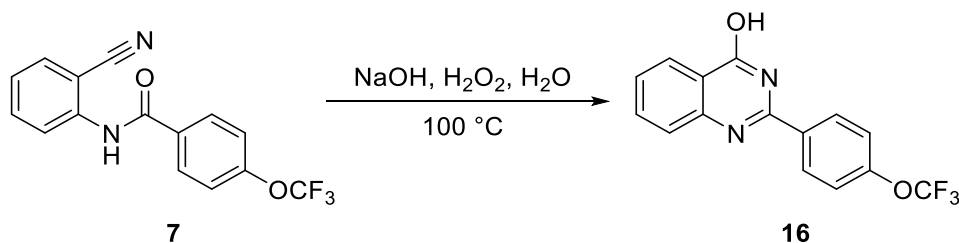
Namerané spektrá súhlasia so záznamom v literatúre⁹¹.

6.2.3. 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-ol

Postup prípravy:

K zmesi *N*-(2-kyanofenyl)-4-metoxybenzamidu (**7**) (0,378 g, 1,2 mmol) a hydroxidu sodného (1,362 g, 34,1 mmol) bol postupne pridávaný 30% vodný roztok peroxidu vodíka (2 ml, 19,6 mmol) a voda (10 ml). Reakcia prebiehala pod refluxom pri teplote 100 °C po dobu 24 hodín. Po vychladnutí bola zmes okyslená kyselinou chlorovodíkovou do pH 4. Vytvorená zrazenina (**16**) bola prefiltrovaná, premytá vodou a vysušená v prostredí vákuua.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,128 g, 34 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₉F₃N₂O₂

Molekulová hmotnosť: 306,24

Charakteristika:

Biela amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.64 (s, 1H, OH), 8.33 – 8.27 (m, 2H, Ar), 7.88 – 7.81 (m, 1H, Ar), 7.77 – 7.72 (m, 1H, Ar), 7.57 – 7.50 (m, 3H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.7, 151.7, 150.9, 149.0, 135.1, 132.4, 130.6, 128.0, 127.3, 126.3, 121.5, 121.3, 120.46 (q, *J* = 257.1 Hz).

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 307.0 [M+H]⁺ (100), 282.2 (5), 256.2 (3), 207.1 (2), 179.0 (1), 121.0 (1), 91.1 (3).

IR (ATR-Ge): 3740, 3648, 3566, 3136, 3101, 1659, 1607, 1576, 1488, 1471, 1346, 1292, 1259, 1213, 1166, 1148, 1122 cm⁻¹.

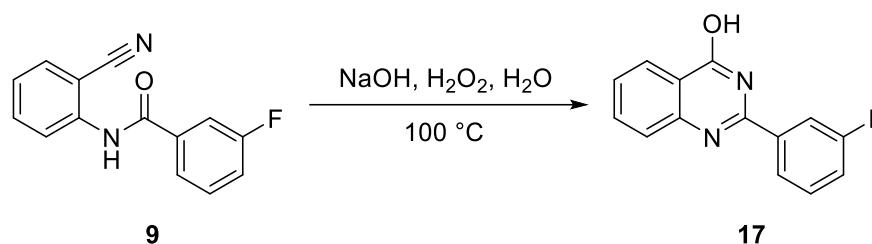
Namerané NMR spektrá súhlasia so záznamom v literatúre⁹².

6.2.4. 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ol

Postup prípravy:

K zmesi *N*-(2-kyanofenyl)-3-fluórbenzamidu (**9**) (4,060 g, 16,5 mmol) a hydroxidu sodného (22,121 g, 0,553 mol) bol postupne pridávaný 30% vodný roztok peroxidu vodíka (34 ml, 0,333 mol) a voda (140 ml). Reakcia prebiehala pod refluxom pri teplote 100 °C po dobu 24 hodín. Po vychladnutí bola zmes okyslená do pH 4 kyselinou chlorovodíkovou, vytvorená zrazenina (**17**) bola prefiltrovaná, premytá vodou a vysušená v prostredí vákua.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 3,863 g, 95 %

Sumárny vzorec: C₁₄H₉FN₂O

Molekulová hmotnosť: 240,24

Charakteristika:

Biela amorfná látka; t.t. v literatúre 232-234 °C⁹³

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.59 (s, 1H, OH), 8.17 – 8.14 (m, 1H, Ar), 8.07 – 8.03 (m, 1H, Ar), 8.02 – 7.98 (m, 1H, Ar), 7.86 – 7.82 (m, 1H, Ar), 7.76 – 7.74 (m, 1H, Ar), 7.63 – 7.57 (m, 1H, Ar), 7.56 – 7.51 (m, 1H, Ar), 7.46 – 7.41 (m, 1H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.2, 162.3, 161.3, 150.3 (d, *J* = 332.3 Hz), 135.2, (d, *J* = 8.0 Hz), 134.9, 130.9 (d, *J* = 8.3 Hz), 127.7, 127.1, 126.1, 124.1 (d, *J* = 2.8 Hz), 121.3, 118.4 (d, *J* = 21.1 Hz), 114.7 (d, *J* = 24.0 Hz).

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 241.0 [M+H]⁺ (100), 221.1 (17), 198.1 (5), 180.2 (3), 165.1 (2), 153.1 (3), 131.1 (1), 117.1 (5), 97.2 (3), 91.0 (13), 83.1 (3).

IR (ATR-Ge): 1025, 1092, 1107, 1150, 1201, 1252, 1279, 1297, 1310, 1347, 1438, 1454, 1471, 1483, 1507, 1566, 1583, 1610, 1678, 2912, 3042 cm⁻¹.

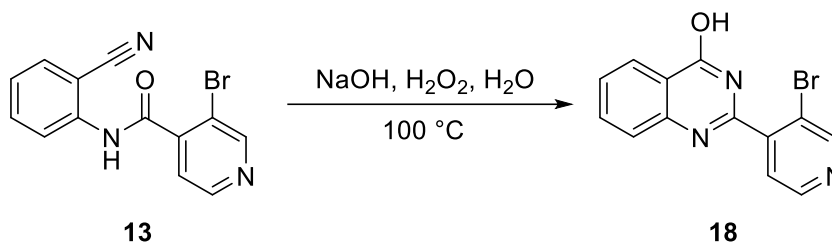
Namerané spektrá súhlasia so záznamom v literatúre⁹³.

6.2.5. 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ol

Postup prípravy:

K zmesi 3-bróm-*N*-(2-kyanofenyl)-izonikotínamidu (**13**) (3,158 g, 10,45 mmol) a hydroxidu sodného (11,572 g, 0,289 mol) bol postupne pridávaný 30% vodný roztok peroxidu vodíka (18 ml, 0,176 mmol) a voda (75 ml). Reakcia prebiehala pod refluxom pri teplote 100 °C po dobu 24 hodín. Po vychladnutí bola reakčná zmes zneutralizovaná kyselinou chlorovodíkovou do pH 4. Vytvorená zrazenina (**18**) bola prefiltrovaná, premytá vodou a vysušená v prostredí vákua.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 2,935 g, 93 %

Sumárny vzorec: C₁₃H₈BrN₃O

Molekulová hmotnosť: 302,13

Charakteristika:

Žltastá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.93 (s, 1H, Ar), 8.73 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar), 8.19 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H Ar), 7.92 – 7.82 (m, 1H, Ar), 7.79 – 7.66 (m, 2H, Ar), 7.64 – 7.56 (m, 1H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.4, 151.9, 151.4, 148.9, 148.4, 142.8, 135.0, 127.7, 127.7, 126.1, 125.2, 121.6, 119.4.

LRMS (APCI): *m/z* (relatívna intenzita) 302.2 [M+H]⁺ (100), 258.1 (9), 224.2 (8), 175.1 (1), 119.1 (1), 92.1 (3).

IR (ATR-Ge): 1030, 1083, 1102, 1111, 1145, 1215, 1242, 1261, 1280, 1304, 1318, 1337, 1400, 1455, 1468, 1498, 1526, 1565, 1589, 1606, 1665, 1682, 2919, 3038 3419 cm⁻¹.

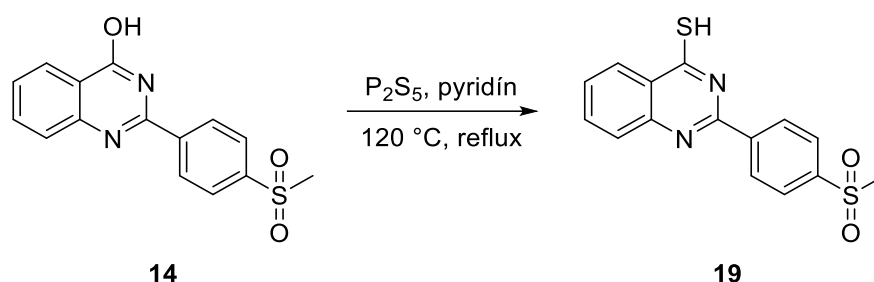
6.3. Príprava derivátov 4-sulfonylchinazolínu

6.3.1. 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-tiol

Postup prípravy:

K navážke 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-olu (**14**) (0,611 g, 2,03 mmol) bol pridaný sulfid fosforečný (0,457 g, 2,06 mmol) rozpustený v pyridíne (15 ml). Takto pripravená zmes bola zahriata na 120 °C a reakcia prebiehala pri tejto teplote po dobu 5 hodín pod refluxom. Výsledný produkt (**19**) bol získaný rozdeľovacím chromatografickým stĺpcom, ktorého stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán – etylacetát v pomere 9:1. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené dosucha pomocou rotačnej vákuovej odparky pri teplote 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,336 g, 52 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₂N₂S₂O₂

Molekulová hmotnosť: 316,39

Charakteristika:

Žltastá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.15 (s, 1H, SH), 8.65 – 8.61 (m, 1H, Ar), 8.42 – 8.37 (m, 2H, Ar), 8.15 – 8.08 (m, 2H, Ar), 7.96 – 7.91 (m, 1H, Ar), 7.83 – 7.80 (m, 1H, Ar), 7.67 – 7.62 (m, 1H, Ar), 3.31 (s, 3H, SCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 188.1, 150.8, 143.5, 137.2, 136.1, 130.1, 129.3, 129.1, 128.4, 128.3, 127.6, 127.5, 125.5, 43.8.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 315.1 [M-H]⁻ (100), 298.2 (10), 283.3 (3), 255.3 (1).

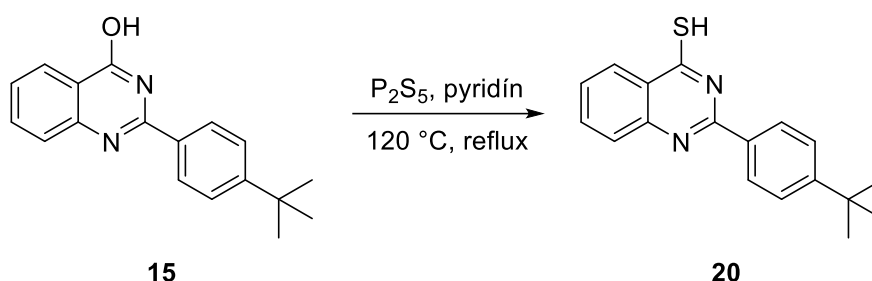
IR (ATR-Ge): 3072, 2923, 2853, 1597, 1568, 1505, 1466, 1331, 1282, 1227, 1192, 1146, 1091, 1018 cm^{-1} .

6.3.2. 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-tiol

Postup prípravy:

K naváženému množstvu 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-olu (**15**) (1,001 g, 3,6 mmol) bol pridaný sulfid fosforečný (0,802 g, 3,61 mmol) rozpustený v pyridíne (25 ml). Zmes bola zahriata na 120 °C po dobu 5 hodín, pričom reakcia prebiehala pod refluxom. Výsledný produkt (**20**) bol odizolovaný rozdeľovacou stĺpcovou chromatografiou, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou bola zmes hexán – etylacetát v pomere 9:1. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené dosucha pomocou rotačnej vákuovej odparky pri teplote 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,437 g, 41 %

Sumárny vzorec: C₁₈H₁₈N₂S

Molekulová hmotnosť: 294,42

Charakteristika:

Oranžová amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 10.95 (s, 1H, SH), 8.75 – 8.70 (m, 1H, Ar), 8.01 – 7.97 (m, 2H, Ar), 7.60 – 7.56 (m, 2H, Ar) 7.84 – 7.81 (m, 2H, Ar), 7.55 – 7.50 (m, 1H, Ar), 1.38 (s, 9H, CCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 187.4, 155.8, 150.0, 145.0, 135.6, 130.0, 128.8, 128.5, 128.0, 127.7, 126.7, 126.3, 35.0, 31.1.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 293.0 [M-H]⁻ (100) 277.0 (15).

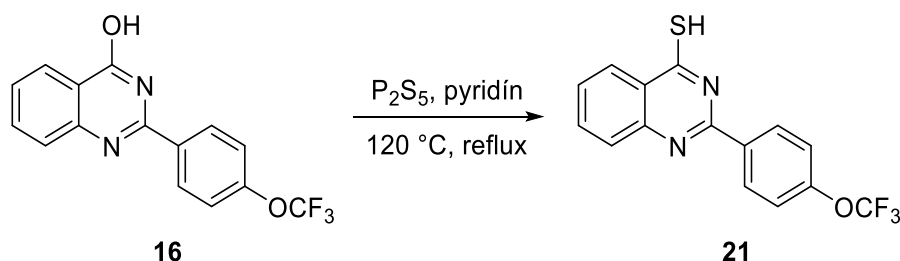
IR (ATR-Ge): 1019, 1030, 1077, 1112, 1125, 1134, 1155, 1198, 1225, 1253, 1267, 1284, 1303, 1319, 1347, 1364, 1404, 1435, 1467, 1500, 1569, 1594, 1665, 2963, 3049 cm^{-1} .

6.3.3. 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-tiol

Postup prípravy:

K naváženému množstvu 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-olu (**16**) (50 mg, 0,163 mmol) bol pridaný sulfid fosforečný (36 mg, 0,163 mmol) rozpustený v pyridíne (10 ml). Zmes bola zahriata na 120 °C po dobu 5 hodín, pričom reakcia prebiehala pod refluxom. Výsledný produkt (**21**) bol odizolovaný rozdeľovacou stĺpcovou chromatografiou, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou bola zmes hexán – etylacetát v pomere 9:1. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke pri 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtazok reakcie: 0,035 g, 67 %

Sumárny vzorec: C₁₅H₉F₃N₂OS

Molekulová hmotnosť: 322,31

Charakteristika:

Žltá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.05 (s, 1H, SH), 8.75 – 8.70 (m, 1H, Ar), 8.18 – 8.09 (m, 2H, Ar), 7.89 – 7.79 (m, 2H, Ar), 7.59 – 7.53 (m, 1H, Ar), 7.45 – 7.40 (m, 2H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187.5, 152.0, 148.7, 144.6, 135.9, 130.3, 130.1, 128.7, 128.5, 127.8, 121.4, 119.3 (q, *J* = 256.2 Hz), 29.7.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 323.1 [M+H]⁺ (100), 307.1 (17), 289.1 (21.5), 264.1 (1), 91.1 (2).

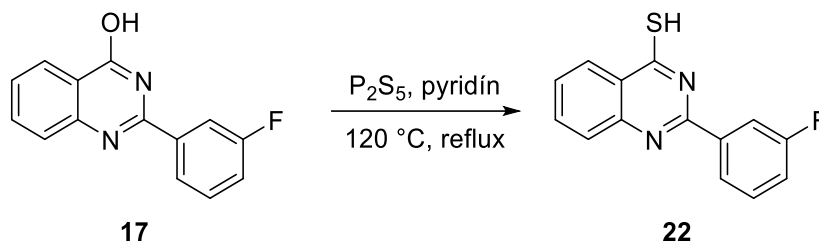
IR (ATR-Ge): 3117, 2920, 2850, 1603, 1570, 1503, 1468, 1437, 1348, 1265, 1252, 1225, 1201, 1164, 1134, 1111, 1082, 1032, 1019 cm^{-1} .

6.3.4. 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-tiol

Postup prípravy:

K naváženému množstvu 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-olu (**17**) (1,002 g, 4,2 mmol) bol pridaný sulfid fosforečný (0,934 g, 4,2 mmol) rozpustený v pyridíne (10 ml). Zmes bola zahriata na 120 °C po dobu 5 hodín, pričom reakcia prebiehala pod refluxom. Výsledný produkt (**22**) bol odizolovaný rozdeľovacou stĺpcovou chromatografiou, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou bola zmes hexán – etylacetát v pomere 9:1. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke pri 60 °C.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,577 g, 54 %

Sumárny vzorec: C₁₄H₉FN₂S

Molekulová hmotnosť: 256,30

Charakteristika:

Žltá amorfná látka; t.t. v literatúre 143-145 °C⁹⁴

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.0 (s, 1H, SH), 8.64 – 8.58 (m, 1H, Ar), 8.04 – 7.97 (m, 2H, Ar), 7.93 – 7.88 (m, 1H, Ar), 7.81 – 7.77 (m, 1H, Ar), 7.64 – 7.57 (m, 2H, Ar), 7.49 – 7.42 (m, 1H, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.0, 161.1, 150.5 (d, *J* = 2.9 Hz), 144.2, 135.7, 134.5 (d, *J* = 8.1 Hz), 130.8 (d, *J* = 8.1 Hz), 129.5, 128.5, 127.9, 124.9 (d, *J* = 2.9 Hz), 118.5 (d, *J* = 21.1 Hz), 115.5 (d, *J* = 24.2 Hz).

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 254.9[M-H]⁻ (100), 239.0 (2.5).

IR (ATR-Ge): 1029, 1131, 1157, 1193, 1222, 1251, 1302, 1349, 1435, 1446, 1489, 1505, 1561, 1598, 2925, 3158 cm⁻¹.

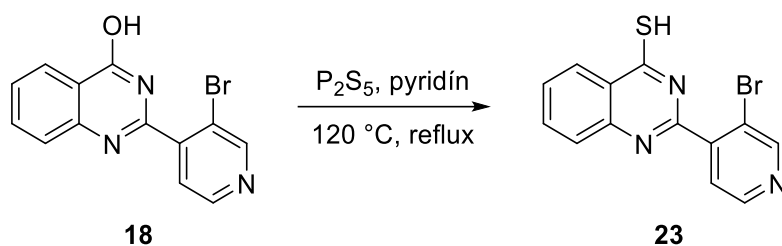
Namerané spektrá súhlasia so záznamom v literatúre⁹⁴.

6.3.5. 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-tiol

Postup prípravy:

K naváženému množstvu 2-(3-(brómpyridín)chinazolín-4-olu (**18**) (1,011 g, 3,3 mmol) bol pridaný sulfid fosforečný (0,744 g, 3.3 mmol) rozpustený v pyridíne (11 ml). Zmes bola zahriata na 120 °C po dobu 4 hodín, pričom reakcia prebiehala pod refluxom. Výsledný produkt (**23**) bol odizolovaný rozdeľovacou stĺpcovou chromatografiou, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou bola zmes hexán – etylacetát v pomere 8:2. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke pri 60 °C.

Schéma reakcie:



Výt'azok reakcie: 0,403 g, 38 %

Sumárny vzorec: C₁₃H₈BrN₃S

Molekulová hmotnosť: 316,96

Charakteristika:

Oranžová amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.93 (1H, d, *J* = 0.6 Hz, Ar), 8.74 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, Ar), 8.64 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, Ar), 7.97 – 7.93 (1H, m, Ar), 7.80 – 7.76 (2H, m, Ar), 7.70 – 7.66 (1H, m, Ar).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187.0, 151.7, 150.1, 148.8, 144.0, 142.3, 135.9, 129.4, 129.1, 128.5, 128.2, 125.4, 119.7.

LRMS (APCI): *m/z* (relatívna intenzita) 318.9 [M+H]⁺ (100), 302.0 (15), 283.2 (49), 269.2 (8), 255.2 (55), 231.1 (1), 222.0 (11).

IR (ATR-Ge): 1022, 1033, 1075, 1105, 1130, 1148, 1177, 1215, 1238, 1361, 1171, 1308, 1352, 1402, 1435, 1463, 1478, 1507, 1531, 1565, 1579, 1601, 1624, 1655, 1668, 2924, 2975, 3070, 3141cm⁻¹.

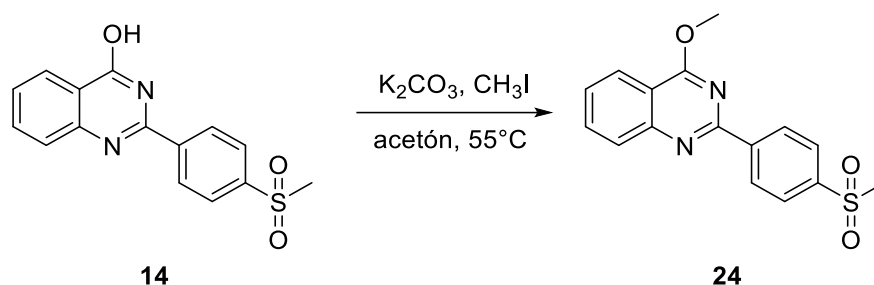
6.4. Príprava derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu

6.4.1. 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]-4-metoxychinazolín

Postup prípravy:

K 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-olu (**14**) (0,618 g, 2,06 mmol) bol pridaný uhličitan draselný (1,434 g, 10,38 mmol) a acetón (20 ml). K zmesi bol následne pridávaný jódetán (5,1 ml, 81,92 mmol). Reakcia prebiehala po dobu 4 hodín pri teplote 55 °C. Produkt (**24**) bol odizolovaný pomocou rozdeľovacieho chromatografického stĺpca, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou bola zmes hexán – etylacetát v pomere 8:2

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,223 g, 38 %

Sumárny vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$

Molekulová hmotnosť: 282,36

Charakteristika:

Biela amorfná látka

^1H NMR: (500 MHz, CDCl_3) δ 8.82 – 8.78 (m, 2H, Ar), 8.21 – 8.18 (m, 1H, Ar), 8.10 – 8.06 (m, 2H, Ar), 8.03 – 8.00 (m, 1H, Ar), 7.89 – 7.85 (m, 1H, Ar), 7.60 – 7.56 (m, 1H, Ar), 4.31 (s, 3H, CH_3), 3.12 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR: (126 MHz, CDCl_3) δ 167.3, 158.0, 151.5, 143.3, 141.6, 133.8, 129.2, 128.1, 127.4, 127.3, 123.5, 115.5, 54.3, 44.5.

LRMS (ESI): neionizuje

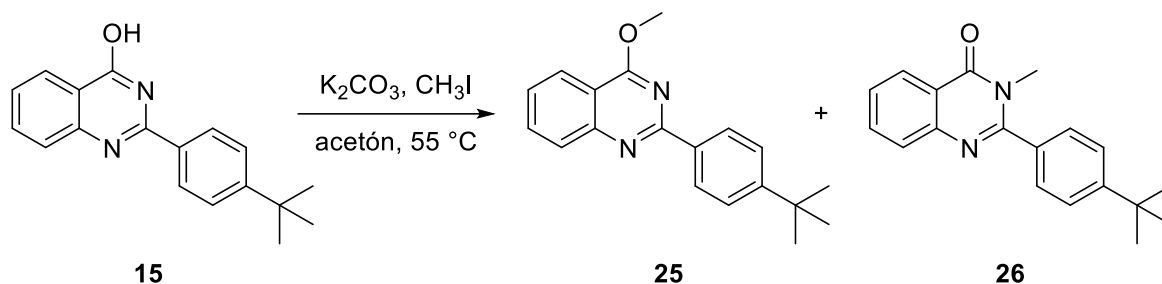
IR (ATR-Ge): 1020, 1084, 1091, 1107, 1152, 1198, 1272, 1298, 1333, 1352, 1377, 1406, 1452, 1502, 1556, 1576, 1622, 2937, 3005, 3021 cm^{-1} .

6.4.2. 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]-4-metoxychinazolín a 2[4-(*tert*-butyl)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón

Postup prípravy:

K 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-olu (**15**) (0,497 g, 1,8 mmol) bol pridaný uhličitan draselný (1,2 g, 8,97 mmol) a acetón (23 ml). K tejto zmesi bol postupne pridávaný jódmetán (4,45 ml, 71,6 mmol). Reakcia prebiehala po dobu 4 hodín pri teplote 55 °C. Produkty (**25**, **26**) boli odizolované použitím rozdeľovacieho chromatografického stĺpca, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou bola zmes hexán – etylacetát v pomeroch 9:1 a 7:3. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené na rotačnej vákuovej odparke.

Schéma reakcie:



Produkt 1 – 4-metoxy-2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín (**25**)

Výtťažok reakcie: 0,252 g, 48 %

Sumárny vzorec: $C_{19}H_{20}N_2O$

Molekulová hmotnosť: 292,38

Charakteristika:

Bezfarebná olejovitá látka

1H NMR: (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.55 – 8.51 (m, 1H, Ar), 8.18 – 8.14 (m, 1H, Ar), 8.02 – 7.96 (m, 2H, Ar), 7.84 – 7.79 (m, 1H, Ar), 7.57 – 7.53 (m, 1H, Ar), 7.53 – 7.45 (m, 2H, Ar), 3.92 (s, 3H, CH_3), 1.55 – 1.21 (d, $J = 24.3$ Hz, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR: (126 MHz, $CDCl_3$) δ 167.1, 156.5, 151.9, 133.3, 129.4, 128.2, 127.4, 126.1, 125.3, 125.3, 123.4, 115.2, 51.9, 35.0, 31.1.

LRMS (ESI): m/z relatívna intenzita 293.4 [M+H]⁺ (100), 278.2 (12.5), 237.1 (8.8).

IR (ATR-Ge): 1018, 1104, 1117, 1162, 1188, 1243, 1280, 1314, 1329, 1348, 1377, 1393, 1409, 1435, 1453, 1496, 1555, 1576, 1621, 1609, 1724, 2869, 2905, 2961 cm⁻¹.

Produkt 2 – 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolin-4-ón (26)

Výtťažok reakcie: 0,173 g, 33 %

Sumárny vzorec: C₁₉H₂₀N₂O

Molekulová hmotnosť: 292,38

Charakteristika:

Biela amorfná látka, t.t. v literatúre 192-194 °C⁹⁵

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 8.35 – 8.32 (m, 1H, Ar), 8.16 – 8.12 (m, 1H, Ar), 7.85 – 7.73 (m, 2H, Ar), 7.61 – 7.58 (m, 1H, Ar), 3.54 (s, 3H, NCH₃), 1.38 (d, $J = 11.6$ Hz, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 162.8, 156.3, 153.4, 147.4, 134.2, 132.5, 127.8, 127.5, 126.8, 126.6, 125.8, 120.5, 34.9, 34.3, 31.2.

LRMS (ESI): m/z relatívna intenzita 293.2 [M+H]⁺ (100), 87.1 (2.5).

IR (ATR-Ge): 1016, 1113, 1302, 1356, 1418, 1446, 1474, 1555, 1568, 1597, 1608, 1672, 2959, 3065 cm⁻¹.

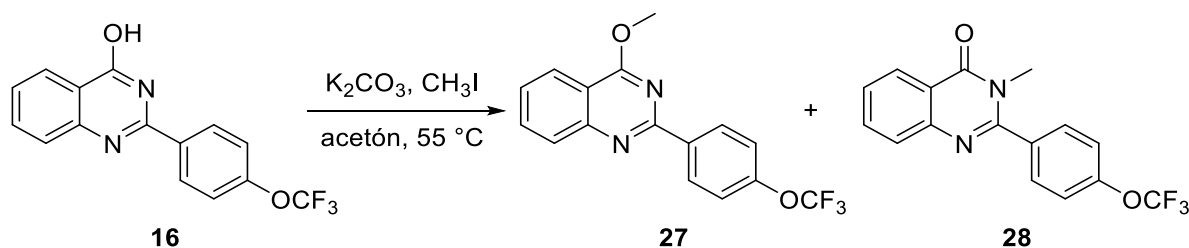
Namerané NMR spektrá sa zhodujú so záznamom v literatúre⁹⁵.

6.4.3. 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]-4-metoxychinazolín a 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón

Postup prípravy:

K 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-2-olu (**16**) (50 mg, 0,2 mmol) bol pridaný uhličitan draselný (0,113 g, 0,8 mmol) a acetón (5 ml). K tejto zmesi bol postupne pridávaný jódmetán (0,5 ml, 8,0 mmol). Reakcia prebiehala po dobu 4 hodín pri teplote 55 °C. Produkty (**27**, **28**) boli odizolované pomocou rozdeľovacieho chromatografického stĺpca, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán – etylacetát v pomere 9:1 a 8:2. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené na rotačnej vákuovej odparke.

Schéma reakcie:



Produkt 1 – 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]-4-metoxychinazolín (**27**)

Výtťažok reakcie: 0,028 g, 54 %

Sumárny vzorec: $C_{16}H_{11}F_3N_2O_2$

Molekulová hmotnosť: 320,27

Charakteristika:

Biela amorfná látka

1H NMR: (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.67 – 8.60 (m, 2H, Ar), 8.19 – 8.13 (m, 1H, Ar), 8.01 – 7.95 (m, 1H, Ar), 7.87 – 7.79 (m, 1H, Ar), 7.58 – 7.50 (m, 1H, Ar), 7.40 – 7.32 (m, 2H, Ar), 4.28 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H, OCH_3)

^{13}C NMR: (126 MHz, $CDCl_3$) δ 167.2, 158.7, 151.7, 151.0, 136.7, 133.6, 130.1, 127.9, 126.7, 123.5, 120.5, 120.5 (q, $J = 257.5$ Hz) 115.3, 54.11.

LRMS (ESI): m/z relatívna intenzita 321.1 $[M+H]^+$ (100), 289.0 (2), 202.1 (15).

IR (ATR-Ge): 1018, 1088, 1102, 1119, 1146, 1156, 1172, 1195, 1208, 1349, 1264, 1331, 1354, 1374, 1415, 1452, 1459, 1499, 1511, 1563, 1577, 1601, 1624, 1732, 2850, 2919 cm⁻¹.

Produkt 2 – 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (27)

Výtťažok reakcie: 0,019 g, 36%

Sumárny vzorec: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂

Molekulová hmotnosť: 320,27

Charakteristika:

Biela amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 8.36 – 8.31 (m, 1H, Ar), 7.81 – 7.74 (m, 1H, Ar), 7.77 – 7.70 (m, 1H, Ar), 7.69 – 7.62 (m, 2H, Ar), 7.56 – 7.49 (m, 1H, Ar), 7.42 – 7.37 (m, 2H, Ar), 3.52 (s, 3H, NCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 162.6, 154.8, 150.4, 147.1, 134.5, 134.0, 129.9, 127.5, 127.3, 126.8, 122.6 (q, *J* = 256.5 Hz), 121.3, 120.6, 34.3.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 321.5 [M+H]⁺ (100), 202.1 (15).

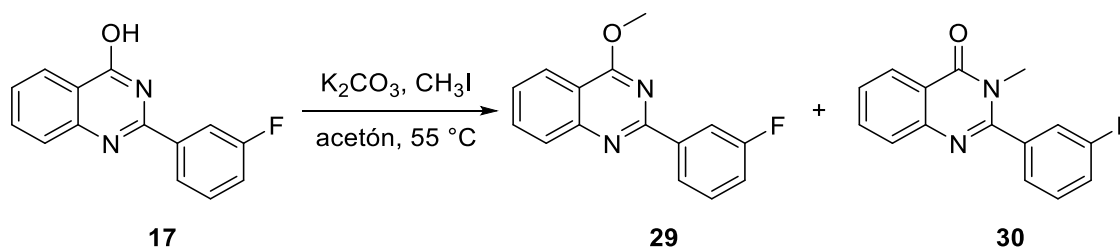
IR (ATR-Ge): 1018, 1044, 1108, 1148, 1179, 1211, 1260, 1275, 1291, 1356, 1414, 1445, 1476, 1513, 1567, 1579, 1595, 1609, 1674, 2855, 2925, 2960 cm⁻¹.

6.4.4. 2-(3-fluórfenyl)-4-metoxychinazolín a 2-(3-fluórfenyl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón

Postup prípravy:

K 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-olu (**17**) (1,008 g, 4,2 mmol) bol pridaný uhličitan draselný (2,9 g, mmol) a acetón (60 ml). K zmesi bol následne pridávaný jódmetán (10,5 ml, mmol). Reakcia prebiehala po dobu 4 hodín pri teplote 55 °C. Produkty (**29**, **30**) boli odizolované pomocou rozdeľovacieho chromatografického stĺpca, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán – etylacetát v pomere 8:2 a 6:4. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené na rotačnej vákuovej odparke.

Schéma reakcie:



Produkt 1 – 2-(3-fluórfenyl)-4-metoxychinazolín (**29**)

Výtťažok reakcie: 0,523 g, 49%

Sumárny vzorec: $C_{15}H_{11}FN_2O$

Molekulová hmotnosť: 254,26

Charakteristika:

Biela amorfná látka

1H NMR: (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 – 8.39 (m, 1H, Ar), 8.33 – 8.28 (m, 1H, Ar), 8.19 – 8.14 (m, 1H, Ar), 8.02 – 7.97 (m, 1H, Ar), 7.86 – 7.52 (m, 1H, Ar), 7.57 – 7.52 (m, 1H, Ar), 7.51 – 7.45 (m, 1H, Ar), 7.22 – 7.16 (m, 1H, Ar), 4.30 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR: (126 MHz, $CDCl_3$) δ 167.1, 163.1 (d, $J = 244.6$ Hz), 158.7 (d, $J = 3.3$ Hz), 151.6, 140.6 (d, $J = 7.9$ Hz), 133.6, 129.8 (d, $J = 8.1$ Hz), 128.0, 126.7, 124.0 (d, $J = 2.8$ Hz), 123.4, 117.2 (d, $J = 21.5$ Hz), 115.4, 115.2 (d, $J = 23.0$ Hz), 54.12.

LRMS (ESI): m/z relatívna intenzita 255.1 $[M+H]^+$ (100), 136.1 (18.8).

IR (ATR-Ge): 1082, 1107, 1137, 1164, 1182, 1201, 1249, 1263, 1328, 1343, 1354, 1378, 1417, 1341, 1489, 1500, 1532, 1578, 1596, 1624, 1646 cm⁻¹.

Namerané NMR spektrá súhlasia so záznamom v literatúre⁹⁶.

Produkt 2 – 2-(3-fluórfenyl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón (30)

Výtťažok reakcie: 0,480 g, 45%

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₁FN₂O

Molekulová hmotnosť: 254,26

Charakteristika:

Biela amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 8.37 – 8.31 (m, 1H, Ar), 7.81 – 7.72 (m, 2H, Ar), 7.56 – 7.49 (m, 2H, Ar), 7.39 – 7.35 (m, 1H, Ar), 7.34 – 7.30 (m, 1H, Ar), 7.28 – 7.22 (m, 1H, Ar), 3.51 (s, 3H, NCH₃)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 163.1 (d, *J* = 143.5 Hz), 161.7, 154.7 (d, *J* = 2.5 Hz), 147.1, 137.2 (d, *J* = 7.9 Hz), 134.42, 130.7 (d, *J* = 8.2 Hz), 127.5, 127.3, 126.7, 123.8 (d, *J* = 3.2 Hz), 120.6, 117.2 (d, *J* = 21.0 Hz), 115.5 (d, *J* = 23.3 Hz), 34.1.

LRMS (ESI): *m/z* relatívna intenzita 255.1 [M+H]⁺ (100), 136.1 (20).

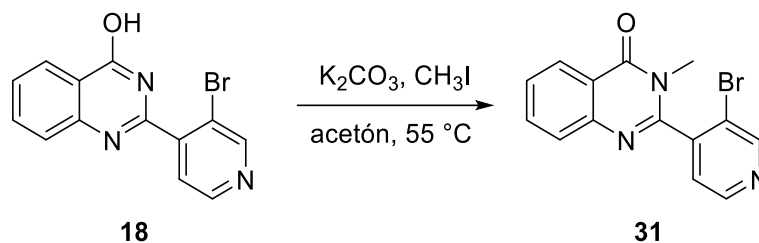
IR (ATR-Ge): 1004, 1049, 1111, 1147, 1159, 1167, 1188, 1225, 1253, 1269, 1303, 1350, 1407, 1418, 1439, 1473, 1490, 1568, 1581, 1591, 1617, 1650, 3051 cm⁻¹.

6.4.5. 2-(3-brómpyridín-4-yl)-3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ón

Postup prípravy:

K 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-olu (**18**) (0,504 g, 1,7 mmol) bol pridaný uhličitan draselný (1,144 g, 8,3 mmol) a acetón (25 ml). K zmesi bol následne pridávaný jódmetán (2,1 ml, 33,1 mmol). Reakcia prebiehala pri teplote 55 °C po dobu 4 hodín. Výsledný produkt (**31**) bol získaný odizolovaním pomocou rozdeľovacieho chromatografického stĺpca, pričom stacionárnou fázou bol silikagél, mobilnou fázou zmes hexán – etylacetát v pomere 2:8.

Schéma reakcie:



Výtťažok reakcie: 0,237 g, 45 %

Sumárny vzorec: C₁₄H₁₀BrN₃O

Molekulová hmotnosť: 316,16

Charakteristika:

Žltastá amorfná látka

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 8.92 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H, Ar), 8.76 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar), 8.41 – 8.36 (m, 1H, Ar), 7.85 – 7.78 (m, 1H, Ar), 7.78 – 7.72 (m, 1H, Ar), 7.62 – 7.55 (m, 1H, Ar), 7.44 (dd, *J* = 4.8, 0.7 Hz, 1H, Ar), 7.27 (s, 1H, Ar), 3.42 (s, 3H, NCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 161.7, 152.6, 152.1, 149.2, 147.0, 143.7, 134.6, 127.9, 127.7, 126.9, 123.6, 121.0, 119.6, 32.4

MS: neionizuje

IR (ATR-Ge): 1023, 1049, 1094, 1116, 1153, 1187, 1218, 1266, 1282, 1300, 1333, 1355, 1399, 1423, 1473, 1530, 1565, 1579, 1597, 1697, 2922 cm⁻¹.

7. ZÁVER

Počas vypracovania mojej diplomovej práce som celkovo syntetizoval dvadsaťtri látok, z ktorých päť patrilo do skupiny *N*-(2-kyanofenyl)arylamidov a osemnásť látok zo skupiny derivátov chinazolínu.

Najskôr som vykonal syntézu *N*-(2-kyanfenyl)arylamidov reakciou chloridov arylkarboxylových kyselín (**2**, **4**, **6**, **8**, **12**) s 2-aminobenzonitrilom (**1**). Takto bolo získaných päť amidov – *N*-(2-kyanfenyl)-4-(metylsulfanyl)benzamid (**3**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(*tert*-butyl)benzamid (**5**), *N*-(2-kyanfenyl)-4-(trifluórmetoxy)benzamid (**7**) popísaný v literatúre, *N*-(2-kyanfenyl)-3-fluórbenzamid (**9**) a 3-bróm-*N*-(2-kyanfenyl)-izonikotínamid (**13**). Tieto zlúčeniny neboli testované na biologickú aktivitu.

Po syntéze vyššie zmienených amidov nasledovala príprava derivátov 4-hydroxychinazolínu cyklizáciou týchto látok (**3**, **5**, **7**, **9**, **13**) z predchádzajúcich reakcií. Takto som syntetizoval päť derivátov chinazolín-4-olu, ktoré okrem iného slúžili ako reaktanty pre ďalšie modifikácie chinazolínového skeletu – 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**14**), 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**15**), 2-[4-(trifluórmetoxyl)fenyl]chinazolín-4-ol (**16**), 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ol (**17**) a 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ol (**18**). Látky (**15** – **17**) boli popísané v literatúre.

Ďalším typom reakcií, ktorým som obmenil predlohovú molekulu chinazolínu, bola syntéza derivátov 4-sulfanylchinazolínu s použitím látok predchádzajúcej série (**15** – **17**). Týmito reakciami som syntetizoval päť látok – 2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín-4-tiol (**19**), 2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-tiol (**20**), 2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-tiol (**21**), 2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-tiol (**22**) popísaný v literatúre a 2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-tiol (**23**).

Poslednými reakciami boli syntézy derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metylchinazolín-4-ónu metyláciou látok pripravených predchádzajúcimi reakciami (**14** – **18**), čoho výsledkom bolo 8 produktov – 4-metoxy-2-[4-(metylsulfonyl)fenyl]chinazolín (**24**), 4-metoxy-2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín (**25**), 3-metyl-2-[4-(*tert*-butyl)fenyl]chinazolín-4-ón (**26**), 4-metoxy-2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín (**27**), 3-metyl-2-[4-(trifluórmetoxy)fenyl]chinazolín-4-ón (**28**), 4-metoxy-2-(3-fluórfenyl)chinazolín (**29**), 3-metyl-2-(3-fluórfenyl)chinazolín-4-ón (**30**) a 3-metyl-2-(3-brómpyridín-4-yl)chinazolín-4-ón (**31**).

Počas testovania biologickej aktivity bolo preukázané, že ani jedna z testovaných zlúčenín nevykazuje vyšší aktivačný účinok na hCAR receptor, ako predlohová molekula 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-olu (**II**) alebo štandard CITCO, no napriek tomu sa pre budúce štúdie jedná o skupinu potenciálnych agonistov hCAR receptora (možné obmeny na kruhu A).

8. ZOZNAM OBRÁZKOV A SCHÉM

Obr. 1: Obecná štruktúra nukleárných receptorov – domény ²	11
Obr. 2: Stavba DBD domény orphan nukleárných receptorov. Vyznačené sú obe podštruktúry domény viažuce zinok, P a D box a oblasť CTE. Čiernou farbou sú zvýraznené časti, ktoré priamo interagujú s DNA, zatvorené a otvorené symboly označujú miesta dimerizácie ²	12
Obr. 3: Priama a nepriama aktivácia CAR ¹⁶	16
Obr. 4: Lokalizácia oblastí regulujúcich translokáciu CAR do jadra – hCAR sa od rCAR okrem iného líši nefunkčnosťou NLS1 oblasti, čo je zapríčinené nahradením arginínu (R) v rCAR za glutamín (Q) v hCAR ²⁵	16
Obr. 5: CITCO – 6-(4-chlórphenyl)imidazo[2,1-b]tiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlórbenzyl)oxím.	28
Obr. 6: CAR/RXR α heterodimér s naviazanými ligandmi – CITCO (vľavo) a kyselina pentadekánová (mastná kyselina, vpravo) – a koaktivátormi – SRC-1 peptidy (označené červenou farbou) ^{12,82,83}	29
Obr. 7: Interakcie väzobného miesta LBD domény CAR receptoru s molekulou CITCO (šedá štruktúra). Modré prerušované čiary – vodíkové väzby, šedé prerušované čiary – hydrofóbne interakcie, oranžové prerušované čiary - Pi interakcie ^{12,82,83}	29
Obr. 8: korekcia štruktúry na 2-(3-metoxyfenyl)chinazolín-4-ol.	30
Obr. 9: Testovanie biologickej aktivity (p(ER ₆) ₃ -luc gene reporter assay) prvej série derivátov na CAR receptor ⁸	31
Obr. 10: Testovanie toxicity (MTS viability assay) prvej série derivátov na HepG2 bunkách ⁸	31
Obr. 11: Testovanie biologickej aktivity (p(ER ₆) ₃ -luc gene reporter assay) syntetizovaných derivátov.....	47
Sch. 1: Plánované syntézy.....	32
Sch. 2: Mechanizmus prípravy chloridu kyseliny 3-brómpyridín-4-karboxylovej.....	34
Sch. 3: Mechanizmus vzniku aromatického amidu.....	35
Sch. 4: Mechanizmus cyklizácie amidov.....	36
Sch. 5: Mechanizmus substitúcie.....	37
Sch. 6: Mechanizmus metylácie.....	38
Sch. 7: Prvá skupina reakcií – syntéza amidov.....	40

Sch. 8: Druhá skupina reakcií – syntéza derivátov chinazolín-4-olu.....	42
Sch. 9: Tretia skupina reakcií – syntéza derivátov chinazolín-4-tiolu.....	43
Sch. 10: Štvrtá skupina reakcií – syntéza derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu	45

9. ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1: Rozdelenie nukleárných receptorov ^{10,11}	9
Tab. 2: Vybrané ligandy CAR	23
Tab. 3: Štruktúry ligandov CAR	25
Tab. 4: Zoznam pripravovaných produktov a im priradené kódy.....	33
Tab. 5: Výťažky produktov prvej skupiny reakcií - amidov	41
Tab. 6: Výťažky produktov druhej skupiny reakcií – derivátov chinazolín-4-olu.....	42
Tab. 7: Výťažky produktov tretej skupiny reakcií – derivátov chinazolín-4-tiolu	43
Tab. 8: Výťažky produktov štvrtej skupiny reakcií – derivátov 4-metoxychinazolínu a 3-metyl-3,4-dihydrochinazolín-4-ónu	45

10. ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

ABC	ATP-binding cassette
ACC	acetyl-CoA carboxylase
ASBT	apical sodium – bile acid transporter
AF-1/2	activation function 1/2
AHR	aryl hydrocarbon receptor
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization
ATR	attenuated total reflectance
CAR	konštitutívny androstanový receptor
CCRP	cytoplasmic CAR retention protein
CGD	cholesterol gallstone disease
CITCO	6-(4-chlórphenyl)imidazo[2,1- <i>b</i>]tiazol-5-karbaldehyd- <i>O</i> -(3,4-dichlórbenzyl)oxím
CPT	carnitine palmitoyltransferase
CRR	cytoplasmic retention region
CTE	carboxy-terminal extension
DBD	DNA-binding domain
DMSO	dimetylsulfoxid
ECI	enoyl-CoA isomerase
EGF	epidermal growth hormone
EGFR	epidermal growth hormone receptor
ELOVL6	elongation of long-chain fatty acids family member 6
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESI	elektrosprejová ionizácia
FASN	fatty acid synthase

FOXO1	forkhead box protein 1
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase
GR	glukokortikoidový receptor
GRIP1	GR-interacting protein 1
GSTA1	glutathione S-transferase α 1/2
HRE	hormone response element
HSP	heat-shock protein
IRD	inner ring deiodination
IRS	insuline response sequences
LBD	ligand binding domain
LCA	kyselina lichoľová
LRMS	low resolution mass spectrography
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NLS1/2	nuclear localization signal 1/2
NR1	nuclear response element 1
ORD	outer ring deiodination
OST α/β	basolateral organic solute transporter α/β
PAPS	3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfát
PBREM	phenobarbital response element module
PBP	PPAR-binding protein
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PKC	proteínkináza C
PP2A	proteínfosfatáza 2A

PXR	pregnanový X receptor
RACK1	receptor aktivovanej C-kinázy 1
RXR	retinoidný X receptor
SDC1	stearyl-CoA desaturase 1
SLC21A6	organic anion transporter SLC21A6
SRC1	nuclear receptor coactivator 1
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein 1c
SULT	sulfotransferáza
S07662	<i>N</i> -[(2-metyl-3-benzofuranyl)metyl]- <i>N'</i> -(2-tienylmetyl)močovina
T0901317	<i>N</i> -[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluór-2-hydroxypropán-2-yl)fenyl]- <i>N</i> -(2,2,2-trifluóretyl)benzénsulfonamid
T3	trijódtýronín
T4	tyroxín
TH	tyroidné hormóny
THRSP	thyroid hormone-responsive spot 14 protein
TRH	thyroid-releasing hormone
TSH	tyroideu stimulujúci hormón
UGT	uridín-5'-difosfát glukuronosyltransferáza
VDR	vitamin D receptor
XRS	xenochemical response signal

11. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Baes, M. *et al.* A New Orphan Member of the Nuclear Hormone Receptor Superfamily That Interacts with a Subset of Retinoic Acid Response Elements. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1544–1552 (1994).
2. Giguère, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocr. Rev.* **20**, 689–725 (1999).
3. Inouye, Y. Structure and Function of the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor. *Yakugaku Zasshi* **136**, 297–308 (2016).
4. Kanno, Y. *et al.* Expression of constitutive androstane receptor splice variants in rat liver and lung and their functional properties. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2058–62 (2005).
5. Mathäs, M. *et al.* Structural and Functional Similarity of Amphibian Constitutive Androstane Receptor with Mammalian Pregnane X Receptor. *PLoS One* **9**, e96263 (2014).
6. Sakai, H. *et al.* Constitutive androstane receptor (CAR) as a potential sensing biomarker of persistent organic pollutants (POPs) in aquatic mammal: Molecular characterization, expression level, and ligand profiling in Baikal seal (*Pusa sibirica*). *Toxicol. Sci.* **94**, 57–70 (2006).
7. Zhang, Z., Burch, P. & Cooney, A. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res.* **14**, 580–590 (2004).
8. Smutny, T. *et al.* 2-(3-Methoxyphenyl)quinazoline Derivatives: A New Class of Direct Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonists. *J. Med. Chem.* **59**, 4601–4610 (2016).
9. Massari, M. E. & Murre, C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429–440 (2000).
10. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **97**, 161–163 (1999).
11. Alexander, S. P. H. *et al.* THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY

- 2017/18: Nuclear hormone receptors. *Br. J. Pharmacol.* **174**, S208–S224 (2017).
12. Xu, R. X. R. X. *et al.* A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXR α Heterodimer. *Mol. Cell* **16**, 919–28 (2004).
 13. Andersin, T., Väisänen, S. & Carlberg, C. The Critical Role of Carboxy-Terminal Amino Acids in Ligand-Dependent and -Independent Transactivation of the Constitutive Androstane Receptor. *Mol. Endocrinol.* **17**, 234–246 (2003).
 14. Omiecinski, C. J., Coslo, D. M., Chen, T., Laurenzana, E. M. & Peffer, R. C. Multi-species analyses of direct activators of the constitutive androstane receptor. *Toxicol. Sci.* **123**, 550–562 (2011).
 15. Pávek, P. *et al.* Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* **15**, 406–409 (2005).
 16. Mackowiak, B. & Wang, H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 1130–1140 (2016).
 17. Mutoh, S. *et al.* Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci. Signal.* **6**, ra31 (2013).
 18. Kawamoto, T. *et al.* Phenobarbital-Responsive Nuclear Translocation of the Receptor CAR in Induction of the CYP2B Gene. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6318–6322 (1999).
 19. Honkakoski, P. & Negishi, M. Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem. J.* **330** (Pt 2), 889–95 (1998).
 20. Zelko, I., Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Negishi, M. & Moore, R. The Peptide Near the C Terminus Regulates Receptor CAR Nuclear Translocation Induced by Xenochemicals in Mouse Liver The Peptide Near the C Terminus Regulates Receptor CAR Nuclear Translocation Induced by Xenochemicals in Mouse Liver. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2838–2846 (2001).
 21. Xia, J. & Kemper, B. Subcellular Trafficking Signals of Constitutive Androstane Receptor: Evidence for a Nuclear Export Signal in the DNA-Binding Domain.

- Drug Metab. Dispos.* **35**, 1489–1494 (2007).
22. Min, G., Kim Kemper, J. & Kemper, B. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 26356–26363 (2002).
 23. Jia, Y. *et al.* Transcription coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein/mediator 1 deficiency abrogates acetaminophen hepatotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12531–6 (2005).
 24. Timsit, Y. E. & Negishi, M. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **72**, 231–246 (2007).
 25. Kanno, Y. & Inouye, Y. The Mechanism for Subcellular Localization of Nuclear Receptor CAR. *Yakugaku Zasshi* **131**, 359–365 (2011).
 26. Hosseinpour, F., Moore, R., Negishi, M. & Sueyoshi, T. Serine 202 Regulates the Nuclear Translocation of Constitutive Active / Androstane Receptor. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1095–1102 (2006).
 27. Ueda, A. *et al.* Diverse Roles of the Nuclear Orphan Receptor CAR in Regulating Hepatic Genes in Response to Phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* **61**, 1 LP-6 (2002).
 28. Yamamoto, Y., Moore, R., Goldsworthy, T. L., Negishi, M. & Maronpot, R. R. The Orphan Nuclear Receptor Constitutive Active / Androstane Receptor Is Essential for Liver Tumor Promotion by Phenobarbital in Mice Advances in Brief The Orphan Nuclear Receptor Constitutive Active / Androstane Receptor Is Essential for Liver Tumor Prom. *Cancer Res.* **64**, 7197–7200 (2004).
 29. Huang, W. *et al.* Xenobiotic Stress Induces Hepatomegaly and Liver Tumors via the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1646–1653 (2005).
 30. Goodwin, B. & Moore, J. T. CAR: Detailing new models. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 437–441 (2004).
 31. Takeda, T. aki *et al.* Potential role of heme metabolism in the inducible expression of heme oxygenase-1. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 1813–1824 (2017).

32. Huang, W. *et al.* Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4156–61 (2003).
33. Pei, T. *et al.* High resolution melting analysis of the NR1I3 genetic variants: Is there an association with neonatal hyperbilirubinemia? *Gene* **573**, 198–204 (2015).
34. Sugatani, J. *et al.* The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* **33**, 1232–1238 (2001).
35. Miao, J., Fang, S., Bae, Y. & Kemper, J. K. Functional Inhibitory Cross-talk between Constitutive Androstane Receptor and Hepatic Nuclear Factor-4 in Hepatic Lipid/Glucose Metabolism Is Mediated by Competition for Binding to the DR1 Motif and to the Common Coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* **281**, 14537–14546 (2006).
36. Cheng, S. *et al.* Activation of Constitutive Androstane Receptor Prevents Cholesterol Gallstone Formation. *Am. J. Pathol.* **187**, 808–818 (2017).
37. Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K. & Negishi, M. Estrogen Activation of the Nuclear Orphan Receptor CAR (Constitutive Active Receptor) in Induction of the Mouse *Cyp2b10* Gene. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1897–1905 (2000).
38. Forman, B. M. *et al.* Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* **395**, 612–615 (1998).
39. Mueller, J. W. *et al.* Human DHEA sulfation requires direct interaction between PAPS synthase 2 and DHEA sulfotransferase SULT2A1. *J. Biol. Chem.* **293**, 9724–9735 (2018).
40. Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P. & Vilarem, M. J. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: A tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1619**, 243–253 (2003).
41. Pascussi, J. M. *et al.* Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6346–6358 (2001).
42. Qatanani, M., Zhang, J. & Moore, D. D. Role of the Constitutive Androstane

- Receptor in Xenobiotic-Induced Thyroid Hormone Metabolism. *Endocrinology* **146**, 995–1002 (2005).
43. Dong, B. *et al.* Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18831–6 (2009).
 44. Masuyama, H. & Hiramatsu, Y. Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**, 120–127 (2012).
 45. Maglich, J. M., Lobe, D. C. & Moore, J. T. The nuclear receptor CAR (NR1I3) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. *J. Lipid Res.* **50**, 439–445 (2009).
 46. Gao, J., He, J., Zhai, Y., Wada, T. & Xie, W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* **284**, 25984–25992 (2009).
 47. Breuker, C. *et al.* Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1I3). *Endocrinology* **151**, 1653–1661 (2010).
 48. Marmugi, A. *et al.* Activation of the Constitutive Androstane Receptor induces hepatic lipogenesis and regulates Pnpla3 gene expression in a LXR-independent way. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **303**, 90–100 (2016).
 49. Hall, R. K., Sladek, F. M. & Granner, D. K. The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 412–416 (1995).
 50. Eloranta, J. J. & Kullak-Ublick, G. A. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 397–412 (2005).
 51. Jiang, G. & Sladek, F. M. The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 1218–1225 (1997).
 52. Rosenfeld, J. M., Vargas, R., Xie, W. & Evans, R. M. Genetic profiling defines the

- xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1268–82 (2003).
53. Cave, M. C. *et al.* Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 1083–1099 (2016).
 54. Kodama, S., Koike, C., Negishi, M. & Yamamoto, Y. Nuclear Receptors CAR and PXR Cross Talk with FOXO1 To Regulate Genes That Encode Drug-Metabolizing and Gluconeogenic Enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7931–7940 (2004).
 55. Chen, S., Wang, K. & Wan, Y. J. Y. Retinoids activate RXR/CAR-mediated pathway and induce CYP3A. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 270–276 (2010).
 56. Masuyama, H. *et al.* Dimethylesculetin ameliorates maternal glucose intolerance and fetal overgrowth in high-fat diet-fed pregnant mice via constitutive androstane receptor. *Mol. Cell. Biochem.* **419**, 185–192 (2016).
 57. Lim, Y. P. *et al.* Allyl isothiocyanate (AITC) inhibits pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) activation and protects against acetaminophen- and amiodarone-induced cytotoxicity. *Arch. Toxicol.* **89**, 57–72 (2015).
 58. Simonsson, U. S. H. *et al.* In vivo and mechanistic evidence of nuclear receptor CAR induction by artemisinin. *Eur. J. Clin. Invest.* **36**, 647–653 (2006).
 59. Maglich, J. M. *et al.* Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 17277–17283 (2003).
 60. Laitinen, T. *et al.* Use of comprehensive screening methods to detect selective human CAR activators. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1994–2007 (2011).
 61. Faucette, S. R. *et al.* Relative Activation of Human Pregnane X Receptor versus Constitutive Androstane Receptor Defines Distinct Classes of CYP2B6 and CYP3A4 Inducers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 72–80 (2006).
 62. Blizard, D., Sueyoshi, T., Negishi, M., Dehal, S. S. & Kupfer, D. Mechanism of Induction of Cytochrome P450 Enzymes by the Proestrogenic Endocrine Disruptor Pesticide-Methoxychlor: Interactions of Methoxychlor Metabolites with the Constitutive Androstane Receptor System. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 781 LP-785

- (2001).
63. Küblbeck, J. *et al.* Discovery of substituted sulfonamides and thiazolidin-4-one derivatives as agonists of human constitutive androstane receptor. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1288–1297 (2008).
 64. Nims, R. W. *et al.* Dose-response relationships for the induction of P450 2B by 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) in rat and cultured rat hepatocytes. *Xenobiotica.* **23**, 1411–1426 (1993).
 65. Cervený, L. *et al.* Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos* **35**, 1032–1041 (2007).
 66. Carazo Fernández, A., Smutný, T., Hyršová, L., Berka, K. & Pavek, P. Chrysin, baicalein and galangin are indirect activators of the human constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicol. Lett.* **233**, 68–77 (2015).
 67. Currie, R. A., Peffer, R. C., Goetz, A. K., Omiecinski, C. J. & Goodman, J. I. Phenobarbital and propiconazole toxicogenomic profiles in mice show major similarities consistent with the key role that constitutive androstane receptor (CAR) activation plays in their mode of action. *Toxicology* **321**, 80–88 (2014).
 68. Wang, H. *et al.* Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J. Biol. Chem.* **279**, 29295–29301 (2004).
 69. Kohalmy, K. *et al.* Dehydroepiandrosterone induces human CYP2B6 through the constitutive androstane receptor. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1495–1501 (2007).
 70. Yao, R. *et al.* Polyphenols in Alcoholic Beverages Activating Constitutive Androstane Receptor CAR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1635–1637 (2011).
 71. Küblbeck, J., Anttila, T., Pulkkinen, J. T. & Honkakoski, P. Improved assays for xenosensor activation based on reverse transfection. *Toxicol. Vitr.* **29**, 1759–1765 (2015).
 72. Lynch, C. *et al.* Identification of novel activators of constitutive androstane receptor from FDA-approved drugs by integrated computational and biological approaches. *Pharm. Res.* **30**, 489–501 (2013).

73. Anderson, L. E., Dring, A. M., Hamel, L. D. & Stoner, M. A. Modulation of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) by 6-arylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepine derivatives, ligands of peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Toxicol. Lett.* **202**, 148–154 (2011).
74. Moore, L. B. *et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 15122–15127 (2000).
75. Repo, S. *et al.* Ligand Specificity of Constitutive Androstane Receptor as Probed by Induced-Fit Docking and Mutagenesis. *J. Med. Chem.* **51**, 7119–7131 (2008).
76. Huang, W., Zhang, J., Wei, P., Schrader, W. T. & Moore, D. D. Meclizine Is an Agonist Ligand for Mouse Constitutive Androstane Receptor (CAR) and an Inverse Agonist for Human CAR. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2402–2408 (2004).
77. Kanno, Y. *et al.* Nigramide J is a novel potent inverse agonist of the human constitutive androstane receptor. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2**, (2014).
78. Li, L. *et al.* The Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand 1-(2-Chlorophenylmethylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide Is a Novel Antagonist of Human Constitutive Androstane Receptor. *Mol. Pharmacol.* **74**, 443–453 (2008).
79. Küblbeck, J. *et al.* New in vitro tools to study human constitutive androstane receptor (CAR) biology: Discovery and comparison of human CAR inverse agonists. *Mol. Pharm.* **8**, 2424–2433 (2011).
80. Kanno, Y., Tanuma, N., Takahashi, A. & Inouye, Y. T0901317, a potent LXR agonist, is an inverse agonist of CAR. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 309–315 (2013).
81. Faucette, S. R. *et al.* Differential Regulation of Hepatic CYP2B6 and CYP3A4 Genes by Constitutive Androstane Receptor but Not Pregnane X Receptor. *Heal. (San Fr.)* **317**, 1200–1209 (2006).
82. Rose, A. S. & Hildebrand, P. W. NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucleic Acids Res.* **43**, W576–W579 (2015).
83. Rose, A. S. *et al.* Web-based Molecular Graphics for Large Complexes. v *Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology* 185–186 (ACM, 2016). doi:10.1145/2945292.2945324

84. Bandgar, B. P. Synthesis of quinazolin-4-(3*H*)-ones from *o*-amidobenzonitriles using urea hydrogen peroxide. *Synth. Commun.* **27**, 2065–2068 (1997).
85. Bender, M. L. Mechanisms of catalysis of nucleophilic reactions of carboxylic acid derivatives. *Chem. Rev.* **60**, 53–113 (1960).
86. Solomons, T. W. G. & Fryhle, C. B. Amides from Acyl Chlorides. v *Organic Chemistry* 802–809 (Wiley, 2007).
87. Pham, C. Functional graphene: synthesis, characterization and application in optoelectronics. *Phys. Chem* **16**, 24 (2016).
88. Špulák, M. *et al.* The unambiguous synthesis and NMR assignment of 4-alkoxy and 3-alkylquinazolines. *Tetrahedron* **69**, 1705–1711 (2013).
89. Close, D., Ripp, S. & Sayler, G. Mammalian-Based Bioreporter Targets: Protein Expression for Bioluminescent and Fluorescent Detection in the Mammalian Cellular Background. *Biosens. Heal. Environ. Biosecurity* 469–98 (2011). doi:10.5772/17028
90. Burbiel, J. C. *et al.* 2-Amino[1,2,4]triazolo[1,5-*c*]quinazolines and Derived Novel Heterocycles: Syntheses and Structure–Activity Relationships of Potent Adenosine Receptor Antagonists. *ChemMedChem* **11**, 2272–2286 (2016).
91. Hu, Y., Chen, L. & Li, B. Iron nitrate/TEMPO-catalyzed aerobic oxidative synthesis of quinazolinones from alcohols and 2-aminobenzamides with air as the oxidant. *RSC Adv.* **6**, 65196–65204 (2016).
92. Sharif, M., Opalach, J., Langer, P., Beller, M. & Wu, X. F. Oxidative synthesis of quinazolinones and benzothiadiazine 1,1-dioxides from 2-aminobenzamide and 2-aminobenzenesulfonamide with benzyl alcohols and aldehydes. *RSC Adv.* **4**, 8–17 (2014).
93. Sharma, R., Vishwakarma, R. A. & Bharate, S. B. Bimetallic Cu–Mn-Catalyzed Synthesis of 2-Arylquinazolin-4(3*H*)-ones: Aqueous Ammonia as Source of a Ring Nitrogen Atom. *European J. Org. Chem.* **2016**, 5227–5233 (2016).
94. Antypenko, L. *et al.* 2-Alkyl(aryl)-quinazolin-4(3 *H*)-thiones, 2-R-(quinazolin-4(3 *H*)-ylthio)carboxylic acids and amides: synthesis, molecular docking, antimicrobial and anticancer properties. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 253–265

- (2016).
95. Kotipalli, T. *et al.* Synthesis of 2,3-Disubstituted Quinazolinone Derivatives through Copper Catalyzed C-H Amidation Reactions. *European J. Org. Chem.* **2016**, 1182–1193 (2016).
 96. Wang, J. *et al.* Quinazoline synthesis via Rh(III)-catalyzed intermolecular C-H functionalization of benzimidates with dioxazolones. *Org. Lett.* **18**, 2062–2065 (2016).