

# Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i in silico analiza odabranih amino-1,3-benzotiazina

---

Penava, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:697256>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Ana Penava**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, rujan 2019.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ana Penava

**ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA I  
*IN SILICO* ANALIZA ODABRANIH AMINO-1,3-  
BENZOTIAZINA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentor: prof. dr. sc. Irena Škorić**

**Neposredni voditelj: Ana Ratković, mag. appl. chem.**

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

**prof. dr. sc. Irena Škorić**

**doc. dr. sc. Dragana Vuk**

**dr. sc. Lidija Furač, v. pred.**

**Zagreb, rujan 2019.**

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ireni Škorić na stručnom vodstvu, susretljivosti, razumijevanju i potpori tijekom izrade Završnog rada.*

*Zahvaljujem svojoj neposrednoj voditeljici, Ani Ratković, mag. appl. chem., na strpljivosti, uloženom trudu i razumijevanju tijekom izrade ovoga rada.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, sestrama i Gabrijelu, koji su mi bili najveća podrška i koji su me uvijek me poticali da vjerujem u sebe i ulažem u svoje obrazovanje.*

*Zahvaljujem svojim prijateljicama, posebice Anji, na svoj pruženoj podršci i potpori tijekom studija.*

## SAŽETAK

Apsorpcija, distribucija, mehanizam i ekskrecija lijekova ključni su parametri u istraživanju i razvoju lijekova koji određuju bioraspoloživost lijekova i njihov utjecaj na ljudski organizam. Potencijalna biološka aktivnost određenih spojeva može se ispitati *in silico* analizom. Lipofilnost je jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava lijekova jer opisuje odnos lijekova i njihovih bioloških, farmakokinetičkih i metaboličkih svojstava. Logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta ispitivanog spoja pruža uvid u njegovu lipofilnost, koja opisuje raspodjelu ispitivanog spoja između organske i vodene faze. Logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta odabranih 1,3-benzotiazina i amino-1,3-benzotiazina u ovom radu određivala se direktnom metodom, metodom protresanja tikvicom, te na temelju teorijskog proračuna. Na temelju rezultata dobivenih direktnom metodom, može se zaključiti da su određeni derivati 1,3-benzotiazina lipofilni te predstavljaju potencijalne kandidate za daljnja predklinička i klinička ispitivanja kojima se može utvrditi njihova biološka aktivnost.

**Ključne riječi:** ADME, *in silico* analiza, lipofilnost, metoda protresanja tikvicom, particijski koeficijent

## **ABSTRACT**

### **Determination of physico-chemical properties and *in silico* analysis of selected amino-1,3-benzothiazines**

Drug absorption, distribution, metabolism and excretion are key parameters in drug design and development that determine drug bioavailability and drug impact on human body. *In silico* analysis provides insight into potential drug candidate biological activity. Lipophilicity is one of the most important physicochemical property of a drug because it describes the relationship between drugs and their biological, pharmacokinetic and metabolic properties. Logarithmic value of partition coefficient of a test compound provides insight into its lipophilicity, which describes the distribution of the test compound between an organic and an aqueous phase. Logarithmic values of partition coefficient of selected 1,3-benzothiazines and amino-1,3-benzothiazines in this paper were determined by the direct method, the shake-flask method, and by theoretical calculation. Based on the results obtained by the direct method, it can be concluded that certain 1,3-benzothiazine derivatives are lipophilic and they can be included in further preclinical and clinical trials that can determine their biological activity.

**Keywords:** ADME, *in silico* analysis, lipophilicity, partition coefficient, shake-flask method

## SADRŽAJ:

<b>1. OPĆI DIO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ADME svojstva lijekova.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Apsorpcija lijekova .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Distribucija lijekova.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3. Metabolizam lijekova.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4. Ekskrecija lijekova .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.5. Predikcija ADME svojstava potencijalnih lijekova.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Lipofilnost.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1. Metode određivanja particijskog koeficijenta.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Uvod.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. <i>In silico</i> analiza odabranih amino-1,3-benzotiazina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Određivanje logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih amino-1,3-benzotiazina teorijskim proračunom .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Određivanje logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih 1,3-benzotiazina 1-3 metodom protresanja tikvicom.....</b>	<b>33</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Određivanje particijskog koeficijenta 6,7-dimetoksi-2-fenil-4<i>H</i>-benzo-1,3-tiazina (2) primjenom metode protresanja tikvicom.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Određivanje particijskog koeficijenta 6,7-dimetoksi-2-(<i>p</i>-tolil)-4<i>H</i>-benzo-1,3-tiazina (3) primjenom metode protresanja tikvicom .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3. Određivanje particijskog koeficijenta 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo-1,3-tiazina (1) primjenom metode protresanja tikvicom .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Sinteza 4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)-<i>N</i>-(tiofen-2-il-metil)anilina (9) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Sinteza <i>N</i>-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (4) .....</b>	<b>41</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>42</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>43</b>
<b>6. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>47</b>
<b>7.1. <i>In silico</i> analiza odabranih amino-1,3-benzotiazina.....</b>	<b>47</b>

<b>7.2. Određivanje logaritamske vrijednosti partijskog koeficijenta odabranih amino-1,3-benzotiazina teorijskim proračunom .....</b>	<b>54</b>
---	-----------



# 1. OPĆI DIO

## 1.1. ADME svojstva lijekova

Istraživanje i razvoj lijekova sastoji se od niza procesa kojima se proučavaju koncentracije lijekova koje su potrebne kako bi lijek imao terapijski, odnosno toksični učinak na organizam, kinetika kretanja lijeka u organizmu, mehanizmi eliminacije lijeka iz organizma te mogućnost utjecaja lijeka na gensku ekspresiju.<sup>[1]</sup>

Farmakodinamika (*engl. pharmacodynamics, PD*), dio je farmakologije orijentiran na istraživanje utjecaja lijekova na tijelo, a farmakokinetika (*engl. pharmacokinetics, PK*) dio je farmakologije koji prati utjecaj tijela na lijekove, odnosno prati kretanje lijekova kroz organizam te njihovu eliminaciju iz organizma. Apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija procesi su koje proučava farmakokinetika, a upravo ti procesi, opisani skraćenicom ADME (*engl. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion*), ključni su u pronalasku novih, sigurnih i djelotvornih lijekova.<sup>[2]</sup>

Apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija procesi su povezani s intrinzičnim svojstvima molekula kao što su relativna molekulska masa, oblik molekule, ionizacijska svojstva, lipofilnost i topljivost te mogućnost vezanja za biološke makromolekule.<sup>[1]</sup>

### 1.1.1. Apsorpcija lijekova

Apsorpcija lijeka ključna je komponenta za postizanje dobre bioraspoloživosti lijeka. Peroralni unos najznačajniji je način unosa lijeka prilikom proučavanja ADME svojstava lijekova. Lijek unesen u organizam peroralno prolazi kroz gastrointestinalni sustav i doprema se do jetre, gdje se razgrađuje na metabolite, koji se arterijskom cirkulacijom putem krvi dopremaju do svih stanica u organizmu. Kod lijekova unesenih u organizam peroralno većina apsorpcije odvija se u tankom crijevu gdje prisutnost sitnih resica znatno utječe na povećanje površine te se na taj način postiže optimalna apsorpcija. Niz faktora koji se nalaze u međusobnoj interakciji, uključujući fizikalno-kemijska svojstva lijeka (lipofilnost, topljivost, formulacija, koncentracija lijeka), gastrointestinalna svojstva (pH, unos hrane, područje tankog crijeva), metabolizam, permeabilnost stanične membrane i aktivni transport kroz crijevnu epitelnu membranu uvelike utječu na apsorpciju lijeka u tankom crijevu. Tkivo između lumena crijeva i portalne cirkulacije

te tkivo jetre dvije su glavne anatomske i biokemijske barijere prolasku lijeka iz lumena crijeva u krvotok.<sup>[1,3]</sup>

Promatrajući apsorpciju lijeka na staničnoj razini, bitno je promotriti svojstva stanične membrane. Stanična membrana je semipermeabilni dvosloj lipida te su u nju ugrađeni globularni proteini koji imaju transportnu i regulatornu funkciju. Lijekovi mogu proći kroz staničnu membranu putem pasivne difuzije, olakšane pasivne difuzije, aktivnog prijenosa i pinocitoze, koja je manje zastupljena u procesu apsorpcije lijekova. Pasivna difuzija vjerojatno je najvažniji mehanizam apsorpcije lijeka, a općenito se odnosi na nepolarne, liposolubilne supstance, budući da im spomenuta svojstva olakšavaju prolazak kroz staničnu membranu. Liposolubilni lijekovi lako prolaze kroz staničnu membranu te je njihov ulazak u stanicu posljedica javljanja koncentracijskog gradijenta duž stanične membrane. Drugim riječima, lijekovi se kreću iz područja više u područje niže koncentracije („down a concentration gradient“), primjerice iz gastrointestinalnog trakta do krvotoka, gdje je koncentracija lijeka niža. Olakšana pasivna difuzija, također zvana nosačem-posredovana difuzija, javlja se kod nekih lijekova, posebice kod onih koji su analogni endogenim spojevima za koje već postoje specifični membranski nosači. U procesu olakšane difuzije sudjeluje skupina membranskih transportnih proteina poznatih pod nazivom SLC („*solute-carrier*“) proteini, koji ne zahtijevaju energiju u obliku adenozin trifosfata (ATP). Lijekovi se i u ovom slučaju kreću iz područja više u područje niže koncentracije. Za aktivni transport potreban je nosač, koji koristi energiju u obliku ATP ili elektrokemijskog gradijenta, za kretanje lijeka iz područja niže u područje više koncentracije („*up a concentration gradient*“). Aktivnim transportom posreduje vrlo velika skupina membranskih transportnih proteina koji se nazivaju ABC („*ATP-binding cassette*“) proteini, a koji zahtijevaju energiju u obliku ATP za transport molekula lijekova kroz stanične membrane. Lokalni protok krvi također je snažna biološka odrednica brzine apsorpcije jer kontinuirano održava koncentracijski gradijent potreban za odvijanje pasivne difuzije. Mnogi će se lijekovi snažno vezati za proteine u krvi ili za čestice hrane u crijevima. Vezanje za proteine u plazmi povećava brzinu pasivne apsorpcije održavanjem koncentracijskog gradijenta slobodnog lijeka. Za mnoge lijekove brzina apsorpcije u gastrointestinalnom sustavu, ali ne i stupanj apsorpcije, smanjuje se prisustvom hrane u crijevima. Postoje lijekovi na čiju apsorpciju ne utječe prisutnost hrane, dok se kod nekih lijekova uz prisutnost hrane povećava brzina apsorpcije lijeka budući da izlučivanje žuči u jetri kao odgovor na hranu u probavnom sustavu povećava apsorpciju lijeka. Važan fizikalno-kemijski

faktor koji utječe na prolaz lijekova kroz staničnu membranu je i pH vrijednost. Lijekovi su većinom slabe organske baze ili kiseline, koje su u vodenoj sredini dijelom ionizirane, a dijelom neionizirane. Neionizirani oblici molekule obično su liposolubilni te stoga lako mogu proći kroz staničnu membranu, dok su ionizirani oblici molekule lijeka lipofobični i hidrofilni te stoga teško prolaze kroz staničnu membranu.<sup>[4,5,6]</sup>

Iz  $pK_a$  može se izračunati udio lijeka u neioniziranom i ioniziranom obliku pri bilo kojem pH:

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} = (pH - pK_a) \quad (1)$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{(pH - pK_a)} \quad (2)$$

$$\frac{[B]}{[BH^+]} = 10^{(pH - pK_b)} \quad (3)$$

$$pK_b = (1 - pK_a) \quad (4)$$

gdje su:

$[A^-]$  – ravnotežna koncentracija ioniziranog oblika lijeka koji se ponaša kao slaba organska kiselina

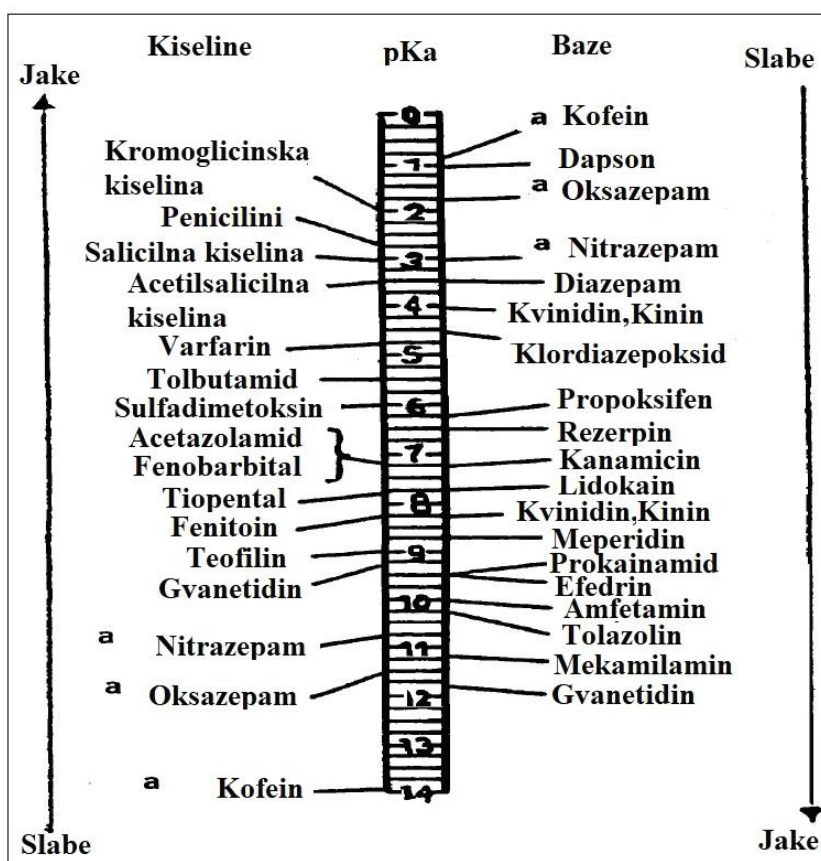
$[HA]$  – ravnotežna koncentracija neioniziranog oblika lijeka koji se ponaša kao slaba organska kiselina

$[B]$  – ravnotežna koncentracija neioniziranog oblika lijeka koji se ponaša kao slaba organska baza

$[BH^+]$  – ravnotežna koncentracija ioniziranog oblika lijeka koji se ponaša kao slaba organska baza

$pK_a$  – negativan logaritam konstante disocijacije lijeka kao slabe organske kiseline,  $K_a$

$pK_b$  – negativan logaritam konstante disocijacije lijeka kao slabe organske baze,  $K_b$ .<sup>[4]</sup>



**Slika 1.**  $pK_a$  vrijednosti nekih kiselih i bazičnih lijekova. Lijekovi označeni s „a“ su amfoterni.<sup>[4]</sup>

Distribucija lijeka kroz staničnu membranu obično se određuje prema njegovoj  $pK_a$  vrijednosti te prema pH vrijednosti na obje strane stanične membrane. Razlika pH vrijednosti na obje strane stanične membrane utječe na ukupnu koncentraciju lijeka s obje strane stanične membrane budući da će u ravnoteži koncentracija neioniziranog oblika lijeka biti jednaka s obje strane stanične membrane.<sup>[4]</sup>

Poboljšanjem topljivosti lijeka i permeabilnosti stanične membrane, doći će do velikog povećanja brzine i stupnja peroralne apsorpcije lijeka. Stoga se može zaključiti da peroralna bioraspodjelivost lijeka u velikoj mjeri ovisi o njegovoj topljivosti u gastrointestinalnom sustavu, apsorpciji u sistemsku cirkulaciju te o metaboličkoj stabilnosti.<sup>[7]</sup>

Lipinskijevo pravilo 5 (engl. „Lipinsky rule of 5“) važan je parametar prilikom proučavanja fizikalno-kemijskih svojstava lijeka, a temelji se na pretpostavci da su loša peroralna apsorpcija i prolaz lijeka kroz staničnu membranu vjerojatniji kada se u strukturi potencijalnog lijeka nalazi više od pet donora vodikove veze i više od deset akceptora vodikove veze te kada je

relativna molekulska masa promatranog potencijalnog lijeka veća od 500, a izračunata vrijednost logP iznosi više od pet.<sup>[1]</sup>

### 1.1.2. Distribucija lijekova

Dospijevanjem lijeka u krvotok istovremeno dolazi do procesa distribucije i eliminacije lijeka iz organizma. Obično se distribucija lijeka, koja se nalazi pod utjecajem protoka krvi, odvija brže nego njegova eliminacija.<sup>[4]</sup>

Na distribuciju lijekova u organizmu utječu perfuzija, način prolaza lijeka kroz staničnu membranu i vezanje lijeka za plazmatske proteine. Brzina distribucije lijeka iz sistemske cirkulacije u specifično tkivo ili organ prvenstveno ovisi o perfundiranosti tog tkiva ili organa. Lijekovi se općenito brže distribuiraju do visoko perfundiranih tkiva. Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na distribuciju lijeka su fizikalno-kemijska svojstva lijeka, budući da o njima ovisi način prolaska lijeka kroz staničnu membranu. Liposolubilni lijekovi lako prolaze kroz staničnu membranu i ulaze u stanicu putem pasivne difuzije. Međutim, liposolubilni lijekovi se također zbog svojeg visokog particijskog koeficijenta mogu lako akumulirati u adipoznom tkivu. S druge strane, lipofobični, hidrofilni, polarni lijekovi većinom se ne distribuiraju povoljno do tkiva i organa u ljudskom organizmu. Ulazak takvih lijekova u stanice tkiva i organa uvjetovan je paracelularnom ili olakšanom difuzijom. Efluksni i influksni transporteri također igraju važnu ulogu u distribuciji lijekova u organizmu.<sup>[8]</sup>

Uloga influksnih transportera u distribuciji lijekova u ljudskom organizmu je transport lijekova iz krvi u hepatocyte, gdje se metaboliziraju, dok efluksni transporteri vrše transport lijekova i njihovih metabolita u žuč.<sup>[9]</sup>

Influksni transporter koji je potrebno istaknuti je OATP1B1, organski anionski transportni protein koji djeluje na metabolite lijekova na način da ih premjesti iz izvanstanične matrice u prostore tkiva.<sup>[8]</sup>

Važni efluksni transporteri iz skupine ABC proteina uključuju MDR1 (P-glikoprotein, P-gp, kodiran genom ABCB1), BCRP (kodiran genom ABCG2) i MRP2 (kodiran genom ABCC2), koji su lokalizirani u barijernim tkivima tijela kao što su crijeva, jetra, bubrezi, krvno-moždana barijera i placenta, gdje uklanjaju širok spektar ksenobiotika poput statina, makrolidnih

antibiotika, blokatora angiotenzina i kemoterapijskih sredstava, te na taj način utječu na klirens *in vivo*.<sup>[3]</sup>

Budući da su inluksni i efluksni transporteri podložni genetskim polimorfizmima, njihova podekspresija ili prekomjerna ekspresija rezultirat će razlikama u stupnju distribucije lijekova među pacijentima.<sup>[8]</sup>

Vežanje lijekova za proteine plazme također je važan faktor koji je potrebno istaknuti prilikom proučavanja distribucije lijekova u ljudskom organizmu. Lijekovi koji se ponašaju kao slabe kiseline i neutralni lijekovi posebice se vežu na albumin, dok se lijekovi koji se ponašaju kao slabe baze uglavnom vežu na alfa-1-kiseli glikoprotein.<sup>[4]</sup>

Nevezani, slobodni dio lijeka je dio lijeka koji je u mogućnosti difundirati iz plazme u stanice tkiva i organa. Stupanj vežanja lijeka na proteine plazme ovisi o koncentraciji lijeka ili proteina, ovisno o afinitetu i kapacitetu plazmatskih proteina. Vežanje lijekova za proteine plazme ovisi i o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, pri čemu valja istaknuti da je veća vjerojatnost vežanja lipofilnih lijekova na proteine plazme, što rezultira manjom zastupljenosti takvih lijekova u intracelularnom prostoru. Vežanje lijekova za proteine tkiva također utječe na koncentraciju lijekova u krvi i plazmi te u tkivima i organima. Međutim, mnogo je manje informacija poznato o vežanju lijekova za proteine tkiva budući da su pouzdane *in vivo* metode za procjenu veživanja za proteine tkiva eksperimentalno zahtjevnije za provesti.<sup>[4,8]</sup>

Lijek se može karakterizirati volumenom tekućine u koju se distribuira. Prividni volumen distribucije ( $V_d$ ) je teorijski volumen tekućine u kojem bi se trebala raspodijeliti primijenjena doza lijeka kako bi se postigla izmjerena razina u plazmi. Volumen distribucije lijeka važan je farmakokinetički parametar, a definira se kao omjer količine lijeka u tijelu i koncentracije lijeka u plazmi. Volumen distribucije lijeka unešenog u organizam intravenozno može se izračunati pomoću jednadžbe:

$$V_d = \frac{A}{C_p} \quad (5)$$

gdje su:

$V_d$  – volumen distribucije [L]

$A$  – doza lijeka [g]

$C_p$  – koncentracija lijeka u plazmi u vremenu nula [g/L]

Ako se, primjerice, injektira 1000 mg lijeka, a postignuta razina u plazmi iznosi 10 mg/L, tada volumen distribucije iznosi 100 L. Prividni volumen distribucije nema veze sa stvarnim ukupnim volumenom tjelesnih tekućina i ne govori ništa o specifičnostima distribucije lijeka u organizmu, već samo odražava raspodjelu lijeka po organizmu. Općenito, lijekovi koji se ponašaju kao slabe baze imaju tendenciju vezati se za tkivne proteine, što rezultira niskom plazmatskom razinom lijeka, odnosno visokim volumenom distribucije. S druge strane, lijekovi koji se ponašaju kao slabe kiseline vežu se za proteine u plazmi i pokazuju nizak volumen distribucije.<sup>[4,8,10]</sup>

### 1.1.3. Metabolizam lijekova

Metabolizam lijekova metabolički je proces u kojem se kemijska struktura (roditeljski spoj) lijeka pretvara u metabolite reakcijama oksidacije, redukcije, hidrolize, konjugacije, kondenzacije i izomerizacije kako bi se olakšao proces eliminacije lijeka iz organizma. Metaboličkih enzimi odgovorni za te reakcije nalaze se u mnogim tkivima, no najviše su izraženi u crijevima i jetri te su zbog toga crijeva i jetra glavna mjesta u ljudskom organizmu u kojima se odvija metabolizam lijekova. Metabolizam lijekova također se odvija u plućima i bubrezima.<sup>[1,10,11]</sup>

Metabolizam lijekova odvija se u dvije faze. Reakcije faze I su nesintetske i uključuju cijepanje molekula, odnosno stvaranje novih ili modificiranje već postojećih funkcionalnih skupina reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize. Reakcije faze II su sintetske, a one uključuju spajanje molekule lijeka s jednom endogenom tvari, primjerice s glukuronskom kiselinom, sumpornom kiselinom i određenim aminokiselinama, pri čemu do spajanja dolazi kod funkcionalnih skupina koje sadrže kisik, sumpor i dušik, primjerice -OH, -NH, -COOH i -SH skupina. Metaboliti nastali sintetskim reakcijama su polarniji i brže se izlučuju bubrezima (urinom) i jetrom (žuču) nego oni nastali nesintetskim reakcijama. Neki lijekovi podliježu samo reakcijama faze I ili faze II, stoga termini faza I i faza II ne ukazuju na redoslijed nego na prirodu reakcija.<sup>[1,10]</sup>

Skupina enzima citokrom P450 (P450; CYP) imaju glavnu ulogu u detoksikaciji ksenobiotika, staničnom metabolizmu i homeostazi. Citokrom P450 jedna je od glavnih skupina

enzima koja katalizira reakcije faze I, a cilj reakcija faze I je stvaranje polarnijih produkata, čime ih se priprema na reakcije konjugacije koju metaboliti prolaze u fazi II, koja prethodi izlučivanju metabolita lijekova iz organizma. Skupina enzima flavin-monooksigenaze (FMO) također katalizira reakcije faze I.<sup>[1,12,13]</sup>

Reakcije koje katalizira skupina enzima citokrom P450 uključuju oksidaciju atoma kisika i ugljika, *N*-dealkiliranje i *O*-dealkiliranje. Skupina enzima flavin-monooksigenaze (FMO) katalizira reakcije oksidacije dušika, sumpora i fosfora. U reakcijama faze II sudjeluje skupina enzima UDP-glukuronoziltransferaze, koja katalizira adiciju glukuronske kiseline ksenobiotikima, čime dolazi do formiranja glukuronida, koji se luče u žuč i izlučuju iz organizma mokraćom. Enzimi koji također sudjeluju u reakcijama faze II su sulfotranferaze, koje kataliziraju adiciju sulfata na ksenobiotike i glutation-*S*-transferaza, enzim koji katalizira reakciju adicije glutationa na ksenobiotike, čime se pospešuje izlučivanje elektrofilnih komponenata i metabolita lijekova iz organizma.<sup>[1]</sup>

#### **1.1.4. Ekskrecija lijekova**

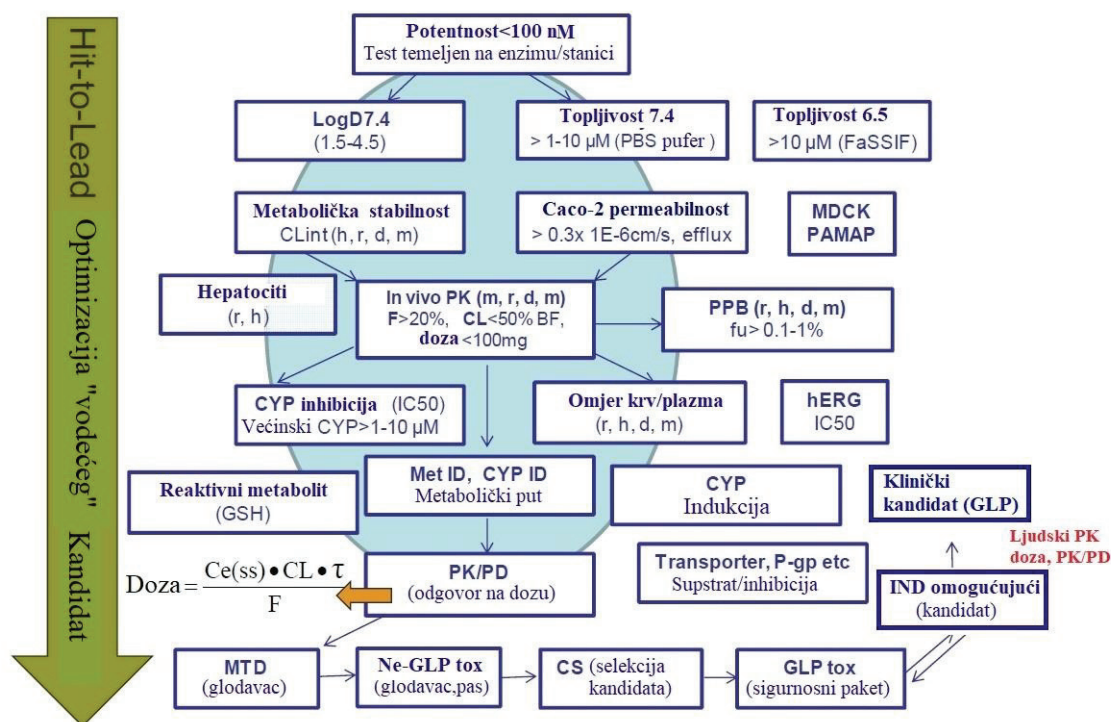
Ekskrecija lijekova odnosi se na proces uklanjanja lijekova iz organizma. Lijekovi se mogu izlučiti iz ljudskog organizma kao nepromijenjene roditeljske molekule samo ako su dovoljno hidrofilni budući da se samo hidrofilne molekule učinkovito izlučuju iz organizma. Lipofilni lijekovi se u procesima metabolizma lijekova transformiraju u hidrofilne metabolite kako bi se mogli izlučiti iz organizma. Lijekovi se najčešće izlučuju putem bubrega ili žuči, znoja i majčinog mlijeka. Plućno izlučivanje javlja se u slučaju hlapljivih lipofilnih tvari. Bubrežno izlučivanje kvantitativno je najvažniji način izlučivanja većine lijekova i njihovih metabolita iz organizma, a uključuje procese glomerularne filtracije, tubularne sekrecije i/ili tubularne reapsorpcije. Glomerularnom filtracijom može se izlučiti velik broj molekula lijekova budući da glomeruli dopuštaju prolazak većine molekula lijeka, ali ograničavaju prolazak proteina plazme, crvenih krvnih zrnaca i ostalih velikih sastojaka krvi, a samim time i prolazak lijekova vezanih za navedene elemente krvi. Lijekovi snažno vezani za proteine plazme ne mogu se u potpunosti učinkovito izlučiti iz organizma glomerularnom filtracijom pa je tubularna sekrecija, proces aktivnog transporta lijekova iz područja niže u područje više koncentracije, važan način izlučivanja takvih lijekova iz organizma. Dospijevanjem lijeka u distalnu tubulu, neionizirani oblik lijeka može difundirati kroz tubularnu membranu i ponovno ući u plazmu. Kako se voda



reapsorbira duž bubrežnog tubula, povećava se koncentracija tubularnog lijeka, što osigurava gradijent koncentracije koji pogoduje reapsorpciji lijeka. Neionizirani, liposulubilni oblik lijeka apsorbira se u plazmu, dok ionizirani i polarni oblik lijeka ostaje u glomerularnom filtratu i izlučuju se mokraćom, pri čemu se treba uzeti u obzir važan utjecaj pH i volumena mokraće. Kod lijekova koji se ponašaju kao slabe kiseline, alkalizacija, odnosno povišenje pH vrijednosti urina pogoduje stvaranju ioniziranog oblika lijeka i potiče njegovo izlučivanje iz organizma, dok sniženje pH vrijednosti mokraće potiče izlučivanje lijekova koji se ponašaju kao slabe baze. Izlučivanje putem žući uključuje aktivni transport lijekova i njihovih metabolita iz područja niže u područje više koncentracije iz hepatocita u žuč, koja zatim prenosi lijekove u crijeva, gdje se lijekovi izlučuju iz organizma. Lijekovi s molarnom masom većom od 300 g/mol, u čijoj se strukturi nalazi više polarnih i lipofilnih skupina, lakše se izlučuju ovim putem, dok se lijekovi manje molarne mase u vrlo malenoj mjeri izlučuju putem žući. Reakcije konjugacije, posebice s glukuronskom kiselinom, olakšavaju proces izlučivanja lijekova putem žući. Učinkovitost izlučivanja putem žući prilično je varijabilna budući da prisutnost određenih enzima u crijevima, kao i pH crijeva, mogu uzorkovati poprimanje nepolarnih lipofilnih oblika kod mnogih lijekova pa se zbog toga takvi lijekovi odmah reapsorbiraju difuzijom u plazmu. Taj se postupak naziva enterohepatičkom cirkulacijom pa zbog toga takvi lijekovi općenito pokazuju dugotrajno djelovanje. Izlučivanje putem pluća važno je za plinovite lipofilne tvari. Lijek difundira iz plazme u alveolarni prostor i izlučuje se prilikom ekspirija. Izlučivanje putem majčinog mlijeka kvantitativno je manje važan način izlučivanja lijekova te se primarno odnosi na dojilje i dojenčad. Majčino mlijeko ima niži pH od plazme pa će se zbog toga bazični lijekovi nakupljati u majčinom mlijeku i na taj način utjecati na dojenčad.<sup>[4,5]</sup>

### **1.1.5. Predikcija ADME svojstava potencijalnih lijekova**

Istraživanje i razvoj novih lijekova dugotrajan je, skup i složen proces. U procesu istraživanja i razvoja lijekova od velike su važnosti *in vitro* i *in vivo* procjena ADME svojstava potencijalnih biološki aktivnih molekula jer povoljna ADME svojstva takvih molekula uvjetuju tijek kasnijih predkliničkih i kliničkih ispitivanja.<sup>[1,14]</sup>

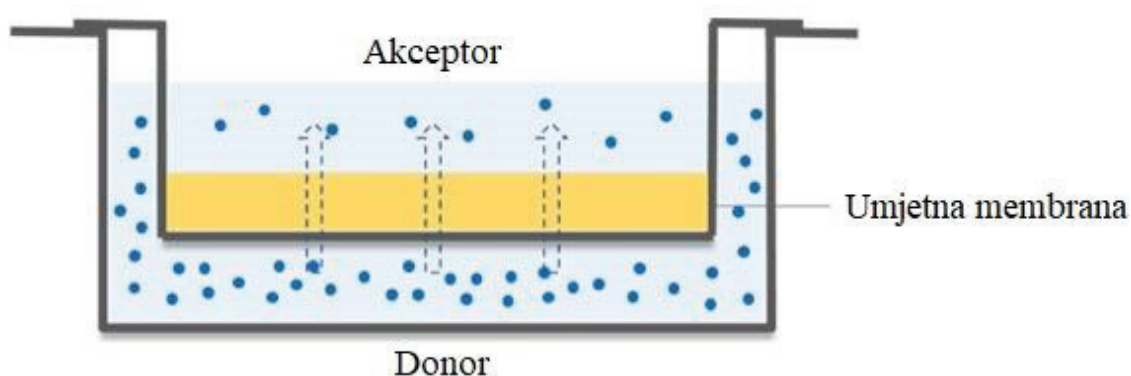


Slika 2. Tijek istraživanja ADME svojstava potencijalnih lijekova.<sup>[14]</sup>

Ključnu ulogu u istraživanju i razvoju lijekova također čini *in silico* predikcija ADME svojstava potencijalnih lijekova. *In silico* analiza fizikalno-kemijskih svojstava potencijalnih biološki aktivnih molekula korisna je u procjeni vrijednosti logaritma partijskog koeficijenta ( $\log P$ ) i vrijednosti logaritma koeficijenta raspodjele ( $\log D$ ), koje su važne u određivanju lipofilnosti potencijalne biološki aktivne molekule. *In silico* analiza nije se pokazala korisnom u procjeni topljivosti lijeka u vodi jer je teško predvidjeti hoće li promatrana komponenta koja se nalazi u čvrstom agregatnom stanju zauzeti kristaliničnu ili amorfnu formu. *In vitro* procjena ADME svojstava uključuje ispitivanje topljivosti lijeka u vodi, stabilnosti lijeka u mikrosomima (*engl. microsomal stability*), stabilnosti lijeka u plazmi (*engl. plasma stability*), stupanj vezanja lijeka na proteine plazme, ispitivanje toksičnosti komponente te ispitivanje apsorpcije lijeka u gastrointestinalnom sustavu. Topljivost lijeka u vodi ili fiziološkoj otopini puferiranom fosfatnim puferom (*engl. phosphate buffered saline*), čija je pH vrijednost jednaka 7,4, mjeri se u stanju termodinamičke ravnoteže u zasićenoj otopini, pri čemu se koncentracija promatrane komponente najčešće određuje metodom tekućinske kromatografije s ultraljubičastim detektorom (*engl. liquid chromatography-ultraviolet*, LC-UV). Obično se topljivost lijeka u vodi procjenjuje pomoću

pregleda velike propusnosti (*engl. high-throughput screening* – HTS) tako da se komponenta otopljena u dimetilsulfoksidu (DMSO) doda u pufer ili vodu u širokom rasponu koncentracija te se promatra zamućenje otopine. U slučaju zamućene otopine pretpostavlja se da lijek nije dobro topljiv u vodi. U ispitivanju stabilnosti lijeka u mikrosomima koriste se mikrosomi dobiveni iz stanica jetre, koji se sastoje uglavnom od endoplazmatskog retikuluma i sadrže mnoge enzime koji kataliziraju reakcije faze I i faze II metabolizma lijekova, uključujući skupinu enzima citokrom P450 (P450; CYP) i skupinu enzima flavin-monooksigenaze (FMO). Potencijalni lijek inkubira se u otopini koja sadrži mikrosome i fosfatni pufer pH vrijednosti 7,4 pri temperaturi od 37°C na 30 min. Za ispitivanje stabilnosti potencijalnog lijeka primjenjuje se metoda tekućinske kromatografije s detektorom masene spektrometrije (*engl. liquid chromatography–mass spectrometry*, LC/MS) ili metoda tekućinske kromatografije s ultraljubičastim detektorom (*engl. liquid chromatography-ultraviolet*, LC-UV), a rezultat se izražava u obliku postotka tvari koja se raspala tijekom reakcija faze I i faze II metabolizma lijeka. Kako bi potencijalni lijek bio valjan kandidat za daljnja pretklinička i klinička istraživanja, potrebno je ispitati njegovu stabilnost u plazmi. Lijekovi moraju biti dovoljno stabilni u plazmi kako bi izvršili svoju funkciju u organizmu. Kako bi se ispitala stabilnost potencijalnog lijeka u plazmi, određena koncentracija potencijalnog lijeka se inkubira u plazmi pri temperaturi od 37°C u vremenu od 30-60 minuta. Za određivanje stabilnosti lijeka primjenjuje se metoda tekućinske kromatografije s detektorom masene spektrometrije (*engl. liquid chromatography–mass spectrometry*, LC/MS) ili metoda tekućinske kromatografije s ultraljubičastim detektorom (LC-UV), a rezultat se izražava kao postotak početne, roditeljske molekule lijeka preostale u plazmi. Djelotvornost lijeka najčešće se određuje koncentracijom slobodnog, nevezanog dijela lijeka, a ne ukupnom koncentracijom lijeka u plazmi. Lijekovi manje vezani za proteine plazme uglavnom pokazuju visok volumen distribucije, dakle učinkovitije će prolaziti kroz stanične membrane i difundirati u stanice drugih organa i tkiva. Stoga su informacije o koncentraciji slobodnog, nevezanog dijela lijeka ključne u procesu razvoja lijekova i mogu biti korisne u korelaciji s *in vivo* djelotvornošću. Ravnotežna dijaliza (*engl. rapid equilibrium dialysis*, RED) točna je i pouzdana metoda koja se primjenjuje za određivanje stupnja vezanja lijeka za proteine plazme, dok se koncentracije slobodnog, nevezanog dijela lijeka određuje primjenom metode visokoučinkovite tekućinske kromatografije s dva detektora masene spektrometrije (*engl. liquid chromatography–mass spectrometry*, LC/MS/MS). *In vitro* test citotoksičnosti koristi se za ispitivanje toksičnosti potencijalnog lijeka.

Stanice jetre se inkubiraju 24 sata s poznatim toksičnim i netoksičnim spojevima u različitom rasponu koncentracija. Na kraju razdoblja inkubacije stanicama se dodaje ATP-lite 1step Cytotoxicity Assay (PerkinElmer), spoj koji služi za praćenje aktivnih stanica metodom luminiscencije. Za ispitivanje apsorpcije lijeka u gastrointestinalnom sustavu najčešće se koristi paralelni test propusnosti umjetne membrane (*engl. parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA), koji služi za procjenu permeabilnosti stanične membrane uzimajući u obzir samo pasivnu difuziju. Uređaj se sastoji od donorskog i akceptorskog odjeljka. Potencijalni lijek se unosi u donorski odjeljak te se mjeri njegov prolaz u akceptorski odjeljak kroz umjetnu membranu koja sadrži lipide metodom ultraljubičaste spektrofotometrije.<sup>[1,14,15]</sup>



**Slika 3.** Shematski prikaz paralelnog testa propusnosti umjetne membrane PAMPA.<sup>[16]</sup>

Caco-2 stanice, stanična linija kolorektalnog karcinoma, također se koristi kao model apsorpcije lijekova u gastrointestinalnom sustavu. Kultivacijom, Caco-2 stanice spontano diferenciraju u crijevne stanice između kojih se nalaze uski prolazi. Međutim, Caco-2 stanice zahtijevaju dugotrajnu kultivaciju te je za ispitivanje apsorpcije lijeka u gastrointestinalnom sustavu potrebna veća količina potencijalnog lijeka pa se zbog toga metoda s Caco-2 stanicama manje koristi u ranoj fazi razvoja lijekova.<sup>[1,15]</sup>

## 1.2. Lipofilnost

Lipofilnost je mjera afiniteta lijeka prema lipidnom okruženju. Važan je parametar u dizajnu lijekova jer opisuje odnos lijekova i njihovih bioloških, farmakokinetičkih i metaboličkih svojstava. Slaba topljivost lijekova, njihova loša bioraspodjelivost, visok stupanj vezanja lijekova za plazmatske proteine te visok afinitet lijekova prema mikrosomima i stanicama jetre često se povezuju s lipofilnosti. Važni parametri kojima se opisuje lipofilnost lijekova su particijski

koeficijenta,  $P$  i koeficijent distribucije,  $D$ . Particijski koeficijent ( $P$ ) definira se kao omjer ravnotežnih koncentracija neioniziranog oblika molekule lijeka u dvofaznom sustavu koji se sastoji od dva međusobno nemješljiva otapala; vrlo često taj sustav čine oktanol i voda. Particijski koeficijent pokazuje raspodjelu neioniziranog oblika molekule lijeka između organske i vodene faze. Koeficijent distribucije,  $D$  definira se kao omjer koncentracija ioniziranih i neioniziranih oblika molekule u organskoj i vodenoj fazi pri određenoj pH vrijednosti, najčešće pri pH vrijednosti od 7,4. jer je najbližnja pH vrijednosti u ljudskom organizmu. Particijski koeficijent i koeficijent distribucije su bezdimenzijske veličine pa se stoga često prikazuju u obliku svojih logaritamskih vrijednosti.<sup>[1,17,18,19]</sup>

Logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta,  $\log P$  računa se prema jednadžbi:<sup>[1]</sup>

$$\log P_{(oktanol/voda)} = \log \left( \frac{[\text{neionizirani oblik molekule u oktanolu}]}{[\text{neionizirani oblik molekule u vodi}]} \right) \quad (6)$$

Logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele,  $\log D$  računa se prema jednadžbi:<sup>[1]</sup>

$$\log D_{(oktanol/voda)} = \log \left( \frac{[\text{neionizirani oblik molekule u oktanolu}]}{[\text{neionizirani oblik molekule u vodi}] + [\text{ionizirani oblik molekule u vodi}]} \right) \quad (7)$$

### 1.2.1. Metode određivanja particijskog koeficijenta

Particijski koeficijent može se eksperimentalno odrediti različitim metodama koje se mogu svrstati u kategorije direktnih, indirektnih i ostalih metoda te metoda koje koriste teorijske izračune. Najpoznatija direktna metoda je metoda protresanja tikvicom (*engl. shake-flask*). Smjesi oktanol/voda dodaje se ispitivana tvar te se tako pripravljena smjesa mućka dok se ne uspostavi ravnotežno stanje. Organska se faza zatim odvoji od vodene i određuje se koncentracija ispitivane tvari u jednoj ili obje faze. Nedostatci „shake-flask“ metode su dugotrajan postupak mućkanja i nepouzdanost metode za tvari visoke lipofilnosti zbog javljanja emulzije oktanela u vodi. Stoga se umjesto „shake-flask“ metode može koristiti metoda sporog miješanja gdje se dvije faze, voda i oktanol, sporo miješaju kako bi se izbjeglo stvaranje emulzije oktanela u vodi. Međutim, nedostatak i ove metode je dugotrajnost procesa miješanja i visoka cijena u vidu količine tvari potrebne za provođenje eksperimenta. Neke od indirektnih metoda za određivanje particijskog koeficijenta su kromatografske metode, među kojima se može istaknuti tekućinska

kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (*engl. reverse phase–high-performance liquid chromatography, RP-HPLC*). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza temelji se na razdvajanju tvari između nepolarne tekuće organske faze i polarne vodene faze u koloni. Najbrža je i cjenovno najprihvatljivija od svih eksperimentalnih metoda jer ne zahtijeva nikakvu kvantifikaciju koncentracija. Međutim, ova metoda služi za procjenu, a ne za direktno određivanje partijskog koeficijenta i po tome se bitno razlikuje se od direktnih metoda. Procesi odgovorni za zadržavanje na koloni nisu slični onima koji se javljaju u direktnom određivanju, stoga se preporuča koristiti RP-HPLC metodu za one tvari čiji se kemijski sastav pretjerano ne razlikuje od referentnih tvari.<sup>[20]</sup>

Potenciometrijska metoda pripada kategoriji ostalih metoda kojima se može odrediti partijski koeficijent, a zasniva se dvije povezane potenciometrijske titracije.  $pK_a$  vrijednost ispitivane tvari određuje se kiselo-baznom titracijom vodene otopine ispitivane tvari upotrebom potenciometrijskog mjerenja pH vrijednosti titrirane otopine. Kako bi se odredila vrijednost  $\log P$ , vrši se jedna ili više dodatnih titracija pri čemu se oktanol dodaje vodenoj otopini ispitivane tvari te se mjeri  $pK_a$  vrijednost ispitivane tvari u dvofaznom sustavu, koja se označava kao  $p_oK_a$  i čija se vrijednost razlikuje od vrijednosti  $pK_a$  izvedene iz titracijske krivulje vodene otopine ispitivane tvari. Razlika tih vrijednosti povezana je s vrijednosti  $\log P$ , koja se može izračunati primjenom utvrđenih jednadžbi. Primjerice,  $\log P$  vrijednost monoprotoskih komponenti računa se prema jednadžbi:

$$P = \frac{10^{p_oK_a - pK_a} - 1}{r} \quad (8)$$

gdje su:

$|p_oK_a - pK_a|$  – apsolutna vrijednost razlike  $p_oK_a$  i  $pK_a$

$r$  – volumni omjer  $V_{n\text{-octanol}}/V_{\text{voda}}$ .<sup>[21]</sup>

Postoji nekoliko načina za teorijski proračun partijskog koeficijenta, međutim, rezultati proračuna ovise o odabiru najprikladnije jednadžbe. Postoji mnogo softverskih paketa koji procjenjuju lipofilnost tvari na temelju teorijskog proračuna partijskog koeficijenta. Struktura ispitivane tvari uglavnom je podijeljena na atome ili veće funkcionalne skupine te se vrijednosti za svaku skupinu zbrajaju kako bi se procijenila ukupna vrijednost partijskog koeficijenta. Ova

metoda je primjenjiva na širok spektar tvari i može se uvelike poboljšati ukoliko su poznate eksperimentalne vrijednosti particijskih koeficijenata tvari sličnih ispitivanoj tvari. Iako su rezultati dobiveni teorijskim proračunom većinom u dobroj korelaciji s rezultatima dobivenim direktnom metodom, metoda može pokazati netočne rezultate za spojeve koji imaju interaktivne funkcionalne skupine ili za kompleksne spojeve s fragmentima koji nisu dostupni u bazi podataka primijenjenog softvera. Također, većina programa dizajnirana je za određivanje particijskog koeficijenta neioniziranog oblika ispitivane tvari, stoga ova metoda nije primjenjiva za spojeve koji disociraju na ione. Brojne metode mogu se primijeniti za mjerenje ili procjenu particijskog koeficijenta tvari između oktanol i vodene faze, ali samo neke od njih primjerene su za spojeve koji disociraju na ione. Pri radu s takvim spojevima mora se pažljivo kontrolirati pH i dostići pH vrijednost na kojoj postoji samo jedna ionska vrsta. Do sada se potenciometrijska metoda pokazala najprihvatljivijom za određivanje particijskog koeficijenta spojeva koji disociraju na ione, ali njen nedostatak je potreba za skupom opremom i stručnim osobljem.<sup>[22]</sup>

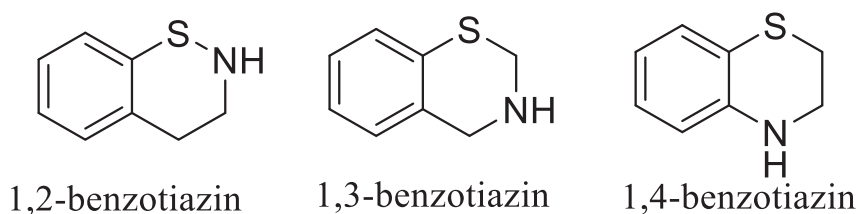
**Tablica 1.** Prikaz različitih metoda određivanja lipofilnosti, njihovih prednosti i nedostataka te uvjeta u kojima se ne mogu primjenjivati:<sup>[22]</sup>

Metoda	Prednost	Nedostatak	Nije primjenljiva ako	Reference
<i>Direktna</i>				
Metoda potresanjem tikvice	Najrealnija metoda, pouzdana	Vrijeme, količina upotrebljenog produkta, nastajanje emulzije oktanol	LogP > 6; testirana supstanca disocira (KoW ovisi o koncentraciji)	OECD (1995)
Metoda polaganog mješanja	Izbjegava se nastajanje emulzija, pouzdana	Vrijeme, količina upotrebljenog produkta	Testirana supstanca disocira (KoW ovisi o koncentraciji)	Brooke et al. (1986) and de Bruijn et al. (1989)
<i>Kromatografska metoda</i>				
Klasičan HPLC pristup	Brza i jeftina, ne zahtijeva kemijsku kvantifikaciju	Drugačiji retencijski mehanizam: slaba reproducibilnost; pH područje ograničeno na 2-7.5	Vrlo niske KoW vrijednosti	Sicbaldi and Finizio (1993), Finizio et al. (1997), and OECD (2004)
Micelarna i mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija	Brza i jeftina.	Zahtijeva utvrđivanje solvacijskih parametara modela	Ionska supstanca	Poole and Poole (2003)
Metanol-voda gradijent i kratka oktadecil-poli(vinil alkohol) kolona	Dobro slaganje sa metodom potresanjem tikvice		Ionska supstanca	Donovan and Pescatore (2002)
<i>Druge</i>				
Metoda filter probe	Brza; dobro prilagođena za konstrukciju logD/pH profila	Potrebna skupocjena oprema, vremenski zahtjevno za postaviti	LogP < 0,2; nema izosbestičke točke	Takacs-Novak et al. (1995) and Leo (2000)
pH metrična metoda (ili potenciometrijska metoda)	Brza; dobro prilagođena za konstrukciju logD/pH profila	Potrebna skupocjena operma	Netopljivi spoj	Chamberlain et al. (1996), OECD (2000), and Avdeef (2001)
<i>Računske</i>				
Regeresija sa drugim svojstvima	Brza i jeftina.	Rezultati ovise o raspoloživom skupu podataka		Xing and Glen (2002) and Lu et al. (2007)
Teorijski račun (fragmentalni pristup)	Širok raspon kemikalija; pouzdana za neutralne spojeve; jedina pouzdana metoda za KoW > 5	Nije pouzdana za zwitterione, tautomere, nabijene spojeve i spojeve povezan jakim vodikovim vezama	Fragment nije dostupan u softverskom skupu	Leo (2000), Mannhold and van de Waterbeemd (2001), and Machatha and Yalkowsky (2005)

## 2. REZULTATI I RASPRAVA

### 2.1. Uvod

Benzotiazini su skupina biološki aktivnih spojeva koji pokazuju antikancerogenu, diuretičku i antihipertenzijsku aktivnost. Derivati 1,2-benzotiazina i 1,3-benzotiazina pokazuju protuupalni, antitumorski i antiproliferativni učinak, dok derivati 1,4-benzotiazina pokazuju antifungalno djelovanje u infekcijama uzrokovanim gljivicama *Aspergillus fumigatus* i *Candida albicans* (**Slika 4**). Pretpostavlja se da biološka aktivnost benzotiazina proizlazi iz njihove strukture, u kojoj se nalaze heteroatomi, atomi dušika i sumpora, koji se mogu ponašati kao akceptori vodikove veze, koja ima važan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva lijeka kao što su topljivost, lipofilnost i vezanje liganda na proteine.<sup>[23,24,25]</sup>

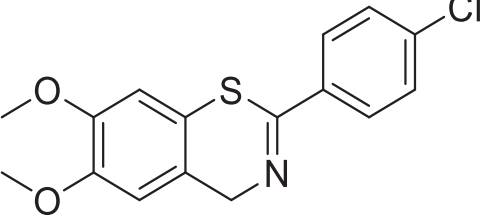
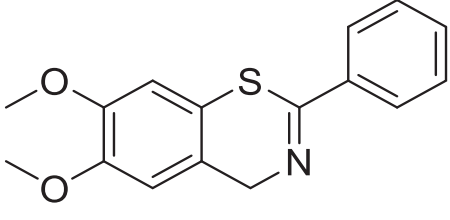
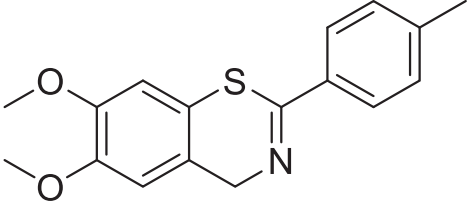


**Slika 4.** Strukture benzotiazina.<sup>[26]</sup>

U ovom radu ispitivala se biološka aktivnost odabranih početnih 1,3-benzotiazina (**1-3**, **Tablica 2**) i amino-1,3-benzotiazina (**4-18**, **Tablica 3**) *in silico* analizom upotrebom softverskog paketa PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*), direktnom metodom, metodom protresanja tikvicom („shakle-flask“ metoda) te na temelju teorijskog proračuna korištenjem programa HyperChem 5.0.1.



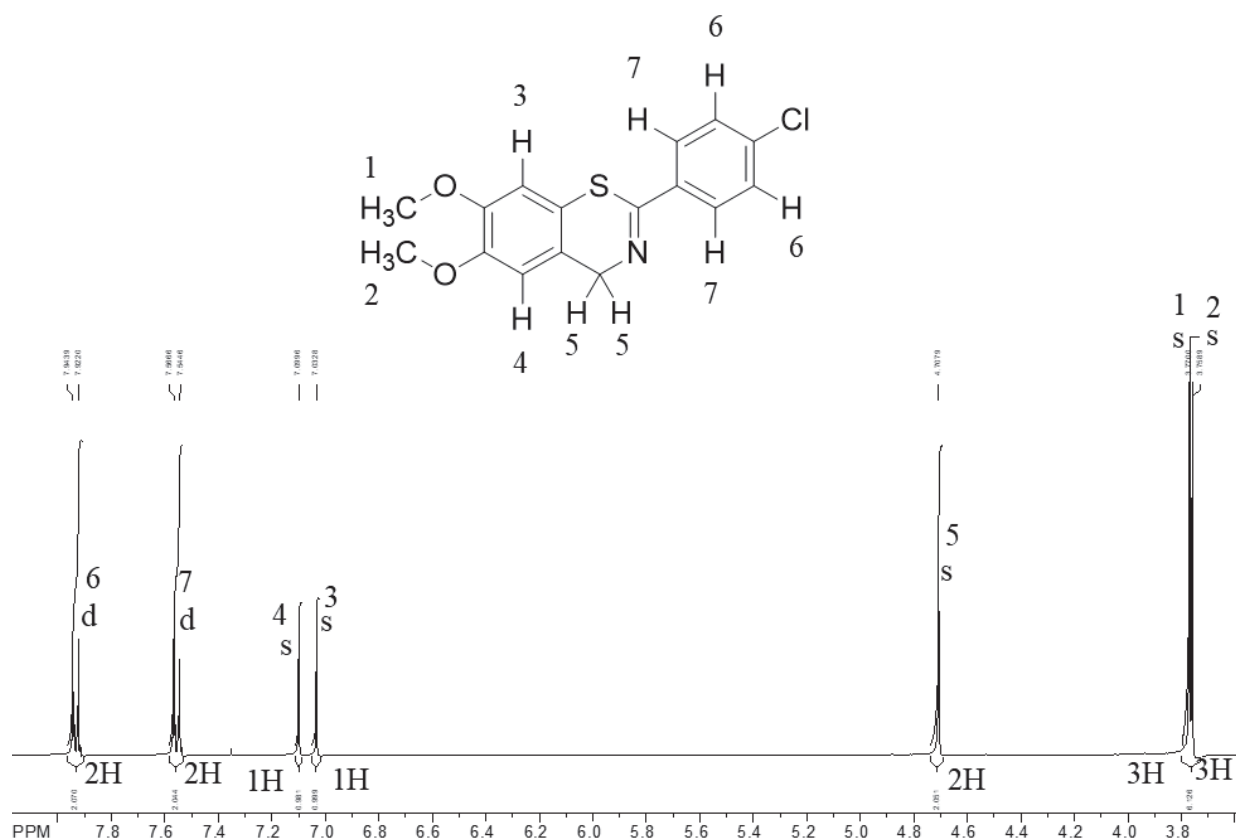
**Tablica 2.** Prikaz struktura odabranih početnih 1,3-benzotiazina (**1-3**) s pripadajućim imenima i oznakama spojeva.<sup>1</sup>

Struktura spoja	Ime spoja	Oznaka spoja
	2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin	(1)
	6,7-dimetoksi-2-fenil-4 <i>H</i> -benzo-1,3-tiazin	(2)
	6,7-dimetoksi-2-( <i>p</i> -tolil)-4 <i>H</i> -benzo-1,3-tiazin	(3)

Početni 1,3-benzotiazini (**1-3**) snimljeni su <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom u cilju potvrde njihove strukture (*Slika 5-7*).

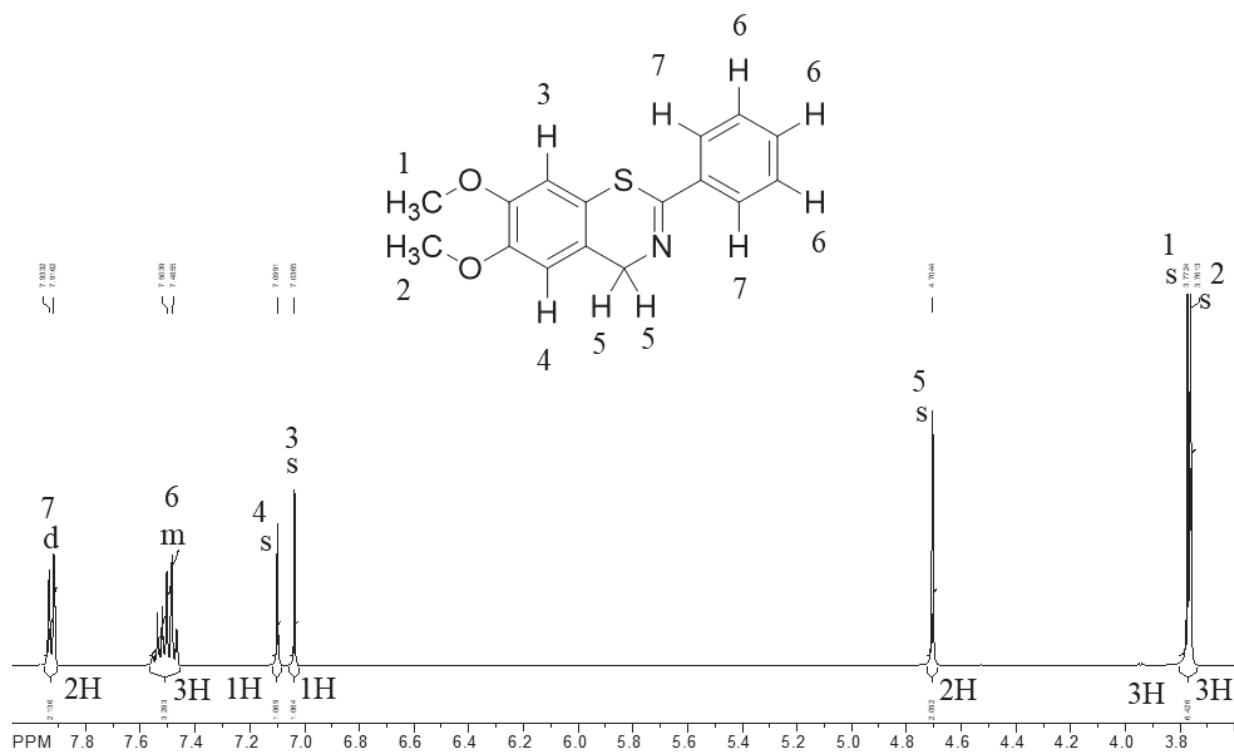
<sup>1</sup>Zahvala prof. dr. sc. M. Šindler-Kulyk na poklonjenim uzorcima spojeva **1-3**.

Iz  $^1\text{H}$  NMR spektra spoja **1** (*Slika 5*) može se uočiti da protoni metoksi-skupina s oznakama 1 i 2 pokazuju singlete s integralima od po 3H na približno 3,8 ppm. Protoni s oznakama 5 su ekvivalentni i pokazuju singlet s integralom od po 2H na približno 4,7 ppm. Za proton s oznakom 3 vidljiv je singlet s integralom od 1H u području nešto nižem od 7 ppm. Proton s oznakom 4 pokazuje singlet s integralom od 1H u području nešto višem od 7 ppm. Protoni s oznakama 7 su u ovoj strukturi ekvivalentni te se za njih može uočiti dublet s integralom od po 2H na približno 7,6 ppm. Protoni s oznakama 6 su ekvivalentni i pokazuju dublet s integralom od po 2H na približno 7,9 ppm.



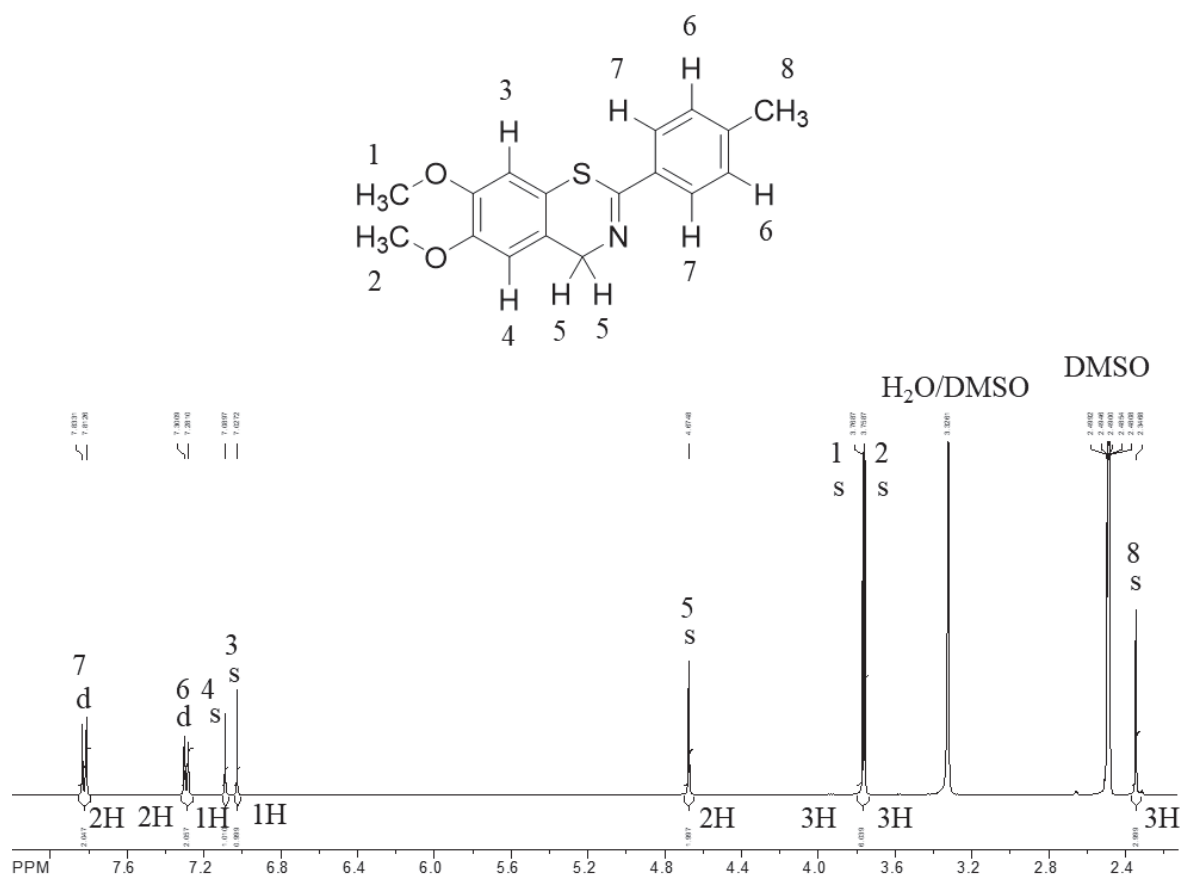
*Slika 5.*  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **1**.

Iz  $^1\text{H}$  NMR spektra spoja **2** (*Slika 6*) mogu se uočiti singleti s integralom od po 3H za protone metoksi-skupina s oznakama 1 i 2 na približno 3,8 ppm. Na približno 4,7 ppm protoni s oznakama 5, koji su ekvivalentni, pokazuju singlet s integralom od po 2H. Za proton s oznakom 3 vidljiv je singlet s integralom od 1H u području nešto nižem od 7 ppm. U području nešto višem od 7 ppm proton s oznakom 4 pokazuje singlet s integralom od po 1H. Za protone s oznakom 6 može se uočiti multiplet s integralom od 3H na približno 7,5 ppm, dok se za protone 7, koji su ekvivalentni, može uočiti dublet s integralom od 2H na približno 7,9 ppm.



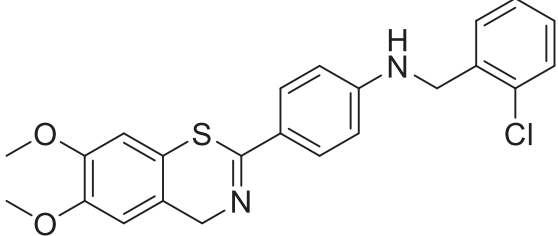
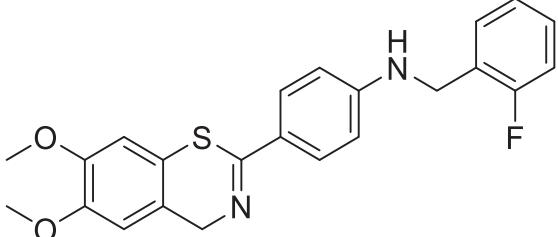
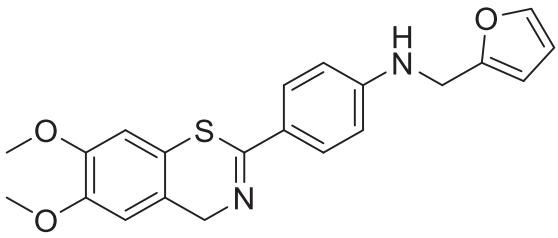
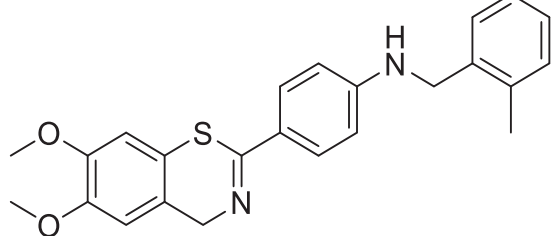
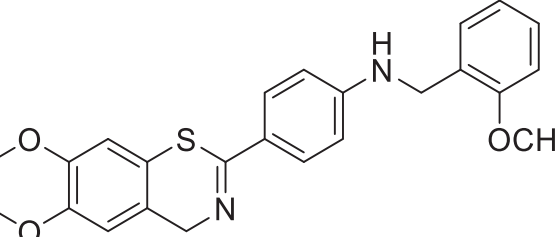
*Slika 6.*  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **2**.

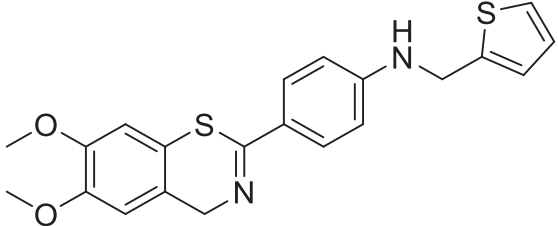
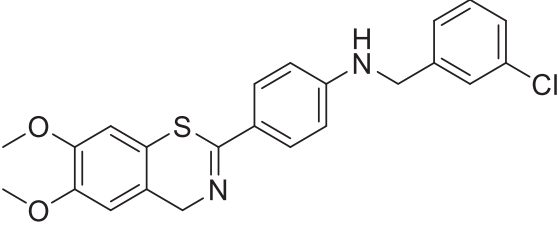
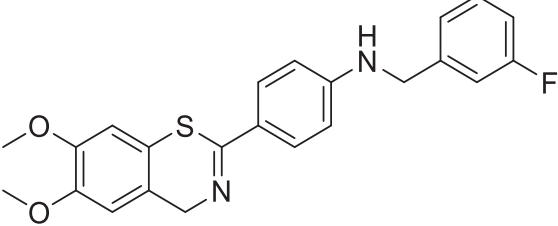
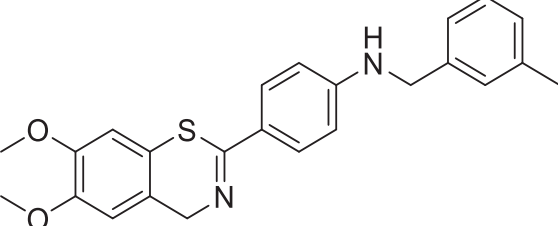
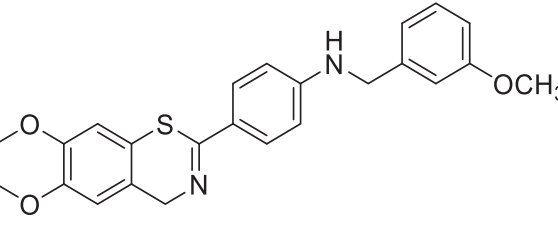
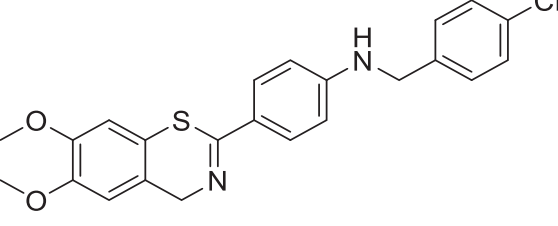
Iz  $^1\text{H}$  NMR spektra spoja **3** (*Slika 7*) mogu se uočiti dva singleta s integralima od po 3H za protone metoksi-skupina s oznakama 1 i 2 na približno 3,7 ppm. Proton oznake 3 pokazuje singlet s integralom od 1H na približno 6,9 ppm. Za proton oznake 4 može se uočiti singlet s integralom od 1H u području nešto nižem od 7,2 ppm. Ekvivalentni protoni oznake 5 pokazuju singlet s integralom od 2H u području nešto nižem od 4,8 ppm. Protoni oznake 6, koji su ekvivalentni, pokazuju dublet s integralom od 2H na približno 7,3 ppm. Protoni oznake 7 su također ekvivalentni te pokazuju dublet s integralom od 2H na približno 7,7 ppm. Protoni metilne skupine s oznakom 8 pokazuju singlet s integralom od 3H na približno 2,3 ppm. U području nešto nižem od 2,8 ppm može se uočiti signal za otapalo, dimetilsulfoksid (DMSO), a na približno 3,5 ppm može se uočiti signal za vodu u dimetilsulfoksidu ( $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ).

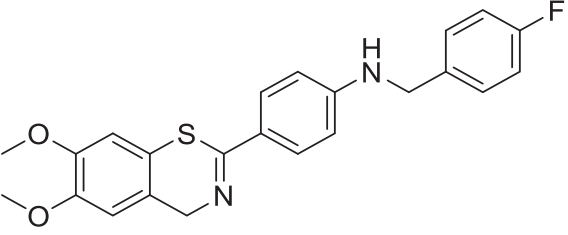
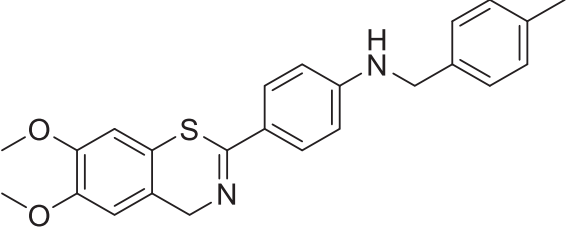
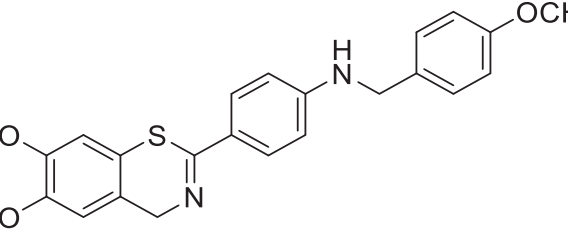
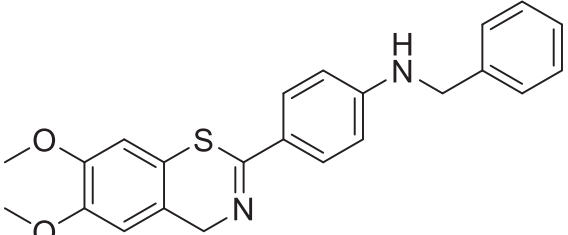


*Slika 7.*  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **3**.

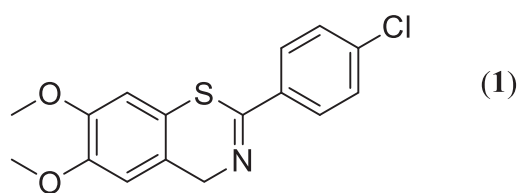
**Tablica 3.** Prikaz struktura odabranih amino-1,3-benzotiazina (4-18) s pripadajućim imenima i oznakama spojeva.

Struktura spoja	Ime spoja	Oznaka spoja
	<i>N</i> -(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin-2-il)anilin	(4)
	4-(6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin-2-il)- <i>N</i> -(2-fluorbenzil)anilin	(5)
	4-(6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin-2-il)- <i>N</i> -(furan-2-ilmetil)anilin	(6)
	4-(6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin-2-il)- <i>N</i> -(2-metilbenzil)anilina	(7)
	4-(6,7-dimetoksi-4 <i>H</i> -benzo[1,3]tiazin-2il)- <i>N</i> -(2-metoksibenzil)anilin	(8)

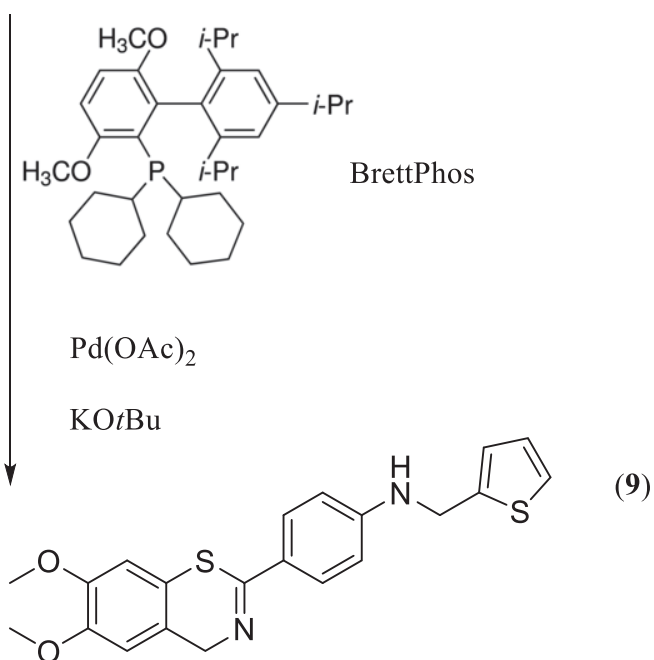
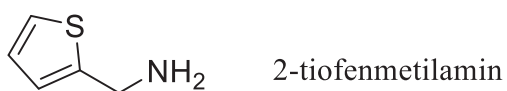
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(tiofen-2-ilmetil)anilin</p>	<p>(9)</p>
	<p>N-(3-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilin</p>	<p>(10)</p>
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-fluorbenzil)anilin</p>	<p>(11)</p>
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-metilbenzil)anilin</p>	<p>(12)</p>
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-metoksibenzil)anilin</p>	<p>(13)</p>
	<p>N-(4-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilin</p>	<p>(14)</p>

	<p>4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)-<i>N</i>-(4-flourbenzil)anilin</p>	<p>(15)</p>
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)-<i>N</i>-(4-metilbenzil)anilin</p>	<p>(16)</p>
	<p>4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)-<i>N</i>-(4-metoksibenzil)anilin</p>	<p>(17)</p>
	<p><i>N</i>-benzil-4-(6,7-dimetoksi-4<i>H</i>-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina</p>	<p>(18)</p>

Od gore navedenih amina u Tablici 3, sintetizirani su spojevi 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-il-metil)anilin (**9**) i *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilin (**4**). Za sintezu oba spoja kao polazni spoj upotrijebio se spoj **1** te su se reakcije provodile uz prisutnost BrettPhosa, koji ima ulogu liganda, paladijeva (II)acetata, Pd(OAc)<sub>2</sub>, koji ima ulogu katalizatora i kalijevojg *tert*-butoksida, KO*t*Bu, koji ima ulogu baze (*Scheme 1 i 2*). Spoj **9** sintetiziran je iz spoja **1** i 2-tiofenmetilamina (*Scheme 1*), dok je spoj **4** sintetiziran je iz klorovog derivata **1** i 2-klorbenzilamina (*Scheme 2*). Tako pripravljene reakcijske smjese zagrijavale su se preko noći na temperaturi od 120 °C.

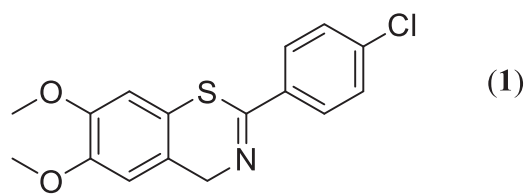


+

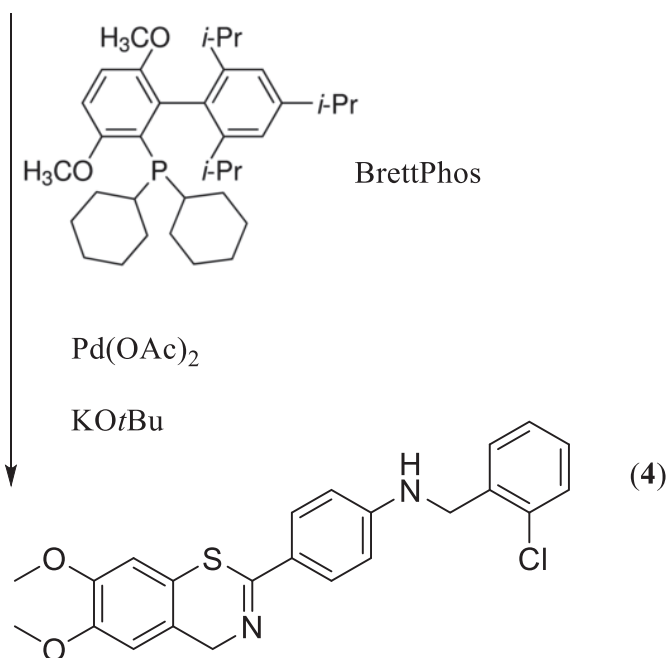
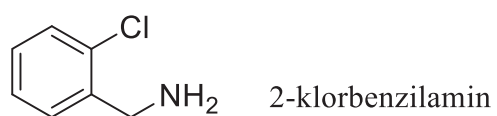


**Shema 1.** Sinteze 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-ilmetil)anilina (9).



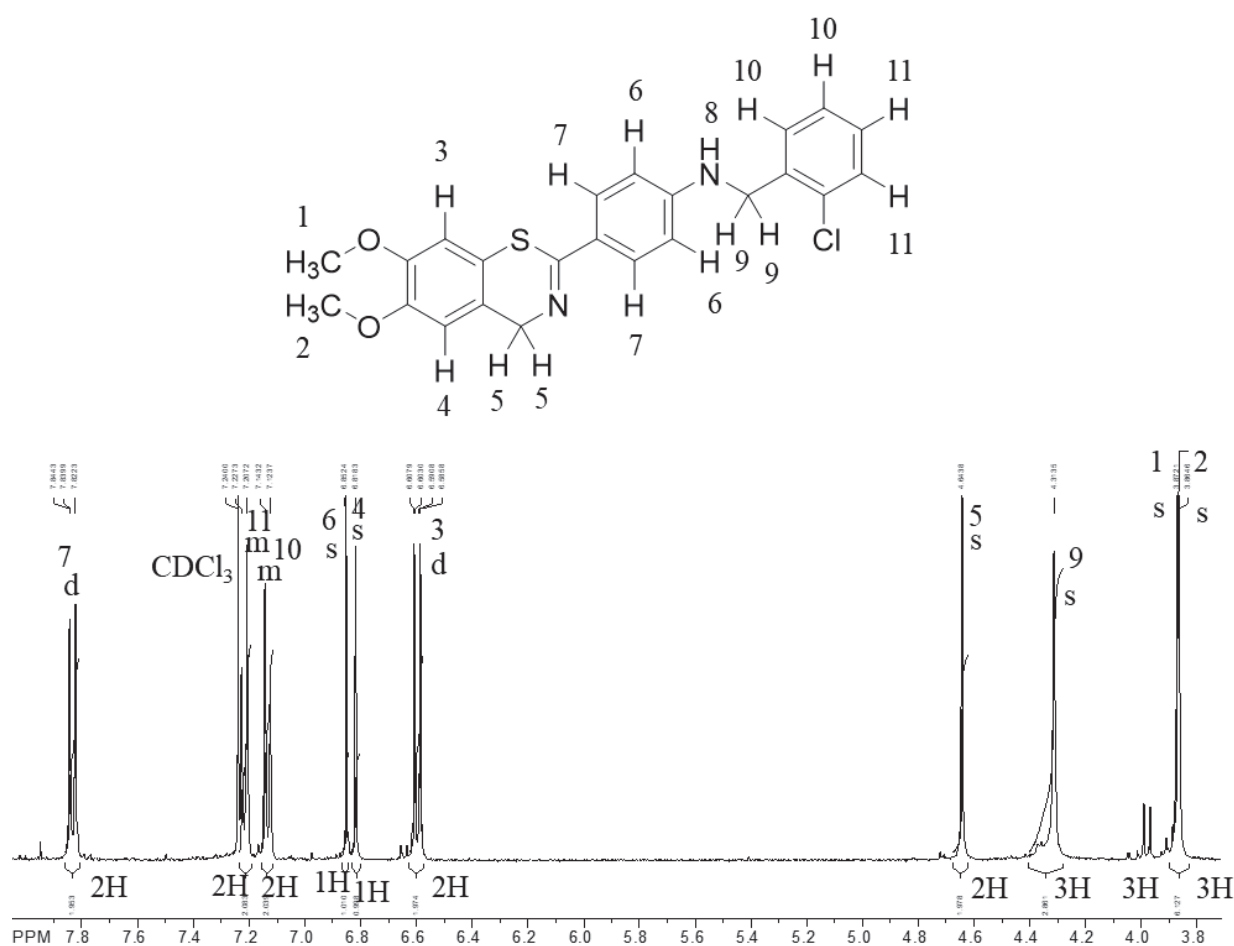


+



**Shema 2.** Sinteza *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (4).

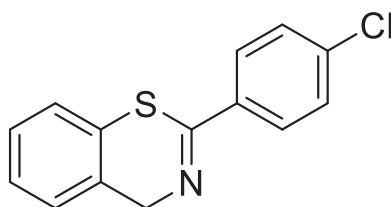
Iz  $^1\text{H}$  NMR spektra spoja **4** (*Slika 8*) mogu se uočiti dva singleta s integralom od po 3H za protone metoksi skupina s oznakama 1 i 2 na približno 3,8 ppm. Proton oznake 3 pokazuje dublet s integralom od 2H na približno 6,6 ppm. Proton s oznakom 4 pokazuje singlet s integralom od 1H na približno 6,8 ppm. Ekvivalentni protoni s oznakom 5 pokazuju singlet s integralom od 2H na približno 4,6 ppm. Protoni s oznakom 6, koji su ekvivalentni, pokazuju dublet s integralom od 2H na približno 6,9 ppm. Za ekvivalentne protone s oznakom 7 može se uočiti dublet s integralom od 2H na području nešto nižem od 7,8 ppm. Široki singlet s integralom od 3H može se uočiti za protone  $-\text{CH}_2$  skupine s oznakom 9 te NH skupine na približno 4,3 ppm. Protoni s oznakom 10 pokazuju multiplet s integralom od 2H na približno 7,1 ppm. Protoni s oznakom 11 pokazuju multiplet s integralom od 2H na približno 7,2 ppm. U području nešto višem od 7,2 ppm može se uočiti signal za otapalo, deuterirani kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ).



*Slika 8.*  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **4**.

## 2.2. *In silico* analiza odabranih amino-1,3-benzotiazina

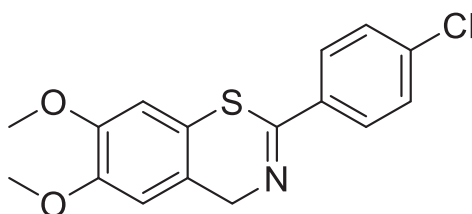
U svrhu ispitivanja biološke aktivnosti odabranih amino-1,3-benzotiazina, primijenjen je *in silico* pristup, korišten je softverski paket PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) te su dobiveni sljedeći rezultati:



**Slika 9.** Struktura 2-(4-klorfenil)-4*H*-benzo[1,3]tiazina (19).

**Tablica 4.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti modelnog spoja 2-(4-klorfenil)-4*H*-benzo[1,3]tiazina (19).

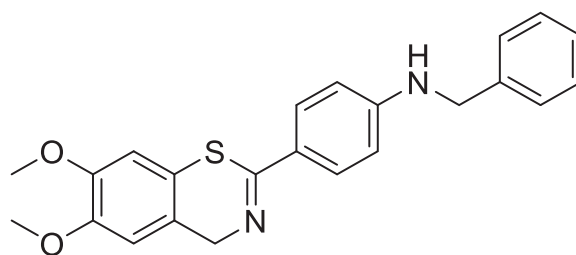
0,873	0,004	Inhibitor glikozil-fosfatidilinozitol fosfolipaze D
0,821	0,005	Inhibitor faktora D (komplement)
0,792	0,037	U tretmanu fobičnih poremećaja
0,717	0,012	Inhibitor IgA-specifične serinske endopeptidaze



**Slika 10.** Struktura 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazina (1),

**Tablica 5.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazina (1).

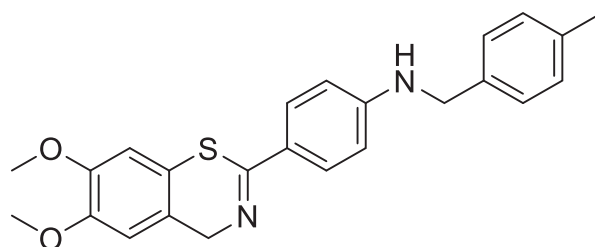
0,716	0,047	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)
0,652	0,027	Inhibitor faktora D (komplement)
0,651	0,049	Inhibitor glikozil-fosfatidilinozitol fosfolipaze D
0,641	0,052	Inhibitor klordekon reduktaze
0,589	0,034	Inhibitor ekspresije JAK2 gena
0,642	0,103	U tretmanu fobičnih poremećaja
0,573	0,037	Inhibitor aldehid oksidaze



**Slika 11.** Struktura *N*-benzil-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**18**).

**Tablica 6.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti *N*-benzil-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**18**).

0,552	0,035	Inhibitor inzulizina
0,480	0,036	Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita
0,434	0,043	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,380	0,022	Tretman prionskih bolesti



**Slika 12.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metilbenzil)anilina (**16**).

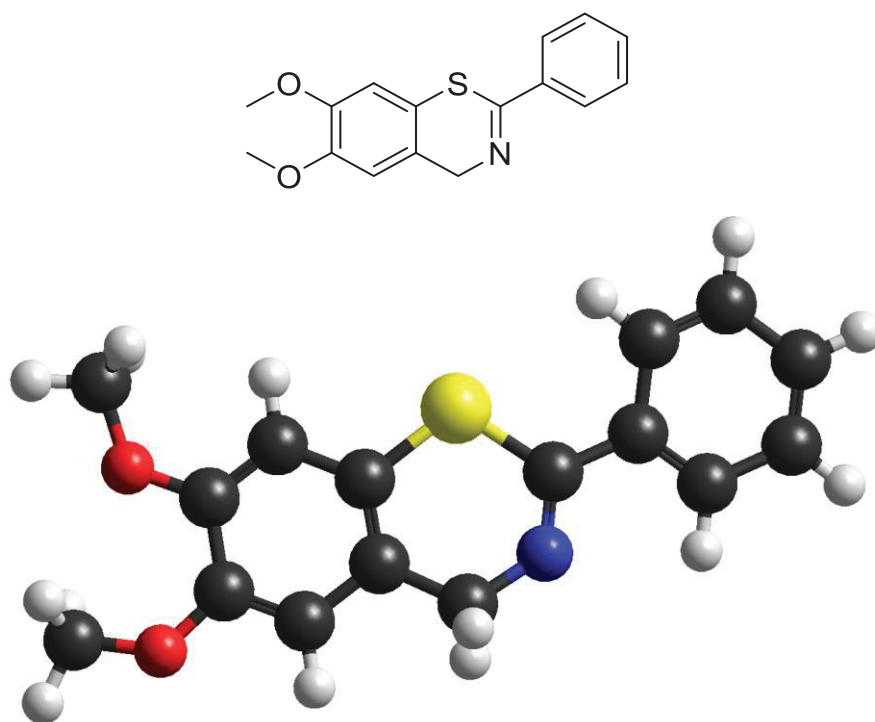
**Tablica 7.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metilbenzil)anilina (**16**).

0,600	0,025	Inhibitor inzulizina
0,493	0,033	Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita
0,410	0,050	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,367	0,041	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3
0,358	0,034	Tretman prionskih bolesti
0,370	0,054	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,335	0,056	Inhibitor kinaze fokalne adhezije

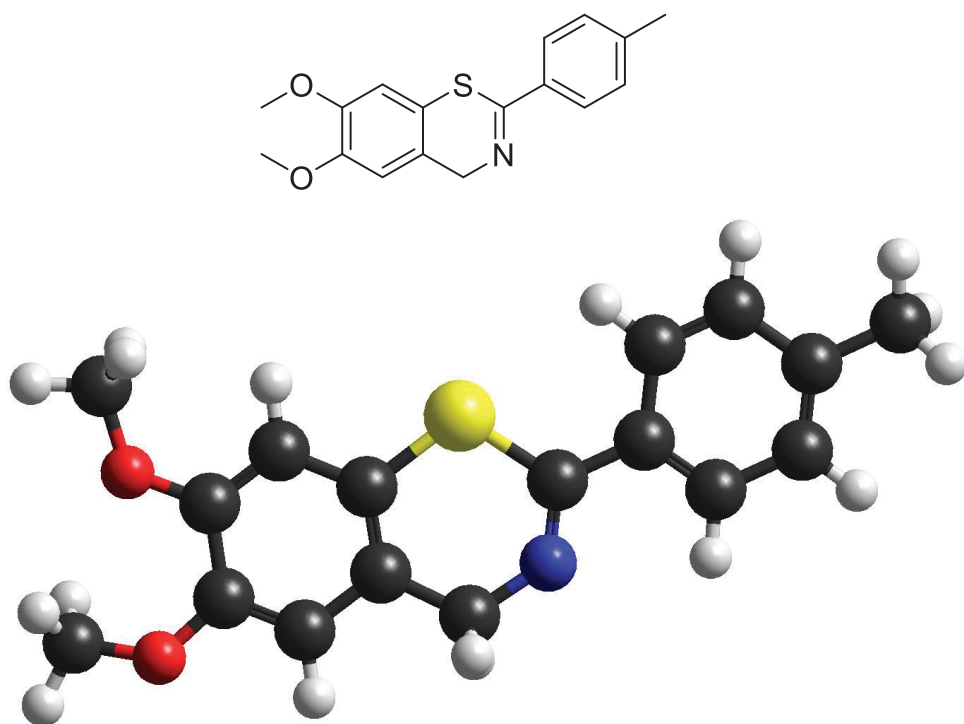
### 2.3. Određivanje logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih amino-1,3-benzotiazina teorijskim proračunom

U svrhu ispitivanja particijskog koeficijenta, koji daje uvid u lipofilnost 1,3-benzotiazina (1-3) i amino-1,3-benzotiazina (4-18), korišten je program HyperChem 5.0.1 (*Slika 13-19*).

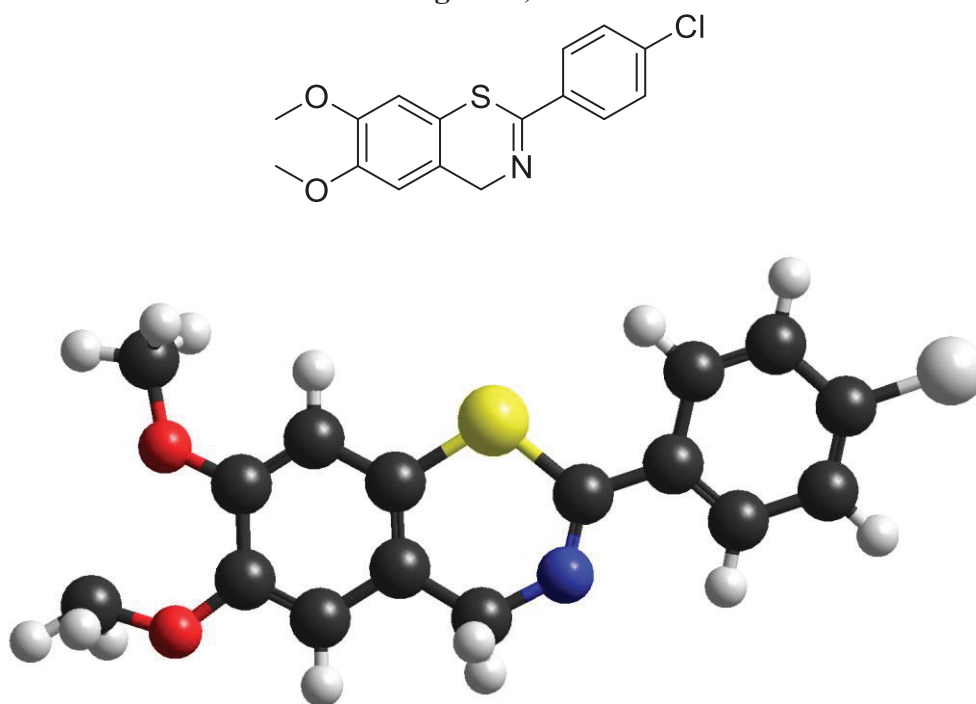
Primjenom programa HyperChem 5.0.1 dobiveni su sljedeći rezultati logaritamskih vrijednosti particijskih koeficijenata 1,3-benzotiazina (1-3):



*Slika 13.* Struktura 6,7-dimetoksi-2-fenil-4*H*-benzo-1,3-tiazina (2) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,30$ .

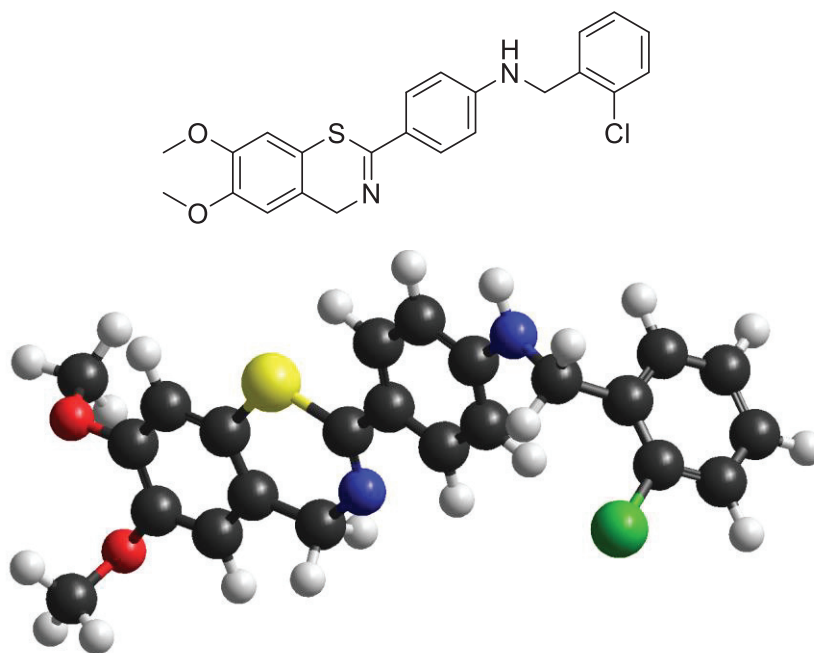


*Slika 14.* Struktura 6,7-dimetoksi-2-(p-tolil)-4H-benzo-1,3-tiazina (**3**) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,15$ .

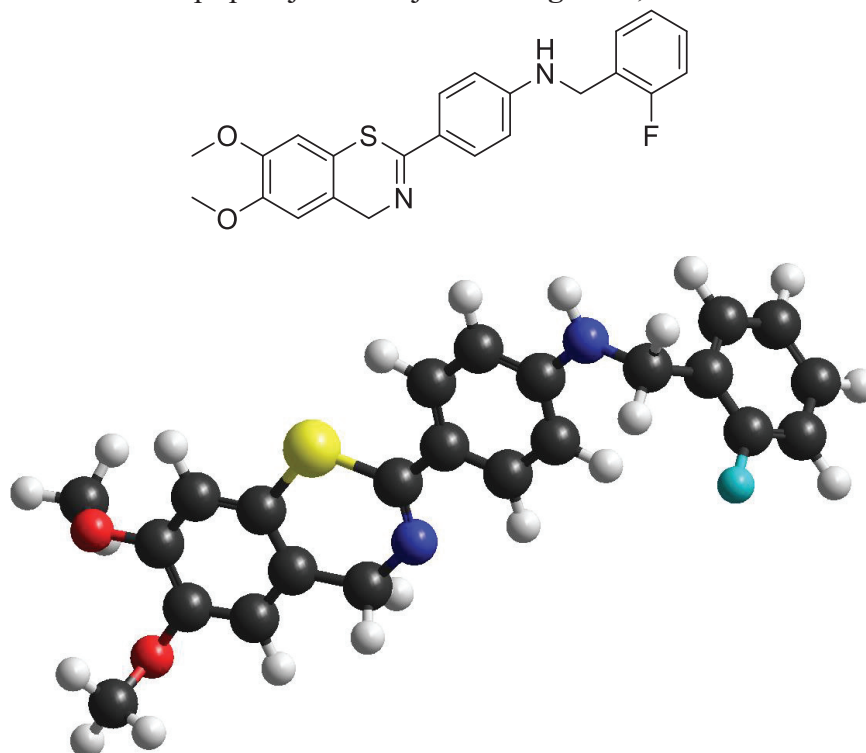


*Slika 15.* Struktura 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4H-benzo-1,3-tiazina (**1**) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,53$ .

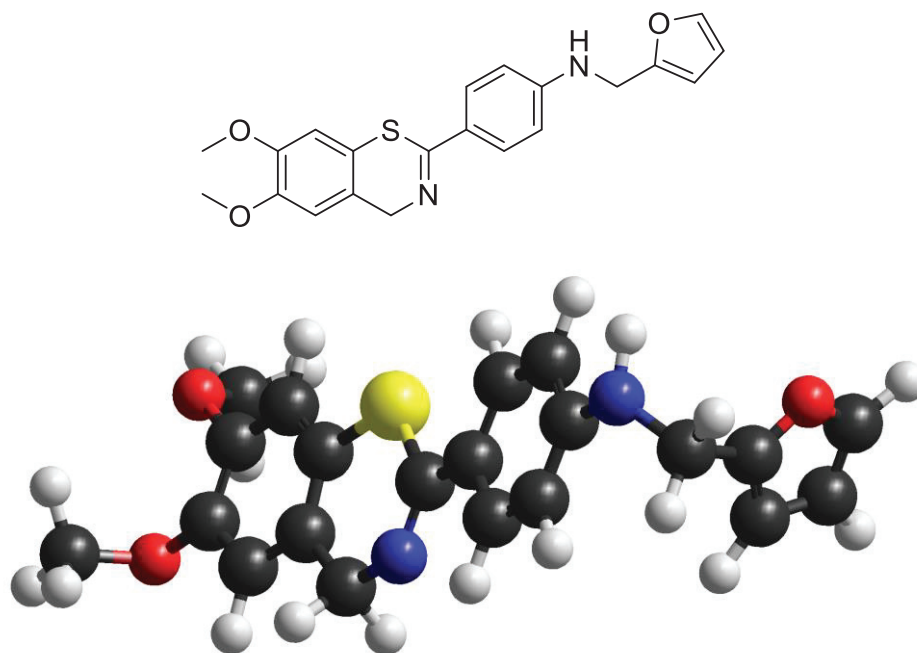
Primjenom programa HyperChem 5.0.1 dobiveni su sljedeći rezultati logaritamskih vrijednosti partijskih koeficijenata amino-1,3-benzotiazina (4-18):



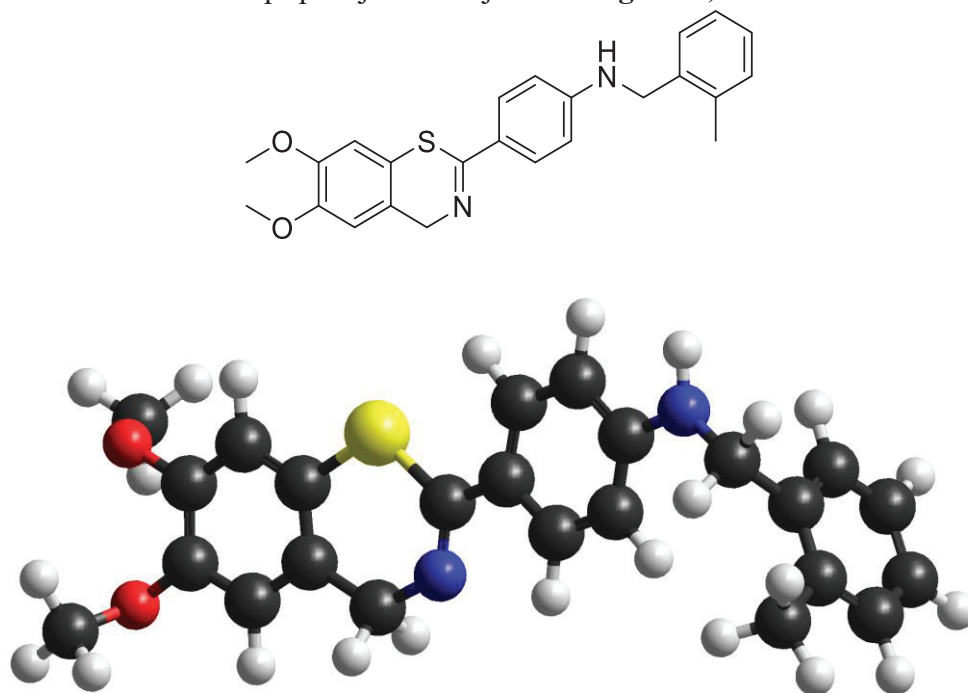
**Slika 16.** Struktura *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (4) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,82$ .



**Slika 17.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-fluorbenzil)anilina (5) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,20$ .



**Slika 18.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(furan-2-ilmetil)anilina (6) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -2,33$ .



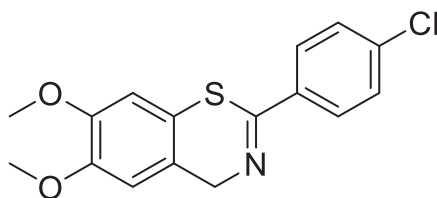
**Slika 19.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-metilbenzil)anilina (7) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,45$ .



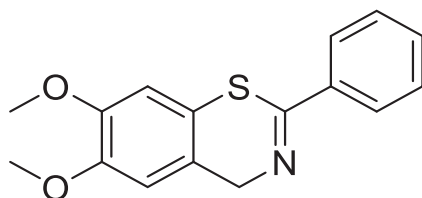
Iz prikazanih podataka može se uočiti da su logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih 1,3-benzotiazina (1-3) i amino-1,3-benzotiazina (4-18) dobivene korištenjem programa HyperChem 5.0.1 negativne i da odabrani spojevi amino-1,3-benzotiazina pokazuju negativniju logaritamsku vrijednost particijskog koeficijenta nego odabrani spojevi 1,3-benzotiazina.

## 2.4. Određivanje logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih 1,3-benzotiazina 1-3 metodom protresanja tikvicom

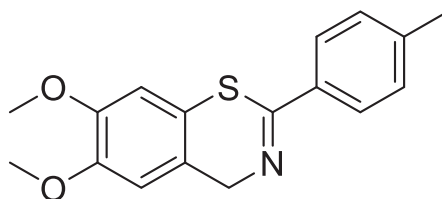
Metoda protresanja tikvicom koristila se u svrhu ispitivanja logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4*H*-benzo-1,3-tiazina (1), 6,7-dimetoksi-2-fenil-4*H*-benzo-1,3-tiazina (2) i 6,7-dimetoksi-2-(*p*-tolil)-4*H*-benzo-1,3-tiazina (3).



*Slika 20.* 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4*H*-benzo-1,3-tiazin (1).



*Slika 21.* 6,7-dimetoksi-2-fenil-4*H*-benzo-1,3-tiazin (2).



*Slika 22.* 6,7-dimetoksi-2-(*p*-tolil)-4*H*-benzo-1,3-tiazin (3).

Za računanje partijskog koeficijenta spojeva (2), (3) i (1) primijenio se sljedeći izraz:<sup>[27]</sup>

$$P = \frac{y-x}{x} \times \frac{V_{\text{pufer}}}{V_{n\text{-oktanol}}} \quad (9)$$

gdje su:

$P$  – partijski koeficijent

$y$  – ukupna koncentracija ispitivanog spoja

$x$  – koncentracija ispitivanog spoja nakon raspodjele između pufera i  $n$ -oktanola

$V_{\text{pufer}}$  – volumen fosfatnog pufera

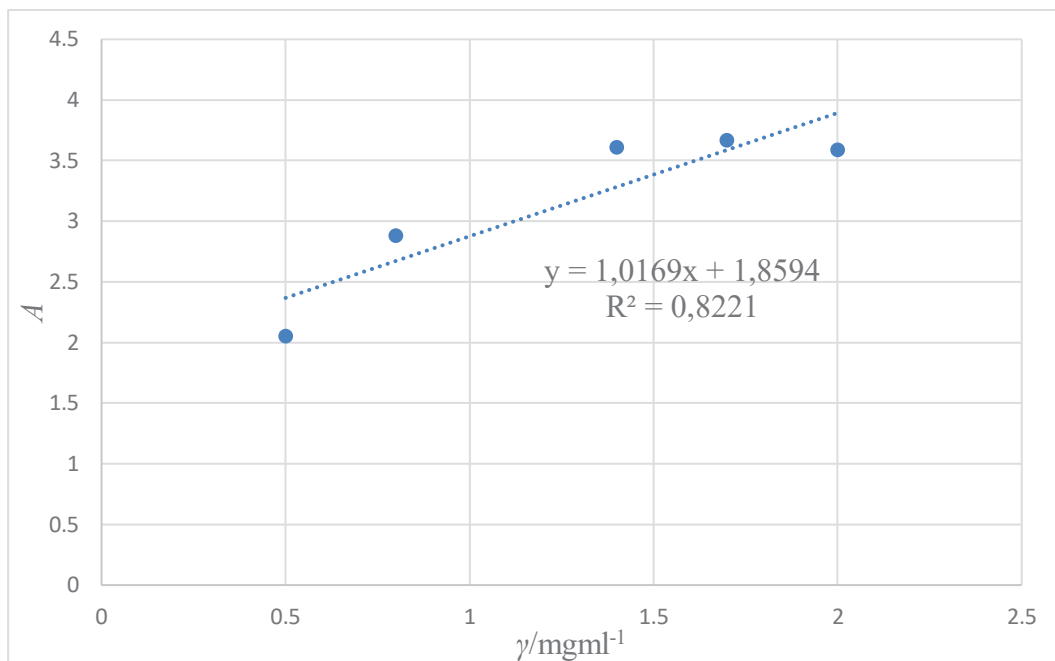
$V_{n\text{-oktanol}}$  – volumen  $n$ -oktanola.

Masena koncentracija ( $x$ ) ispitivanog spoja nakon raspodjele između pufera i  $n$ -oktanola izračunala se pomoću jednadžbe pravca kojim se prikazuje ovisnost apsorbancije ispitivane tvari u ultraljubičastom području o masenoj koncentraciji ispitivane tvari u uzorku.

**Tablica 8.** Apsorbancija spoja (2) u ovisnosti o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

$A$	$\gamma / \text{mg ml}^{-1}$
2,05	0,5
2,88	0,8
3,61	1,4
3,67	1,7
3,59	2

Apsorbancija uzorka spoja (2) nakon raspodjele između  $n$ -oktanola i pufera iznosila je **3,22**.



**Slika 23.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije spoja (2) o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

$$y = \frac{10 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$A = 1,0169\gamma + 1,8594$$

$$\gamma = x = 1,3379 \text{ mg/ml}$$

$$P = \frac{2 \text{ mg/ml} - 1,3379 \text{ mg/ml}}{1,3379 \text{ mg/ml}} \times \frac{700 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$

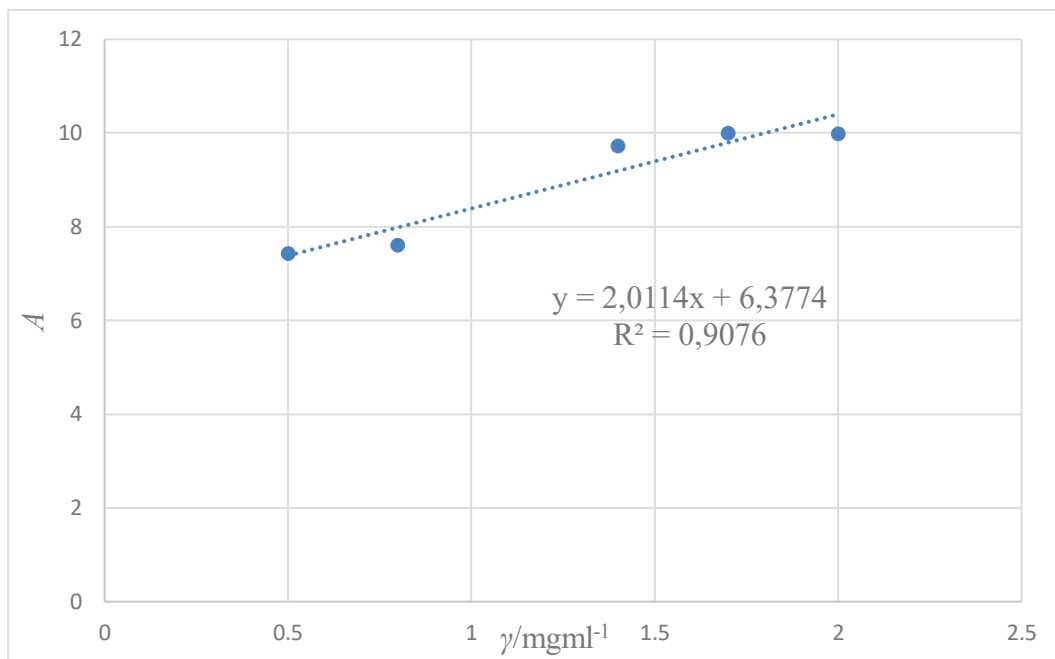
$$P = 17,3208$$

$$\log P = \log(17,3208) = 1,2386$$

**Tablica 9.** Apsorbancija spoja (3) u ovisnosti o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

A	γ / mg ml <sup>-1</sup>
7,42	0,5
7,61	0,8
9,73	1,4
10,00	1,7
9,99	2

Apsorbancija uzorka spoja (3) nakon raspodjele između *n*-oktanola i pufera iznosila je **1,73**.



**Slika 24.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije spoja (3) o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

$$y = \frac{11,0 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 2,2 \text{ mg/ml}$$

$$A = 2,0114\gamma + 6,3774$$

$$\gamma = x = -2,3105 \text{ mg/ml}$$

$$P = \frac{2,2 \text{ mg/ml} - (-2,3105) \text{ mg/ml}}{(-2,3105) \text{ mg/ml}} \times \frac{700 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$

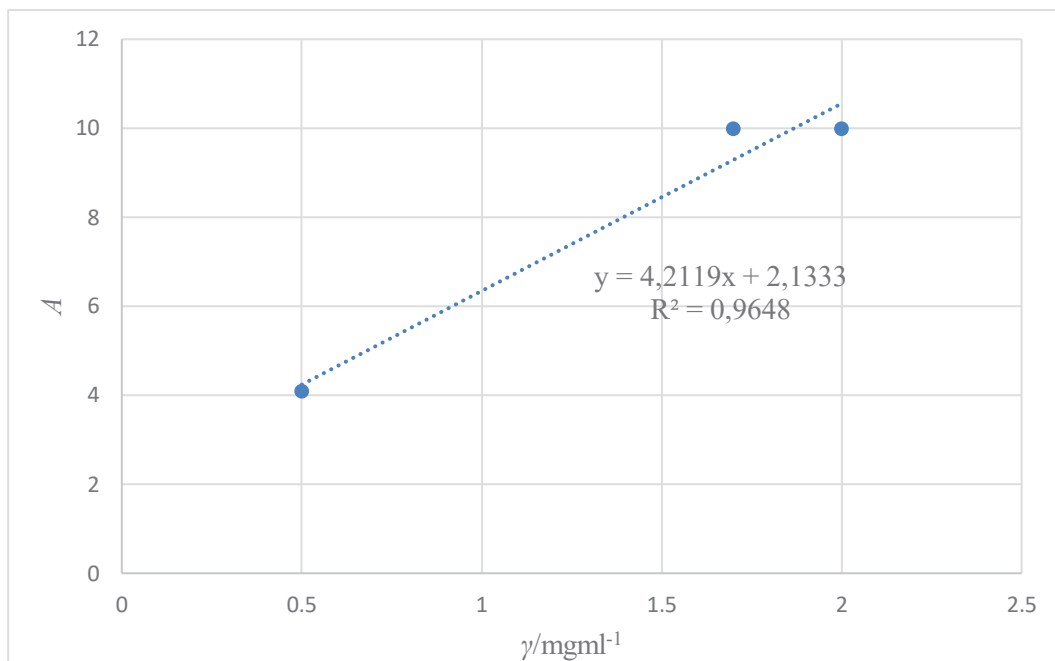
$$P = -68,3261$$

$$\log P = \log(-68,3261) = \emptyset$$

**Tablica 10.** Apsorbancija spoja (1) u ovisnosti o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

A	γ / mg ml <sup>-1</sup>
4,1	0,5
9,99	1,7
10,00	2

Apsorbancija uzorka spoja (1) nakon raspodjele između *n*-oktanola i pufera iznosila je **3,56**.



**Slika 25.** Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije spoja (**1**) o masenoj koncentraciji navedenog spoja u uzorku.

Pri kreiranju jednadžbe pravca izbačene su točke (0,8 , 9,91) i (1,4 , 10,01) radi smanjenja eksperimentalne pogreške.

$$y = \frac{11,1 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 2,22 \text{ mg/ml}$$

$$A = 4,2119\gamma + 2,1333$$

$$\gamma = x = 0,3387 \text{ mg/ml}$$

$$P = \frac{2,22 \text{ mg/ml} - 0,3387 \text{ mg/ml}}{0,3387 \text{ mg/ml}} \times \frac{700 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$

$$P = 194,4066$$

$$\log P = \log(194,4066) = 2,2887$$

Kada je logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta ispitivanog spoja jednaka nuli, spoj je jednako raspodijeljen između organske i vodene faze. Pozitivna vrijednost logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta ispitivanog spoja označava veću koncentraciju ispitivanog spoja u organskoj fazi, odnosno može se zaključiti da je ispitivani spoj lipofilan. Negativna vrijednost logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta ispitivanog spoja upućuje na veći afinitet ispitivanog spoja prema vodenoj fazi, odnosno upućuje na činjenicu da je spoj hidrofilan. Ako je logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta ispitivnog spoja jedan, može se zaključiti da je ispitivani spoj raspodijeljen između organske i vodene faze u omjeru 10: 1. Prema Lipinskijevom pravilu 5,  $\log P$  vrijednost lijeka namijenjenog peroralnom unosu trebala bi iznositi manje od 5. Ako je lijek više lipofilan, bit će manje topljiv u vodi, čime se ugrožava njegova bioraspodjeljivost. Ako se ne može postići ili održati odgovarajuća koncentracija lijeka, čak i najmoćnija *in vitro* tvar ne može biti učinkovit lijek. U slučaju kada je  $\log P$  vrijednost lijeka veća od 5, može doći do akumulacije lijeka u masnom tkivu, čime se otežava proces ekskrecije lijekova, što može dovesti do toksičnosti lijeka za organizam. Također, lijekovi koji ciljaju središnji živčani sustav trebali bi imati  $\log P$  vrijednost oko 2; za peroralnu i crijevnu apsorpciju, idealna  $\log P$  vrijednost lijekova iznosi 1,35–1,8, dok lijekovi namijenjeni sublingvalnoj apsorpciji trebaju imati  $\log P$  vrijednost veću od 5.<sup>[28]</sup>

**Tablica 11.** Prikaz logaritamskih vrijednosti particijskog koeficijenta dobivenih teorijskim proračunom upotrebom programa HyperChem 5.0.1 i direktnom metodom, metodom protresanja tikvicom.

Oznaka spoja	HyperChem 5.0.1	Metoda protresanja tikvicom
(1)	$\log P = -0,53$	$\log P = 2,2887$
(2)	$\log P = -0,30$	$\log P = 1,2386$
(3)	$\log P = -0,15$	$\log P = \emptyset$

Iz tablično prikazanih rezultata može se zaključiti da metoda teorijskog proračuna logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta spojeva (1), (2) i (3) nije u korelaciji s direktnom metodom, metodom protresanja tikvicom. Iz rezultata dobivenih metodom protresanja tikvicom može se zaključiti da su spojevi (1) i (2) lipofilni te su pogodni kandidati za daljnja preklinička i klinička istraživanja kojima se može ispitati njihova biološka aktivnost.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Određivanje particijskog koeficijenta 6,7-dimetoksi-2-fenil-4*H*-benzo-1,3-tiazina (2) primjenom metode protresanja tikvicom

10,0 mg uzorka spoja (2) otopljeno je u 5 ml etanola te je uzorak ostavljen preko noći da se u potpunosti otopi.

Odvagalo se redom 2,0 mg, 3,2 mg, 5,6 mg, 6,8 mg i 8,0 mg spoja (2) te se svakom uzorku dodalo 4 ml 96%-tne otopine etanola. Time su se pripravile otopine uzorka spoja (2) masenih koncentracija 0,5 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,7 mg/ml i 2,0 mg/ml. Uzorci su se nakon otapanja prebacili u kivete i snimili na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer*. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara očitale su se vrijednosti apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije za sve navedene otopine uzorka spoja (2) te se uz pomoć očitanih vrijednosti apsorpcija i masenih koncentracija otopina uzorka spoja (2) izradio baždarni dijagram prikazan na *slici 23*.

Fosfatni pufer pH vrijednosti 7,5 priređen je otapanjem prethodno kupljene tablete pufera proizvođača *Sigma Aldridge* u 400 ml vode. 700  $\mu$ l tako pripremljenog fosfatnog pufera preneseno je u bočicu u koju se zatim doda 700  $\mu$ l prethodno otopljenog uzorka spoja (2). Naposljetku je u bočicu dodano 20  $\mu$ l *n*-oktanola te se tako pripravljena smjesa ručno protresala 30 min., a zatim na uređaju *Stuart-vortex mixer SA8* 60 min. brzinom od 600 rpm. Slojevi su se odvojili te se gornji sloj, sloj *n*-oktanola, izvadio kapaljkom. Donji sloj snimio se na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer* te se iz dobivenog apsorpcijskog spektra očitala vrijednost apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije spoja (2). Na temelju te vrijednosti, te uz pomoć jednadžbe pravca prikazanog na *slici 23*., odredila se masena koncentracija (*x*) ispitivanog spoja nakon raspodjele između pufera i *n*-oktanola.

#### 3.2. Određivanje particijskog koeficijenta 6,7-dimetoksi-2-(*p*-tolil)-4*H*-benzo-1,3-tiazina (3) primjenom metode protresanja tikvicom

11,0 mg uzorka spoja (3) otopljeno je u 5 ml etanola te je uzorak ostavljen preko noći da se u potpunosti otopi.

Odvagalo se redom 2,0 mg, 3,2 mg, 5,6 mg, 6,8 mg i 8,0 mg spoja (3) te se svakom uzorku dodalo 4 ml 96%-tne otopine etanola. Time su se pripravile otopine uzorka spoja (3) masenih

koncentracija 0,5 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,7 mg/ml i 2,0 mg/ml. Uzorci su se nakon otapanja prebacili u kivete i snimili na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer*. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara očitale su se vrijednosti apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije za sve navedene otopine uzorka spoja (3) te se uz pomoć očitanih vrijednosti apsorpcija i masenih koncentracija otopina uzorka spoja (3) izradio baždarni dijagram prikazan na *slici 24*.

Fosfatni pufer pH vrijednosti 7,5 priređen je otapanjem prethodno pripremljene tablete pufera proizvođača *Sigma Aldridge* u 400 ml vode. 700 µl tako pripremljenog fosfatnog pufera preneseno je u bočicu u koju se zatim doda 700 µl prethodno otopljenog uzorka spoja (3). Naposljetku je u bočicu dodano 20 µl *n*-oktanola te se tako pripremljena smjesa ručno protresala 30 min., a zatim na uređaju *Stuart-vortex mixer SA8* 60 min. brzinom od 600 rpm. Slojevi su se odvojili te se gornji sloj, sloj *n*-oktanola, izvadio kapaljkom. Donji sloj snimio se na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer* te se iz dobivenog apsorpcijskog spektra očitala vrijednost apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije spoja (3). Na temelju te vrijednosti, te uz pomoć jednadžbe pravca prikazanog na *slici 24*., odredila se masena koncentracija (*x*) ispitivanog spoja nakon raspodjele između pufera i *n*-oktanola.

### **3.3. Određivanje particijskog koeficijenta 2-(4-klorfenil)-6,7-dimetoksi-4*H*-benzo-1,3-tiazina (1) primjenom metode protresanja tikvicom**

11,1 mg uzorka spoja (1) otopljeno je u 5 ml etanola te je uzorak ostavljen preko noći da se u potpunosti otopi.

Odvagalo se redom 2,0 mg, 3,2 mg, 5,6 mg, 6,8 mg i 8,0 mg spoja (1) te se svakom uzorku dodalo 4 ml 96%-tne otopine etanola. Time su se pripravile otopine uzorka spoja (1) masenih koncentracija 0,5 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,7 mg/ml i 2,0 mg/ml. Uzorci su se nakon otapanja prebacili u kivete i snimili na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer*. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara očitale su se vrijednosti apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije za sve navedene otopine spoja (1) te se uz pomoć očitanih vrijednosti apsorpcija i masenih koncentracija otopina uzorka spoja (1) izradio baždarni dijagram prikazan na *slici 25*.



Fosfatni pufer pH vrijednosti 7,5 priređen je otapanjem prethodno pripremljene tablete pufera proizvođača *Sigma Aldridge* u 400 ml vode. 700  $\mu$ l tako pripremljenog fosfatnog pufera preneseno je u bočicu u koju se zatim doda 700  $\mu$ l prethodno otopljenog uzorka spoja (1). Naposljetku je u bočicu dodano 20  $\mu$ l *n*-oktanol te se tako pripremljena smjesa ručno protresala 30 min., a zatim na uređaju *Stuart-vortex mixer SA8* 60 min. brzinom od 600 rpm. Slojevi su se odvojili te se gornji sloj, sloj *n*-oktanol, izvadio kapaljkom. Donji sloj snimio se na UV-spektrofotometru *CARY 300 BIO UV-Visible Spectrophotometer* te se iz dobivenog apsorpcijskog spektra očitala vrijednost apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije spoja (1). Na temelju te vrijednosti, te uz pomoć jednadžbe pravca prikazanog na *slici 25.*, odredila se masena koncentracija (*x*) ispitivanog spoja nakon raspodjele između pufera i *n*-oktanol.

### **3.4. Sinteza 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-il-metil)anilina (9)**

4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-il-metil)anilin (9) pripremljen je iz spoja (1) i 2-tiofenmetilamina. Upotrijebilo se 100 mg spoja (1) i 35,2  $\mu$ l (1,1 molarni ekvivalent) 2-tiofenmetilamina ( $\rho$ (2-tiofenmetilamina)=1,103 g/ml). Reakcijskoj smjesi dodano je 17,3 mg (0,1 molarni ekvivalent) BrettPhos, koji ima ulogu liganda, 3,6 mg (0,05 molarni ekvivalent) paladijeva (II) acetata, Pd(OAc)<sub>2</sub>, koji ima ulogu katalizatora, i 50 mg (1,4 molarni ekvivalent) kalijevoeg tert-butoksida, KO*t*Bu, koji ima ulogu baze, otopljenog u 4 ml dioksana. Tako pripremljena reakcijska smjesa zagrijavala se preko noći na temperaturi od 120 °C.

### **3.5. Sinteza *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (4)**

*N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilin (4) pripremljen je iz spoja (1) i 2-klorbenzilamina. Upotrijebilo se 100 mg spoja (1) i 21,2  $\mu$ l (1,1 molarni ekvivalent) 2-klorbenzilamina ( $\rho$ (2-klorbenzilamin)=1,173 g/ml). Reakcijskoj smjesi dodano je 17,3 mg (0,1 molarni ekvivalent) BrettPhos, koji ima ulogu liganda, 3,6 mg (0,05 molarni ekvivalent) paladijeva (II) acetata, Pd(OAc)<sub>2</sub>, koji ima ulogu katalizatora, i 50 mg (1,4 molarni ekvivalent) kalijevoeg tert-butoksida, KO*t*Bu, koji ima ulogu baze, otopljenog u 4 ml dioksana. Tako pripremljena reakcijska smjesa zagrijavala se preko noći na temperaturi od 120 °C.

#### 4. ZAKLJUČAK

Metoda protresanja tikvicom upotrijebila se u svrhu ispitivanja logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta za 1,3-benzotiazine **1-3**.

Logaritamske vrijednost particijskog koeficijenta za spoj **(2)** i za spoj **(1)** iznose  $\log P=1,2386$ , odnosno  $\log P= 2,2887$ . Dobivene vrijednosti logaritamskih vrijednosti particijskih koeficijenata su pozitivne, iz čega se može zaključiti da su ispitivani spojevi lipofilni te su stoga pogodni kandidati za daljnja predklinička i klinička ispitivanja kojima se može ispitati njihova potencijalna biološka aktivnost.

Logaritamska vrijednost particijskog koeficijenta spoja **3** nije se mogla izračunati budući da je particijski koeficijent negativan.

Primjenom programa HyperChem 5.0.1, logaritamske vrijednost particijskog koeficijenta za spojeve **1-3** su negativne, iz čega se može zaključiti da primijenjena teorijska metoda proračuna logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta nije u korelaciji s direktnom metodom, metodom protresanja tikvicom.

## 5. LITERATURA

- [1] J. Vrbanac, R. Slauter, *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, Second Edition* **2017** 39-56.
- [2] D. Verbanac, V. Stepanić, *Novi pogled na istraživanje lijekova – nove formulacije i kombinacije*.
- [3] M. D. Mitchell, D. C. Thompson, *The Role of Intestinal Efflux Transporters In Drug Absorption*, Biofiles, Volume 9, No 8.
- [4] DRUG ABSORPTION, DISTRIBUTION AND ELIMINATION; PHARMACOKINETICS <http://www.columbia.edu/itc/gsas/g9600/2004/GrazianoReadings/Drugabs.pdf> (pristupljeno 8. kolovoza 2019.)
- [5] Stan K. Bardal BSc (Pharm), MBA, PhD, Jason E. Waechter BSc, MD, FRCP(C), Douglas S. Martin PhD, *Applied Pharmacology* **2011** 17-27.
- [6] Elaine MAldredBSc (Hons), DC, Lic Ac, Dip Herb Med, Dip CHM, *Pharmacology: A Handbook for Complementary Healthcare Professionals* **2009** 123-125.
- [7] Cao X., Yu L., Sun D. (2008) *Drug Absorption Principles*. In: Krishna R., Yu L. (eds) *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Springer, Boston, MA 76.
- [8] Seng Kok-Yong, Lee Lawrence, *Basic Pharmacokinetic Concepts and Some Clinical Applications*, edited by Tarek A Ahmed **2015** 100-101.
- [9] M. Kalan, *Čimbenici varijabilnosti učinkovitosti rosuvastatina*, specijalistički rad, Farmaceutsko - biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, **2008** 49.
- [10] <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/farmakokinetika> (pristupljeno 9. kolovoza **2019.**)
- [11] N. T. Issa, H. Wathieu, A. Ojo, S. W. Byers, and Sivanesan Dakshanamurthy, *Drug Metabolism in Preclinical Drug Development: A Survey of the Discovery Process, Toxicology, and Computational Tools*, *Curr Drug Metab.* (2017) 18(6): 556–565. 2.
- [12] <https://recipe-cpsa.com/cyp-enzimi-stup-metabolizma-lijekova/> (pristupljeno 10. kolovoza **2019.**)

- [13] P. Manikandan, S. Nagini, *Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review*, Current Drug Targets, (2018) 19, 38-54. 38.
- [14] H. Wan, *What ADME tests should be conducted for preclinical studies?*, ADMET & DMPK 1(3) (2013) 19-28. 19.
- [15] T. D.Y. Chung, D. B. Terry, L. H. Smith, *In Vitro and In Vivo Assessment of ADME and PK Properties During Lead Selection and Lead Optimization – Guidelines, Benchmarks and Rules of Thumb*, Assay Guidance Manual, 2015 3-12.
- [16] <https://www.gvkbio.com/biology-services/in-vitro-adme-services/pampa-assay/> (pristupljeno 12. kolovoza 2019.)
- [17] A. Andres, M. Roses, C. Rafols, E. Bosch, S.Espinosa, V. Segarra, J.M. Huerta, *Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 76 (2015) 181–191. 182.
- [18] Y. W. Alelyunas, L. Pelosi-Kilby, P. Turcotte, Mary-Britt Kary, R. C. Spreena. *A high throughput dried DMSO LogD lipophilicity measurement based on 96-well shake-flask and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry detection*, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 1950–1955. 1950.
- [19] OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Adopted by the Council on 27th July 1995, Partition Coefficient (*n*-octanol/water): Shake Flask Method 1.
- [20] A. Finizio, M. Vighi, D. Sandroni, *Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods*, Chemosphere 34, (1997) 131-161. 131-132.
- [21] OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 122, Partition Coefficient (n-Octanol/Water), pH-Metric Method for Ionisable Substances (2000) 1-6.
- [22] M. Kah, C. D. Brown, *LogD: Lipophilicity for ionisable compounds*, Chemosphere 72 (2008) 1401–1408. 1403.-1404.
- [23] Joanna Matysiak<sup>1</sup>, Alicja Skrzypek<sup>1</sup>, Urszula Głaszcz<sup>1</sup>, Arkadiusz Matwijczuk, Bogdan Senczyna, Joanna Wietrzyk, Elzbieta Krajewska-Kułak, Andrzej Niewiadomy, *Synthesis and*

*biological activity of novel benzoazoles, benzoazines and other analogs functionalized by 2,4-dihydroxyphenyl moiety*, Res Chem Intermed (2018) 44:6169–6182. 6170.

[24] Jérôme Graton, Jean-Yves Le Questel, Peter Maxwell, and Paul Popelier, *Hydrogen-Bond Accepting Properties of New Heteroaromatic Ring Chemical Motifs: A Theoretical Study*, J. Chem. Inf. Model. 2016, 56, 322–334. 322.

[25] Deliang Chen, Mingming Zhao, Wen Tan, Yibao Li, Xun Li, Yongdong Li, Xiaolin Fan, *Effects of intramolecular hydrogen bonds on lipophilicity*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 130 (2019) 100–106. 100.

[26] Monika Maheshwari, Anju Goyal, *A Review: Synthesis and Medicinal Importance of 1,4-Benzothiazine Analogs*, Asian J Pharm Clin Res, Vol 8, Issue 2, 2015, 41-46. 41.

[27] Marica Medić-Šarić, Ana Mornar, Tanja Badovinac-Črnjević, and Ivona Jasprica, *Experimental and Calculation Procedures for Molecular Lipophilicity: A Comparative Study for 3,3'-(2-Methoxybenzylidene)bis(4-hydroxycoumarin)*, CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA 77 (1–2) 367–370 (2004). 368.

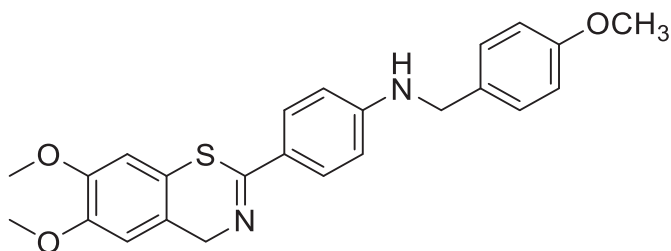
[28] S. K. Bhal, *LogP—Making Sense of the Value*, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/LABS). 1-2.

## 6. ŽIVOTOPIS

[REDACTED] Osnovnu školu Ante Kovačića završila sam 2011. godine te sam iste godine svoje srednjoškolsko obrazovanje započela u Gimnaziji Lucijana Vranjanina u Zagrebu. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja 2015. godine, upisala sam preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjersva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu studija odradila sam stručnu praksu na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar".

## 7. PRILOZI

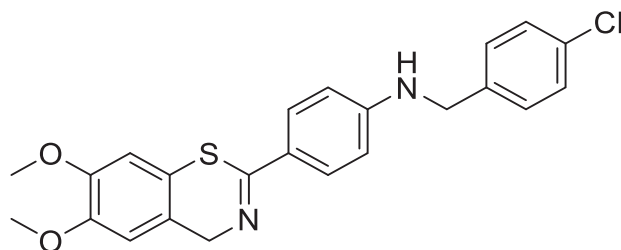
### 7.1. *In silico* analiza odabranih amino-1,3-benzotiazina



**Slika 26.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metoksibenzil)anilina (**17**).

**Tablica 12.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metoksibenzil)anilina (**17**).

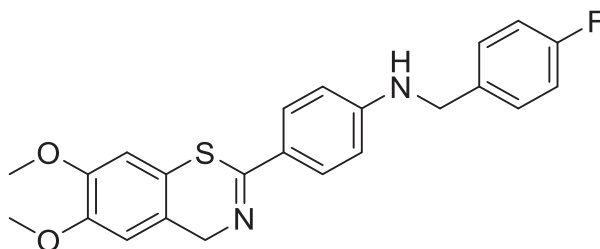
0,530	0,041	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,569	0,145	<b>Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)</b>
0,455	0,045	Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita
0,414	0,049	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,375	0,024	Tretman prionskih bolesti
0,351	0,047	Inhibitor kinaze fokalne adhezije
0,386	0,084	Antiartritički



**Slika 27.** Struktura *N*-(4-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**14**).

**Tablica 13.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti *N*-(4-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**14**).

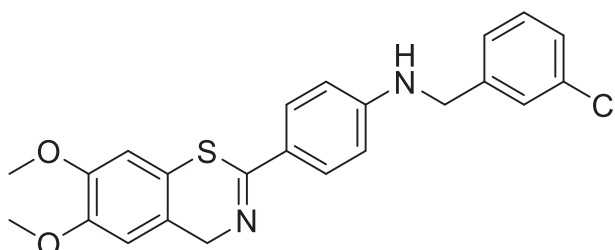
0,507	0,048	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,469	0,035	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,571	0,143	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)
0,462	0,043	Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita
0,381	0,021	Tretman prionskih bolesti
0,459	0,113	Aktivator kalcijevih kanala (osjetljivih na napon)
0,352	0,051	Agonist Vaniloida 1



**Slika 28.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-flourbenzil) anilina (**15**).

**Tablica 14.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-flourbenzil) anilina (**15**).

0,513	0,028	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,458	0,059	Antiartritički
0,367	0,067	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,303	0,020	Agonist aril ugljikovodičnih receptora Agonist aril ugljikovodičnih receptora
0,329	0,063	Tretman aterskleroze
0,314	0,049	Inhibitor kinaze fokalne adhezije
0,321	0,065	Inhibitor kinaze fokalne adhezije 2

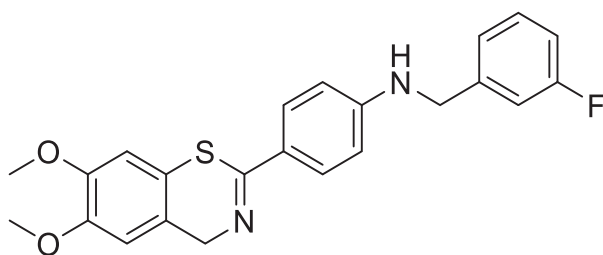


**Slika 29.** Struktura *N*-(3-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**10**).

**Tablica 15.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti *N*-(3-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**10**).

0,502	0,029	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,574	0,142	<b>Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)</b>
0,445	0,049	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,456	0,065	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,366	0,029	Tretman prionskih bolesti
0,331	0,015	Agonist aril ugljikovodičnih receptora

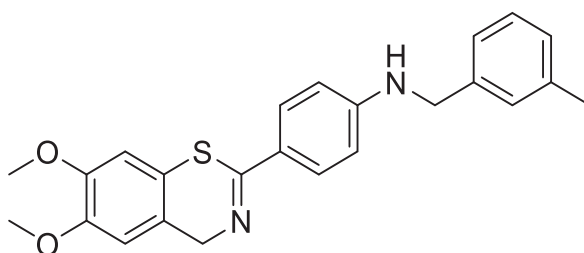




**Slika 30.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-fluorbenzil)anilina (**11**).

**Tablica 16.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-fluorbenzil)anilina (**11**).

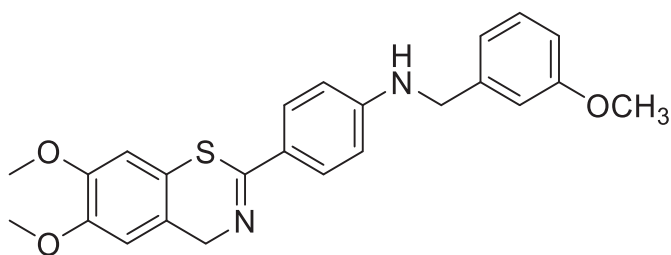
0,495	0,032	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,460	0,058	Antiartritički
0,354	0,060	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,355	0,073	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,334	0,061	Tretman ateroskleroze
0,325	0,062	Inhibitor kinaze fokalne adhezije



**Slika 31.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-metilbenzil)anilina (**12**).

**Tablica 17.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4H-benzo[1,3]tiazin-2-il)-N-(3-metilbenzil)anilina (**12**).

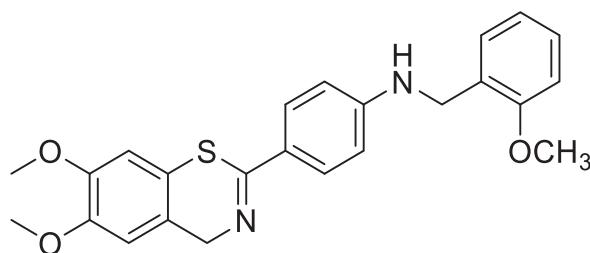
0,593	0,026	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,475	0,038	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,397	0,055	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,360	0,033	Tretman prionskih bolesti
0,348	0,046	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3
0,343	0,064	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,305	0,029	Tretman makularne degeneracije vezane uz dob
0,333	0,057	Inhibitor kinaze fokalne adhezije



**Slika 32.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(3-metoksibenzil) anilina (**13**).

**Tablica 18.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(3-metoksibenzil) anilina (**13**).

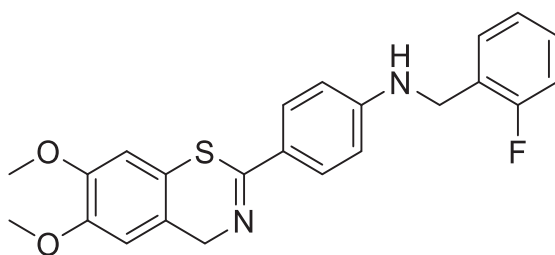
0,539	0,038	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,571	0,143	<b>Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)</b>
0,438	0,052	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,381	0,021	Tretman prionskih bolesti
0,399	0,054	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,352	0,047	Inhibitor kinaze fokalne adhezije
0,349	0,046	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3



**Slika 33.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2il)-*N*-(2-metoksibenzil)anilina (**8**).

**Tablica 19.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2il)-*N*-(2-metoksibenzil)anilina (**8**).

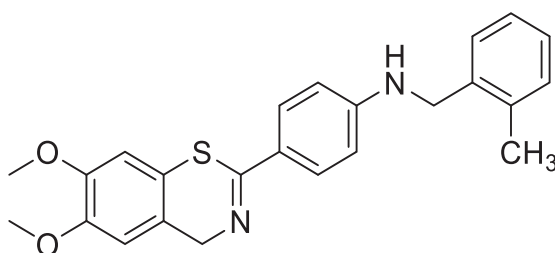
0,466	0,062	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,429	0,056	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,415	0,049	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,525	0,180	Inhibitor glukonat 2-dehidrogenaze (akceptor)
0,372	0,039	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3
0,361	0,032	Tretman prionskih bolesti
0,360	0,042	Inhibitor kinaze fokalne adhezije
0,369	0,054	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT



**Slika 34.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-fluorbenzil)anilina (5).

**Tablica 20.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-fluorbenzil)anilina (5).

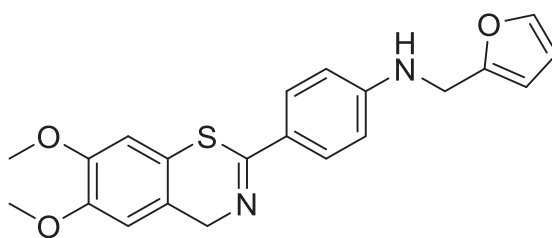
0,471	0,039	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,471	0,055	Antiartritički
0,370	0,066	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,346	0,075	Analgetik, ne-opoidni
0,329	0,063	Tretman ateroskleroze



**Slika 35.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-metilbenzil)anilina (7).

**Tablica 21.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(2-metilbenzil)anilina (7).

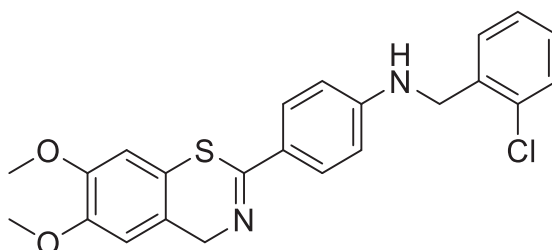
0,575	0,030	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,444	0,050	<b>Inhibitor faktora rasta receptora kinaze izvedenog iz trombocita</b>
0,412	0,050	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,380	0,026	Inhibitor CYP2C9 gena
0,336	0,055	Tretman prionskih bolesti



**Slika 36.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(furan-2-ilmetil)anilina (**6**).

**Tablica 22.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(furan-2-ilmetil)anilina (**6**).

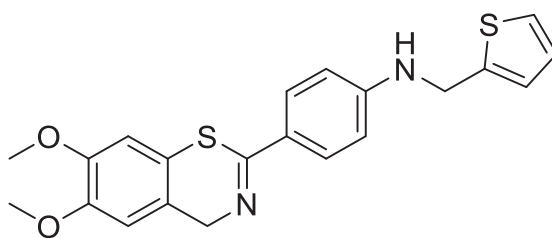
0,806	0,005	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena
0,640	0,018	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,491	0,019	<b>Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3</b>
0,450	0,007	Antagonist prekursora proteina amiloid-beta
0,429	0,008	Agonist aril ugljikovodičnih receptora
0,448	0,033	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT
0,416	0,012	Mcl-1 antagonist
0,415	0,021	Diuretik Henleove petlje
0,379	0,006	Antagonist oreksinskog receptora 1
0,399	0,028	Inhibitor kinaze fokalne adhezije



**Slika 37.** Struktura *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**4**).

**Tablica 23.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti *N*-(2-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**4**).

0,592	0,026	<b>Inhibitor inzulizina</b>
0,497	0,030	Pojačivač ekspresije HMGCS2 gena

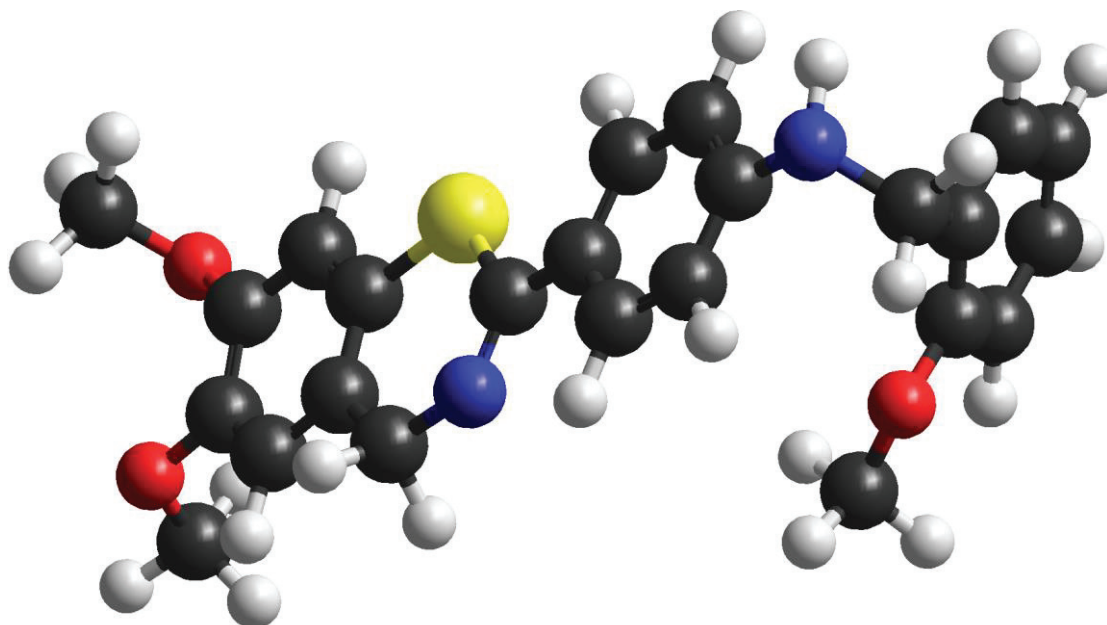


**Slika 38.** Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-ilmetil)anilina (**9**).

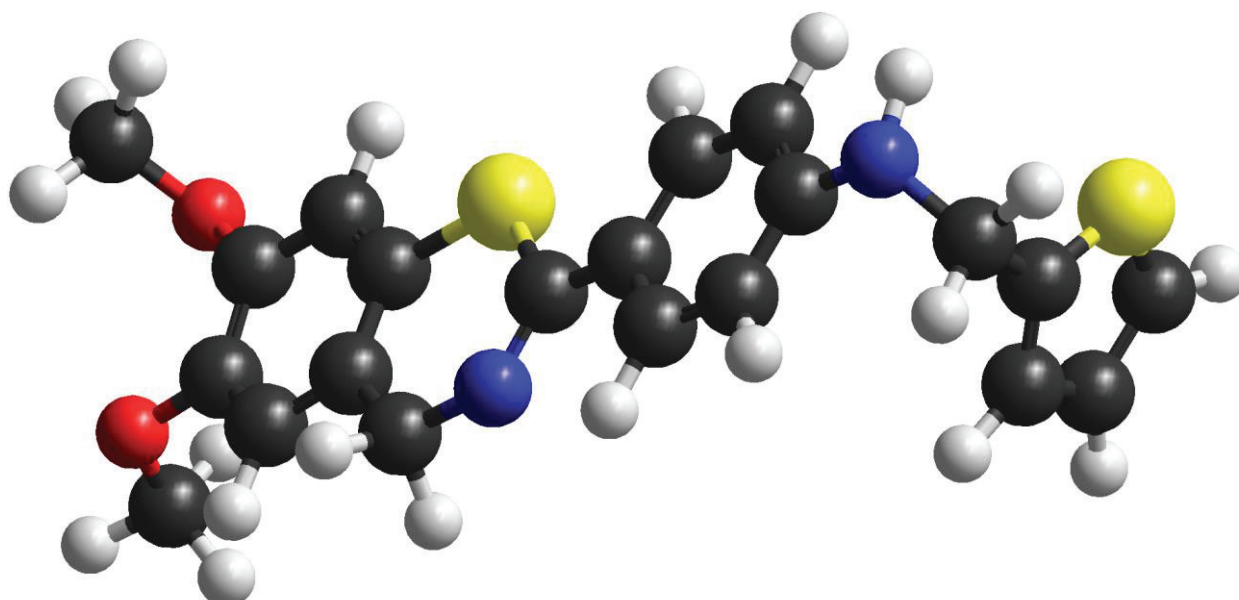
**Tablica 24.** *In silico* predviđanje biološke aktivnosti 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-ilmetil)anilina (**9**).

0,526	0,061	<b>Inhibitor komplementnog faktora D</b>
0,389	0,006	Antagonist oreksinskog receptora 1
0,440	0,065	Antiartritički
0,395	0,034	Inhibitor transkripcijskog faktora STAT3

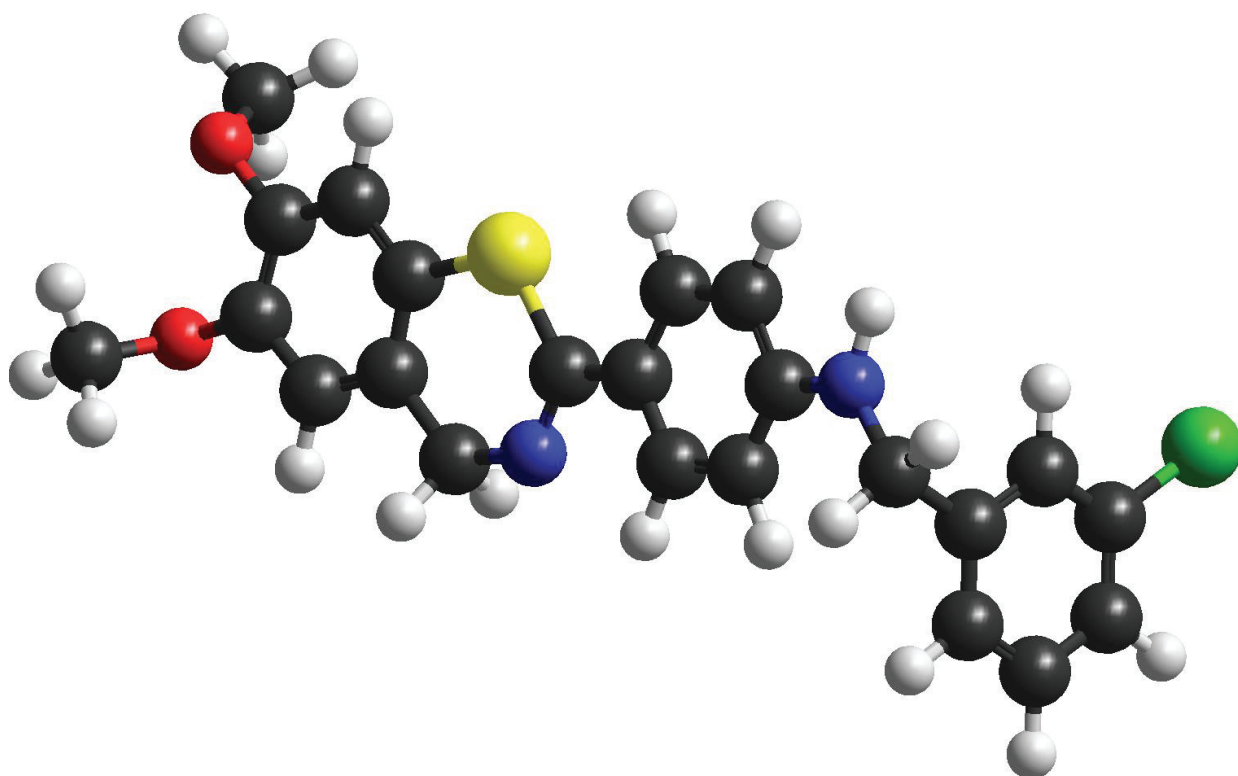
## 7.2. Određivanje logaritamske vrijednosti particijskog koeficijenta odabranih amino-1,3-benzotiazina teorijskim proračunom



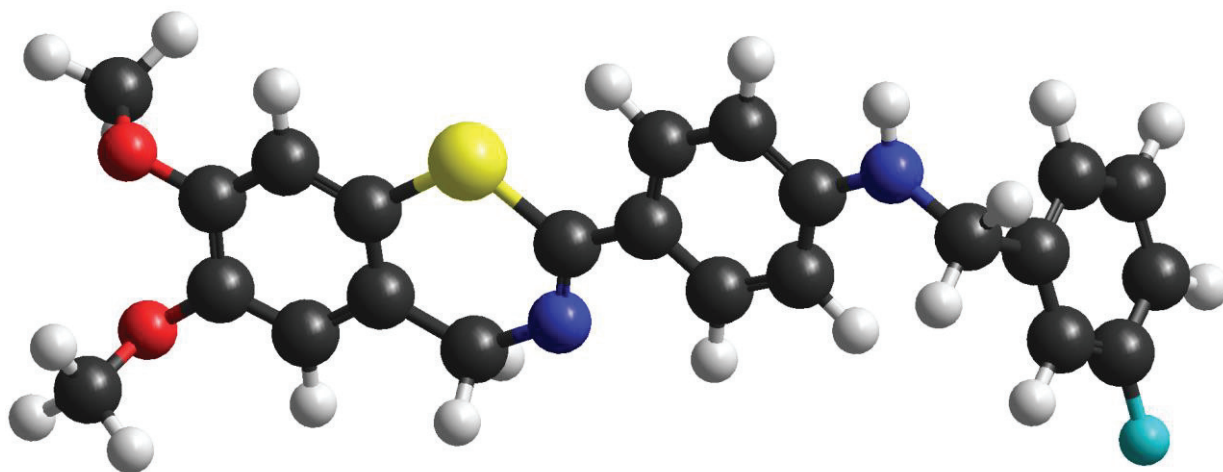
*Slika 39.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metoksibenzil)anilina (17) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,59$ .



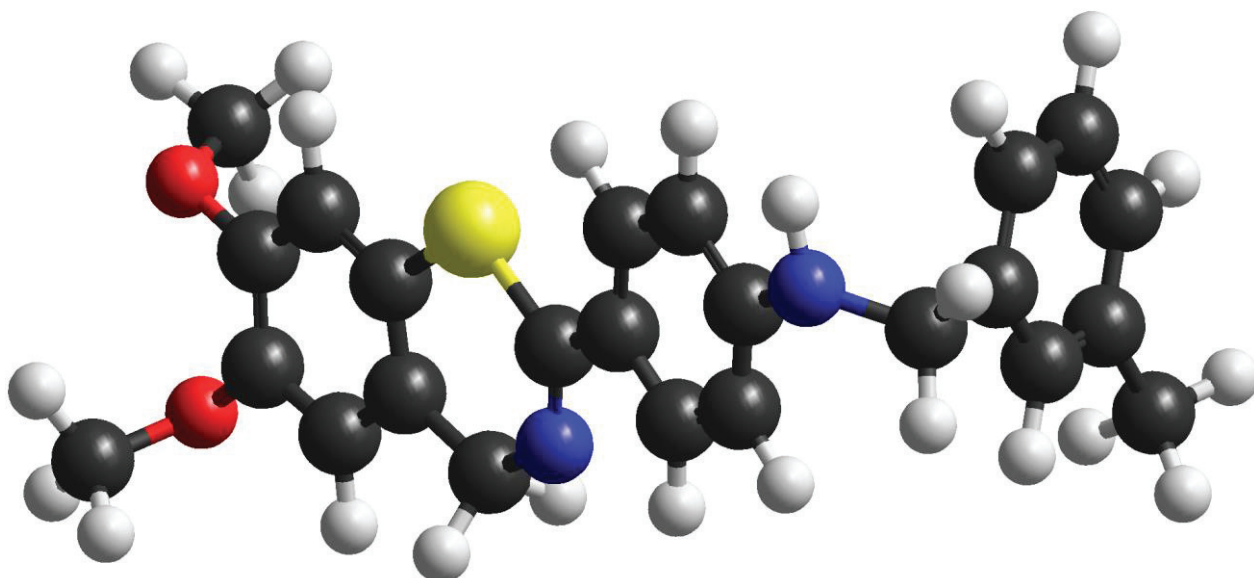
*Slika 40.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[*e*][1,3]tiazin-2-il)-*N*-(tiofen-2-ilmetil)anilina (9) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,99$ .



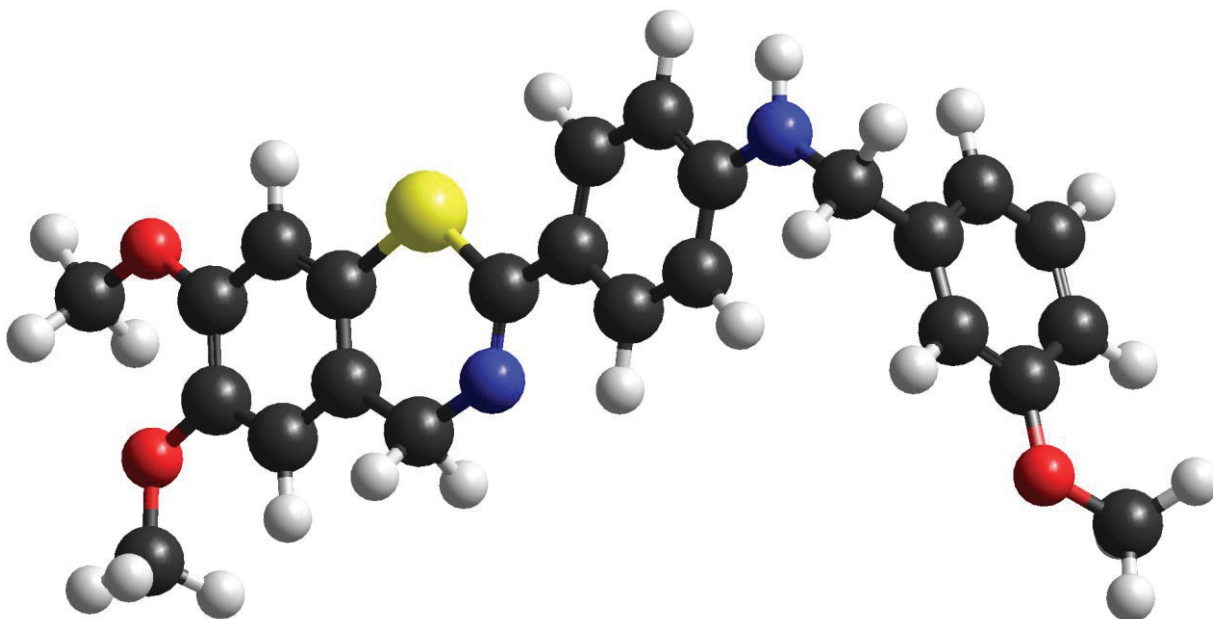
*Slika 41.* Struktura *N*-(3-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**10**) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,82$ .



*Slika 42.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(3-fluorbenzil)anilina (**11**) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,20$ .

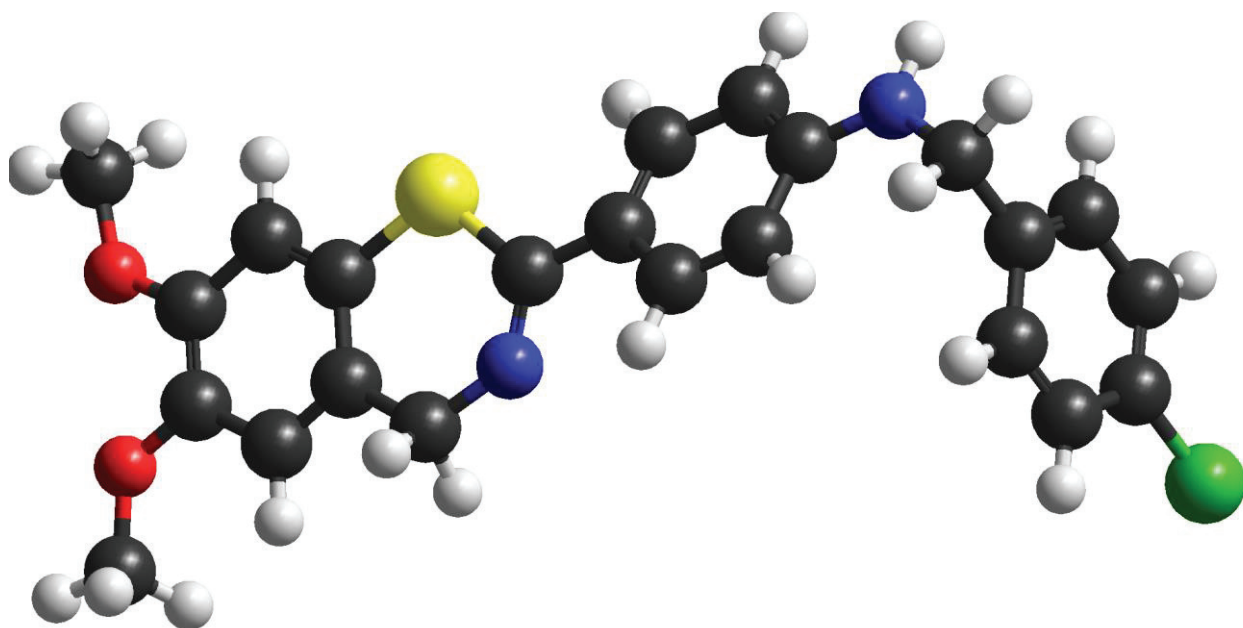


*Slika 43.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(3-metilbenzil)anilina (12) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,45$ .

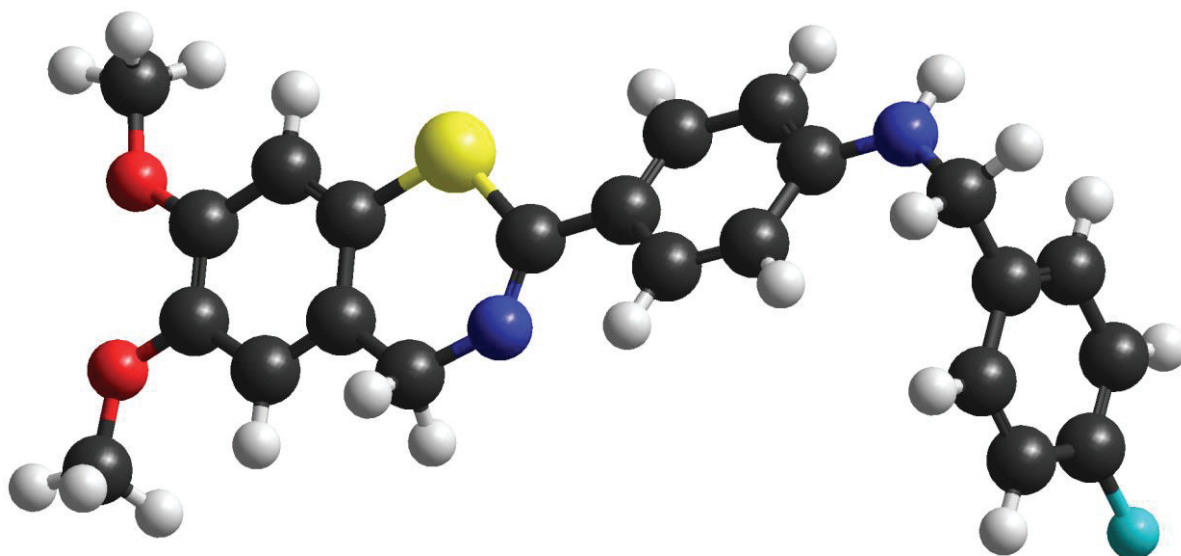


*Slika 44.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(3-metoksibenzil)anilina (13) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,59$ .

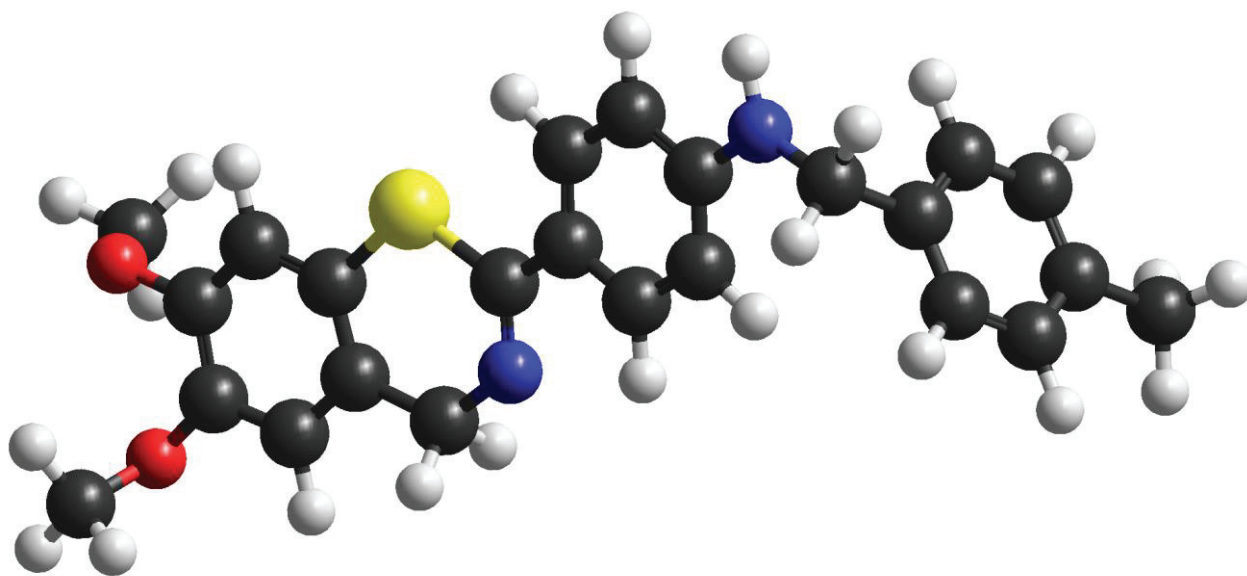




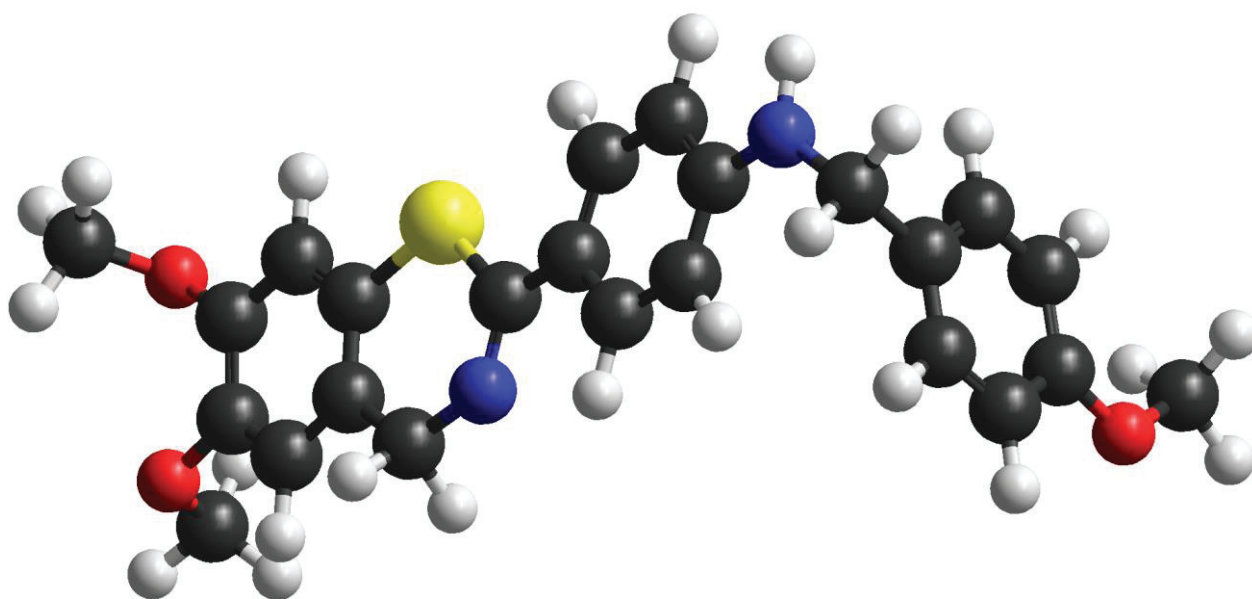
*Slika 45.* Struktura *N*-(4-klorbenzil)-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (14) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,82$ .



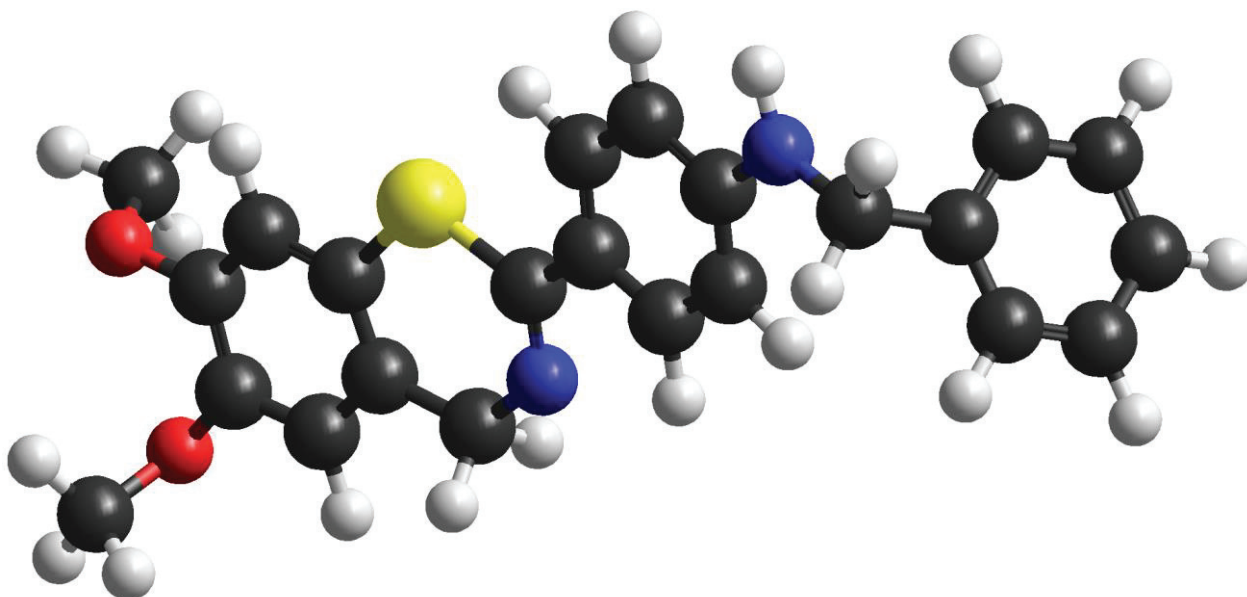
*Slika 46.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-fluorbenzil)anilina (15) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,20$ .



*Slika 47.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metilbenzil)anilina (**16**)s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,45$ .



*Slika 48.* Struktura 4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)-*N*-(4-metoksibenzil)anilina (**17**)s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -1,59$ .



*Slika 49.* Struktura *N*-benzil-4-(6,7-dimetoksi-4*H*-benzo[1,3]tiazin-2-il)anilina (**18**) s pripadajućom vrijednosti  $\log P = -0,60$ .