JARC

علمی-پژوهشی

سنتز ترکیب‌های دی‌هیدروپیرانوکربونیتریل بر پایه کوجیک اسید متصل به حلقه ۳،۲،۱-تری آزول با روش شیمی کلیک و ارزیابی آن‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز

زهرا نجفی[۱و*]، سهیلا اسمعیلی[۲]، سعید بابایی[۲]، بهنام خالصه[۳]، غلامعباس چهاردولی[٤]، مهدی خوشنویس‌زاده[٥و*] و تهمینه اکبرزاده[٦]

۱. استادیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲. دانشجوی دکتری شیمی آلی، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۳. دانشجوی دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۴. دانشیار شیمی آلی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۵. دانشیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۶. استاد شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

دریافت: دی ۱۴۰۱ بازنگری: بهمن ۱۴۰۱ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

10.30495/JACR.2023.1976876.2080 20.1001.1.17359937.1401.16.4.5.3

چکیده

در این پژوهش، سنتز ترکیب‌های دی‌هیدروپیرانوکربونیتریل بر پایه کوجیک اسید متصل به حلقه ۳،۲،۱- تری‌آزول با روش شیمی کلیک و ارزیابی آن‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز انجام شد. حلقه‌زایی تری‌آزول در ترکیب‌های هدف با روش کلاسیک شارپلس و درحضور کاتالیست مس انجام شد. ترکیب‌ها شامل سه گروه مشتق‌های کوجیک اسید دارای حلقه ۳،۲،۱-تری‌آزول بودند که برمبنای ۴-هیدروکسی‌بنزآلدهید، ۳-هیدروکسی‌بنزآلدهید و ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی‌بنزآلدهید (وانیلین) سنتز شدند. ارزیابی برون‌تنی اثر مهارکنندگی آنزیم تیروزیناز همه ترکیب‌ها انجام شد. اکثر ترکیب‌ها قدرت مهاری متوسط را از خود نشان دادند و در نهایت نتیجه‌ها به‌صورت درصد مهار گزارش شدند. از میان آن‌ها، ترکیب‌های **8d** ، **8f**، و **8n** بهترین درصد فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز با درصدهای به ترتیب ۲/۸۸ ± ۴۰/۱۲، ۳/۰۵ ± ۴۵/۵۳، و ۲/۰۵ ± ۴۲/۵۲ را نسبت به کوجیک اسید به‌عنوان شاهد استاندارد (۲/۱۱ µM ± ۱۹/۶۹) نشان دادند. مطالعه‌های داکینگ نشان داد که ترکیب‌ها با آمینو اسیدهای اطراف مکان فعال آنزیم تیروزیناز برهم‌کنش دارند. همچنین، بررسی ویژگی‌های دارونمایی و جنبش‌شناسی دارویی برای ترکیب‌های منتخب، محاسبه شد و در گستره قابل‌قبول قرار گرفتند.

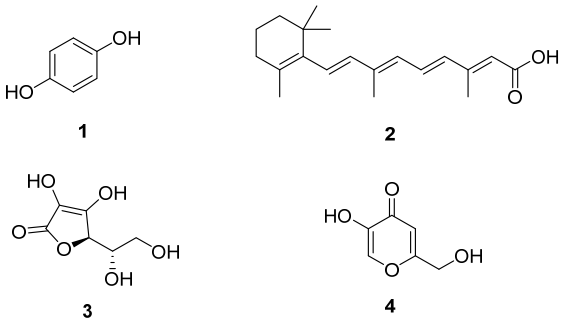
واژه‌های کلیدی: مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز، کوجیک اسید، حلقه ۳،۲،۱-تری‌آزول، حلقه‌زایی، داکینگ مولکولی.

* **عهده‌دار مکاتبات:** khoshnevim@sums.ac.ir

z.najafi@umsha.ac.ir

مقدمه

حلقه‌زایی آزید-آلکین هیوسگن[1] درحضور کاتالیست مس منجر به ایجاد حلقه ۱،۲،۳-تری‌آزول می‌شود که با نام شیمی کلیک[2] معروف است و برای نخستین بار توسط دانشمندی به‌نام شارپلس[3] ارائه شد [۱]. این روش، روشی پرکاربرد، قابل اعتماد و ساده برای ایجاد پیوندهای کووالانسی بین بلوک‌های ساختمانی حاوی گروه‌های عملکردی متفاوت است که در سنتز آلی، شیمی دارویی، شیمی سطح، بسپار، و زیست‌مزدوج‌کردن بسیار پرکاربرد است. شیمی کلیک رویکرد جدیدی برای سنتز مولکول‌های دارویی است و ترکیب‌های بسیاری با کمک روش شیمی کلیک به‌عنوان داروهای پادسرطان، پادقارچ، پادباکتری، پادآلزایمر، پادتیروزیناز و غیره کشف شده است [۲ و ۳]. ملانوژنز فرایندی است که زیست‌سنتز ملانین در آن رخ می‌دهد و آنزیم تیروزیناز در این فرایند نقش اساسی دارد، ولی تغییر در فعالیت آنزیم ممکن است موجب اختلالات در تولید رنگدانه شود. نوع و مقدار ملانین سنتزشده با ملانوسیت‌ها و مقدار انتشار آن‌ها در اطراف کراتینوسیت‌ها، رنگ واقعی پوست را تعیین می‌کند [۴ و ۵]. تایروزنایز آنزیمی با نقشی کلیدی در مسیر بیوسنتز ملانین است که حاوی دو اتم مس است که اکسایش فنل‌هایی مانند تایروزین و دوپامین را با استفاده از اکسیژن انجام می‌دهد. آنزیم در پیش‌ساز[4] L-تایروزین یا دوپا به‌طور چشمگیری اختصاصی عمل می‌کند که منجر به تولید ملانین یا رنگدانه پوست می‌شود [۶ و ۷]. تولید بیش از اندازه یا هایپرپیگمانتاسیون، ملانین موجب اختلال‌های پوستی متفاوتی مانند کک، لک‌های سالمندی، لک‌های بارداری، ملاسما و اسکارهای پیگمانته ناشی از آکنه می‌شود [۸ و ۹]. افزون‌براین، هیپرپیگمانتاسیون ناشی از افزایش فعالیت تیروزیناز از نشانه‌های ظاهری ملانوم است که یکی از انواع کشنده‌ترین سرطان است [۱۰ و ۱۱]. بسیاری از مهارکننده‌های تیروزیناز مانند هیدروکینون (۱)، ترتینوئین (۲)، ال اسکوربیک اسید (۳)، و کوجیک اسید (۴) به عنوان عامل‌های روشن‌کننده پوست در بازار موجود هستند (شکل ۱) [۱۲].



شکل ۱ نمونه‌هایی از مهارکننده‌های قوی تیروزیناز

یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های طبیعی شناخته شده تیروزیناز، کوجیک اسید است که یک متابولیت قارچی تولیدشده با تعدادی از گونه‌های متفاوت *آسپرژیلوس*[5] و *پنیسیلیوم*[6] است [۱۳] و از راه کی‌لیت‌شدن با مس در جایگاه فعال، می‌تواند آنزیم را مهارکند. این ترکیب در حال حاضر به‌عنوان عامل سفیدکننده پوست در صنایع آرایشی و به‌عنوان افزودنی در صنایع غذایی برای جلوگیری از تغییر رنگ استفاده می‌شود که اثر مهاری رقابتی بر فعالیت مونوفنولازی و اثر مهاری ترکیبی بر فعالیت دی‌فنولازی آنزیم تیروزیناز قارچی دارد. هر کدام از این ترکیب‌ها دارای مزایا و معایبی هستند. برای مثال، هیدروکینون یک مهارکننده خوب است، ولی موجب قرمزی، سوزش و خارش پوست می‌شود و سمی و جهش‌زا نیز هستند [۱۴ تا ۱۶]. برپایه داربست کوجیک اسید و در ادامه برنامه پژوهشی خود [۱۷ و ۱۸] برای توسعه بیشتر، ترکیب‌های دی‌هیدروپیرانو – [۲،۳*b*]-۳-کربونیتریل بر پایه کوجیک اسید دارای حلقه

1. Azide-alkyne Huisgen cycloaddition
2. Click chemistry
3. Sharpless
4. Substrate
5. Aspergillus
6. Penicillium

۳،۲،۱-تری‌آزول به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز ارزیابی شدند.

بخش تجربی

دستگاه‌ها

نقاط ذوب ترکیب‌های سنتزشده با دستگاه Stuart melting point apparatus SMP3 اندازه‌گیری شد. طیف‌های ^{1}H-NMR[1] و ^{13}C-NMR ترکیب‌ها با دستگاه مدل Bruker 400 MHz ثبت و جابه‌جایی‌های شیمیایی (δ) آن‌ها به‌صورت ppm گزارش شدند. ثابت‌های جفت‌شدگی (J) به‌صورت Hz و جفت‌شدن پروتون‌ها به‌صورت یکتایی Singlet (s)، دوتایی Doublet (d)، سه‌تایی Triplet (t) و Multipletچندتایی (m) گزارش شده‌اند. تجزیه عنصری نمونه‌ها با دستگاه Elementar Analysensystem GmbH VarioEL CHNS انجام شد. طیف‌های فروسرخ تبدیل فوریه ترکیب‌ها با دستگاه مدل Bruker ALPHA FTIR spectrometer ثبت شدند.

روش کلی برای سنتز آلدهیدهای پروپارژیله 3a-c

مقدار ۱ میلی‌مول هیدروکسی بنزآلدهید یا وانیلین **1a-c**، ۱٫۵ میلی‌مول نمک پتاسیم‌کربنات، ۱٫۵ میلی‌مول پروپارژیل برماید و ۵ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌فرمامید (DMF) در یک بالون ۲۵ میلی‌لیتری ریخته و هم‌زده شد. پس از یک شبانه‌روز پیشرفت واکنش با سوانگاری لایه نازک ارزیابی شد. پس از اطمینان از تشکیل فراورده به مخلوط واکنش مقداری یخ افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه هم‌زده شد. پس از تشکیل رسوب، مخلوط واکنش صاف و با آب مقطر شسته شد. در نهایت ترکیب‌های **3a-c** با بازده بالای ۸۰ درصد بدون خالص‌سازی بیشتر، برای مرحله بعد استفاده شد [۱۹].

روش کلی برای سنتز مشتق‌های ۲-آمینو-۶-(هیدروکسی متیل)-۸-اکسو-۴-فنیل- ۴، ۸-دی‌هیدروپیرانو[۳ , ۲-b] پیران-۳-کربونیتریل 6a-c

در یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری، مخلوطی از آلدهید پروپارژیله **3a-c** (۱ میلی‌مول)، مالونونیتریل ۵ (۱٫۲ میلی‌مول)، و کوجیک اسید (۱ میلی‌مول) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول درحضور سه قطره تری‌اتانول آمین به‌عنوان کاتالیست به مدت ۲۴ ساعت بازروانی شد. پس از تکمیل واکنش (بررسی با سوانگاری لایه نازک) و کاهش دمای واکنش به دمای اتاق، ترکیب‌های **6a-c** با بازده بالای ۷۰ درصد به‌صورت رسوب به‌دست آمد و با کمک کاغذ صافی از محیط جدا و بدون خالص‌سازی بیشتر برای مرحله بعد استفاده شد [۲۰].

روش کلی برای سنتز مشتق‌های کوجیک اسید دارای حلقه ۳،۲،۱- تری‌آزول

مخلوط بنزیل هالیدهای متفاوت **7a-e** (۱٫۵ میلی‌مول) و سدیم آزید (۱٫۵ میلی‌مول) در حلال متانول در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت هم‌زده شد. سپس به آن ترکیب‌های **7a-c** (۱ میلی‌مول) درحضور آسکوربیک اسید و سولفات مس (II) به‌عنوان کاتالیست افزوده شد و در دمای اتاق هم‌زده شد. پس از تکمیل واکنش (بررسی با سوانگاری لایه نازک)، مخلوط واکنش صاف شد و فراورده نهایی**8a-o** با کمک سوانگاری صفحه‌ایی جداسازی و خالص شد [۱۷و ۲۱].

1. Nuclear Magnetic Resonance

3-Amino-4-(4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-b]pyran-2-carbonitrile (8a)
Yellow solid; m.p. = 183-185 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3425, 2924, 2193, 1641, 1509, 1410; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6), δ_{ppm}: δ 8.32 (s, 1H), 7.44 – 7.33 (m, 7H), 7.27 (s, 2H), 7.04 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.79 (s, 1H), 4.27 – 4.13 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6), δ_{ppm}: 162.6, 157.7, 150.9, 144.4, 131.4, 131.0, 127.7, 127.2, 125.2, 125.0, 120.7, 119.4, 116.0, 115.8, 115.7, 105.7, 59.7, 56.9, 55.1, 39.8; Anal. calcd. for $C_{26}H_{21}N_5O_5$, C: 64.59, H: 4.38, N: 14.49, and found, C: 64.51, H: 4.42, N: 14.52.

2-Amino-4-(4-((1-(4-chlorobnzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-b]pyran-3-carbonitrile (8b)
Yellow solid; m.p.= 174-176 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3229, 2193, 1644, 1509, 1409; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: δ 8.29 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (s, 2H), 7.19 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 5.61 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.72 (s, 1H), 4.24 – 4.08 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 170.1, 168.8, 159.7, 158.2, 149.8, 143.4, 138.1, 136.7, 133.7, 133.5, 129.8, 129.4, 128.6, 125.1, 119.9, 115.5, 111.9, 61.6, 56.4, 53.2, 40.7; Anal. calcd. for $C_{26}H_{20}ClN_5O_5$, C: 60.30, H: 3.89, N: 13.52, and found, C: 60.19, H: 3.80, N: 13.24.

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(4-((1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8c)
Brown solid; m.p= 178-180 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3318, 2920, 2193, 1645, 1509; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: δ 8.26 (s, 1H), 7.28 – 7.14 (m, 8H), 7.03 – 7.05 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.24 – 4.10 (m, 2H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.6, 168.2, 159.1, 157.6, 149.2, 142.8, 137.5, 136.1, 133.2, 132.9, 131.6, 129.2, 128.8, 128.0, 124.5, 119.3, 115.0, 111.3, 61.1, 59.1, 55.9, 52.6, 38.0, 20.7; Anal. calcd. for $C_{27}H_{23}N_5O_5$, C: 65.18, H: 4.66, N: 14.08, and found, C: 65.19, H: 4.70, N: 14.04.

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(4-((1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8d)
Brown solid; m.p= 131-133 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3429, 2926, 2197, 1640, 1511, 1385; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: δ 8.25 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.10-415 (m, 2H), 3.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.6, 168.2, 159.1, 157.6, 149.2, 136.1, 133.9, 133.2, 129.6, 128.8, 127.9, 124.4, 119.3, 114.9, 114.3, 114.1, 113.4, 111.3, 61.1, 59.0, 55.1, 45.5, 41.3; Anal. calcd. for $C_{27}H_{23}N_5O_6$, C: 63.15, H: 4.51, N: 13.64, and found, C: 63.19, H: 4.45, N: 13.58.

2-Amino-4-(4-((1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8e)
Brown solid; m.p= 163-165 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3416, 2207, 1605, 1510, 1228; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.30 (s, 1H), 7.42 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 7.22 – 7.19 (m, 5H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 5.61 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.17 – 4.11 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 170.1, 168.7, 159.8, 149.6, 147.6, 143.4, 136.7, 135.5, 134.2, 132.8, 130.9, 130.8, 125.3, 124.7, 120.1, 116.7, 116.4, 116.2, 116.0, 114.1, 111.8, 62.1, 59.6, 56.0, 46.2; Anal. calcd. for $C_{26}H_{20}FN_5O_5$, C: 62.27, H: 4.02, N: 13.97, and found, C: 62.22, H: 4.10, N: 13.98.

2-Amino-4-(3-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8f)

Yellow solid; m.p= 139-141 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3320, 2194, 1643, 1639, 1097; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.32 (s, 1H), 7.44 – 7.33 (m, 7H), 7.27 (s, 2H), 7.04 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.79 (s, 1H), 4.27 – 4.13 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 163.6, 162.2, 157.7, 150.8, 144.1, 135.0, 131.4, 131.3, 131.2, 130.1, 128.5, 127.7, 127.1, 124.3, 120.6, 119.5, 117.4, 116.1, 115.9, 105.7, 61.6, 58.0, 55.1, 39.9; Anal. calcd. for $C_{26}H_{21}N_5O_5$, C: 64.59, H: 4.38, N: 14.49, and found, C: 64.42, H: 4.40, N: 14.55.

2-Amino-4-(3-((1-(4-chlorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8g)

Brown solid; m.p= 183-185 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3430, 2925, 2193, 1641, 1601, 1508, 1408, 1256; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.32 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.02 (d, J = 7.9, Hz, 1H), 6.92 – 6.90 (m, 1H), 6.87 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.24 – 4.12 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 162.9, 162.1, 142.3, 134.9, 131.8, 131.5, 129.9, 129.6, 129.4, 128.8, 128.7, 128.7, 125.0, 122.0, 115.2, 114.7, 98.3, 61.4, 56.1, 52.0, 40.1; Anal. calcd. for $C_{26}H_{20}ClN_5O_5$, C: 60.30, H: 3.89, Cl: 6.84, N: 13.52, and found, C: 60.30, H: 3.40, N: 13.56.□

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(3-((1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8h)

Brown solid; m.p= 135-137 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3313, 2927, 2193, 1643, 1442, 1261, 1021; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.26 (s, 1H), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.28 – 7.21 (m, 4H), 7.18 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 7.02 (dd, J = 8.2, 2.6 Hz, 1H), 6.91 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 6.89 – 6.84 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.76 (s, 1H), 4.25 – 4.10 (m, 2H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.5, 168.2, 166.9, 162.3, 159.2, 158.3, 148.8, 142.8, 142.4, 137.5, 136.4, 132.9, 131.6, 130.1, 129.3, 128.6, 128.0, 124.5, 120.1, 119.2, 114.5, 113.6, 111.4, 61.1, 59.1, 52.6, 40.2, 20.7; Anal. calcd. for $C_{27}H_{23}N_5O_5$, C: 65.18, H: 4.66, N: 14.08, and found, C: 65.21, H: 4.70, N: 14.08.

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(3-((1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8i)

Brown solid; m.p= 143-145 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3425, 2928, 2193, 1642, 1513, 1252, 1139; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.23 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 4.0 Hz, 3H), 7.14 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.12-4.26 (m, 2H), 3.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.6, 168.1, 159.2, 159.1, 149.1, 149.0, 147.1, 142.8, 136.1, 133.6, 129.6, 127.9, 124.4, 119.6, 119.3, 115.7, 115.5, 114.1, 113.6, 111.5, 111.3, 61.6, 59.1, 55.1, 52.3, 39.8; Anal. calcd. for $C_{27}H_{23}N_5O_6$, C: 63.15, H: 4.51, N: 13.64, and found, C: 63.15, H: 4.49, N: 13.55.□

2-Amino-4-(3-((1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8j)

Yellow solid; m.p= 151-153 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3387, 2938, 2192, 1641, 1511, 1420, 1223; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.30 (s, 1H), 7.62–7.56 (m, 1H), 7.42 (dd, J = 8.3, 5.8 Hz, 2H), 7.24 – 7.19 (m, 3H), 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.81 – 6.75 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.75 (s, 1H), 4.13-4.26 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.6, 168.1, 159.2, 149.1, 147.0, 142.9, 136.1, 135.0, 133.6, 132.2, 130.4, 130.3, 124.7, 119.6, 115.9, 115.7, 115.5,

113.6, 111.3, 61.6, 59.1, 55.4, 45.6; Anal. calcd. for $C_{26}H_{20}FN_5O_5$, C: 62.27, H: 4.02, N: 13.97, and found, C: 62.14, H: 3.99, N: 13.98.□

2-Amino-4-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxyphenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8k)

Yellow solid; m.p= 159-161 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3400, 2925, 2193, 1644, 1509, 1409, 1210; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.28 (s, 1H), 7.41–7.36 (m, 5H), 7.21 (s, 2H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.13-415 (m, 2H), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 160.5, 159.0, 151.0, 148.6, 146.3, 138.3, 137.7, 137.5, 133.2, 131.1, 130.7, 128.1, 127.8, 127.0, 126.7, 121.9, 121.7, 119.0, 115.3, 113.7, 112.0, 111.7, 109.7, 61.7, 57.7, 55.4, 52.0, 36.1, Anal. calcd. for $C_{27}H_{23}N_5O_6$, C: 63.15, H: 4.51, N: 13.64, and found, C: 63.16, H: 4.46, N: 13.66.□

□

2-Amino-4-(4-((1-(4-chlorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxyphenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8l)

Brown solid; m.p = 190-192 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3430, 2927, 2193, 1642, 1512, 1092; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.29 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.21 (s, 2H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.75 (s, 1H), 4.13-4.25 (m, 2H), 3.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 168.5, 167.2, 162.1, 159.6, 158.2, 157.3, 147.8, 141.9, 141.4, 135.4, 131.2, 129.3, 129.3, 129.1, 123.6, 119.2, 118.2, 114.7, 114.5, 113.5, 112.6, 110.4, 60.1, 58.1, 54.5, 51.0, 44.7; Anal. calcd. for $C_{27}H_{22}ClN_5O_6$, C: 59.18, H: 4.05, N: 12.78, and found, C: 59.20, H: 4.01, N: 12.70.

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(3-methoxy-4-((1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8m)

Brown solid; m.p= 165-167 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3405, 2189, 1642, 1512, 1420, 1215; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.24 (s, 1H), 7.19-7.25 (m, 6H), 7.18 – 7.10 (m, 2H), 6.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 4.21 – 4.08 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.6, 168.2, 159.2, 149.1, 149.0, 147.0, 142.8, 137.5, 136.1, 133.6, 133.0, 129.3, 128.0, 124.6, 119.6, 119.3, 113.6, 111.5, 111.3, 61.6, 59.1, 55.4, 52.6, 39.8, 20.7; Anal. calcd. for $C_{28}H_{25}N_5O_6$, C: 63.75, H: 4.78, N: 13.28, and found, C: 63.72, H: 4.78, N: 13.32.

2-Amino-6-(hydroxymethyl)-4-(3-methoxy-4-((1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8n)

Brown solid; m.p= 163-165 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3430, 2924, 2193, 1641, 1514; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.26 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.24 (s, 2H), 7.01 (d, J = 8.0, Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.92–6.89 (m, 1H), 6.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.72 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.76 (s, 1H), 4.18 (qd, J = 15.9, 5.9 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.60 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.5, 168.2, 159.2, 159.1, 158.3, 148.8, 142.4, 136.4, 130.1, 129.6, 127.9, 124.3, 120.1, 119.2, 114.5, 114.1, 113.6, 111.4, 69.7, 61.1, 59.1, 55.1, 52.4, 40.2; Anal. calcd. for $C_{28}H_{25}N_5O_7$, C: 61.87, H: 4.64, N: 12.89, and found, C: 61.85; H: 4.64; N: 12.67.

2-Amino-4-(4-((1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxyphenyl)-6-(hydroxymethyl)-8-oxo-4,8-dihydropyrano[3,2-*b*]pyran-3-carbonitrile (8o)

Brown solid; m.p= 181-183 °C; FTIR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3441, 2193, 1637, 1510, 1223; ^{1}H NMR (400

MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 8.26 (s, 1H), 7.44 – 7.40 (m, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 2H), 7.14 (s, 2H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.59 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.71 (s, 1H), 4.09-4.21 (m, 2H), 3.69 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{ppm}: 169.5, 168.2, 163.1, 160.6, 159.2, 158.3, 148.8, 142.9, 142.4, 136.4, 132.2, 130.3, 130.3, 130.1, 124.6, 120.2, 119.2, 115.7, 115.5, 114.5, 113.6, 111.4, 61.1, 59.1, 55.5, 52.0, 45.7; Anal. calcd. for $C_{27}H_{22}FN_5O_6$, C: 61.02, H: 4.17, N: 13.18, and found, C: 61.00,; H: 4.11, N: 13.15.

تعیین فعالیت مهار تیروزیناز

برای اندازه‌گیری مقدار مهار آنزیم تیروزیناز، از یک نوع قارچی آن (EC 1.14.18.1) استفاده شد. همچنین از لوودوپا[1] به‌عنوان پیش‌ساز، استفاده شد. محلول مادر ترکیب‌ها تحت بررسی **8a-o** و کوجیک اسید در DMSO با غلظت ۲۰ mM تهیه شد و با بافر فسفات با pH برابر با ۶٫۸ برای رسیدن به غلظت‌های مورد نیاز رقیق شد. در آغاز، ۱۰ میکرولیتر از ترکیب موردسنجش با ۱۴۰ میکرولیتر از بافر فسفات (۵۰ mM ، pH = ۶٫۸) در میکروپلیت ۹۶ خانه مخلوط و سپس ۱۰ میکرولیتر از تیروزیناز قارچی با غلظت ۲۷۳ U ml^{-1} افزوده شد. پس از اینکه مخلوط در ۲۸ °C به‌مدت ۲۰ دقیقه پیش گرم شد، ۲۰ میکرولیتر از محلول لوودوپا (۰٫۷ mM) به هر خانه افزوده و تشکیل دوپاکروم در طول موج جذبی ۴۹۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه دنبال شد. هر آزمون تعیین مقدار، سه بار انجام شد. از DMSO خالص به‌عنوان کنترل و کوجیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. غلظت نهایی DMSO در محلول آزمون کمتر از ۲ ٪ بود. درصد مهار با توجه به معادله ۱ محاسبه شد [۱۸].

درصد مهار =

(۱) (جذب شاهد / (جذب ترکیب – جذب شاهد)) × ۱۰۰

اثرهای مهاری هر ترکیب به‌شکل غلظت مورد نیاز جهت مهار ۵۰ ٪ فعالیت آنزیم (IC_{50}) و درصد مهار به نمایش گذاشته شد.

پیش‌بینی مجازی ویژگی‌های دارونمایی[2] و جنبش‌شناسی دارویی[3]

پیش‌بینی ویژگی‌های دارونمایی و جنبش‌شناسی دارویی مولکولی سه ترکیب منتخب با استفاده از نرم‌افزارهای آن‌لاین کامپیوتری انجام ش. در این مرحله، مقادیر MW[4]، HBA[5]، HBD[6]، LogP[7]، tPSA[8] و RBC[9] ترکیب‌های انتخاب شده با نرم‌افزار MarvinSketch و آنلاین pkCSM محاسبه شد. پیش‌بینی اثر ترکیب‌ها بر آنزیم‌های سیتوکروم P450، درصد جذب روده‌ای (HIA[10]%) و درصد پیوند به پروتئین‌های پلاسما (PPB[11]%) با نرم‌افزارهای ذکرشده برای سه ترکیبی که بهترین نتیجه‌های مهار آنزیم تیروزیناز را داشتند، انجام شد.

مطالعه‌های داکینگ مولکولی

ساختار بلورنگاری آنزیم تیروزیناز (PDB code: 2Y9X) دارای تروپولون[12] به‌عنوان لیگاند ذاتی از بانک اطلاعاتی پروتئین‌ها به‌دست آمد. مطالعه‌های داکینگ مولکولی با نرم‌افزار AutoDock 4.2 انجام شد. ساختارهای سه‌بعدی لیگاندها با نرم‌افزار ChemDraw رسم شد و سپس با کمک نرم افزار Chem3D انرژی آن بهینه‌سازی و کمینه شد. با کمک ابزار نرم‌افزار Autodock بارهای گاستایگر[13] برای لیگاند محاسبه و

1. L-DOPA
2. Drug-likness
3. Pharmacokinetic
4. Molecular weight
5. Number of H-bond acceptors
6. Number of H-bond donors
7. The octanol-water partition coefficient
8. Rotatable bond count
9. Total polar surface area
10. Human Intestinal Absorption
11. Plasma Protein Binding
12. Tropolone
13. Gasteiger charges

در نهایت فایل PDBQT لیگاند ساخته شد. برای ساخت فایل PDBQT آنزیم به‌ترتیب مولکول‌های آب، لیگاند و بخش‌های اضافی مشابه از آنزیم حذف شد. هیدروژن‌ها افزوده شدند و هیدروژن‌های ناقطبیده ادغام شده و بار کولمن با آن افزوده شد. Scoring grid box برای AutoDock در مرکز Cu-۴۰۱ قرار گرفت (x–مرکز: ۸٫۰۶۴–، y–مرکز: ۲۵٫۷۷۶–، z–مرکز: ۳۹٫۳۸۴– بود). اندازه جعبه ۶۴ × ۵۲ × ۵۰ نقطه با مقدار فاصله‌گذاری ۰٫۳۷۵ آنگستروم تنظیم شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با استفاده از تحمل ۲٫۰ مجذور میانگین ریشه (RMS[1]) بر نتیجه‌های داکینگ انجام شد و پایین‌ترین انرژی صورت‌بندی از پرجمعیت‌ترین گروه برای تجزیه انتخاب شد. تصویرپردازی گرافیکی با نرم‌افزار Discovery Studio Client (نسخه ۲۰۲۱) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

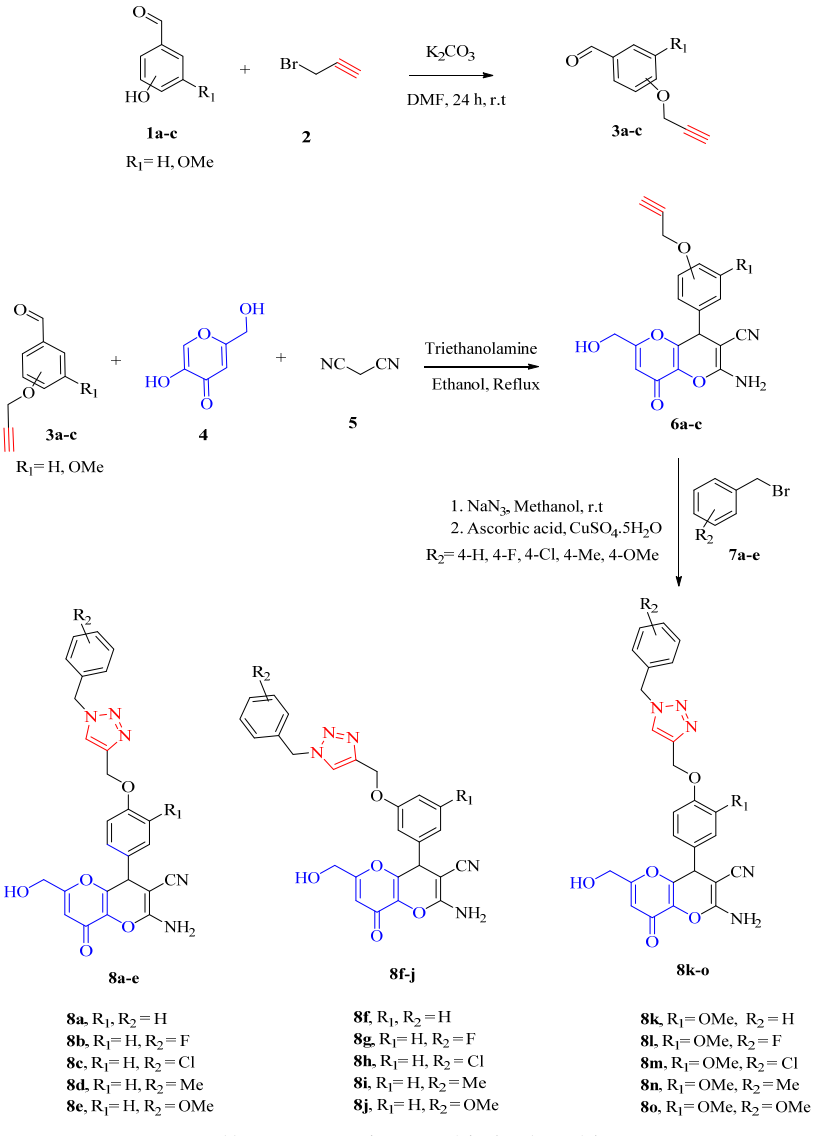
شناسایی ترکیب‌های سنتزشده با طیف‌سنجی‌های FTIR، ^{1}H-NMR و ^{13}C-NMR انجام‌شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده، برپایه قدرت مهاری (درصد مهار) خواهد بود که با آزمون طیف‌سنجی در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام شد و ترکیب دارای بیشترین‌ترین قدرت مهاری، برای بررسی ویژگی جنبش‌شناسی دارویی و چگونگی پیش‌بینی برهم‌کنش ترکیب‌ها با آنزیم تیروزیناز انتخاب شد.

نتیجه‌ها و بحث

شکل ۲ مراحل کلی سنتز این گروه از ترکیب‌ها را نشان می‌دهد. سنتز این ترکیب‌ها شامل سه مرحله است. در مرحله اول ابتدا آلدهید **۱a-c** دارای گروه هیدروکسی با پروپارژیل برمید در حلال DMF و کاتالیست K_2CO_3 به مشتق پروپارژیله **3a-c** در دمای اتاق تبدیل می‌شود. سپس مشتق‌های آمینو–۶–(هیدروکسی متیل)–۸–اکسو–۴–فنیل–۴، ۸–دی‌هیدروپیرانو [۳, ۲–b] پیران–۳–کربونیتریل (**6a-c**) با یک واکنش چند جزئی (شامل کوجیک اسید (۴)، مالونیتریل (۵) و آلدهید به‌دست‌آمده از مرحله پیشین در اتانول به همراه کاتالیست تری‌اتانول آمین و شرایط بازروانی سنتز می‌شود. در نهایت، بنزیل هالیدهای متفاوت در حضور سدیم آزید در حلال متانول به ترکیبات آزیدو تبدیل می‌شوند و در همان ظرف واکنش در حضور کاتالیست سولفات مس (II) –آسکوربیک اسید، تری‌اتیل آمین و حلال متانول وارد واکنش با حدواسط (**6a-c**) شده و ترکیب‌های نهایی **8a-o** را ایجاد می‌کند [۱۷و ۲۰].

در شکل ۳، ترکیب **8l** به‌عنوان منتخبی از ترکیب‌های (**8a–o**) نمایش داده شده است و شماره اتم‌ها برپایه سامانه آیوپاک در آن مشخص شده است.

1. Root mean square (RMS)

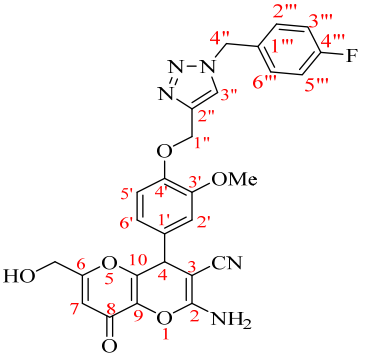


8a, $R_1, R_2 = H$
8b, $R_1 = H, R_2 = F$
8c, $R_1 = H, R_2 = Cl$
8d, $R_1 = H, R_2 = Me$
8e, $R_1 = H, R_2 = OMe$

8f, $R_1, R_2 = H$
8g, $R_1 = H, R_2 = F$
8h, $R_1 = H, R_2 = Cl$
8i, $R_1 = H, R_2 = Me$
8j, $R_1 = H, R_2 = OMe$

8k, $R_1 = OMe, R_2 = H$
8l, $R_1 = OMe, R_2 = F$
8m, $R_1 = OMe, R_2 = Cl$
8n, $R_1 = OMe, R_2 = Me$
8o, $R_1 = OMe, R_2 = OMe$

شکل ۲ طرحواره کلی سنتز ترکیب‌های موردمطالعه

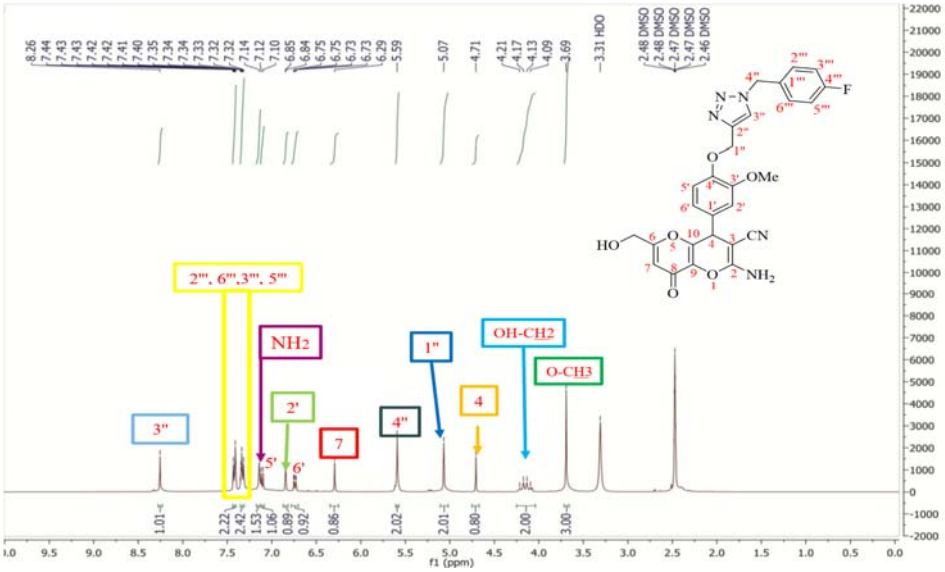


شکل ۳ ساختار شیمیایی و شماره‌گذاری ترکیب **8l**

در شکل ۴ طیف ^{1}H-NMR مربوط به ترکیب **8l** آورده شده است. همان‌طور که در این طیف مشاهده می‌شود، قله مربوط به پروتون کربن شماره "۳ بر حلقه تری‌آزول در ناحیه ۸٫۲۶ ppm پدیدار شده است. قله هیدروژن‌های حلقهِ آروماتیک فلوئورو بنزیل بر کربن‌های شماره "۶، "۲ و "۳ ، "۵ در گستره ۷٫۳۲ تا ۷٫۴۲ ppm مشاهده می‌شود و قله هیدروژن‌های حلقه آروماتیک بنزیل بر کربن‌های شماره '۵، '۲ و '۶ به ترتیب در ۷٫۱۰، ۶٫۸۵۳ و ۶٫۷۵ ppm است. همچنین قله مربوط به هیدروژن بر کربن شماره ۷، حلقه پیران در ۶٫۲۹ ppm و پیک مربوط به هیدروژن بر کربن شماره ۴، حلقه پیران در ۴٫۷۱ ppm نمایان شده است. پیک مربوط به هیدروژن بر کربن شماره "۴، در ۵٫۵۹ ppm و قله مربوط به هیدروژن بر کربن شماره "۱، در ۵٫۰۷ ppm نمایان شده است. همچنین، قله هیدروژن‌های استخلاف متوکسی حلقه آرماتیک بنزیل در ۳٫۶۹ ppm و قله هیدروژن‌های متیلن، متیلن-هیدروکسی بر کربن شماره ۶ حلقه پیران در گستره ۴٫۰۹ تا ۴٫۲۱ ppm مشخص شده است. در آخر هم قله تک‌شاخه هیدروژن‌های گروه آمین بر کربن شماره ۲ در ۷٫۱۴ ppm ظاهر شد.

ارزیابی برون‌تنی میزان مهار آنزیم تیروزیناز

با توجه به نتیجه‌های آزمون برون‌تنی مهار آنزیم تیروزیناز، بیشتر ترکیب‌ها قدرت مهاری متوسطی را از خود نشان دادند که نتیجه‌ها به‌صورت درصد مهار در جدول نمایش داده شده است. از کوجیک اسید به‌عنوان ترکیب استاندارد استفاده شده است. ترکیب‌های موردمطالعه کوجیک اسید دارای حلقه ۳،۲،۱- تری‌آزول را می‌توان به سه گروه (۱) برپایه آلدهید ۴-هیدروکسی پروپارژیله (**8a-e**)، (۲) برپایه آلدهید ۳-هیدروکسی پروپارژیله (**8f-j**) و (۳) برپایه آلدهید وانیلین پروپارژیله (**8k-o**) تقسیم کرد. باتوجه به این‌که ترکیب‌ها دارای اثرات مهاری در حد درصد مهار بودند، نمی‌توان بیان دقیقی در مورد رابطه ساختمان- اثر داشت. با این حال مشتق‌های گروه اول و سوم به‌طور کلی فعالیت مهاری مشابهی در قیاس با مشتق‌های گروه دوم از خود نشان دادند. در مشتق‌های هر دو گروه دیده می‌شود که ترکیب‌ها (**8a** و **8k**) دارای کمترین فعالیت مهاری با درصد مهار ۱۸٫۱۵ و ۳۱٫۱۲ هستند. استخلاف های الکترون‌کشنده فلوئور و کلر در موقعیت پارای بخش بنزیلی در گروه اول ترکیب‌ها (**8b** و **8c**) به‌ترتیب درصد مهاری ۲۷٫۲۳ و ۳۸٫۹۸ از خود نشان دادند و همین استخلاف در گروه سوم ترکیب‌ها (**8l** و **8m**) به ترتیب درصد مهاری ۳۷٫۵۷ و ۳۷٫۹۲ داشتند. همچنین، استخلاف‌های الکترون‌دهنده متیل و متوکسی در موقعیت پارای بخش بنزیلی در گروه اول ترکیب‌ها **8d**و **8e** به ترتیب درصد مهاری ۴۰٫۱۲ و ۳۲٫۵۱ از خود نشان دادند و همین استخلاف در گروه سوم ترکیب‌ها (**8n** و **8o**) به‌ترتیب درصد مهاری ۴۲٫۵۲ و ۳۶٫۱۳ داشتند. به‌نظر می‌رسد استخلاف‌های الکترون‌دهنده و لیپوفیل مانند متیل منجر به بهبود اثر می‌شوند. گروه دوم دارای تفاوت ساختار بیشتری با گروه اول و سوم هستند، زیرا بر پایه ۳-هیدروکسی‌بنزآلدهید ساخته شده‌اند. در این گروه ترکیب **8f** بدون هیچ استخلافی دارای بیشترین درصد مهار با مقدار ۴۵٫۵۳ است. وجود استخلاف الکترون‌کشنده و الکترون‌دهنده منجر به کاهش فعالیت مهاری به میزان جزئی می‌شود.



شکل ۴ طیف ^{1}H-NMR مربوط به ترکیب **8l**

جدول ۱ مقادیر درصد مهار ترکیب‌های **8a-o** در برابر آنزیم تیروزیناز

ردیف	ترکیب ۸	R_1	R_2	مهار تیروزیناز (٪)
۱	**8a**	H	H	۱۸٫۱۵ ± ۱٫۰۵
۲	**8b**	H	F	۲۷٫۲۳ ± ۴٫۱۵
۳	**8c**	H	Cl	۳۸٫۹۸ ± ۲٫۶۵
۴	**8d**	H	CH_3	۴۰٫۱۲ ± ۲٫۸۸
۵	**8e**	H	OCH_3	۳۲٫۵۱ ± ۳٫۱۶
۶	**8f**	H	H	۴۵٫۵۳ ± ۳٫۰۵
۷	**8g**	H	F	۳۸٫۲۱ ± ۳٫۵۵
۸	**8h**	H	Cl	۳۹٫۲۶ ± ۲٫۱۵
۹	**8i**	H	CH_3	۳۶٫۱۱ ± ۴٫۲۱
۱۰	**8j**	H	OCH_3	۳۲٫۵۱ ± ۳٫۱۶
۱۱	**8k**	OCH_3	H	۳۱٫۱۲ ± ۲٫۹۶
۱۲	**8l**	OCH_3	F	۳۷٫۵۷ ± ۴٫۲۱
۱۳	**8m**	OCH_3	Cl	۳۷٫۹۲ ± ۳٫۴۵
۱۴	**8n**	OCH_3	CH_3	۴۲٫۵۲ ± ۲٫۰۵
۱۵	**8o**	OCH_3	OCH_3	۳۶٫۱۳ ± ۳٫۵۶
۱۶	کوجیک اسید			۱۹٫۶۹ ± ۲٫۱۱ µM

نتیجه‌های پیش‌بینی‌شده از ویژگی جنبش‌شناسی دارویی ترکیب‌های منتخب

ترکیب‌های (**8d**، **8f** و **8n**) با بهترین درصد فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز برای محاسبه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی انتخاب [۲۲ و ۲۳] و با نرم‌افزارهای آنلاین pkCSM و MarvinSketch این ویژگی‌ها محاسبه شدند. قانون ۵ لیپینسکی برای این ترکیب‌ها، شامل MW ≥ ۵۰۰، HBA ≥ ۱۰ و HBD ≥ ۵، Log P ≥ ۵، PSA ≥ ۱۴۰ Å^2، و RBC ≥ ۱۰ برای پیش‌بینی فراهمی زیستی آن‌ها بررسی و محاسبه شد. نتیجه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. برای پیش‌بینی ویژگی جنبش‌شناسی دارویی[1] شامل جذب، توزیع، سوخت و ساز دفع و سمیت (ADMET) ترکیب‌های انتخاب شده (**8d**، **8f** و **8n**)، از نرم‌افزار آنلاین استفاده شد و نتیجه‌های آن در جدول ۳ ارائه شده است.

قانون لیپینسکی[2] برای این ترکیب‌ها، شامل MW ≥ ۵۰۰، HBA ≥ ۱۰ و HBD ≥ ۵، Log P ≥ ۵ و RBC ≥ ۱۰ است که می‌تواند با متغیرهای دیگری مانند PSA ≥ ۱۴۰ Å نیز به‌منظور بهبود آن، همراه باشد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۲ ویژگی‌های دارونمایی ترکیب‌های سنتز شده **8d**، **8f** و **8n**

ردیف	ترکیب	HBD	HBA	MW	Log P	RBC	PSA
۱	**8d**	۲	۱۰	۴۹۷/۵۱۱	۲/۸۷	۷	۱۵۴/۷۴
۲	**8f**	۲	۱۰	۴۸۴/۴۸۳	۲/۵۶	۷	۱۴۵/۵۱
۳	**8n**	۲	۱۰	۵۲۷/۵۳۷	۲/۸۸	۷	۱۶۳/۹۷

در مورد سه ترکیب (**8d**، **8f** و **8n**) بیش‌بینی دارونمایی (Drug-Likness) بررسی و محاسبه شد. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که چهار متغیر اول ترکیب‌های **8d** و **8f** از قانون ۵ لیپینسکی پیروی می‌کنند و PSA به مقدار ناچیزی (PSA ≥ ۱۴۰ Å) فراتر از گستره تعیین شده است. همچنین، برپایه مطالعه‌های پیشین یکی از متغیرها می‌تواند خارج از گستره مجاز باشد [۲۲]. درحالی‌که برای ترکیب **8n** دو مورد MW و PSA خارج از گستره هنجار قرار می‌گیرد.

نتیجه‌های جنبش‌شناسی دارویی و سمیت در جدول ۳ خلاصه شده‌اند. درصد جذب روده‌ای (HIA[3]) بین ۷۴/۵۳ تا ۸۸/۵۷ است که در گستره پذیرفته شده قرار دارد. حجم توزیع (VD_{SS}[4]) یک عامل جنبش‌شناسی دارویی است که نشان‌دهنده تمایل یک دارو برای ماندن در پلاسما یا توزیع دوباره آن در سایر محفظه‌های بافتی است.

برپایه این نرم افزار آنلاین مقدار پذیرفته‌شده برای VD_{SS} به‌صورت $-0/15 < \text{Log } VD_{SS} < 0/45$ Log L/Kg است. بنابراین، ترکیب‌های سنتزشده دارای Log VD_{SS} در گستره پذیرفته شده هستند.

برای سوخت‌وساز پیش‌بینی می‌شود همه ترکیب‌ها به‌عنوان پیش‌ساز یا مهارکننده CYP450 3A4 عمل کنند. در حالی که انتظار می‌رود به‌عنوان پیش‌ساز یا مهارکننده CYP450 2D19 و CYP450 2D6 نباشند. با توجه به دفع، انتظار می‌رود هیچ یک از ترکیب‌ها، پیش‌ساز انتقال‌دهنده کاتیون آلی ۲ کلیه (OCT2) نباشند. در نهایت، همه ترکیب‌ها از نظر حساسیت پوستی بررسی شدند که پیش‌بینی می‌شود که حساسیت‌زا نباشند. در ادامه سمیت سلولی با نرم‌افزار برخط pro-Tox-II ارزیابی شد و برپایه پیش‌بینی هیچ‌کدام سمیت سلولی ندارند.

1. Pharmacokinetic 2. Lipsinki's rule of 5 3. Human Intestinal Absorbtion 4. Steady state volume of distribution (VDss)

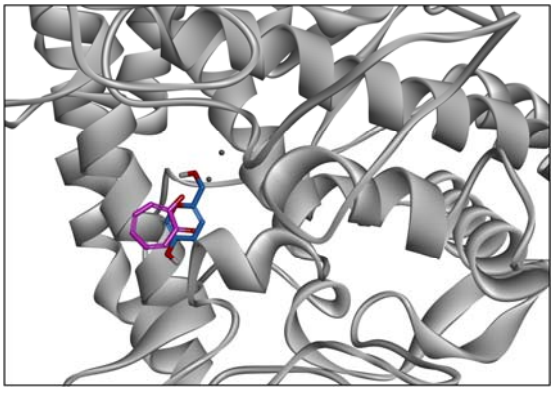
جدول ۳ پیش‌بینی ویژگی ADME*-Tox ترکیب‌های سنتز شده **8d**، **8f** و **8n**

جذب		توزیع	دگردشتی						دفع	سمیت		
HIA%		VDss (logL/Kg)	مهار CYP3A4	پیش‌ساز CYP3A4	مهار CYP2D6	پیش‌ساز CYP2D6	مهار CYP2C9	پیش‌ساز CYP2C19	پیش‌ساز Renal OCT2	سمیت سلولی	حساس‌سازی پوست	بازدارنده hERG** I
۷۴٫۵۳	**8d**	-۰٫۰۲۱	بله	بله	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
۸۸٫۵۷	**8f**	۰٫۱۱۶	بله	بله	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر
۸۳٫۴۴	**8n**	۰٫۴۱۱	بله	بله	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر	خیر

* Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (ADME)
** Human ether-a-go-go related gene (hERG)

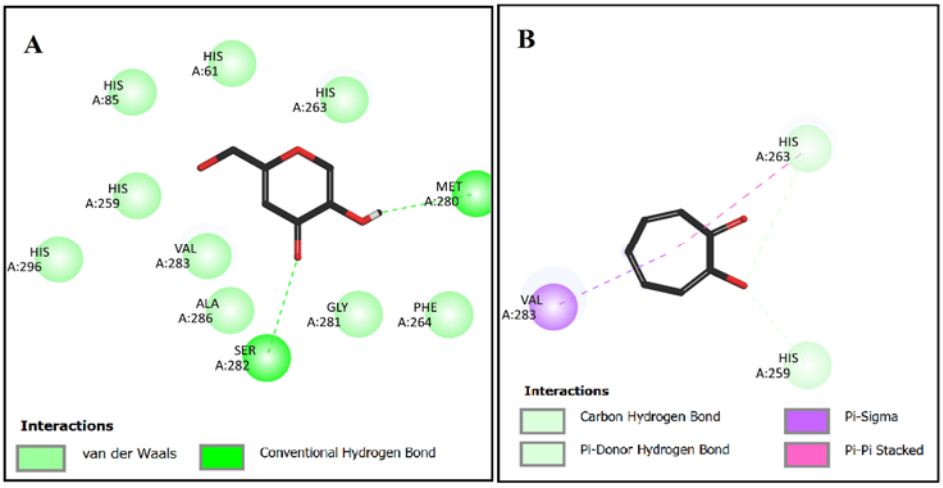
مطالعه‌های داکینگ مولکولی

داکینگ ترکیب موثر **8f**، تروپلون و کوجیک اسید برای بررسی برهم‌کنش بین این لیگاندها و آنزیم تیروزیناز با کمک نرم‌افزار AutoDock انجام شد. بهترین هم‌صورت[1] و امتیاز داکینگ برای هر لیگاند تعیین شد. همان‌طور که در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است، حفره پیوند پیش‌ساز شش آمینواسید هیستیدین یون‌های مس را احاطه کرده و بقایای آمینواسیدهای Ser282 و Met280 محل اصلی پیوند کوجیک اسید و ایجاد پیوند هیدروژنی است. تروپولون نیز در مکان فعال همانند کوجیک اسید قرار می‌گیرد و با بقایای His۲۶۳ و His۲۵۹ پیوند هیدروزنی ایجاد می‌کند، در حالی که برهم‌کنش آب‌گریز پای با His۲۶۳ و Val۲۸۳ برقرار می‌کند.



شکل ۵ کوجیک اسید (به رنگ آبی) و تروپولون (به رنگ بنفش) در مکان فعال آنزیم تیروزیناز

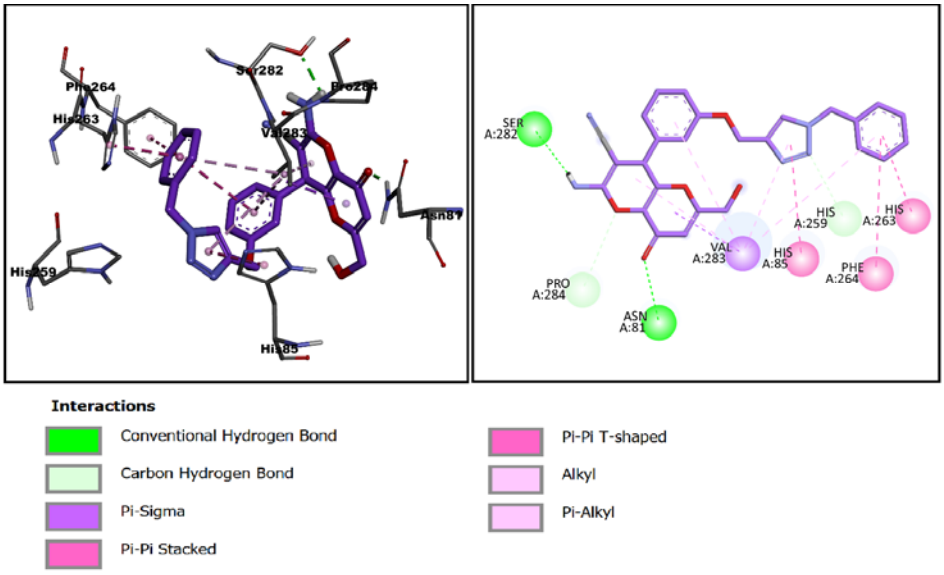
1. Conformer



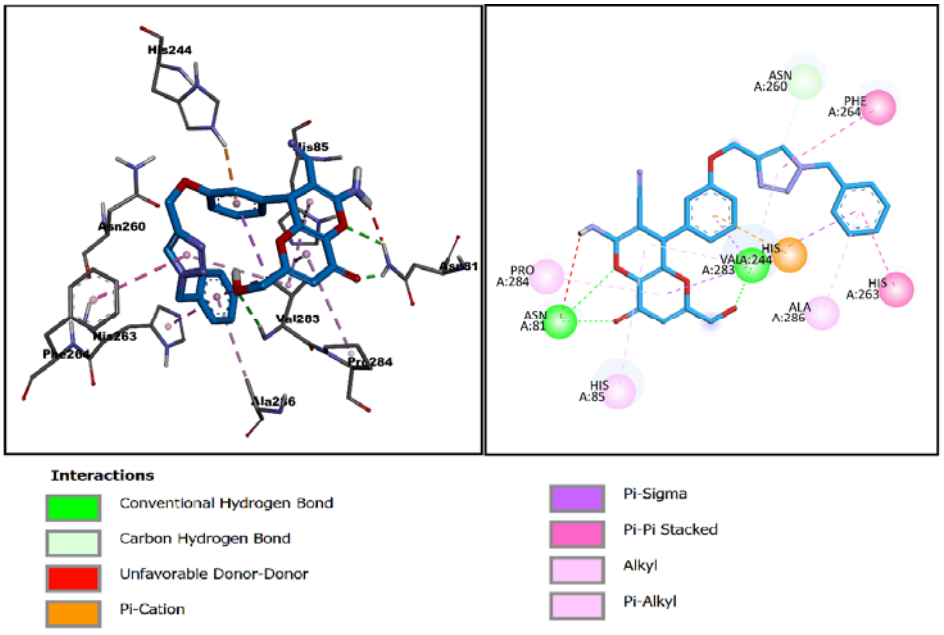
شکل ۶ نمایش دو بعدی برای برهم‌کنش‌های ترکیب کوجیک اسید (A) و تروپولون (B) با آمینواسیدهای موجود در مکان تیروزیناز

شکل‌های ۷ و ۸ داکینگ ترکیب 8f را در مکان فعال آنزیم تیروزیناز نشان می‌دهد. از آن‌جایی‌که ترکیب‌ها دارای مرکز دستوار[1] هستند، دو انانتیومر *S* و *R* دارند و محاسبه‌های داکینگ برای هر دو انانتیومر، در شکل ۷ تا ۸ نمایش داده شده است. در شکل ۷ برهم‌کنش دو بعدی و سه بعدی انانتیومر *S* ترکیب 8f با مکان فعال نمایش داده شده است. به‌طوری‌که مشاهده می‌شود قسمت بنزیلوکسی به سمت دهانه حفره مکان فعال جهت‌گیری می‌کند و با آمینو اسیدهای His283 و Phe264 وارد برهم‌کنش‌های استکینگ پای-پای می‌شود. حلقه تری‌آزول برهم‌کنش‌های پای-پای با His85 برقرار می‌کند. فنیل مرکزی با اسیدآمینه Val283 برهم‌کنش پای-آلکیل ایجاد می‌کند. بخش کوجودی‌هیدروپیران در اطراف مکان فعال که دارای اسیدآمینه‌های مناسب برای پیوند هیدروژنی است جهت‌گیری می‌کند و گروه کربونیل برهم‌کنش پیوند هیدروژنی با Asn81 و گروه آمین با Ser82 برقرار می‌کند. در شکل ۸ برهم‌کنش دوبعدی و سه‌بعدی انانتیومر *R* ترکیب 8f با مکان فعال نمایش داده شده است. به‌طوری‌که مشاهده می‌شود قسمت بنزیلوکسی به سمت دهانه حفره مکان فعال جهت‌گیری می‌کند و با آمینو اسیدهای His263 و His244 وارد برهم‌کنش‌های استکینگ پای-پای می‌شود و پای-آلکیل با Ala286 برقرار می‌کند. تری‌آزول وارد برهم‌کنش پای-پای و هیدروژنی به ترتیب با آمینواسیدهای Phe264 و Asn260 می‌شود. Val283 وارد برهم‌کنش پای-آلکیل با حلقه فنیل مرکزی، تری‌آزول و کوجودی‌هیدروپیران می‌شود. فنیل مرکزی همچنین، با اسیدآمینه His244 برهم‌کنش پای-کاتیون ایجاد می‌کند. بخش کوجودی‌هیدروپیران در اطراف مکان فعال که دارای اسیدآمینه‌های مناسب برای پیوند هیدروژنی است جهت‌گیری می‌کند و گروه کربونیل برهم‌کنش پیوند هیدروژنی با Asn81 و گروه آمین برقرار می‌کند. همچنین، گروه آمین یک برهم‌کنش نامطلوب پیوند هیدروژنی دهنده- دهنده با Asn81 ایجاد می‌کند.

1. Chiral



شکل ۷ نمایش دو بعدی و سه بعدی برای برهم‌کنش‌های انانتیومر S از ترکیب **8f** با اسیدآمینه‌های مکان فعال تیروزیناز



شکل ۸ نمایش دو بعدی و سه بعدی برای برهم‌کنش‌های R از ترکیب 8f با اسیدآمینه‌های مکان فعال تیروزیناز

نتیجه‌گیری

پانزده ترکیب کوجیک اسید دارای حلقه ۳،۲،۱-تری‌آزول 8a-o طی سه مرحله سنتز شد. در مرحله اول ترکیب‌های آلدهیدی پروپارژیله 3a-c از آلدهیدهای دارای گروه هیدروکسیل سنتز شد. در مرحله دوم واکنش سه‌جزیی شامل آلدهیدهای پروپارژیله، مالونیتریل، و کوجیک اسید در حلال اتانول منجر به تولید حدواسط ۲-آمینو-۶-(هیدروکسی متیل)-۸-اکسو-۴-فنیل- ۴، ۸-دی‌هیدروپیرانو [۳, ۲-*b*] پیران-۳-کربونیتریل 6a-c شدند. در مرحله سوم واکنش شیمی کلیک با روش کلاسیک شارپلس انجام شد و مشتق‌های کوجیک اسید دارای حلقه ۳،۲،۱-تری‌آزول سنتز و در مرحله بعد در برابر آنزیم تیروزیناز ارزیابی شدند. با توجه به نتیجه‌های آزمون برون‌تنی مهار آنزیم تیروزیناز، بیشتر ترکیب‌ها توانستند قدرت مهاری متوسط داشته باشند. باتوجه به این‌که ترکیب‌ها دارای اثرهای مهاری در حد درصد مهار بودند نمی‌توان بیان دقیقی در مورد رابطه ساختمان- اثر داشت. مطالعه‌های داکینگ ترکیب 8f نشان داد پیوند بین مهارکننده و آنزیم از راه هیستیدین‌های دهانه کانال ورودی مکان فعال آنزیم انجام می‌شد. همچنین، بررسی ویژگی‌های دارونمایی و جنبش‌شناسی دارویی با سرورهای محاسباتی برخط نشان داد که ترکیب‌های منتخب توانستند ویژگی‌های دارونمایی برپایه قوانین لیپینسکی و کینتیکی قابل‌قبول بدون هیچ نوع سمیتی داشته باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با شماره پروژه ۹۸۰۵۱۵۳۷۲۴ توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان حمایت شد.

مراجع

[1] Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V.; J. Am. Chem. Soc. 127, 210-216, 2005.

[2] Hein, J. E.; Fokin, V.V.; Chem. Soc. Rev. 39, 1302-15, 2010.

[3] Jiang, X.; Hao, X.; Jing, L.; Wu, G.; Kang, D.; Liu, X.; Zhan, P.; Expert. Opin. Drug. Discov. 14, 779-789, 2019.

[4] Vaibhav, S.; Lakshaman, K.; Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci. 3, 977-82, 2012.

[5] Nursid, M.; Marraskuranto, E.; Septorini, D.; Batubara, I.; Squalen Bull. Mar. Fish. 14, 33-42, 2019.

[6] Narayanaswamy, N.; Duraisamy, A.; Balakrishnan, K.; Int. J. Pharma Bio Sci. 2, 294-303, 2011.

[7] Zimmermann Franco, D.C.; Goncalves de Carvalho, G.S.; Rocha, P.R.; da Silva Teixeira, R.; Da Silva, A.D.; Barbosa Raposo, N.R.; Molecules. 17, 11816-11825, 2012.

[8] Sharma, K.; Joshi N.; Goyal, C.; Anc. Sci. Life. 31, 18-25, 2015.

[9] Kamaraj, B.; Purohit, R.; Bio. Med. Res. Int. 2013, 697051, 2013.

[10] Kanteev, M.; Goldfeder, M.; Fishman, A.; Protein Sci. 24, 1360-9, 2015.

[11] Mohania, D., Chandel, S.; Kumar, P.; Verma, V.; Digvijay, K.; Tripathi, D.; Choudhury, K.; Mitten, S. K.; Shah, D.; "Ultraviolet Radiations: Skin Defenc-Damage Mechanism" in: Ahmad, S. (eds) "Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, Advances in Experimental Medicine and Biology", vol 996. Springer, Cham., 2017.

[12] Ullah, S.; Son, S.; Yun, H.; Kim, Y.D.H.; Chun. P.; Moon, H.R.; Expert Opin. Ther. Pat. 26, 347-62, 2016.

[13] Wan, H.M.; Chen, C.C.; Giridhar, R.; Chang, T.S., Wu, W.T.; Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32(6), 227-233, 2005.

[14] Jones, K.; Hughes, J.; Hong, M.; Jia, Q.; Orndorff, S.; Pigment. Cell. Res. 15, 335-40, 2002.

[15] Xu, X.; Zhang, P.J.; Elder, D.E.; Arch. Pathol. Lab. Med. 127, 1083-4, 2003.
[16] Taranto, F.; Pasqualone, A.; Mangini, G.; Tripodi, P.; Miazzi. M.; Pavan. S.; Int. J. Mol. Sci. 18, 377, 2017.
[17] Najafi, Z.; Esmaili, S.; Khaleseh, B.; Babaee, S.; Khoshneviszadeh, M.; Chehardoli, G.; Akbarzadeh, T.; Sci Rep. 12, 19917, 2022.
[18] Karimian, S.; Ranjbar, S.; Dadfar, M.; Khoshneviszadeh, M.; Gholampour, M.; Sakhteman, A.; Khoshneviszadeh, M.; Mol. Divers. 25(4), 2339-49, 2021.
[19] Somakala, K.; Amir, M.; Sharma, V.; Wakode, S., Monatsh. Chem. 147 (11), 2017-2029, 2016.
[20] Dgachi, Y.; Martin, H.; Malek, R.; Jun, D.; Janockova, J.; Sepsova, V.; Soukup, O.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Maalej, E.; Carreiras, M.C.; Refouvelet, B.; Chabchoub, F.; Marco-Contelles, J.; Ismaili, L., J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 34 (1), 163-170, 2019.
[21] Buckley, B.R.; Figueres, M.M.; Khan, A.N.; Heaney, H., Synlett 27(1), 51-56, 2016.
[22] Abdelli, I.; Benariba, N.; Adjdir, S.; Fekhikher, Z.; Daoud, I.; Terki, M.; Benramdane, H.; Ghalem, Said.; J. Biomol. Struct. Dyn. 39(3), 816-22, 2021.

JARC

Synthesis of dihydropyranocarbonitrile compounds based on kojic acid linked to 1,2,3-triazole ring by click chemistry approach and their evaluation as potential tyrosinase inhibitors

Z. Najafi[1,*], S. Esmaili[2], S. Babaee[2], B. Khaleseh[3], G. Chehardoli[4], M. Khoshneviszadeh[5,*] and T. Akbarzadeh[6]

1. Assistant Prof. of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
2. Ph.D Student of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3. Ph.D Student of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
4. Associate Prof. of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
5. Associate Prof. of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
6. Professor of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract: In this research, synthesis of dihydropyranocarbonitrile compounds based on kojic acid linked to 1,2,3-triazole ring were performed by click chemistry method and evaluated as tyrosinase enzyme. Ring formation of triazole in the target compounds was performed by the classic Sharpless approach and in the presence of copper as catalyst. The compounds included three categories including kojic acid derivatives with 1,2,3-triazole ring based on 4-hydroxybenzaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde, and 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyde (vanillin). In vitro evaluation of the tyrosinase enzyme inhibitory effect of all compounds was performed. Most of the compounds showed moderate to weak inhibition and finally, the results were reported as inhibition percentage. Among them 8d, 8f, and 8n compounds have the best percentage of tyrosinase enzyme inhibitory activity with percentages of 40.40 ± 2.88, 45.53 ± 3.05, and 42.52 ± 2.05, respectively, compared to kojic acid as standard control (19.69 ± 2.11 μM). Docking studies showed that the compounds interacted with the amino acids of the entry of active site and its around. In addition, the drug-likeness and pharmacokinetic properties for the selected compounds were calculated and the obtained data were within the acceptable range.

Keywords: Tyrosinase inhibitors, Kojic acid, 1,2,3-Triazole, Cyclization, Molecular docking

*** Corresponding author Email:**
z.najafi@umsha.ac.ir &
khoshnevim@sums.ac.ir