

Kavitha Anthonypillai

Konformasjonsanalyse og semipreparativ separasjon av chinchona alkaloider

Masteroppgave i farmasi

Veileder: Dr. Michal Rachel Suissa, Dr. Per Ola Rønning

Juni 2019

Konformasjonsanalyse og semipreparativ separasjon av chinchona alkaloider

Masteroppgave i farmasi 2019

OsloMet – Storbyuniversitetet, Farmasiutdanning (HV/TKD)

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, Fakultet for medisin og helsevitenskap

Kavitha S. Anthonypillai

Veiledere: Dr. Michal Rachel Suissa, Dr. Per Ola Rønning

Juni 2019

OSLOMET



NTNU

Norges teknisk-
naturvitenskapelige
universitet

Sammendrag

Chinchona alkaloidet kinin, og til dels kinidin, har vært benyttet mot malaria i flere hundre år, og spiller fortsatt en viktig rolle i behandling mot alvorlige tilfeller av malaria, spesielt hos gravide og ammende. Både kinin, kinidin og syntetiske analoger dreper parasittene ved å hemme dannelsen av hem-polymer i malariaparasittens fordøyelses-vakuoler. Den eksakte virkningsmekanismen på molekylært nivå er ikke ennå fullstendig kartlagt. Det er i tillegg ikke helt oppklart hvorfor disse stoffene har ulike grader av antimalaria-effekter. Flere studier viser at kinidin er mer effektiv enn kinin, mens diastereomerene epikinidin og epikinidin har tilnærmet ingen effekt mot malaria.[1-6] Konformasjonsanalyser, analyser av aggregat-tilstander ved hjelp av nukleær magnetisk resonans (NMR) og avanserte teoretiske beregninger er grunnleggende for å analysere legemiddel-target komplekser *in vitro*. For å kunne utføre dette kreves det 100% rene forbindelser, men studier viser at kinin og kinidin som markedsføres av ulike produsenter kan inneholde spor av urenheter, blant annet i form av deres dihydro- og / eller demetoksy-derivater.[7]

Kvantitative og kvalitative analyser som ble utført i denne oppgaven ved hjelp av væskechromatografi koblet til UV-detektor (*High pressure liquid chromatography*-UV, HPLC-UV), NMR og væskechromatografi koblet til *time of flight* -massespektrometer (LC-TOF), viser at både kinin og kinidin inneholder spor av både dihydro-derivater og demetoksy-derivater i ulike mengder, avhengige av produsenten. De reneste stoffene for kinin var fra Merck og for kinidin fra Aldrich. Et forsøk på å isolere kinin og kinidin i rene former var ikke vellykket i den tidsrammen vi hadde for denne oppgave. Strukturelle likheter i molekylene gjør det krevende å få analyttene i ren form hver for seg.

Grundige og fullstendige konformasjonsanalyser av både kinin og kinidin ble foretatt ved å ta hensyn til samtlige torsjonsvinkler i molekylene. Det ble i tillegg foretatt struktur-aktivitets-analyser (*Structure Activity Relationship*, SAR) av kinin, kinidin og deres epi-derivater i tillegg til SAR analyser til utvalgte syntetiske analoger. Det ble benyttet molekylfigurer, og Newman projeksjoner ble tegnet ved hjelp av ChemDraw for å illustrere de ulike konformasjonene til hver torsjonsvinkel i molekylene. SAR studier ble foretatt ved hjelp av både molekylmodeller, 3D figurer fra ChemDraw og enkle molekylær mekaniske (MM2) beregninger utført ved hjelp av ChemDraw.

Konformasjonsanalysene som ble utført viser til at molekylene har en svært kompleks konformasjonsatferd. Kinin og kinidin har totalt 432 mulige konformerer som kan foreligge mono-, di- eller uladet form avhengig av miljøets pH. Konformasjoner som ikke danner intern-hydrogenbinding antas å fylle de topologiske kravene som skal til for å kunne danne god kompleks med hem-monomer eller hem-dimer.

Kompleksiteten i strukturene til kinin og kinidin krever flere type avanserte analyser for å få en bedre forståelse av virkningsmekanismene som så kan benyttes til å fremstille legemidler som er mer effektive, mer motstandsdyktige mot resistensutvikling og med mindre bivirkninger.

Basal forskning i dette fagfeltet er fremdeles høyt aktuelt for å kunne tilby en bedre behandling mot malaria som er en ledene infeksjonssykdom på verdensbasis. Kunnskap om virkningsmekanismen på konformasjonsnivå kan videre benyttes til *drug discovery* og utvikling av et større utvalg av effektive, tilpassede og rimelige antimalaria legemidler.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført våren 2019 ved OsloMet – Storbyuniversitetet med farmasiutdanningen (Fakultet for helsevitenskap) i samarbeid med Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU, Fakultet for medisin og helsevitenskap).

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine veiledere Dr. Michal Rachel Suissa og Dr. Per Ola Rønning for å ha tatt meg imot som deres masterstudent og gitt meg muligheten til å fullføre dette prosjektet. Veien til det ferdige resultatet har iblant vært utfordrende men dere var alltid støttende og hjelpende under hele denne prosessen. Dette prosjektet har stilt store krav til utholdenhet og tålmodighet men har til gjengjeld gitt meg økt kunnskap i ulike fagområder og flere ben å stå på.

Å skrive denne masteroppgaven har ikke bare vært en utfordring for meg, men det har også krevd tålmodighet fra min familie. Derfor vil jeg takke min kjære ektefelle Seelan og våre tre flotte barn Kevin, Anirtha og Krishan for motivasjon gjennom hele denne perioden. Uten deres støtte og kjærighet ville denne drømmen ikke vært realiserbar.

En stor takk til professor Israel Agranat ved Universitet i Jerusalem for faglig innspill og til Sintef Oslo for bruk av NMR instrumentet.

Takk til mine medstudenter ved DIAMED forskningsgruppen, Ali, Ana og Miguel, for gode faglige diskusjoner og praktisk hjelp på lab.

Til slutt ønsker jeg å takke min arbeidsgiver Dr. Knut Breistøl (Vitusapotek Kilen) for tilrettelegging av arbeidsforhold og hjelp med gjennomgang av oppgaven.

Innhold

Sammendrag.....	iv
Forord.....	v
Forkortelser	vii
Introduksjon	8
Mål med oppgaven	9
Bakgrunnsteori om malaria	10
Utbredelse av malaria	10
Patogenese	11
Sykdomsforløp, diagnose og behandling av malaria.....	14
Resistensproblematikken	17
Vaksine mot malaria	18
Antimalarialegemidler.....	21
Artemisinin og artemisinin-derivater	21
Bakgrunnsteori for legemiddelanalyse	23
Kromatografi og spektroskopi i analyser	23
Massespektrometri	28
Metoder	32
Eksperimentell del	32
Resultater og diskusjon	41
Del 1: Resultater fra den eksperimentelle delen.....	41
Del 2: Konformasjonsanalyse, SAR og mekanistiske studier	56
Oppsummering og konklusjoner	92
Referanser	96
Vedlegg 1: Diverse strukturer.....	101
Vedlegg 2: NMR-spektroskopi	102
Vedlegg 3:.....	105
Kjemiske- og fysikalske egenskaper av chinchona derivater	105
Liste over løsningsmidler benyttet i denne oppgaven	105
Vedlegg 4: Utstyrspesifikasjoner	106

Forkortelser

ACT	Artemisinin-based combination therapy
CD36	Cluster of differentiation 36
CSP	Chiral Stationary Phase
CYP-50	Cytokrom P-50
DHQD	Dihydrokinidin
DHQN	Dihydrokinin
FPIX	Ferriprotoporphyrin IX
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IC50	Half maximal inhibitory concentration
IPTp	Intermittent preventive treatment in pregnancy
IRS	Indoor residual spraying
ITN	Insecticide-treated mosquito nets
KK	Kinkonin
KKD	Kinkonidin
H-binding	Hydrogenbinding
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
nbe	non-bondings elektroner
NMR	Nuclear magnetic resonance
QD	Kinidin
QN	Kinin
RDT	Rapid diagnostic testing
SA	Selectand
SAR	Structure-activity relationship
SMC	Seasonal malaria chemoprevention
SO	Selector
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TOF	Time of flight
WHO	World Health Organization

Introduksjon

Malaria er et globalt samfunnsproblem, flere millioner mennesker rammes av denne sykdommen hvert år, spesielt barn, gravide og ammende. Ifølge verdens helseorganisasjonens (WHO) malariarapport fra 2017 ble det estimert 216 millioner malariatilfeller verden over, og 90% av disse tilfellene oppstod i Afrika. Rundt 445.000 mennesker døde som følge av denne sykdommen med høyest mortalitet i Afrika.[8]

Frem til 1930 tallet ble malaria hovedsakelig behandlet med chinchona alkaloidet kinin og til dels kinidin. Effektive syntetiske antimalaria legemidler som klorokin ble tilgjengeliggjort, men den utstrakte bruken førte til resistensutvikling. Økende resistens mot klorokin i malariaparasitten *Plasmodium (P.) falciparum* og dårlig tilgang til andre typer antimalaria legemidler i enkelte malaria-utsatte områder gjør kinin og kinidin fortsatt til aktuelle legemidler i behandling av alvorlig malaria tilfeller. Et viktig steg i bekjempelsen av malaria er utvikling av malariavaksiner som per dags dato kun gis til barn fra fem måneds alderen som en del av et pilotprosjekt.[6,9-13]

Chinchona alkaloidene utvinnes fra barken til chinchona treet, som i utgangspunktet ble benyttet som febernedsettende middel av Sør- Amerikas urbefolkning. Chinchona barken som antimalaria medisin ble introdusert til Europa rundt 1640-tallet. Kinin, som det finnes mest av i chinchona barken, ble isolert i 1820 og dens eksakte struktur ble bestemt i 1908. Molekylets totale syntese ble utført av Stork et al. i 2001.[14-16] Chinchona alkaloider har fem kirale sentra hvor tre av dem har lik topologi i alle chinchona alkaloidene: N¹(S), C³(R) og C⁴(S). Forskjellen ligger i stereokjemien rundt C⁸ og C⁹ som gir opphav til ulike diastereomerer: 8S,9R (kinin), 8R,9S (kinidin), 8S,9S (epikinin) og 8R,9R (epikinidin). Flere studier viser at hydroksyl- og alifatisk amin gruppene er avgjørende for molekylenes farmakologiske effekt.[3,17,18]

De fleste malariatilfeller forårsakes av myggen *P. falciparum*. Plasmodium parasitter invaderer røde blodceller hos mennesker for å få tilgang til hemoglobin som de spalter til globin og hem-monomer. Globin spaltes videre til aminosyrer mens det toksiske biproduktet hem-monomer omdannes til hem-dimer som videre aggregerer seg til ikke toksiske hem-polymer.[4,6,19]

Flere studier viser at både kinin og kinidin og de syntetiske analogene hemmer denne polymeriseringsprosessen, men den eksakte virkningsmekanismen på molekylært nivå er ikke helt oppklart. Andre studier viser at kinidin er mer effektiv enn kinin, mens de respektive epi-derivatene har nærmest ingen antimalaria effekt. For kinin og kinidin er det dessuten funnet at de foreligger ved fysiologiske forhold i en kompleks termodynamisk likevekt mellom deres monomere, dimere og heksamere former. Litteratursøk viser i tillegg at de fleste syntetiske analogene er mye mer effektive enn de naturlige chinchona derivatene.[1,2,20-22]

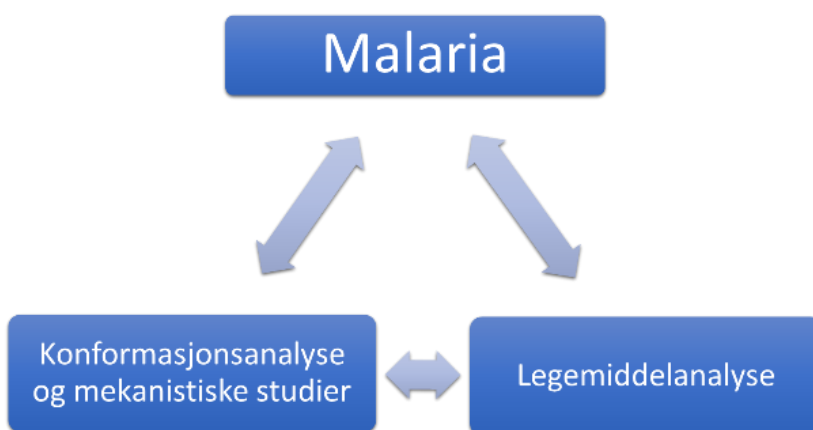
Denne masteroppgaven er inspirert av doktorgradsavhandlingen til Caner H. (2005) og skal se nærmere på de topologiske kravene som antas å være nødvendig for legemidlenes antimalaria effekt.[17] Informasjon som gis i dette dokumentet uten kildehenvisning er et resultat av felles diskusjoner utført med mine veiledere.[23]

Mål med oppgaven

Hovedmålet med denne oppgaven er å gjennomføre konformasjonsanalyser og mekanistiske studier av antimalaria-midler, samt utarbeide kvantitative og kvalitative metoder som kan benyttes i legemiddelanalyse. I denne oppgaven fokuseres det hovedsakelig på virkningsmekanismene til chinchona alkaloidene og utvalgte syntetiske analoger.

En fullstendig konformasjonsanalyse av både kinin og kinidin skal brukes til å oppnå en bedre forståelse av molekylenes antimalaria virkningsmekanismer. En slik fullstendig konformasjonsanalyse er ikke tilgjengelig per dags dato og er et viktig ledd i videre arbeid med disse eldgamle, men fremdeles viktige og relevante antimalaria-legemidler. Det foreligger et stort antall publikasjoner i dette feltet som inkluderer både syntese og teoretiske beregninger av komplekset mellom molekylene og deres target. Det er allikevel fortsatt behov for utfyllende studier for fullstendig oppklaring av molekylenes farmakologiske effekter.

Et viktig steg mot å oppklare virkningsmekanismen(e) til chinchona derivatene er studier av molekylenes aggregeringsatferd (mono-, di- og heksamerer), ved hjelp av NMR etterfulgt av avanserte teoretiske beregninger. Til dette kreves 100% rene forbindelser, men studier viser at kinin og kinidin fra kommersielle produsenter inneholder urenheter i form av deres respektive demetoksy- og dihydro-derivater.[7] En del av denne oppgaven er derfor å foreta analyser av renhetsgraden til kinin og kinidin fra tilgjengelige produsenter samt å få dem i ren form ved å utvikle metoder for semipreparativ separasjon og isolering.



Figur 1: Hovedmålene med oppgaven.

Bakgrunnsteori om malaria

Utbredelse av malaria

Malaria (mal'aria, på italiensk: dårlig luft) regnes som den mest utbredte smittsomme sykdommen i de tropiske og subtropiske områdene og har krevd millioner av liv i årenes løp.[9] Over 200 millioner mennesker blir smittet av malaria årlig.[24] Gravide, spedbarn og barn under fem år i endemiske områder er mest utsatt for smitte.[25] Den økonomiske belastningen (blant annet behandlings- og forebyggingskostnader, tap av arbeid osv.) av malaria er høy. Utgiftene reduserte den årlige økonomiske veksten med ca. 1.3% i 2013 i land hvor sykdommen forekom endemisk.[14]

Malaria har vært kjent siden antikken og er en av verdens mest utbredte infeksjon.[26] Sykdommen hadde trolig sin opprinnelse fra Afrika og spredde seg videre til Middelhavet, India og Sør-øst Asia.[9] På 1800-tallet var det malariautbrudd i hele Europa, hovedsakelig i sumpområder. I 1880-tallet ble Plasmodium parasitten hos myggarten Anopheles påvist som årsak til malaria.[26]

WHO har delt malariaregionene etter utbredelse og forekomst av infeksjonen. Afrika hadde den høyeste andelen av tilfellene i 2016, etterfulgt av Sør-øst Asia, det vestlige Stillehavet, det østlige Middelhavet og sør Amerika.[8] Anslagsvis forekom malaria endemisk i 90 land i 2018.[26]

Selv om sykdommen er mest utbredd i tropiske- og subtropiske områder har det siden 2009 forekommet tilfeller av malaria i Hellas, og i 2017 ble det registrert malaria-tilfeller på Kypros. Klimaforandringer er en av de faktorene som nevnes i forbindelse med dette. Malaria-infeksjonen har store lokale og globale samfunnsøkonomiske konsekvenser og resistensutvikling hos Plasmodium parasittene mot de mest brukte antimalarialegemidlene er et økende og stort problem.[9,27]

Globalt sett er det likevel flere land som beveger seg i retning mot utryddelse av malaria. I 2016 var det 44 land som rapporterte inn mindre enn 10.000 malariatilfeller, i motsetning til 37 land i 2010. Tjuen land er med i et malaria-elimineringprogram kalt "*E-2020 countries*." De ble utvalgt av verdens helseorganisasjon siden disse landene har potensialet til å utrydde malaria innen 2020.[8]

Insidens og insidensrate av malariatilfeller

Ifølge verdens malaria rapport fra 2017 ble det anslått omlag 216 millioner malaria tilfeller på verdensbasis i 2016. Det ble estimert at det oppstod 5 millioner flere tilfeller i 2016 sammenlignet med 2015. Omlag 90% av malaria-tilfellene oppstod i Afrika. En stabil nedgang i antall malariatilfeller i utsatte land ble registrert i perioden 2010 - 2016. Insidensraten var redusert fra 76 til 63 tilfeller per 1000 personer i risikoutsatte populasjoner, dette tilsvarer en nedgang på 18%. I Afrika gikk insidensraten ned fra 256 til 206 tilfeller pr 1000 innbyggere, dette tilsvarer en nedgang på 20%. Omlag 8.55 millioner (4%) av de estimerte malariatilfellene ble forårsaket av myggarten *P. vivax*. Afrika hadde den minste andelen *P. vivax* tilfeller (0,4%) men den største andelen av *P. falciparum* tilfeller (99.6%).[8]

WHOs malariarapport konkluderte at omlag 80% av dødstilfellene forårsaket av malaria i 2016 oppstod i 15 land. Det ble estimert 445.000 dødstilfeller, hvorav 91% var i Afrika. Det dreier seg fremdeles om mange mennesker som lider eller dør av malaria. Forskning på dette feltet er fremdeles svært viktig og aktuelt.[8]

Tabell 1: Oversikt over insidens og mortalitet av malaria i de ulike WHO regionene (gitt i millioner). [8]

WHO region for 2016	Afrika	Sør - Amerika	Østlige Middelhavet	Sør-øst Asia	Vestlige Stillehavet	Verden
Estimert malariatilfeller	194	0.9	4.3	14.6	1.6	216
Estimert <i>P. vivax</i> tilfeller	0.86	0.56	1.79	4.96	0.38	8.55
Estimert malaria dødstilfeller	0.407	0.00065	0.0082	0.027	0.0033	0.445

Patogenese

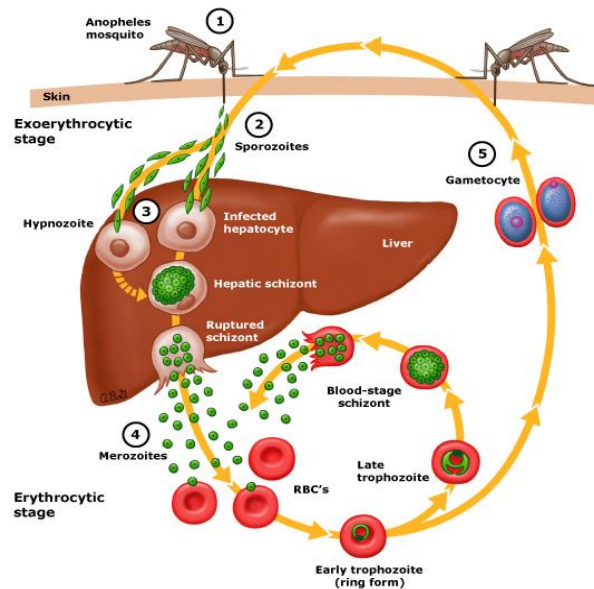
Plasmodiums livssyklus

Det finnes fem ulike Plasmodium parasitter som forårsaker malaria hos mennesker og to av disse (*P. falciparum* og *P. vivax*) står for mesteparten av malaria tilfellene. *P. falciparum* er mest utbredt på det afrikanske kontinentet og er ansvarlig for mesteparten av malaria dødstilfeller i hele verden. *P. vivax* er mest utbredt i områder utenfor Sahara.[6] Patogenesen til *P. falciparum* er mest studert siden denne arten forårsaker de fleste tilfeller med sykdommen.[28]

Det er kun infiserte hunnkjønn Anopheles mygg (også kalt malaria vektor) som kan spre parasitten til mennesker via stikk (figur 2). De sender umodne Plasmodium parasitter (sporozoitter) inn i blodbanen, som når leveren og invaderer levercellene (hepatocytene). Sporozoittene formerer seg ukjønnert til flere såkalte merozoitter. En samling av merozoittene kalles for schizonte. Som følge av formeringen vil etterhvert hepatocytene sprekke og frigjøre schizontene ut i blodbanen. Dette skjer cirka 7 til 10 dager etter infeksjonen uten symptomer hos den infiserte.[28,29]

I blodbanen invaderer merozoittene røde blodceller (erytrocytter) og formerer seg videre til såkalte tidlig fase trophozoitter, som har en ringstruktur. Senere utvikles de til sen fase trophozoitter. Senfase trophozoittene omdannes til flere merozoitter og dette resulterer i at de infiserte røde blodcellene sprekker. Denne prosessen tar omlag 48 timer og gir periodevise symptomer som feber, frysninger og svetting hos den infiserte. Merozoittene frigjøres i blodbanen igjen hvor de kan invadere nye røde blodceller. Dermed fortsetter sirkelen hvor merozoittene formerer seg til tidlig fase trophozoitter og senere til sen fase trophozoitter. Noen merozoitter formerer seg ikke, men blir isteden til seksuelt differensierte former kalt gametocytter. Merozoittene kan omvandle seg til både hunn- og hannkjønnede gametocytter.

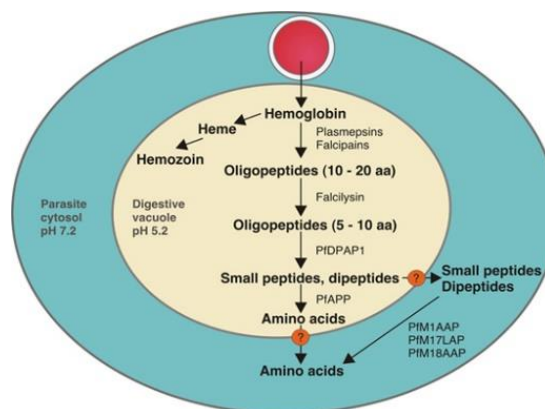
Modne gametocytter sirkulerer deretter i blodbanen helt til disse blir tatt opp av nye, ikke infiserte Anopheles mygg. I myggen vil gametocytterne omdannes etter flere trinn til sporozoitter og transporteres videre til spyttkjertelen til myggen. På denne måten kan myggen spre parasittene videre ved neste stikk. Hos *P. vivax* vil merozoittene i enkelte tilfeller ikke formere seg videre i hepatocytterne. De vil forbli i dvale og det kan ta opptil en til to år før de fortsetter med syklusen.[28-31]



Figur 2: Livssyklus til Plasmodium parasitten. [28]

Hemoglobin-nedbrytning og hemozin dannelse

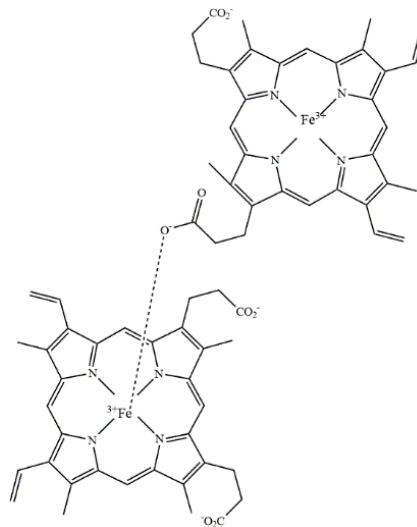
Malaria-parasittene har en begrenset mulighet til å selv syntetisere aminosyrer, de må derfor invadere erythrocytter hos mennesker for å få tilgang til hemoglobin som blir deres kilde til aminosyrer. Hemoglobin tas opp i parasittens fordøyelses-vakuoler hvor det spaltes til globin og hem. Globin spaltes videre til aminosyrer (figur 3) og inkorporeres i parasittens proteiner som senere blir tilgjengeliggjort til energiomsetning.[9] Denne prosessen skjer i den trophozoitiske fasen av parasittens livssyklus.[4,32,33]



Figur 3: Hemoglobin nedbrytning i Plasmodium parasitten. [34]

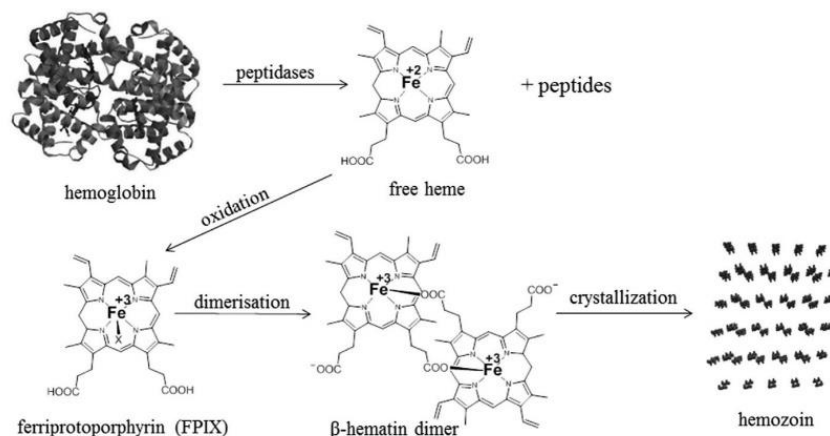
Når parasitten spalter hemoglobin frigjøres det i tillegg fritt hem-jern (Fe^{2+}) som raskt oksideres til Fe^{3+} (også kalt hem-monomer eller ferriprotoporphyrin IX, FPIX). Hem-monomer er toksisk for parasitten og akkumulering av denne kan forårsake skader og føre til parasittens død. For å unngå dette (Plasmodium mangler hem oksygenase) omdanner Plasmodium parasittene hem-monomeren til ikke toksiske hemozoin-krystaller (også kjent som malaria pigmenter).[4,35,36]

Faktorer som pH og lipidsammensetning i fordøyelses-vakuolene til Plasmodium parasitten antas å påvirke om hem eksisterer i dens frie form eller som dimer, som senere aggregerer til hemozoin krystaller ved hjelp av interne hydrogenbindinger mellom karboksylat grupper. [1,4,19] Siden pH i vakuolene er om lag 5 vil ca. 50% av karboksylgruppene foreligge i ladet form.



Figur 4: Hem-dimer.

I hvert hem er fire nitrogen atomer bundet til ett Fe^{3+} via charge-transfer interaksjoner (figur 4). Mekanismen bak omdannelsen av hem-dimer til hemozoin-krystaller er ikke fullstendig kartlagt. Det foreslås at to og to hem-dimerer blir stabilisert av interne hydrogenbindinger ved de gjenværende karboksyl-gruppene og danner hemozoin (figur 5). Dette er en reversibel prosess da enhetene er koblet med hydrogenbindinger seg imellom.[4,19]



Figur 5: Likevekt mellom monomer-, dimer- og polymere former (hemozoin) av hem.[19]

Sykdomsforløp, diagnose og behandling av malaria

Inkubasjonstiden fra myggstikk til symptomene utvikles er 7-14 dager for *P. falciparum* og 8-14 dager for *P. vivax*. [26] Når merozoitter invaderer erythrocytter vil makrofager og monocytter fagocyttere de infiserte erythrocyttene. Fagocytose fører til både anemi hos pasienten (et veldig vanlig symptom ved malaria) og frisetting av flere proinflammatoriske cytokiner. Eksempler på disse er TNF- α og Interleukiner. Dette gir symptomer som feber, hodepine, svetting, frysninger og lavt blodtrykk. Makrofager og monocytter frigjør i tillegg cytokinet Interferon- γ som påvirker blodkarene blant annet i hjernen, nyrene, placenta og lungene. Både Interferon- γ og makrofager øker uttrykket av spesielle adhesjonsmolekyler (blant annet CD36 og ICAM-1) på endotelcellene. Infiserte røde blodceller frigjør spesielle typer av overflate-proteiner som kan feste seg til disse adhesjonsmolekylene. Dette fører til trigging av koagulasjonssystemet som forårsaker inflammasjon i vevet i de ulike organene. I hjernen kan dette føre til cerebral malaria som er fatal. I nyrene kan både anemi og inflammasjon i vevet føre til nedsatt nyrefunksjon. [29]

Forebygging (vektorkontroll) og rask behandling kreves for å kontrollere økning i malariasykdom. WHO's retningslinjer for behandling av malaria (2015) inneholder følgende hovedprinsipper for kontroll- og utryddelse av malaria:

- Tidlig diagnose og rask og effektiv behandling
- Rasjonell bruk av antimalaria midler
- Kombinasjonsterapi
- Vekttilpasset dosering

De første malariasymptomer er uspesifikke og er influensalignende. Symptomene kan være hodepine, utmattelse, abdominal smerte, muskel- og leddsmerter etterfulgt av feber og frostanfall, oppkast og så videre. Så lenge infeksjonen ikke har begynt å angripe vitale organer er fullstendig helbredelse mulig dersom en korrekt diagnose og rask og effektiv behandling blir gitt. I malariautsatte områder bør malaria vurderes hos alle pasienter som har eller har hatt feber $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$, med mindre man er sikker på at årsaken skyldes noe annet. Retningslinjene anbefaler at malaria diagnostiseres *parasittologisk*. Dette omfatter bruk av mikroskopiske undersøkelser av tynt og tykt bloddråpeutstryk eller hurtig diagnose testing (RDT, rapid diagnostic testing). Førstnevnte undersøkelsen kan avsløre malaria parasittarter og parasittemigraden (antall parasitter per antall røde blodlegemer), mens RDT benyttes for å påvise Plasmodium antigener hos pasienten. RDT brukes når mikroskopisk undersøkelse ikke er tilgjengelig. Denne kan også benyttes hos pasienter som har fått ufullstendig antimalaria behandling eller når bloddråpeutstryket gir negativt resultat. Malaria kan utelukkes når begge undersøkelsene gir negative resultater. [6]

Behandlingsprinsipper

WHO's behandlingsveileder kan grovt deles etter kompleksjonsgraden av malaria og etter hvilken parasitt som har forårsaket infeksjonen. Ukomplisert malaria er tilfeller der en pasient har de typiske symptomene på malaria i tillegg til at det påvises positiv *parasittologisk* test. Denne pasienten vil ikke ha én eller flere av symptomene som observeres ved alvorlig *P. falciparum* eller *P. vivax* infeksjon (nedsatt

bevissthet, utmattelse, flere hendelser med krampeanfoll, hypoglykemi, acidose, alvorlig anemi, nyresvikt, gulsott, lungeødem, betydelig blødning, sjokk, hyperparasittisme). Målet med behandlingen er å fullstendig og raskt kurere pasienten fra infeksjonen. WHO definerer ordet "kurere" som å eliminere alle malaria parasittene fra kroppen og dermed forhindre videre spredning av sykdommen til andre (via myggstikk) og avverge resistensutvikling mot antimalaria legemidler.[6]

Barn og voksne (unntatt gravide i første trimester) skal behandles med ACT (Artemisinin based combination therapy). ACT består av en kombinasjon av en hurtigvirkende artemisinin derivat med en langsomt virkende komponent (meflokin, piperakin, lumefantrin og følgende to legemidler som ikke er tilgjengelige i Norge: *amodiaquine*, *sulfadoxine-pyrimethamine*). Artemisinin derivater eliminerer parasittene fra blodet raskt, mens partner legemidlet i ACT fjerner de resterende parasittene og hindrer resistensutvikling mot artemisinin derivatene. I tillegg vil partner legemidlet gi en forebyggende effekt mot ny infeksjon en bestemt periode etter behandlingen på grunn av den lange halveringstiden. WHO anbefaler en tre dagers kur med ACT og legemidlene skal tilpasses vekt (mest anbefalt) eller alder. Gravide i første trimester skal gis en syv dagers kur med kinin i kombinasjon med klindamycin.[6]

Behandling ved ukomplisert *P. vivax* malaria

P. vivax er den andre mest utslagsgivende årsaken til malaria hos mennesker og omtrent 4% av malariatilfeller skyldtes denne parasitten i 2016. Målet med behandling av malaria forårsaket av *P. vivax* er å kurere både infiserte blodceller og leverceller for å forebygge oppblussing og tilbakefall av infeksjonen. Ved infeksjon av blodceller behandles voksne og barn (unntatt gravide i første trimester) med en ACT eller klorokin (unntak ved klorokin resistens). Ved infeksjon av leverceller behandles voksne og barn (unntatt gravide, ammende og spedbarn) med primakin i 14 dager.[6]

Behandling ved alvorlig malaria

Ubehandlet alvorlig malaria gir meget høy mortalitetsrisiko. Dersom det gis rask behandling kan den reduseres med 10-20%. Målet med behandlingen er derfor i første omgang å hindre mortalitet, for så å forebygge funksjonshemming og tilbakefall av infeksjonen. Både artemisinin derivater og chinchona derivater (kinin og kinidin) benyttes ved alvorlig malariatilfeller. WHO anbefaler at barn og voksne (inkludert gravide, ammende og spedbarn) behandles med artesunat intravenøst eller intramuskulært i 24 timer. Man skal fortsette å gi parenteral artesunat frem til pasienten klarer å ta medisin oralt. Etter 24 timer og når pasienten er i stand til å ta orale legemidler skal det gis ACT i tre døgn. Når parenteral artesunat ikke er tilgjengelig skal det gis artemeter framfor kinin. Når hverken artesunat eller artemeter er tilgjengelige, anbefales intramuskulært kinin. I ikke endemiske områder, der artesunat, artemeter eller kinin kan være utilgjengelig, anbefales det å gi kinidin parenteralt med nøye EKG og blodtrykk-monitorering (kinidin øker QT-tiden).[6]

Behandling av malaria i Norge

Fram til slutten av 1800-tallet ble det registrert små, lokale utbrudd av malaria i Norden, forårsaket av *P. vivax*. Det siste lokale utbruddet i Norge var i 1870. Siden 1970 er malaria meldepliktig til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). I dag diagnostiseres malaria i Norge primært hos befolkning med utenlandsk opprinnelse. Årsaken til dette er dårlig immunitet for malariasykdommen og reiser til risikoutsatte områder. I 2017 ble det meldt inn 61 malariatilfeller til MSIS, hvorav 40 skyldtes

P. falciparum og 12 skyldtes *P. vivax*. Selv om *P. falciparum* er den vanligste malariaformen som importeres til Norge er dødsfall og alvorlige sykdommer veldig sjeldent i Norge.[26]

Ved ukomplisert *P. vivax* malaria er det anbefalt å gi klorokin eller hydroksyklorokin peroralt i tre dager med en tilleggsbehandling med primakin i 14 dager. Ved ukomplisert *P. falciparum* malaria anbefales ACT (artemeter-lumefantrin eller dihydroartemisinin–piperakin), atovakvon-proguanil eller meflokin. Komplisert *P. vivax*-malaria og *P. falciparum*-malaria behandles på samme måte: artesunat intravenøst er førstevalg og kinin intravenøst er andrevalg. Dersom artesunat må gis i mer enn noen få døgn bør behandlingen kombineres med et parenteralt tetrasyklin. Det skal byttes til artemeter-lumefantrin, meflokin eller atovakvon-proguanil i en full kur når pasienten er i stand til å ta orale legemidler, er klinisk stabil og parasittemi-graden er under 1%. Diagnose av malaria gjøres etter WHO protokoll. Diagnostisering er spesialistoppgave og hurtigtester for påvisning av antigener (RDT) er anbefalt å bruke kun på sykehus.[26,37,38]

I 2012-2014 ble det utført en spørreundersøkelse på totalt 48 sykehus i Norge. Formålet var å undersøke "beredskap og rutiner for diagnostikk og behandling av malaria ved norske sykehus". 19 av de 48 sykehusene rapporterte at de ikke hadde medikamenter for alvorlig malaria tilgjengelig. Av de resterende 29 sykehusene hadde 13 sykehus kun artesunat til intravenøs bruk. 13 sykehus hadde kun kinin til intravenøs bruk. Kun tre sykehus hadde både artesunat og kinin til intravenøs bruk. 13 av de 48 sykehusene hadde kun mikroskopi som diagnostisk metode, ett sykehus hadde kun hurtigtest tilgjengelig, tre sykehus hadde ingen diagnostiske metoder og 31 sykehus hadde både hurtigtest og mikroskopi.[39]

Tabell 2: Statistikk fra reseptregisteret for uttak av malarialegemidler (2017).[40]

ATC-kode	Virkestoff	Antall brukere
P01BA01	Klorokin	11
P01BA02	Hydroksyklorokin	6256
P01BA03	Primakin	10
P01BB51	Proguanil kombinasjoner*	25118
P01BC01	Kinin	286
P01BC02	Meflokin	2035
P01BE02	Artemeter ^a	0
P01BE03	Artesunat ^a	0
P01BF01	Artemeter og lumefantrin	13

*Proguanil kombinasjoner (Malarone®) brukes i tillegg som forebyggende medisin mot malaria ved reiser til malariaområder.

Tabellen viser uttak for begge kjønn i alle aldre med befolkningsgrunnlag 5 276 846 (a: befolkningsgrunnlag = 0) [28]

Strategier for kontroll av malariavekst

I 2016 ble det brukt omlag 2.7 milliarder US dollar til malaria kontroll og bekjempelse. Rundt 74% ble brukt i WHO's Afrikaregion. Mellom 2014 og 2016 ble det utdelt totalt 582 millioner insekticid impregnerte myggnett (ITN) i hele verden, av disse ble 505 millioner utdelt til husholdninger sør for Sahara. 80% av alle husholdningene sør for Sahara eide minst en ITN i 2016. Bruken av innendørs insektmiddel (IRS) er blitt redusert fra 5.8% i 2010 til 2.9% i 2016. Årsaken til nedgangen skyldes IRS' økte priser. Gravide som bor i moderate til høy utsatte områder tilbys intermitterende forebyggende behandling (IPTp) med *sulfadoxine-pyrimethamine*. [8] Sesongbasert malaria kjemoprofylakse (SMC) tilbys til barn under fem år som bor i områder med høy risiko for smitte. Målet er å forebygge malaria ved å opprettholde en terapeutisk dose av antimalaria legemidler i blodet i perioder hvor malariarisikoen er høyt. SMC består av en kombinasjon med *sulfadoxine-pyrimethamine* og *amodiaquine*. [41]

Resistensproblematikken

Resistens mot antimalaria-legemidler defineres som en parasittstammes evne til å overleve eller formere seg, til tross for riktig administrering og absorpsjon av legemidler i anbefalte doser. Hovedårsaken til resistens skyldes behandlingssvikt, det vil si at man mislykkes med å fjerne malaria parasittene eller de kliniske symptomene. Tegn på økende resistens er en reduksjon i parasitt clearance og økt antall gametocytter i blodet. [6]

Dårlig compliance, dårlig legemiddelkvalitet, interaksjoner med andre legemidler, oppkast av legemidler, feildiagnostisering er eksempler på andre årsaker til resistensutvikling. Svikt i behandling er en stor trussel for både pasienten og for det lokale samfunnet på grunn av økt fare for spredning av både sykdommen og legemiddelresistensen. Når graden av resistens øker, vil oppblussing av sykdommen oppstå tidligere og tidligere og resultere i mindre eliminering eller økt formering av parasittene. [6,8]

Resistens har oppstått ved bruk av de fleste antimalaria-legemidlene (f. eks. artemisinin og dets derivater, klorokin, kinin), og har medført en økning i malarielatert mortalitet verden over, især Afrika. [42]. Ved delvis resistens mot artemisinin må "partnerlegemidlet" i ACT eliminere en større mengde parasittstamme enn ved ikke resistens. Dersom eliminering av parasittene er avhengig av et effektivt partnerlegemiddel, og det utvikles resistens mot dette, kan dette føre til en høyere risiko for behandlingssvikt. [8]

Det er blitt observert flere faktorer for legemiddelresistens hos malaria parasittene. Noen eksempler er:

- Mutasjonshastighet i parasitten
- Valg av legemiddel/ ulike behandlingsregimer
- Pasient compliance/ reinfeksjon

Per dags dato antas det at mutasjoner eller endringer i antall kopier av gener som påvirker legemiddelkonsentrasjonen ved target eller effluks-pumper har skyld i økning av resistens. [6] Kinins resistens antas å skyldes doseavhengig effekt og kort halveringstid, i tillegg til utstrakt behandling. Den økende legemiddel-resistensen mot de mest brukte behandlingsregimene krever nyere og avanserte terapeutiske strategier. Det ønskes progresjon i *drug discovery* og utvikling av et større utvalg av effektive, tilpassede og rimelige antimalaria legemidler. Andre strategier går på å gjøre befolkningen mer oppmerksomme på resistensutviklingen, opplæring av helsepersonell, adherence til behandlingen og vektorkontroll. [43]

Vaksine mot malaria

De fleste malaria dødstilfeller i Afrika oppstår hos barn i alderen under fem år. De som har vokst opp i malaria-endemiske områder fra barndommen av og fortsetter å bo på slike områder har, generelt lav risiko for å dø av malaria. Spedbarn og yngre barn i malaria endemiske områder i Afrika kan oppleve flere malaria episoder før de kan utvikle immunitet mot malaria. En slik immunitet kan i senere tid beskytte mot alvorlig malaria og død. Immunitet mot febril malaria utvikles gradvis gjennom barndommen og er derfor sjeldent å finne hos voksne. Ervervet immunitet mot malaria, via gjentatte infeksjoner, kan være kortvarig ved fravær av naturlig triggering (*exposure to natural boosting*). Derfor kan personer, som forlater områder med høy forekomst av malaria i lengre perioder, være utsatt for alvorlig malaria når de vender tilbake. På samme måte kan det i områder hvor transmisjonen er irregulær og hvor transmisjonen varierer fra år til år, være vanskelig å erverve immunitet. Ved gjentatt eksponering oppnås først beskyttelse mot alvorlig malaria, deretter mot symptomer/ sykdom ved malaria, og på sikt beskyttelse mot mikroskopisk påvisbare mengder parasitter. Noen kliniske manifestasjoner av malaria, som cerebral malaria, oppstår oftere hos eldre barn, både i områder hvor transmisjonen er sesongbasert eller flerårig. Livstruende alvorlig anemi kan ses hos yngre barn og er mer prevalent hvor malaria parasitt transmisjonen er intens og rundt hele året.[44]

Immunrespons mot malaria

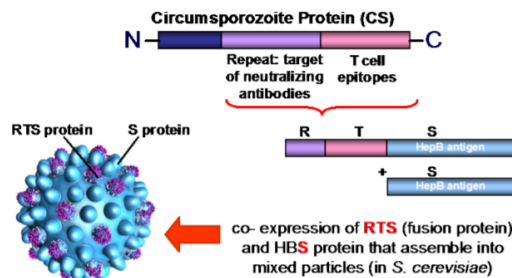
Etter gjentatt eksponering for *P. falciparum* malaria infeksjoner, utvikler individer en signifikant redusert risiko for utvikling av alvorlig sykdom eller død av senere parasittinfeksjoner. Mens immunitet mot *patent parasitaemia*, påvist ved mikroskopi, oppstår i voksen alder etter mange eksponeringer, kan *subpatente* infeksjoner fortsatt oppstå uten at den er direkte påvisbar. Dette kan muligens være en reaksjon på rester av parasitten fra forrige infeksjoner eller en reaksjon på antigener. I områder med moderat til høy transmisjonsgrad synker mortalitet av malaria ved rundt to års alderen. Insidens av akutt febril malaria synker senere i barndommen eller ungdoms alderen. Mekanismen for ervervet immunitet mot malaria er ikke fullstendig forstått. Det finnes to hoved-hypoteser, hvor den ene går ut på gradvis oppstått virusstamme-spesifikk immunitet. Den andre hypotesen går ut på at det trengs gjentatte antigen-spesifikke eksponeringer, muligens i kombinasjon med aldersrelatert immun modning, for å kunne utvikle immunitet mot malaria.[44]

Utvikling av malaria vaksiner er et resultat av mer kunnskap på mekanisme-nivå, samt stadig bedre global forståelse for viktigheten for å bekjempe alvorlige sykdommer slik som malaria. Mekanismene bak malaria er fortsatt uklare og det er nødvendig med mye forskning på dette feltet. Dette er krevende ikke minst siden dette innebærer et komplekst genom på ikke mindre enn 5000 gener.

Malariavaksinens mekanisme

Når myggen infiserer blodstrømmen med sporozoittene skjer det en rask migrering av sporozoitter til leveren (i løpet av noen få minutter til noen få timer). Antigener på overflaten til sporozoittene (CSP = circumsporozoite protein) eller på overflaten til infiserte hepatocytene er blitt benyttet som pre-erytrocytt-fase vaksine kandidater. En immunrespons rettet mot enten sporozoitt-fasen eller infisert hepatocyt kan i teorien beskytte mot utvikling av blod-fase infeksjoner. CSP er den predominerende overflate antigenet til sporozoittene og antistoffer mot CSP har vist seg å beskytte mot sporozoitt migrering og infisering av hepatocytene. Mer enn 30 *P. falciparum* malaria vaksine prosjekter er i

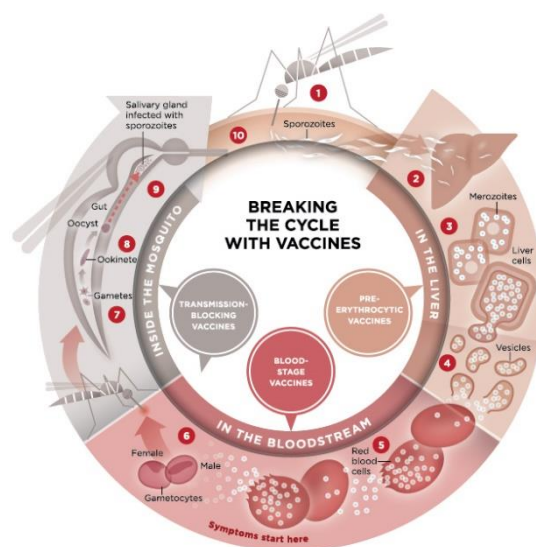
avanserte prekliniske og kliniske fase studier for evaluering. Så langt har det vist seg at kun en pre-erythrocytisk fase vaksine, RTS,S/AS01 (Mosquirix[®], GlaxoSmithKline), har fullført fase III evaluering med gode resultater.[44]



Figur 6: RTS,S rekombinant protein (virus-lignende partikkel).[45]

Den aktive substansen er et virus di-peptid lignende partikkel (figur 6), som består av et protein del fra sporozoitt (CSP) og amino-terminal endedel av hepatitt B virus, S protein. RTS, S består dermed av to proteiner (RTS og S) som aggregerer sammen intracellulært til en tredimensjonalt "ball" partikkel, bygget av bestemte forhold mellom de to proteinene. Disse partiklene har dermed en virus-lignende struktur.[45]

Denne vaksinen er den mest avanserte kandidaten mot *P. falciparum* myggen. Siden RTS,S /AS01 kun inneholder CSP malaria antigen, kan den utføre biologisk aktivitet kun ved å interferere i stadiene 1 og 2 i malaria livssyklusen (figur 7). På denne måten er det mulig å enten oppnå fullstendig beskyttelse mot lever-fase infeksjoner, og dermed redusere antall sporozoitt-infiserte hepatocytter, eller hemme utvikling av lever-fase infeksjoner delvis eller fullstendig. CSP er ikke uttrykt i blod-faser og dermed vil en RTS,S/AS01 immun respons ikke direkte påvirke blod-fasen i livssyklusen.[44]



Figur 7: Malaria livssyklus og tilhørende angrepspunkter til vaksiner. RTS,S/AS01 virker i stadiet 1 og 2.[46]

Fase III studieresultater for RTS,S /AS01

Fase III studien, finansiert av GlaxoSmithKline og *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH), ble utført i tidsrommet 2009-2014 i 7 områder sør for Sahara i Afrika (områdene ble delt inn i lav-, middels, og høy transmisjonsområder). Denne studien ble utført med omlag 15.000 spedbarn og barn. Barna ble delt inn i to målgrupper, de eldste barn mottok den første dosen med malariavaksine ved alderen 5-17 måneder. Spedbarn mottok vaksinen i kombinasjon med andre barnevaksiner ved alderen 6, 10 og 14 uker.[12,13,47]

Blant barn i alderen 5-17 måneder, som mottok tre doser med vaksiner med 1 måneds intervall, etterfulgt av den fjerde dosen ved 18 måneders alderen, ble malaria redusert med 39%. I tillegg reduserte vaksinen alvorlige malariatilfeller med 29%. Av de barna som ikke mottok den fjerde dosen, kunne man registrere tap av denne beskyttende gevinsten. Det kunne i tillegg ses en signifikant reduksjon av sykehusinnleggelse, som er nødvendige for blodtransfusjoner, påkrevd for å behandle livstruende malaria.[47,48]

Hos spedbarn virket ikke malariavaksinen tilstrekkelig nok for å kunne rettferdiggjøre videre bruk av vaksinen hos denne aldersgruppen. Mulige årsaker til dette kan være at spedbarn mottok andre type vaksiner i tillegg, som kunne ha forårsaket en interferens, hvis immunsystemet ikke var modnet tilstrekkelig. Vaksinen ble generelt godt tolerert og bivirkningene lignet på de som man kan få ved vanlige barnevaksiner. Hos eldre barn så man en økt risiko for febrile kramper innen 7 dager etter vaksinen. Hos spedbarn var denne risikoen kun tilstede ved administrasjon av den fjerde dosen. De febrile krampetilfellene ga ingen langvarige konsekvenser. Hos eldre barn ble det i tillegg funnet et moderat økt antall av tilfeller med meningitt og cerebral malaria.[47]

Malaria vaccine implementaion programme (MVIP)

I oktober 2015 ble det besluttet av WHO å starte et pilotprosjekt i bestemte områder i Ghana, Kenya og Malawi, hvor barn ved fem måneders alderen skulle få tre vaksiner med 1 måneds intervall, etterfulgt av den fjerde dosen som skulle gis 15-17 måneder etter den tredje dosen. Spedbarn ved alderen 6-12 uker var det ikke anbefalt å gi vaksine på grunn av lav effekt. Introduksjon av vaksineprogrammet startet januar 2019 og skal vare frem til 2022. GlaxoSmithKline utfører i tillegg en rekke fase IV studier i pilotområdene, som kreves som tilleggsdokumentasjon for effektiviteten og bivirkningene av vaksinen. Resultater fra pilotprosjektet og fase IV studiene vil bli benyttet av WHO til total evaluering av vaksines bruk.[11,47]

Antimalarialegemidler

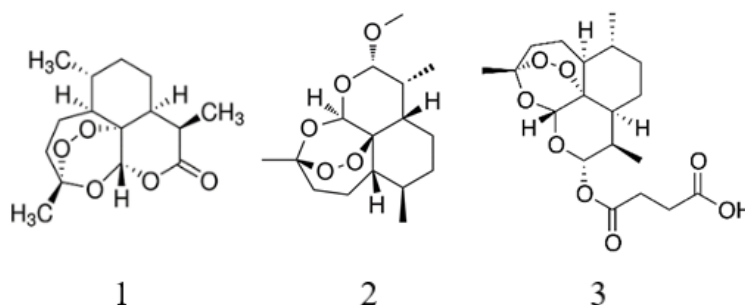
De fleste antimalariamidler angriper den *erythrocytiske* (eller blod-) fasen av malaria infeksjonen, det er denne fasen som gir symptomer hos den smittede. Til behandling benyttes artemisinin og ulike type derivater av artemisinin og chinchona alkaloider i tillegg til antifolater og tetrasykliner.[41]

I denne oppgaven fokuseres det hovedsakelig på virkningsmekanismene til chinchona alkaloidene og utvalgte syntetiske analoger. I tillegg blir det gitt en kort beskrivelse av virkningsmekanismene til artemisinin og artemisinin-derivater siden disse blir benyttet som førstelinjebehandling ved malaria. Virkningsmekanismene til chinchona alkaloidene analyseres grundig i resultat- og diskusjonsdelen.

Artemisinin og artemisinin-derivater

Behandling av malariasykdom startet med kinin. Etter flere år med utvikling og testing av syntetiske legemidler mot malaria, ble kinin erstattet med en annen plantebasert derivat kalt artemisinin.[9]

Artemisinin stammer fra planten *Artemisia annua*, et gammelt urt som ble benyttet til behandling av tilbakevendende feber i Kina. I 1970 ble urten gjenopplaget i Kina for dens effekt mot malaria.[49]



Figur 8: Artemisinin (1), artemeter (2) og artesunat (3). [50-52]

Grunnet lav biotilgjengelighet og lav løselighet av det aktive stoffet i både olje og vann var den terapeutiske nytten begrenset. For å øke løseligheten og dermed effekten ble det fremstilt en serie artemisinin-derivater. I 1973 ble det første semi-syntetiske derivatet dihydroartemisinin produsert, etterfulgt av flere hundretalls semi-syntetiske analoger (vedlegg 1). Disse inkluderer arteeter, artemeter, artelinat og artesunat og de beskrives samlet som første generasjons endoperoksider. Derivatene er meget effektive mot parasitter som er multiresistente mot andre legemidler. Mange av disse derivatene er mer lipofile enn artemisinin og har derfor en forbedret passiv diffusjon gjennom cellemembraner. For eksempel har arteeter en logP verdi på ca. 4 sammenlignet med artemisinin som har en logP verdi på ca. 3. Høy lipofilisitet er spesielt viktig i behandling av cerebral malaria.[9,49]

Artemisinin er en terpen med bestemt ringstruktur, der det er både en eter og perokside funksjonelle grupper på en ring struktur. Det er to karbonatomer i molekylet med 2 C-O bindinger (*endoperoksid*), noe som gjør molekylet meget ustabil og dermed meget reaktivt.

Virkningsmekanismen til artemisinin og artemisinin-derivatene er ikke fullstendig kartlagt. Det er likevel stor enighet om at den *endoperokside* funksjonelle gruppen spiller en viktig rolle for effekten og er dermed en viktig del av molekylets farmakofor (en samling av funksjonelle grupper i molekylet som gir biologisk aktivitet). Molekylet har en toksisk effekt på parasittene ved at det angriper direkte eller indirekte targetmolekylet. Det antas at stoffene har flere, brede og relativt uspesifikke effekter mot *Plasmodium* parasittene.[9,23] Noen av de foreslåtte virkningsmekanismene for artemisinin er beskrevet under.

Hem-veien (The hem pathway)

Antagelsen er at det dannes frie radikaler når endoperoksid spaltes til to C-O radikaler i parasitten. Dette fører til dannelse av metylradikaler som alkylterer intracellulært hem-jern.[49] Hemozoin kan ikke dannes med det alkylerte hem-jernet siden den ortogonale posisjon som brukes til å danne en binding mellom jern og en karboksylgruppe nå er koblet til en CH₃ gruppe. Det betyr at avgiftningsprosessen som forårsakes av parasitten blir hindret.

Protein alkylering

Produksjon av frie radikaler i parasitten kan i tillegg føre til dannelse av uønskede kovalente bindinger i andre molekyler i cellene, slik som i proteiner.[49] De to radikalene som fås ved spalting av σ binding i den *endoperokside*-enheten kan angripe en rekke bindinger i en rekke molekyler i cellen. Alkylering kan påvirke proteinenes funksjoner, slik som membranproteiner, proteaser som er involvert i nedbrytning av hemoglobin og en mengde andre cellulære enzymer.

PfATP6 hemming

PfATP6 er et viktig enzym knyttet til den oksidative metabolismeprosessen i parasitten. Enzymatisk hemming via artemisinin fører til en økning av Ca²⁺ inne i cytosolen som igjen fører til redusert celleoverlevelse.[49] For at artemisinin skal kunne hemme dette enzymet må molekylet først aktiveres av jern [9], det vil si en redoks reaksjon mellom den *endoperokside* enheten i molekylet og jern. Dette kan bety at den aktive formen av artemisinin som komplekserer seg med enzymet er sannsynligvis uten *endoperoksid* enhet. Det kan muligens være di-alkohol eller eventuelle eliminasjonsprodukter (eliminering av vann molekyler kan tenkes). Det vil igjen bety at legemidlet muligens er et prodrug hvis "prodrug" er et relativt mer stabilt molekyl. Ut fra det begrensende litteratursøket som ble utført i denne oppgaven fant vi ingen di-alkoholer og etylen derivater som kunne ha vært relevante her.

Effekt på mitokondriell funksjon

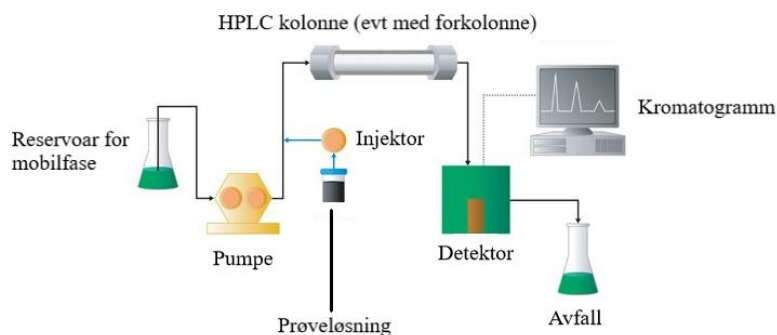
Artemisinin blir distribuert i parasittens mitokondrie, og svekker dens funksjon på grunn av produksjon av reaktive oksygen radikaler.[49]

Bakgrunnsteori for legemiddelanalyse

Kromatografi og spektroskopi i analyser

På samme måte som ekstraksjon er basert på en fordeling av én eller flere forbindelser mellom to væskefaser, er kromatografiske metoder basert på en fordeling av forbindelser mellom en stasjonær fase og en mobil fase, som enten kan være væske (*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)) eller bæregass (gass chromatography (GC)). Med kromatografi menes separasjon av ulike forbindelser etter deres evne til å danne interaksjoner med den stasjonære fasen, samt deres løsningskapasitet i løsningsmidlet. Til å begynne med var separasjon og deteksjon basert på farger (*chroma* på gresk). Navnet ble beholdt men separasjonsmetodene har utviklet seg dramatisk siden den først ble beskrevet av den russiske biokjemikeren M. S. Tswett i 1906.[53] I dag benyttes HPLC, hvor høyt trykk brukes for å tvinge løsemidlene med analyttene gjennom lukkede kolonner som består av fine partikler av silika- eller alumina-derivater. Som følge av dette kan det oppnås separasjon av ulike analytter på relativ kort tid. HPLC kan benyttes til både kvantitative- og kvalitative analyser av et bredt utvalg av forbindelser.

HPLC (figur 9) koblet til ulike spektroskopiske deteksjonsmetoder er blitt et viktig verktøy i utvikling av legemidler, separasjon av eventuelle kirale og diastereomeriske forbindelser, samt farmakokinetiske og farmakodynamiske studier. Det har vært en markant utvikling i ulike type kolonner og kolonnemateriale som kan benyttes til separasjonsanalysene, samt en forenkling av bruk av HPLC koblet til avanserte deteksjonsmetoder slik som MS og NMR. For rutine arbeid er det fremdeles mye bruk av UV detektorer.



Figur 9: Skjematisk fremstilling av komponenter i HPLC (etter Waters).[54]

UV/VIS spektroskopi er en metode som benyttes i legemiddelanalyse for både kvantitative- og kvalitative analyser. Stråling av et molekyl med lys kan føre til flere prosesser som høyner molekylets energi-nivå uten å bryte bindinger slik som absorpsjon, refleksjon, spredning, fluorescens, fosforescens; eller føre til bryting av bindinger og danne nye bindinger, slik som fotokjemiske reaksjoner. Energien til lysstråling er avhengig av strålingsfrekvens (bølgelengden).

Ved absorpsjon av energien vil elektroner flytte fra en orbital til en orbital med høyere energi, avhengig av kvantum av energien de er i stand til å absorbere. Ulike molekyler med ulike bindinger (og dermed

med ulike elektroner på ulike orbitaler og med ulike energi-nivå) vil ha ulike absorpsjons-adferd. I UV/VIS spektroskopi er det som regel mengden av absorbert lys (som sendes gjennom prøven) som måles og studeres.

Kvantitativ måling av analyttene ved hjelp av UV-detektor følger *Beers lov* (forutsetter monokromatisk stråling):[55]

$$A = a * b * c$$

hvor A er absorbansen, a er den molare absorptiviteten, b er lengden på strålingsveien gjennom prøven og c er konsentrasjon av analytten. Formelen viser at absorbansen er proporsjonal med konsentrasjonen av analytten i prøven. Når a og b er kjent kan formelen benyttes til å bestemme ukjente konsentrasjoner av et kjent stoff ved å måle stoffets absorbans. For analyse av stoff ved bruk av UV som detektor bør maksimal absorbans (a varierer lite i dette området) for stoffene bestemmes for å sikre optimal deteksjon. Ved hjelp av maksimal absorbans kan bølgelengdene justeres slik at målingene kan foretas i et smalt bølgelengdeområde.[55]

Kolonner

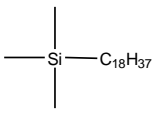
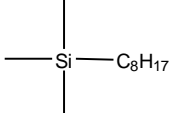
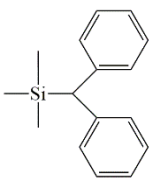
Kolonner som benyttes i HPLC har ofte en lengde på mellom 3-25 cm, og de er pakket med partikler (stasjonærfaser) vanligvis på størrelser 3-5 μ m. Indre diameter i HPLC kolonner kan typisk variere fra 2.1-4.6 mm. Hastigheten på mobilfasen (flow hastighet) kan ligge mellom 0.4-2 ml/min.[56]

Stasjonærfasen i kolonnen består vanligvis av mikroporøse partikler av ulike derivater av silika, alumina eller ulike andre forbindelser slik som kirale forbindelser. Silanolgrupper (SiOOH) kan modifiseres etter behov til ulike derivater med ulike kjemiske- og fysikalske egenskaper slik som polaritet, volum, lengde osv. C₁₈ er et standard silanol-derivat som er brukt mye i rutine HPLC-arbeid. HPLC kolonner er kostbare og degraderes lett av urenheter og partikler fra prøveløsningen eller mobilfasen. Forurensinger fra prøveløsninger eller mobilfaser kan i verste fall irreversibelt adsorbere seg til kolonnen.

Inngangen til kolonnen kan kobles til en kort forkolonne som inneholder den samme stasjonære fasen slik som i hoved-kolonnen. Forkolonne benyttes ofte når en hoved-kolonne har en lengde mellom 10-30 cm. Fine partikler og sterkt adsorberende stoffer holdes igjen i forkolonnen og dermed økes hoved-kolonnens levetid.

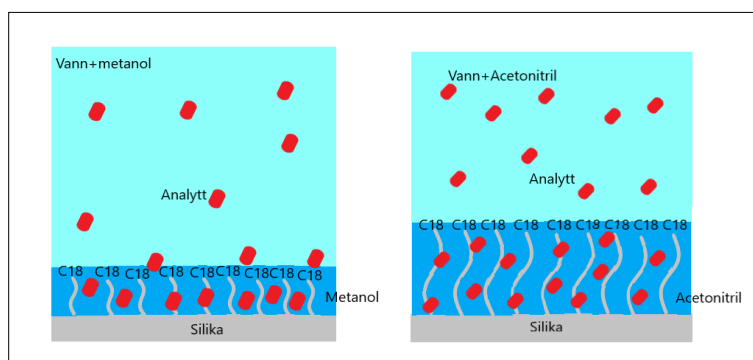
Bruk av kolonner der OH gruppene i silanolen er byttet ut med OR grupper, som O-C₁₈, kalles omvendt fase kolonner ettersom polariteten til adsorbenten reverseres fra å være meget polart silika materiale til upolare materiale avhengig av R gruppen som er valgt. Dermed vil hoved-interaksjonene mellom den stasjonære fasen og analyttene være av upolar karakter. Jo flere og bedre upolare interaksjoner, jo bedre vil analytten festes til den stasjonære fasen og øke retensjonstiden i kolonnen. Retensjonstiden er i tillegg avhengig av flere andre parametere som løsningsmidlets polaritet, flow hastighet, temperatur, trykk osv.

Tabell 3: Eksempler på hydrofobe funksjonelle grupper som benyttes i omvendt kromatografi. [55]

	Navn	Struktur
$R = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	Octadecyl, ODS eller C ₁₈	
$R = (\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	Octyl eller C ₈	
$R = (\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$	Difenyl	

Det er flere dynamiske prosesser som foregår i en kolonne og som totalt avgjør kvaliteten til separasjonen av analyttene:

- Dynamiske likevekter mellom eventuelle uladete formene av analyttens molekyler og deres korresponderende ladete former.
- Dynamiske likevekter mellom ulike konformasjoner (og dermed ulike topologier) av samme analyttmolekyl.
- Dynamiske likevekter mellom molekyler som er adsorbent på den stasjonære fasen og de som ikke er adsorbent (de frie).
- Dynamiske likevekter mellom molekyler som befinner seg i løsningsmidlet nær –OR gruppene og de som er i løsningsmiddelet utenfor dette området. Figur 10 illustrerer at karbonkjedene er mer utstrakte når acetonitril benyttes som mobilfase. I slike tilfeller vil analyttene i omvendt-fase kromatografi være bundet lengre til stasjonærfasen og retensjonstiden vil dermed øke.



Figur 10: Effektiviteten til C₁₈ kolonner med ulike løsemidler (etter Harris).[57]

Denne komplekse likevektssituasjonen er avhengige av mange faktorer som analyttens kjemiske- og fysikalske egenskaper, OR gruppene og deres tetthet, løsningsmiddelets polaritet, temperatur, trykk osv. Stasjonærfasen kan bli brutt ned etterhvert ved bruk av løsninger med for høye eller for lave pH verdier.

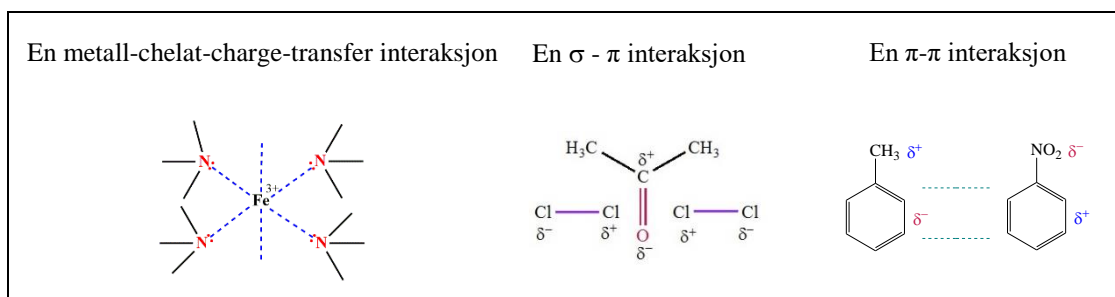
Tabell 4: Type bindingskrefter mellom analytt og stasjonærfase. [56]

Stasjonærfase	Interaksjoner			
	Hydrofobe	Van der Waals	π - π	Ioniske
C ₁₈	veldig sterk	svak	ingen	moderat
C ₈	sterk	svak	ingen	svak
Fenyl	moderat	svak akseptor	sterk donator	svak

De viktigste interaksjoner er som følger:

1. **Hydrofobe interaksjoner** oppstår mellom upolare molekyler der små forskjeller i elektronegativitet bidrar til små forskjeller i ladninger, δ^+ og δ^- .
2. **Van der Waals krefter** forårsakes av midlertidige dipoler som oppstår på grunn av ujevn fordeling av elektroner og protoner rundt kjernen til atomene. Når molekylene kommer i kontakt med hverandre, vil det midlertidige dipolet fra det ene molekylet indusere til motsatt dipolladning hos det nærliggende upolare molekylet. Dette fører til intermolekylære tiltrekninger, som i dette tilfelle kan forekomme mellom analytt- molekyler, mellom analytt og løsningsmidlet, mellom analytten og O-RC₁₈ enhetene osv.
3. **Charge-transfer** er intermolekylære bindinger som oppstår mellom atomer som har fulle orbitaler og atomer i andre molekyler som har frie orbitaler (donor akseptor kompleks). Charge-transfer kan også oppstå intramolekylært. Det finnes tre hovedtyper charge-transfer-komplekser, π - σ , π - π og *metall-kelet charge transfer* (figur 11):
 - a. **π - σ - interaksjon:** Donoren kan være et molekyl med ledige elektronpar (non-bondings elektroner), som oksygen-, svovel-, nitrogen- eller fosforforbindelser slik som, NH₃, H₂O, Cl₂, Br₂, mm..
 - b. **π - π - interaksjon:** En interaksjon mellom to aromatiske ringer, to alkener eller mellom en aromatisk ring og et alken. Dette er et resultat av oppståtte midlertidige dipoler.
 - c. ***metall-kelet charge transfer*** mellom atomer som har non-bondings elektroner, og metaller som har tomme orbitaler. Akseptorer kan være Fe²⁺, Fe³⁺
4. **Dipol-dipol-binding og dipol-ionebinding:** oppstår på grunn av relative store forskjeller i elektronegativitet, i legemidler er de viktigste atomene: oksygen, nitrogen og svovel men også halogener som ofte benyttes i en bestemt posisjon i molekyler for å redusere metabolisme *in vivo*.
5. **Ione-dipol-bindinger** ligner på dipol-dipol-bindinger, men er sterkere fordi ioner har større ladninger enn dipoler.
6. **Hydrogenbinding** er en meget viktig bindingsform i biologien, og er en type dipol-dipol-binding mellom et elektronegativt atom og et hydrogenatom som er bundet til et elektronegativt atom (for eksempel O, F og S).

Ionebinding eller polare bindinger mellom to ladede grupper med motsatte ladning er en relativ sterk binding som er viktig for mange legemiddel-target makromolekyl-komplekseringer. Bindingen dannes mellom to atomer (salter) eller to funksjonelle grupper med motsatte ladninger. Ionebinding oppstår også når molekyler blir protonert eller deprotonert i et vandig miljø, slik som ammonium og karboksylat gruppene i peptider.



Figur 11: Charge transfer interaksjoner.

Kolonnens oppløsningsevne

Oppløsningsevnen til en kolonne beskriver effektiviteten av en separasjon, det vil si hvor godt to eller flere topper separeres fra hverandre på kortest mulig tid, og kan defineres med følgende likning:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

hvor t_1 og t_2 er retensjonstidene til topp 1 og 2. w_1 og w_2 er bredden til topp 1 og 2 målt ved halve topphøyden. For kvantitative analyser er det ønskelig at oppløsningsevne ligger mellom 1,5-2,0, noe som betyr grunnlinjeseparasjon. Oppløsningsevnen forteller at separasjonen i kolonnen er avhengig av retensjonstider i kolonnen, kolonnens evne til å skille stoffene (selektivitet) og kolonnens evne til å gi smale topper (effektivitet).[56,57]

Mobilfaser

Mobilfase (-ne) i omvendt fase kromatografi er som regel en kombinasjon av polare og upolare blandinger av acetonitril, metanol, vann og tetrahydrofuran. Det benyttes sjelden en enkel løsemiddelkomponent som mobilfase. Mobilfasen kan bestå av 2 (binære mobilfaser) til 4 komponenter (kvarternære mobilfaser) og blandingsforholdet kan justeres for å få best mulig separasjon av analyttene med kortest mulig elueringsstid.

Elueringsstyrke er et mål på løsemidlets adsorpsjonsenergi på silika (tabell 5). Elueringsstyrken til løsemidlene øker med økende polaritet (mobilfasen blir mer polar) og påvirker retensjonstiden til analyttene i omvendt fase kromatografi. Jo høyere elueringsstyrke mobilfasen har, jo raskere vil den forflytte analytt-molekylene fra adsorbenten, noe som resulterer i at analytten elueres raskere ut av kolonnen. Som følge av dette vil retensjonstiden til analyttene forkortes.[56]

Tabell 5: Elueringsstyrke, polaritet og UV cut-off verdier til utvalgte løsemidler. [37,55]

Løsemiddel	Elueringsstyrke, ϵ°	Polaritet, log P	UV cut-off, nm
Vann (H ₂ O)	>>1	10.2	190
Metanol (CH ₃ OH)	0.70	5.1	205
Acetonitril (CH ₃ CN)	0.52	5.8	190

Ved valg av mobilfaser må det i tillegg tas hensyn til analyttens løselighetsgrad i løsningsmidlet, og ved bruk av HPLC med UV som detektor må det tas hensyn til at løsemidlene i mobilfasen har en lavere cut-off verdi (den laveste bølgelengden som kan benyttes sammen med løsemidlet) enn selve analytten. Hvis cut-off verdien er høyere enn analytten vil løsemidlet selv begynne å absorbere UV-lys og påvirke resultatet.[55]

Løsemidlene i tabell 5 har lav UV cut-off og er av den grunn velegnet for analyse av legemidler, siden de fleste legemidlene har UV-respons over 200 nm.[55] De er i tillegg lite toksiske og har lav- viskositet og kokepunkt. Viskositeten spiller en viktig rolle i HPLC, siden den påvirker trykket (lav viskositet gir lavt trykk).

Kombinasjoner av metanol, acetonitril og tetrahydrofuran sammen med vann eller vandig bufferløsning gir tilstrekkelig med dipolare interaksjoner eller hydrogenbindinger med analytten for å kunne forårsake separasjon i omvendt fase kromatografi. Metanol foretrekkes framfor acetonitril, siden metanol er kostnadseffektiv og har lavere toksisitet enn acetonitril.

Når det gjelder elueringsstyrke anslås det at 20% metanol i vann har samme elueringsstyrke som 14% acetonitril i vann.[56] Acetonitril i kombinasjon med vann er fordelaktig med tanke på trykk, siden den er mindre viskøs, og med tanke på UV-deteksjon, siden den har lavere cut-off enn metanol.

Bufferløsning tilsettes til mobilfasen når analytten inneholder ioniserbare funksjonelle grupper. Når det tilsettes bufferløsning i en mobilfase kan pH i mobilfasen påvirke retensjonen til stoffer som er syrer eller baser. For en base vil retensjonstiden avta med synkende pH i omvendt fase kromatografi.[55,57]

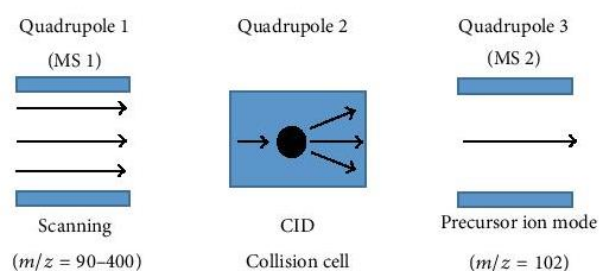
Massespektrometri

Massespektrometri (MS) regnes som en av de mest kraftfulle deteksjonsmetodene knyttet til kromatografiske analyser. Den mest vanlige metoden for å analysere organiske molekyler involverer bombardering av molekylene med stråling av elektroner med energi på 50-100 eV i høyt vakuum og videre analyse av de produserte positiv ladede fragmentene. Det er mulig å produsere negative ladede fragmenter men denne teknikken er mindre brukt. De positive fragmentene blir akselerert videre ved hjelp av en negativ ladet plate som fører dem mot detektoren, der de blir sortert etter deres m/z ratio. M^+ er masse til et molekyl som mister ett elektron og gir dermed en nøyaktig molekylær masse. I en del tilfeller blir molekylet fragmentert før M^+ kan måles. I slike tilfeller kan det hende at MS spektrum ikke inneholder molekylets masse. Dette er avhengig av molekylets bindings-stabilitet og hvor lett et molekyl kan fragmenteres eller ikke. Hydrogen transfer fra et molekyl til et annet kan også forekomme, som i sin

tur kan føre til at $(M+n)^{n+}$ kan bli detektert. Molekylstrukturbestemmelse ved hjelp av MS gjøres ved å ta utgangspunkt i molekylets fragmenter og deres isotop derivater.

To viktige MS metoder er Trippel-kvadrupol massespektrometri (TQMS eller MS/MS) og Time-of-flight massepektrometer (TOF).[56]

TQMS er en velegnet metode for kvantitative analyser på grunn av god deteksjonssensitivitet og høy grad av selektivitet. Masse-spektrometeret er bygget opp av tre kvadrupoler (Q_1 , Q_2 , Q_3) hvor masseanalysen foregår i Q_1 og Q_3 . Q_2 fungerer som en kollisjonscelle hvor det foregår fragmenteringen av molekyler og overføring av molekylioner til Q_3 (figur 12).[56,58]



Figur 12: Prinsipp for trippel-kvadrupol.[58]

I den første kvadrupolen filtreres og analyseres ionene hver for seg. I kollisjonscellen aktiveres molekylene ved at de tilføres energi fra eksterne gasser, som f.eks. nitrogengass. Gass molekylene kolliderer med ionene og fragmenterer dem videre. Denne prosessen kalles kollisjonsindusert dissosiasjon (CID). Her er det mulig å isolere ønsket ion som kan sendes til Q_3 for videre analyse.[56,58,59]

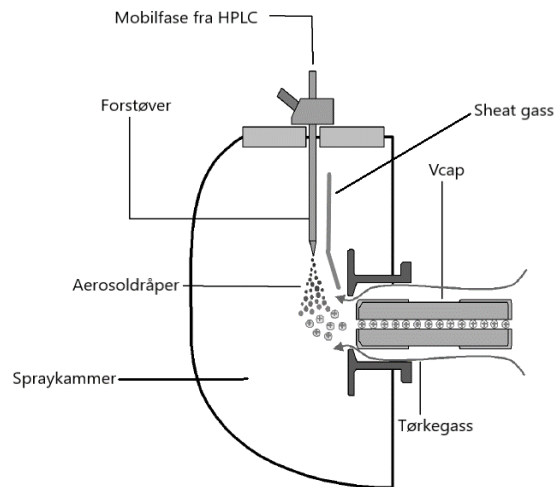
I denne oppgaven ble det benyttet (TOF) sammen med væskkromatografisk separasjon. TOF benyttes til å bestemme massene til ionene ut fra m/z ratio. Som ionekilde benyttes AJS-ESI (Agilent jet spray – electron spray ionisation), og følgende standardinnstillinger for ionekilden er vanlig:

Tabell 6: Oversikt over anbefalte innstillinger av parametere for spray kammeret.[56]

Parametere	
Tørkegass / L/min	7
Nebulisator / psi	50
Sheat gass temperatur / °C	400
Capillary Voltage / V	4000

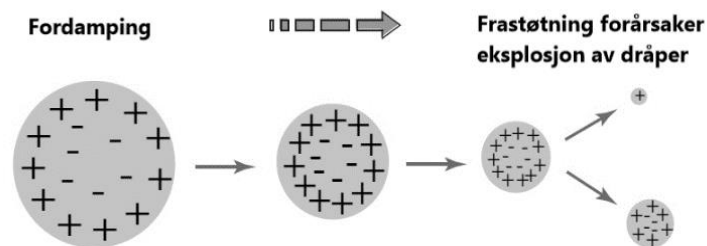
ESI (figur 13) er velegnet for forbindelser som har sure eller basiske funksjonelle grupper, og er en mild ioniseringsmetode og fragmentering av ionet forekommer svært sjelden. Dermed vil MS spektra bestå hovedsakelig av massen til ionet uten fragmenter sammenlignet med et massespekter hvor elektronionisasjon benyttes. For å kunne produsere et masse-spektrum til et molekyl, forutsettes det at

analytt-molekylet befinner seg i gassfase slik at de kan akselereres i et elektrisk felt, ioniseres, separeres og detekteres.[55-57]



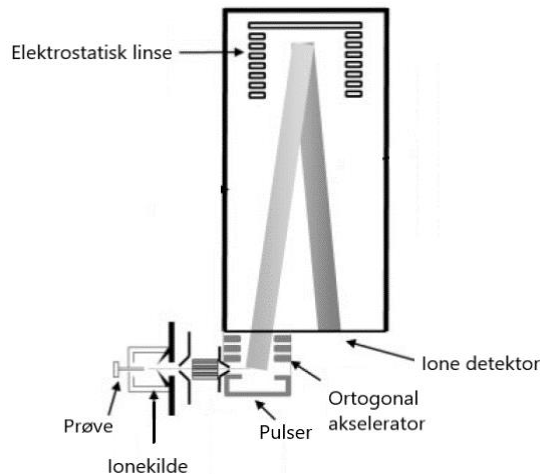
Figur 13: Oppsett av ionekilde i et masse MS instrument (etter Agilent). [60]

Ved bruk av MS må komponentene i mobilfasen og syren som benyttes til pH justering være flyktige (maursyre som ble benyttet i dette forsøket er flyktigere enn andre syrer). Mobilfasen fra HPLC føres inn i ionekilden sammen med tørkegass (nitrogengass, figur 13). Prøven forgasses slik at det dannes aerosoler og aerosol dråpene ioniseres (vanligvis til positive ioner) under svært lavt atmosfæretrykk. Før ionene kan nå masseanalysatoren må mobilfasevæsken fordampes. Tørkegass (nitrogen) damper bort overskuddet av væsken slik at diameteren til aerosol dråpene minsker fortløpende. Dette fører til at partikler med lik ladning trekkes nærmere hverandre. Når *Columb repulsion* blir lik overflatespenningen til dråpene, vil dette føre til at dråpene eksploderer til mindre dråper (figur 14). Denne prosessen gjentar seg til tettheten til ladningen når ca. 10^8 V/cm^3 slik at ionene trekkes mot kapillæret.[55,60]



Figur 14: Fordampningsprosessen (etter Agilent). [60]

Ionene fra ESI-ionekilden føres videre inn i et pulserende elektrisk felt som sender ionene oppover i et lufttomt sveverør (figur 15). I toppen av sveverøret sitter det en elektrostatiske linse som reflekterer ionene slik at de sendes videre til detektoren i bunnen av sveverøret. Den målte svevetiden gjennom røret er proporsjonal med ionenes masse-ladningsforhold.



Figur 15: TOF oppsett (etter Lacorte et.al.)[61]

Ionene fra et visst antall pulser, kalt transienter, blir kombinert til et fullt massespekter. Typisk summeres rundt 10000 transienter til et massespekter. Scan-raten tilsvarer da ett massespekter pr. sekund. Summen av alle ionene i dette massespekteret (totalionestrømmen) blir deretter til ett datapunkt i totalionekromatogrammet (TIC). Ved kobling til en LC får vi dermed kromatogrammer hvor den totale ionestrømmen er plottet som funksjon av separasjonstiden i kolonnen.

Masseområdet i TOF'en kan tilpasses til de massene som forekommer i analyseprøvene. Med innstilling for utvidet dynamisk område kan m/z -verdier opp til 3200 registreres. For optimal følsomhet og oppløsning bør likevel masseområdet tilpasses til de faktiske masse/ladnings-verdiene man har i aktuelle prøvene. I vårt tilfelle ble instrumentet kalibrert for positive ioner med masser opp til m/z 1700.

Et TOF-totalionekromatogram er generert fra mange massespektre. Disse spektrene inneholder bidrag fra både analytter og matrikskomponenter. Dette kan gi kompliserte kromatogrammer med mange topper. For å se bidraget fra analyttionene alene, er løsningen å ekstrahere utvalgte ionemasser fra TIC'en i form av såkalte «Extracted Ion Chromatograms (EIC)» - ekstraherte ionekromatogrammer. Ekstraksjonen skjer ved filtrering av TIC'en ved hjelp av programvarefunksjoner der de aktuelle ionemassene eller molekylformlene oppgis. Programvaren ekstraheres deretter de spesifiserte ionene og ionekromatogrammene plottes. I vårt tilfelle har vi ekstrahert ioner som tilsvarer de protonerte molekylmassene til chinchonaderivatene, rent spesifikt ionemassene $[M+H]^+$ og $[M+2H]^{2+}$. Ioner som ikke har de valgte ionemasser eller molekylformler vil ikke detekteres til tross for at de befinner seg i våre prøver.

Metoder

I dette avsnittet beskrives metodeutviklinger benyttet for kvantitative og kvalitative analyser samt metoder benyttet for kvantitativ separasjon av analyttene.

Det ble foretatt kvantitative renhetsanalyser ved hjelp av HPLC-UV og renhetene ble kvalitetssikret ved hjelp av LC-TOF og NMR. For å sikre at man fanget opp urenheterne for samtlige chinchona derivatene ble ionene fra TIC-kromatogrammet (LC-TOF) ekstrahert med molekylformlene til disse derivatene.

Kvantitativ separasjon av analyttene kinin og kinidin ble utført ved hjelp av HPLC-UV og fraksjonene ble senere analysert ved hjelp av NMR og LC-TOF. Både NMR og LC-TOF ble ikke grundig studert på grunn av oppgavens omfang.

Konformasjonsanalyse, SAR og mekanistiske studier av kinin, kinidin og noen utvalgte analoger, som utgjør mesteparten av denne oppgaven, er fremlagt i resultat- og diskusjonsdelen av denne oppgave. Vi anvendte kvalitative metoder for å legge vekt på fortolkning av innhentet studier fra ulike akademiske bøker, samt fagartikler fra forskjellige databaser slik som SciFinder, PubMed, Oria og Google Scholar. Programmet ChemDraw ble tatt i bruk for å tegne strukturene til de ulike legemidlene. Newman projeksjoner og MM2-beregninger ble brukt til å få innsikt i mulige konformasjonelle former av de utvalgte molekylene. Konformasjonene til molekylene ble bestemt ved å se på samtlige dihedral vinklene i molekylene og Newman projeksjonene ble i tillegg benyttet for å sikre riktig antall mulige konformasjoner. Molekyl modeller ble benyttet for å studere både molekylenes konformasjonell atferd, topologier og mulige interaksjoner (stabiliserende og destabiliserende).

Eksperimentell del

Det ble utviklet ulike type metoder for å analysere renhetsgradene til kinin, kinidin, dihydro- og demetoksy- derivatene, fra totalt 9 ulike produsenter som er gitt i tabell 7. Metoden som ga beste resultat fra de kvantitative analysene ble videre optimalisert og brukt for semipreparativ separasjon av analyttene. Under følger detaljerte beskrivelser for fremgangsmåter for alle analysemetodene foretatt for kvantifisering, kvalitetssikring, isolering og fraksjonering av kinin og kinidin. Renhetsgraden ble undersøkt ved bruk av både LC-TOF og NMR. NMR analysene ble utført av min veileder ved SINTEF Oslo og utvikling av metoder for NMR forsøkene ble ikke tatt med i denne oppgaven.

Utvalg av produkter fra ulike produsenter

Både kinin og kinidin, som benyttes i produksjon av medikamenter verden over selges til ulike priser og med ulik renhetsgrad. Siden produktene ikke er helt rene har vi i tillegg kjøpt inn dihydro- og demetoksy-derivater av chinchona for våre analyser. I tabell 7 er det listet opp stoffene vi analysert og navn på produsentene. Siden stoffene har nokså like molekylærmasser ble stamløsningene laget i gr, og antall mol er gitt i tabell 8 for ordenskyld.

Tabell 7: Oversikt over stoffer analysert i denne oppgaven (DHQN = dihydrokinin, DHQD = dihydrokinidin).

Kinin	≥ 99.00	Merck
	99, (opptil 5% DHQN)	Alfa Aesar
	≥ 98.00	Sigma-Aldrich
	99.00	Fluka Chemie AG
	99.00	Acros Organics
	98.00	BLD pharm
	97.00	Chemenu
	99.59	MedChemExpress
Kinidin	≥ 98.00 - ≤ 102.00	Alfa Aesar
	≤ 20.00 DHQD	Sigma-Aldrich
	98.00	Acros Organics
	98.00	Chemenu
	=/>98	Aldrich
Dihydrokinin	98	Sigma-Aldrich
Dihydrokinidin	95	Sigma-Aldrich
Kinkonin	=/>98	Sigma-Aldrich
Kinkonidin	96	Sigma-Aldrich

Forberedelse

Tilberedning av stam- og testløsninger

1. For både de analytiske- og semipreparative metodene ble det benyttet samme prosedyre for tilberedning av stam- og testløsninger for de ulike analyttene (tabell 8-10). Løsningene ble lagret i kjøleskap beskyttet mot lys.
2. For analytiske metoder ble det benyttet 1ml av testløsning og for semipreparative metoder ble det benyttet 1ml av ulike konsentrasjoner av henholdsvis stamløsning 1 og 2.
3. For samtlige analytiske metoder ble det i tillegg benyttet 1ml Milli-Q vann som blindprøve.
4. For å sikre reproduserbarheten av analysene ble både blindprøven og testløsningene kjørt med 3 replikater.

Tabell 8: Tilberedelse av stamløsning 1 i 100 ml metanol.

Analytt	Mengde analytt / g	Antall mol	Konsentrasjon / mol/L
Kinin / kinidin	0.1	3.08×10^{-4}	3.08×10^{-3}
Dihydrokinin / dihydrokinidin	0.1	3.07×10^{-4}	3.07×10^{-3}
Kinkonin / kinkonidin	0.1	3.39×10^{-4}	3.39×10^{-3}

Tabell 9: Tilberedelse av stamløsning 2 i 100 ml metanol.

Analytt	Mengde analytt / g	Antall mol	Konsentrasjon / mol/L
Kinin / kinidin	0.2	6.17×10^{-4}	6.17×10^{-3}

Tabell 10: Tilberedelse av testløsning.

Analytt	Mengde stamløsning 1 / ml	Mengde Milli-Q vann / ml	Konsentrasjon / mol/L
Kinin / kinidin	10	90	3.08×10^{-4}
Dihydrokinin / dihydrokinidin	10	90	3.07×10^{-4}
Kinkonin / kinkonidin	10	90	3.39×10^{-4}

Valg av mobilfaser og kolonner

Mobilfasene som ble benyttet til de analytiske metodene på HPLC-UV og LC-TOF bestod av 1L Milli-Q vann tilsatt 1ml maursyre (heretter mobilfase A) og 1L acetonitril tilsatt 1ml maursyre (heretter mobilfase B). Mobilfase A ble avgasset ved hjelp av ultralydbad (Branson® 2519 F-565). pH til mobilfase A ble målt til ca 3 ved hjelp av pH-meter (MeterLab®, PHM210).

Til semipreparative metoder på HPLC-UV ble det benyttet 1L metanol tilsatt 1ml maursyre (heretter mobilfase C). Metanol ble valgt til semipreparativ analyse siden den er mindre toksisk og mer kostnadseffektiv. Acetonitril og metanol har svært forskjellige kjemiske- og fysikalske egenskaper og begge løsningsmidlene ble prøvd ut, hver for seg med og uten maursyre, med henholdsvis mobilfase A, for å finne ut hvilken mobilfase-kombinasjon som gir beste separasjon av analyttene for de ulike metodene. Følgende kolonner ble benyttet for de ulike analytiske og semipreparative metodene:

Tabell 11: Benyttede kolonner. For fullstendig liste over spesifikasjoner se vedlegg 3.

Analytisk	Karboninnhold / %		Semi preparativ	Karboninnhold / %
C₁₈	15.5		Difenyl	13
C₁₈ HL	20			

Metodeutvikling for kvantitativ analyse på HPLC-UV

Gradient eluering for kvantitativ analyse på HPLC-UV

Det ble foretatt en test-analyse for å finne den omtrentlige mobilfase B konsentrasjonen som ga en akseptabel eluering av analyttene. Prøvene (blindprøve og testløsning) ble kjørt på analytisk C₁₈ kolonne ved 35°C og med mobilfasene A og B:

Tabell 12: Oversikt over metoder som ble utprøvd for kvantitativ analyse på HPLC-UV (injeksjonsvolum: 5 µl, flow hastighet: 1 ml/min, bølgelengde: 350nm).

Metode	Forhold mobilfase A : B	Gradient / %	Kjøretid / min
1	10 : 90	10 → 90 → 10	37

Etter å ha funnet mobilfase B forholdet som ga eluering av analyttene ble det kjørt nye analyser. Parametere var som på metodene over men bølgelengde på UV-detektor ble i første omgang satt til 250 nm.

Tabell 13: Oversikt over metoder som ble utprøvd for kvantitativ analyse på HPLC-UV.

Metode	Forhold mobilfase A : B	Gradient / %	Kjøretid / min
2	75 : 25	10 → 25 → 10	11

Bestemmelse av UV-absorbans

UV- absorbans ved pH ca 3 for de seks analyttene (kinin, kinidin, dihydrokinin, dihydrokinidin, kinkonin og kinkonidin) ble bestemt ved hjelp av UV-spektrometer (Helios Omega[®] UV-VIS), for å kunne velge maksimal mulig følsomhet. UV-spektrometer ble kalibrert med mobilfase A og spektrum ble tatt i området 200 - 500 nm. Prøvene bestod av 4.5 ml mobilfase A tilsatt 0.5 ml testløsning. Etter å ha funnet absorbansen for de 6 analyttene, ble UV-detektor satt til 235 nm og 250 nm for videre arbeid.

Isokratisk eluering for kvantitativ analyse på HPLC-UV

Etter å ha funnet den omtrentlige løsemiddelstyrken for å eluere analyttene ved hjelp av gradient eluering ble prøvene (blindprøve og testløsning) kjørt med isokratisk eluering på analytisk C₁₈ kolonne ved 35°C og med henholdsvis mobilfasene A, B og C, både med og uten maursyre. Metodene er vist på tabell 14 på neste side.

Tabell 14: Oversikt over metoder som ble utprøvd for kvantitativ analyse på HPLC-UV (injeksjonsvolum: 5 µl, flow hastighet: 1 ml/min).

Metode	Forhold mobilfase A : B	Forhold mobilfase A : C	Forhold mobilfase A : C uten maursyre	Kjøretid / min
3	85 : 15			15
4	90 : 10			15
5	85 : 15			7
6	80 : 20			10
7		80 : 20		30
8		70 : 30		15
9		75 : 25		10
10			85 : 15	45-90
11			70 : 30	10
12			50 : 50	15

Metodeutvikling for kvalitativ analyse på LC-TOF

Gradient eluering for kvalitativ analyse på LC-TOF

Prøvene (blindprøve og testløsning) ble i første omgang kjørt med gradient eluering på analytisk C₈ kolonne ved 35°C og med mobilfasene A og B.

Tabell 15: Oversikt over metoder benyttet til kvalitative analyser (injeksjonsvolum: 5 µl, flow hastighet: 0.4 ml/min).

Metode	Forhold mobilfase A : B	Gradient / %	Kjøretid / min
13	60 : 40	10 → 40 → 10	21
14	70 : 30	10 → 30 → 10	13

Videre analyser ble kjørt med analytisk C₁₈ kolonne slik at alle kvantitative og kvalitative analysene hadde samme forhold. Til denne metoden ble det valgt samme LC- parametere som for HPLC-UV.

Tabell 16: Oversikt over metoder benyttet til kvalitative analyser.

Metode	Forhold mobilfase A : B	Gradient / %	Kjøretid / min
15	75 : 25	10 → 25 → 10	13

Isokratisk eluering for kvalitativ analyse på LC-TOF

For kvalitativ analyse av fraksjonene fra den semipreparative metoden ble en analytisk C₁₈HL kolonne benyttet og metoden ble kjørt med isokratisk eluering.

Tabell 17: Oversikt over metoder benyttet til kvalitative analyser (injeksjonsvolum: 5 µl, flow hastighet: 0.4 ml/min, temperatur: 35°C).

Metode	Forhold mobilfase A : B	Kjøretid / min
16	85 : 15	10

Metodeutvikling for semipreparativ analyse på HPLC-UV

Den kvantitative metoden med analytisk kolonne ble videre effektivisert for semipreparativ separasjon med tanke på å oppnå like god separasjon mellom analyttene på kortest mulig tid og med lite mobilfaseforbruk.

For å finne den maksimale flow-hastigheten for den semipreparative kolonnen ble følgende oppskalerings-formel benyttet:[57] (Flow-hastighet 1 og radius 1(indre diameter) gjelder C₁₈ kolonne).

$$\frac{\text{flow-hastighet 2}}{\text{flow-hastighet 1}} = (\text{radius 2} / \text{radius 1})^2 = \frac{\text{flow-hastighet 2}}{1\text{mL/min}} = (10\text{mm} / 4,6\text{mm})^2 = 4,7 \text{ ml/min}$$

Ved hjelp av informasjonene fra oppskalerings-formelen og PrepMass [62] (tabell 18) ble det prøvd ut ulike metoder med mobilfasene A, B og C for å finne den metoden som ga god separasjon av kinin og kinidin.

Tabell 18: Oversikt over anbefalte parametere for oppskalering, etter PrepMass. [62]

	C ₁₈ analytisk	Difenyl
Indre diameter / mm	4.6	10
Lengde / cm	10-15	10
Partikkelstørrelse / µm	5	5
Mobilfaser	acetonitril/vann	metanol/vann
Flow hastighet / ml/min	1	4.7
Loading / mg/ml	0.1	0.5
Injeksjonsvolum / µl	5	23.6

Prøvene (blindprøve og fortyninger av henholdsvis stamløsning 1 og 2) ble kjørt med isokratisk eluering ved 35°C.

Tabell 19: Oversikt over benyttede metoder for semi-preparativ analyse.

Metode	Mobilfase forhold A : C	Injeksjonsvolum / μ l	Flow hastighet / ml/min	Kjøretid / min
17	70 : 30	50	3	20
18	75 : 25	50	3	20
19	80 : 20	50	3	20

Det ble dessuten foretatt analyser med ulike konsentrasjoner av stamløsning 1 for å se hvor mye "masse-loading" kolonnen tålte. Prøver fra stamløsningen ble fortynnet med mobilfase A til ulike konsentrasjoner:

Tabell 20: Oversikt over metoder som ble benyttet med ulike konsentrasjoner av analyttene.

Metode	Analytt konsentrasjon / mg/ml	Mobilfase forhold	Injeksjonsvolum / μ l	Flow hastighet / ml/min	Kjøretid / min
20	0.5	75 : 25	50	3	20
21	0.5	75 : 25	50	4	20
22	0.5	70 : 30	50	4	20
23	0.5	70 : 30	50	3	20
24	0.6	75 : 25	50	4	15
25	0.7	75 : 25	50	4	15
26	0.8	75 : 25	50	4	12
27	0.7	75 : 25	25	4	14

Etter å ha funnet maksimal *loading* og injeksjonsvolum som ga god separasjon med metanol ble det kjørt nye analyser med stamløsning 2. Stamløsningen ble fortynnet med mobilfase A slik at konsentrasjonen til prøven ble 1,4 mg/ml.

Tabell 21: Oversikt over metoder som ble benyttet med ulike injeksjonsvolumer.

Metode	Mobilfase forhold A : C	Injeksjonsvolum / μ l	Flow hastighet / ml/min	Kjøretid / min
28	75 : 25	25	4	14
29	75 : 25	50	4	14

Det ble i tillegg foretatt analyser på en semipreparative C₁₈ kolonne. Metodene ble kjørt med isokratisk eluering ved 35°C. Grunnet dårlige resultater ble disse metodene ikke tatt med i denne oppgaven.

Metodeutvikling for kvalitativ analyse av fraksjonene på LC-TOF

Etter å ha funnet den mest egnede semipreparative metoden for våre analytter, ble det foretatt en test-fraksjonering av kinin og kinidin ved hjelp av fraksjonsoppsamleren (Shimadzu FRC-10A) på HPLC-UV. Med tanke på "storskala" fraksjonering av ren kinin og kinidin må det foretas flere injeksjoner. For å sikre at fraksjonsnålen ikke tar med seg urenheter fra den forgående injeksjonen ble det samlet opp fraksjoner med blindprøver (Milli-Q vann) før og etter fraksjonering av analyttene. Denne prosedyren ble kun benyttet for den første test-fraksjoneringsprosessen. Testfraksjonene og blindprøven ble oppkonsentrert og kvalitetssikret på LC-TOF før det ble foretatt "storskala" fraksjoneringsprosesser av kinin og kinidin.

Tabell 22: Oversikt over analyse og fraksjoneringstid for kinin. Analysene ble kjørt i 12 minutter.

Kjøring nr	Fraksjon	Vial åpnet ved tiden / min	Vial stengt ved tiden / min
1	1	6.75	7.25
2	2	7.25	7.75
3	3	7.75	8.25
4	4	8.25	8.75

Tabell 23: Oversikt over analyse og fraksjoneringstid for kinidin. Analysene ble kjørt i 14 minutter.

Kjøring nr	Fraksjon	Vial åpnet ved tiden / min	Vial stengt ved tiden / min
1	1	7.00	7.50
2	2	7.50	8.00
3	3	8.00	8.50
4	4	8.50	8.75

Oppkonsentrering og kvalitativ analyse av test-fraksjonene

Blindprøven og test-fraksjonene av kinin og kinidin ble oppkonsentrert ved hjelp av sentrifuge-inndamper (Labconco – CentriVap® Concentrator). Fraksjonene (4 glassrør) ble dampet inn ved 80°C i 90 min ved lavt trykk. Konsentratet ble overført til 3 HPLC vials og kvalitativ analyse av konsentratene ble foretatt på LC-TOF med C₁₈ HL kolonne. Til dette formålet ble metode 16 benyttet.

Etter at konsentratet av blindprøven og test-fraksjonene ble verifisert for renhet ble det foretatt fraksjonering av kinin og kinidin for kvantitative analyser på NMR.

Tabell 24: Oppsett for fraksjonering av kinin og kinidin.

	Antall injeksjoner	Kjøretid pr injeksjon / min	Vial åpnet ved tiden / min	Vial stengt ved tiden / min
Kinin	100	12.00	6.25	9.00
Kinidin	100	14.00	7.00	9.00

Prøveopparbeidelse og pH justering av fraksjonene

Prøveopparbeidelse er en flertrinns prosess som er påkrevet for å omdanne en prøve slik at den blir egnet for videre analyse. Trinnene kan blant annet bestå av oppløsning av prøven, ekstraksjon av analytten fra en kompleks matriks og oppkonsentrering av ekstraksjonen.[57]

Væske-væske ekstraksjon (LLE, liquid-liquid extraction) er en klassisk prøveopparbeidelses metode som benyttes blant annet for å ekstrahere en ønsket analytt fra en løsning eller fjerne urenheter som kan interferere med analytten. Ved LLE benyttes to ikke blandbare flytende løsningsmidler for å utføre en ekstraksjon og separasjon. Fasene består vanligvis av en vandig komponent og en organisk komponent. Analytten må ha en høyere løselighet i en av fasene siden analytten vil distribuere seg selv i begge fasene avhengig av den relative løseligheten i hver fase. For analytter med syre eller base egenskaper må pH i den vandige løsningen bestemmes, for så justeres slik at analytten foreligger i uionisert form hvis man ønsker oppkonsentrering i organisk fase. Denne pH justeringen øker løseligheten av den uioniserte analytten til den organiske fasen.[63]

Kinin og kinidin foreligger som salter (kininformat og kinidinformat) siden de er oppløst i metanol/vann tilsatt maursyre. pKa verdiene til kinin og kinidin (4.2 og 9.05) tilsier at pH må justeres opp til 10 (helst til ca. 11 siden denne pH er isoelektrisk punkt for kinin og kinidin). 3M (12 g) natriumhydroksid (NaOH) ble oppløst i 100ml Milli-Q vann. 15-20 dråper (ca. 1 ml) av denne løsningen ble tilsatt til ca. 45 ml fraksjonsløsningen og blandet godt. pH til løsningen ble målt til over 10 ved hjelp av pH papir.

Væske-væske ekstraksjon og oppkonsentrering

Ekstraksjons-fasen ble utført i tre trinn, hver med 50 ml kloroform, siden kinin og kinidin er godt løselig i dette løsningsmidlet (se vedlegg 3 for kjemiske og fysikalske egenskaper). En fraksjons-løsning på 200 ml ble ekstrahert med 50 ml kloroform og deretter separert. Resterende 200 ml fraksjons-løsning ble ekstrahert en gang til med 50 ml kloroform løsning. De vandige fasene ble slått sammen og ekstrahert på nytt med 50 ml kloroform. Den endelige organiske ekstraksjons-fasen bestod av totalt 150 ml kloroform-løsning. Kloroform løsningen ble overført til en kolbe og den ble oppkonsentrert ved bruk av en rotavapor (VWR-IKA® HB 10) ved 35 °C med 300 runs per minutt (RPM). Etter ca. 7 minutter ble ekstraktet overført til glassrør og kjørt i sentrifuge- inndamper. Ekstraktet ble videre overført til HPLC vials og lagt til inntørking i avtrekksskapet, pakket med aluminiumsfolie beskyttet mot lys. Det inntørkede stoffet ble etterpå oppbevart i kjøleskap for senere analyser med NMR.

Resultater og diskusjon

I denne oppgaven er det valgt å dele resultater og diskusjon i 2 hoved deler:

Del 1: Resultater fra den eksperimentelle delen

1. Kvantitativ renhetsanalyse ved bruk av HPLC-UV
2. Kvalitativ analyse ved bruk av LC-TOF
3. Renhetsanalyse ved bruk av NMR.
4. Kvantitativ separasjon ved bruk av HPLC-UV
5. Kvalitativ analyse av testfraksjonene ved bruk av LC-TOF
6. Renhetsgrad-analyse ved bruk av NMR.

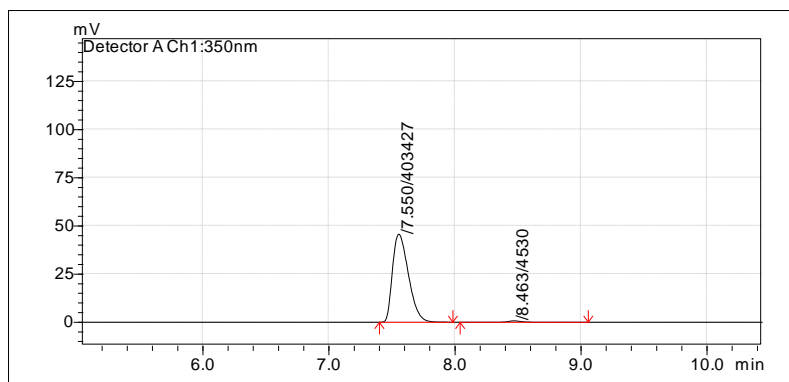
Del 2: Konformasjonsanalyse, SAR og mekanistiske studier

1. Introduksjon til chinchona alkaloider
2. Konformasjonsanalyse av chinchona derivater
3. SAR analyse og mekanistiske studier av chinchona derivater
4. SAR analyser og mekanistiske studier av syntetiske analoger

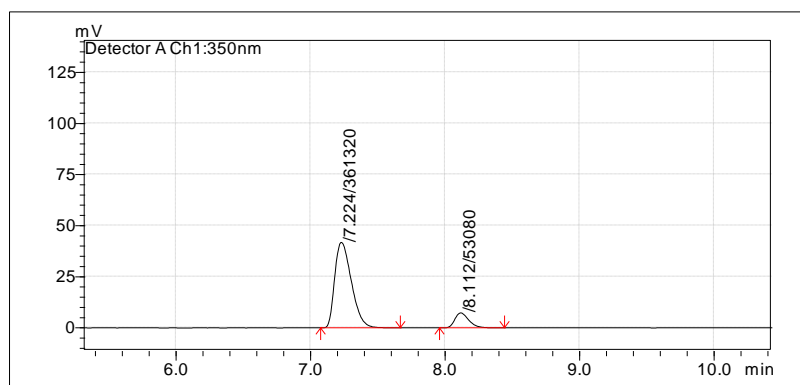
Del 1: Resultater fra den eksperimentelle delen

1.1 Kvantitativ renhetsanalyse ved bruk av HPLC-UV

For den kvantitative analysen av kinin, kinidin, dihydrokinin, dihydrokinidin, kinkonin og kinkonidin ble det totalt utprøvd 12 ulike separasjons-metoder som bestod av gradient- og isokratisk eluering med mobilfase A, B og C, både med og uten maursyre. Resultatene fra metode 2 med gradient eluering er vist under:

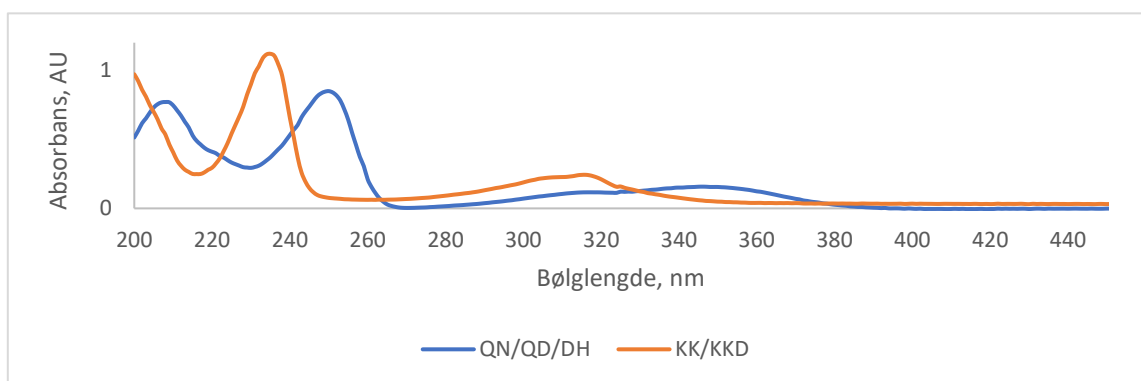


Figur 16: Kinin (t_R 7.5min) og dihydrokinin (t_R 8.4min), t_R = retensjonstid



Figur 17: Kinidin (t_R 7.2min) og dihydrokinidin (t_R 8.1min).

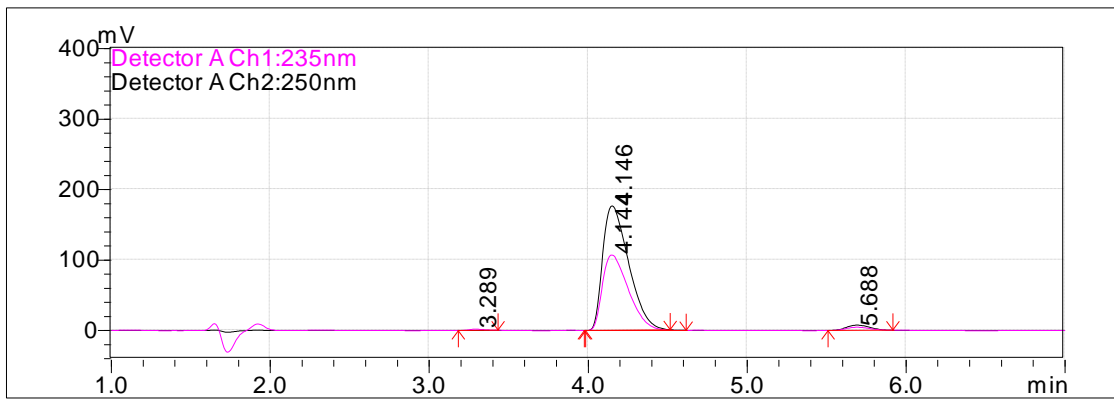
Videre kvantitative analyser ble utført ved bølglengdene 235 nm og 250 nm etter å ha målt maksimal UV absorpsjon for de 6 analyttene ved pH ca 3.



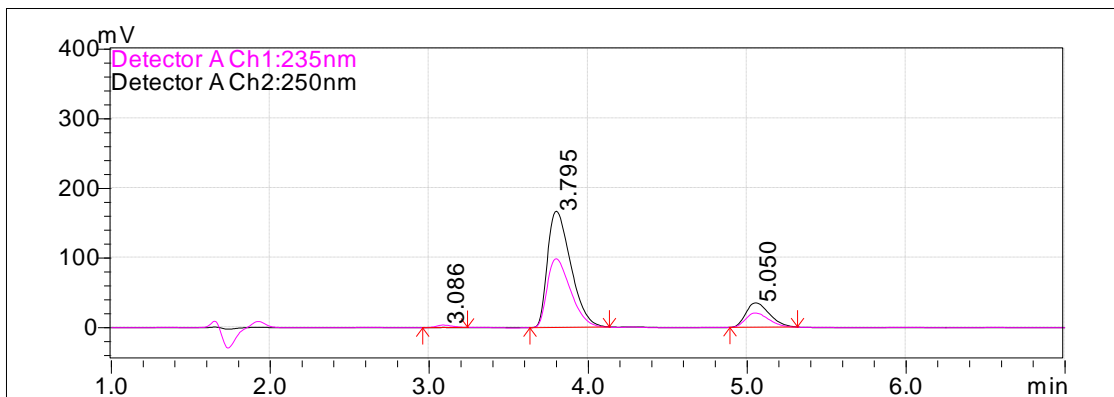
Figur 18: Kinin (QN), kinidin (QD) og dihydro-derivatene (DH) har maksimal absorpsjon ved 250 nm og 350 nm. Kinkonin (KK) og kinkonidin (KKD) har maksimal absorpsjon ved 235 nm og 315 nm.

Metode 3 til 6 ble kjørt med ulike konsentrasjoner av mobilfase A og B og isokratisk eluering. Av disse 4 metodene viste det seg at metode 5 ga den beste separasjonen av analyttene, med gode oppløsningsevner og på kortest tid. I og med at programvaren (Labsolutions) justerer y-aksen etter største topp i kromatogrammet er noen av kromatogrammene ikke direkte sammenlignbare med tanke på skalering. Kromatogrammene i denne oppgaven ble benyttet for å finne metoder som gir rask eluering og god grunnlinjeseparasjon av de ulike derivatene. Kromatogrammene ble ikke benyttet for å sammenligne eller beregne arealforholdene til toppene for de ulike metodene, men snarere for å finne de beste betingelsene som videre kunne optimaliseres til kvantitativ separasjon.

Resultater fra metode 5 er på vist på neste side.

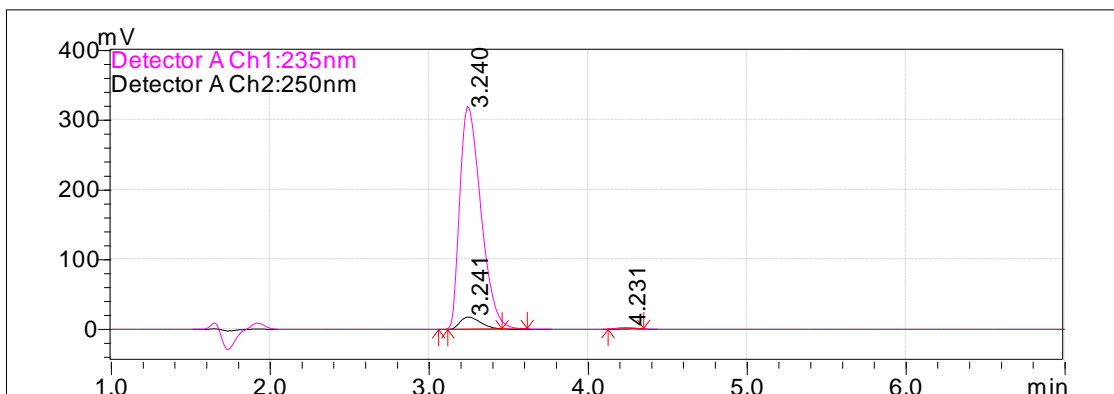


Figur 19: Resultat for kinkonidin (t_R 3.2 min), kinin (t_R 4.1 min) og dihydrokinin (t_R 5.6 min).

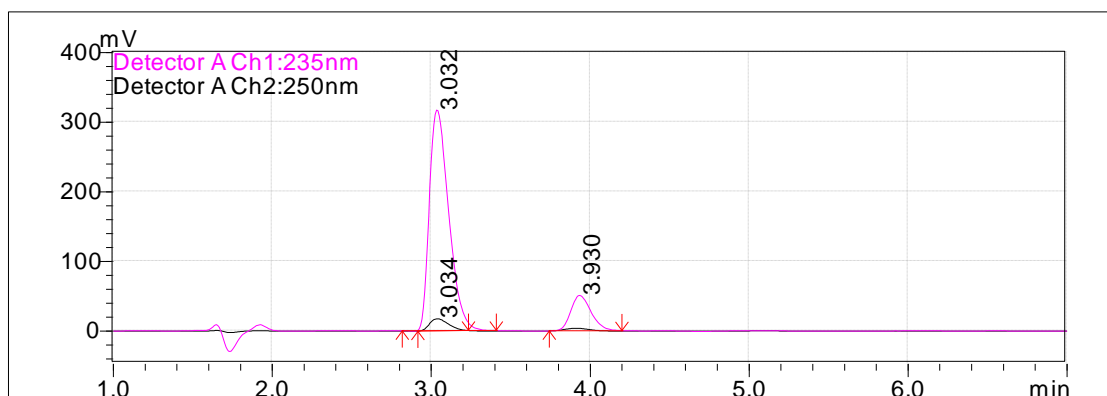


Figur 20: Resultat for kinkonin (t_R 3.0 min), kinidin (t_R 3.8 min) og dihydrokinidin (t_R 5.0 min).

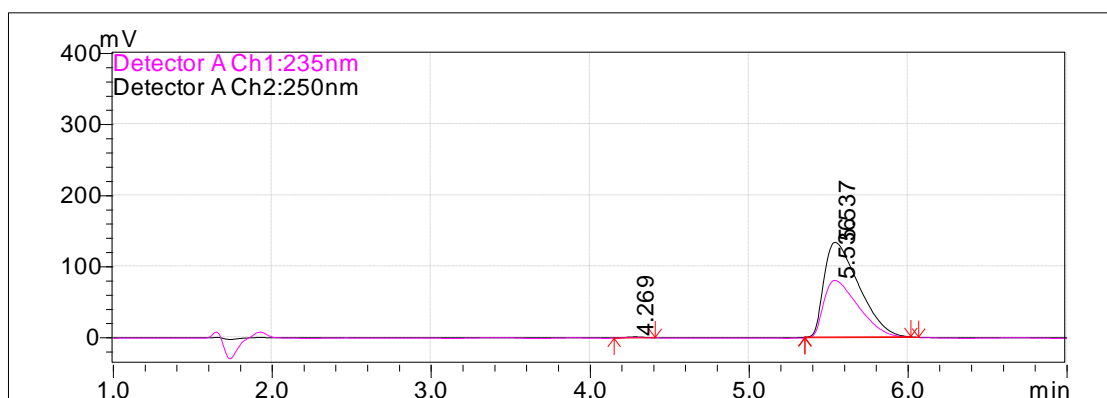
Metode 5 ble i tillegg benyttet for å analysere derivatene til henholdsvis kinin og kinidin. Resultatene for kinkonin, kinkonidin og dihydro-derivatene er vist i figurene 21-24.



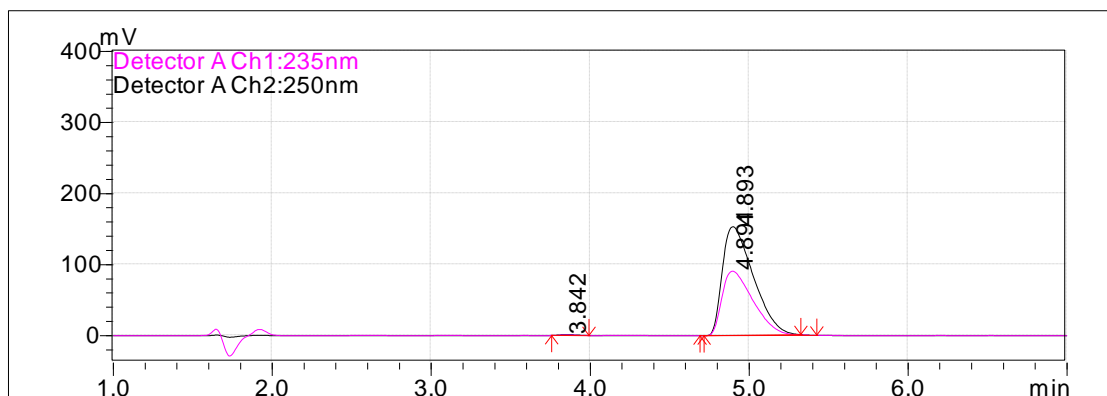
Figur 21: Resultat for kinkonidin (t_R 3.2min) og kinin (t_R 4.2 min).



Figur 22: Resultat for kinkonin (t_R 3.0 min) og kinidin (t_R 3.9 min).

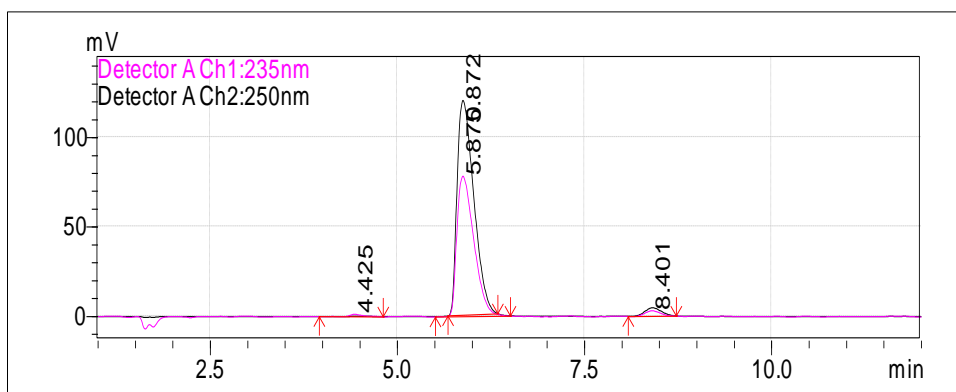


Figur 23: Resultat for dihydrokinin (t_R 5.5 min) og kinin (t_R 4.2 min)

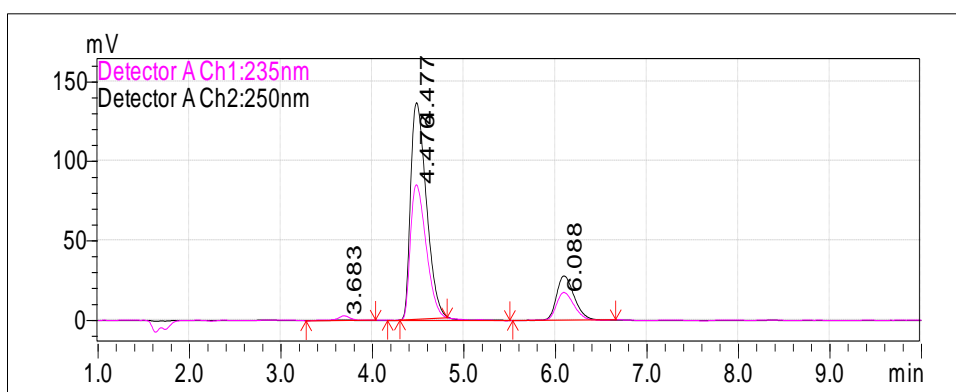


Figur 24: Resultat for dihydrokinidin (t_R 4.8 min) og kinidin (t_R 3.8 min).

Metode 5 ble videre benyttet for kvantitative analyser av alle 6 analyttene på HPLC-UV. Med tanke på miljøet og økonomien i forbindelse med kvantitativ separasjon av kinin og kinidin, ble det utført analyser med metanol i kombinasjon med Milli-Q vann, begge tilsatt maursyre (metode 7-9). Til dette formålet ble det benyttet isokratisk eluering. Metode 9 ga best resultat for videre utprøving på semipreparativ difenyl kolonne. Resultatene for analytisk C_{18} kolonne er vist i figurene 25-26.

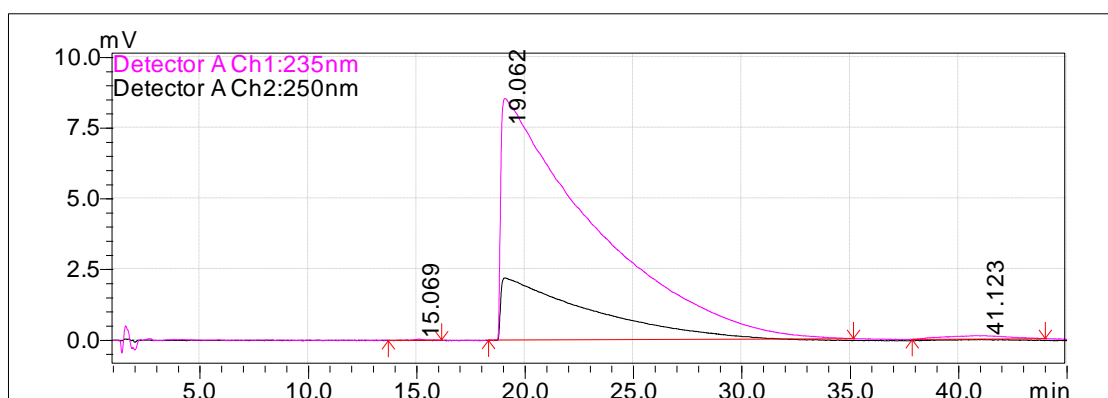


Figur 25: Resultat for kinkonidin (t_R 4.4 min), kinin (t_R 5.8 min) og dihydrokinin (t_R 8.4 min).

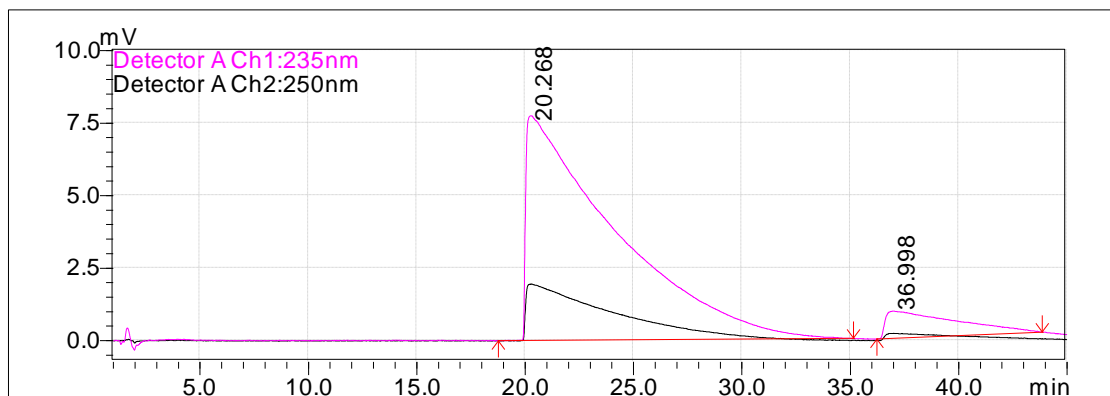


Figur 26: Resultat for kinkonin (t_R 3.6min), kinidin (t_R 4.4min) og dihydrokinidin (t_R 6.0min).

Målet med separasjon av kinin og kinidin var å få de separert i størst mulig mengde, og i ren og nøytral form. For å unngå å få analyttene i deres saltform ble det forsøkt å få til en separasjon av analyttene uten tilsatt maursyre, først på en analytisk kolonne, ved å benytte ulike konsentrasjoner av metanol. Det ble benyttet en analytisk C_{18} kolonne, og resultatene for metode 10 er vist i figurene 28-29.



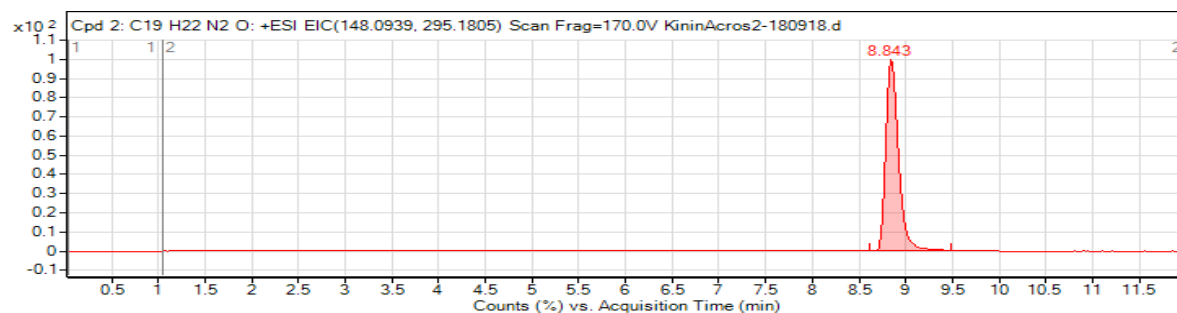
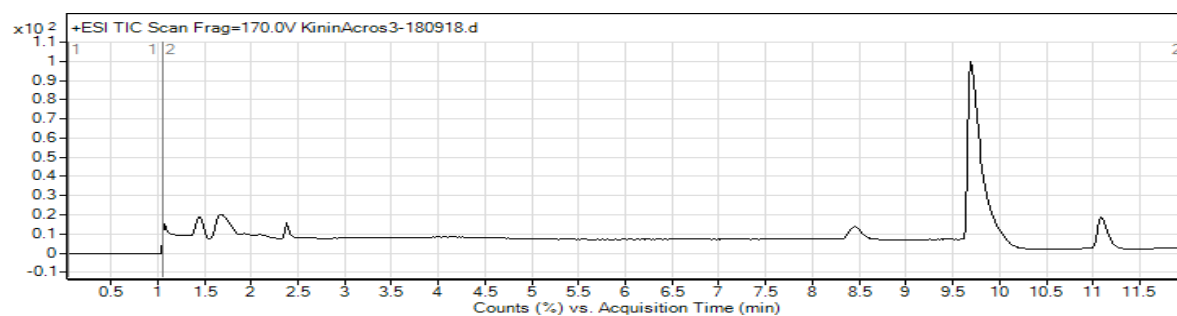
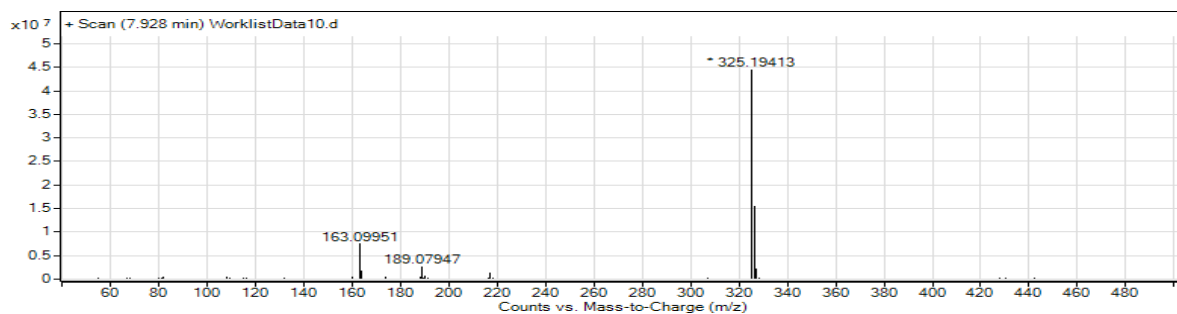
Figur 27: Resultat for kinkonidin (t_R 15.0 min), kinin (t_R 19.0 min) og dihydrokinin (t_R 41.1 min).

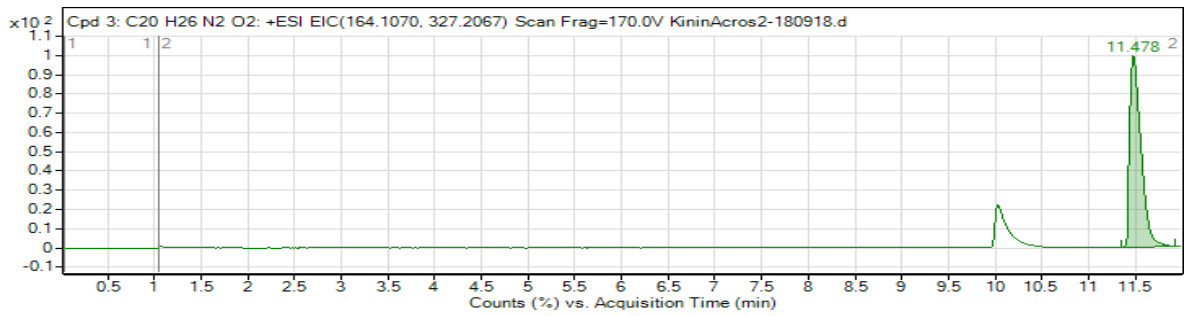
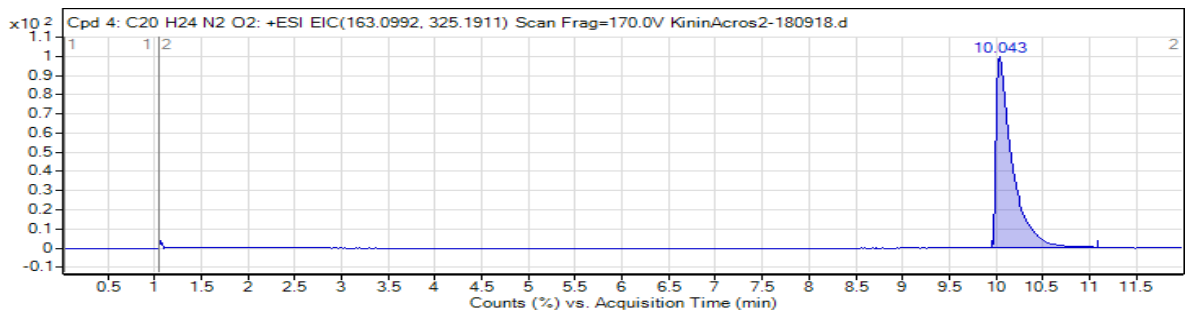


Figur 28: Resultat for kinidin (t_R 20.2 min) og dihydrokinidin (t_R 36.9 min).

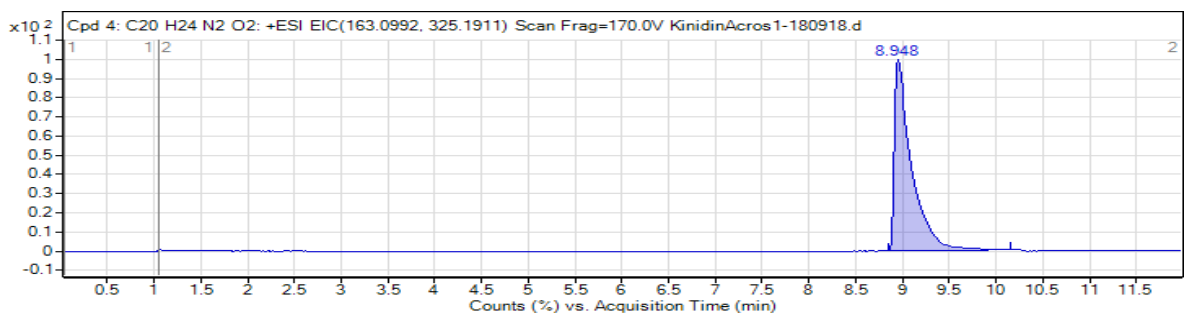
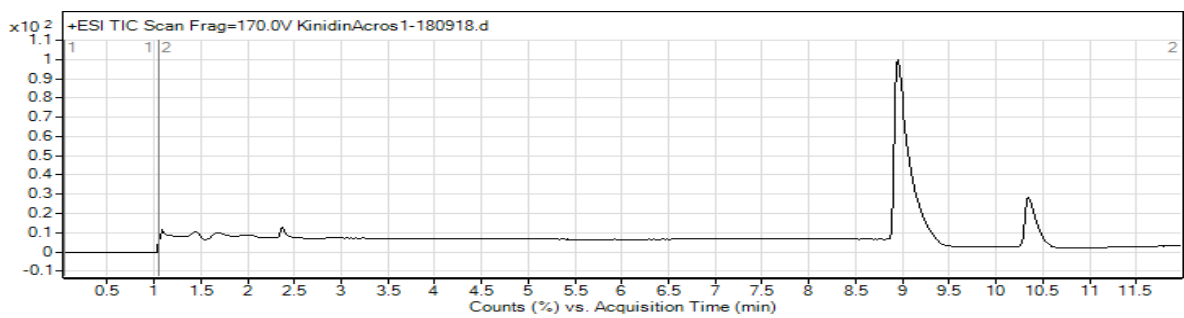
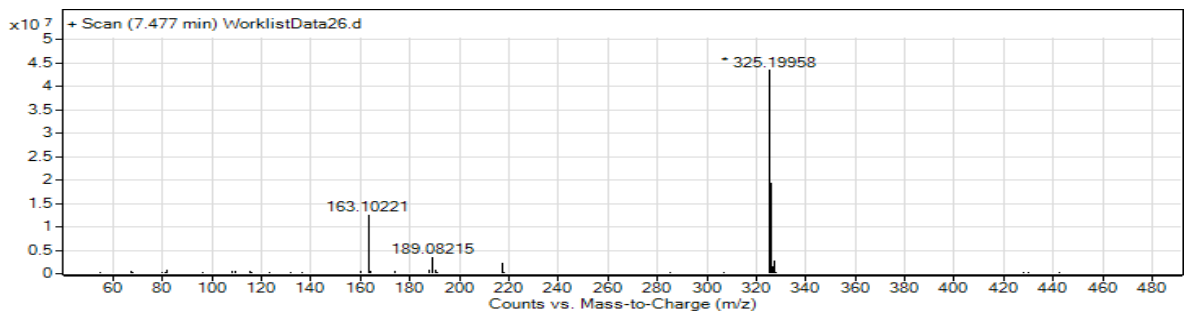
1.2 Kvalitativ renhetsanalyse ved bruk av LC-TOF

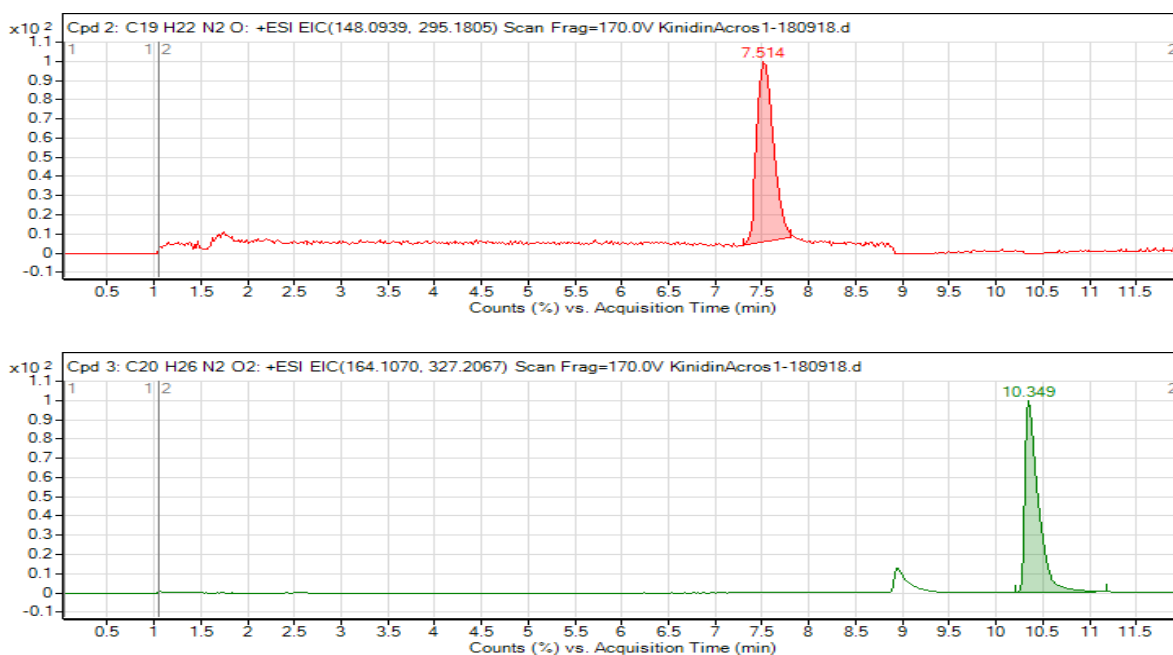
For den kvalitative analysen av stoffene fra de ulike produsentene ble det prøvd ut 3 ulike metoder med mobilfasene A og B. Det ble kjørt gradient eluering (metode 13-15) på samme analytisk C_{18} kolonne som det ble brukt på HPLC-UV. Resultatene for metode 15 for kinin og kinidin er vist under:





Figur 29: Monoisotopisk masse ((M⁺H) og (M+2H)²⁺), TIC og ECI resultater for kinkonidin (t_R 8.8 min, rød), kinin (t_R 10.0 min, blå), dihydrokinin (t_R 11.4 min, grønn).





Figur 30: Monoisotopisk masse ((M^+H) og $(M+2H)^2$) TIC og ECI for kinkonin (t_R 7.5min, rød), kinidin (t_R 8.9min, blå), dihydrokinidin (t_R 10.3min, grønn).

1.3. Renhetsgradsanalyse ved bruk av NMR

Renhetsgraden av analyttene ble i tillegg analysert ved bruk av NMR og resultatene ble sammenlignet med resultatene fra HPLC-UV metoden. Resultatene er oppsummert i tabell 25 og 26.

Produsent	HPLC-UV resultater / %			NMR resultater				
	Kinkonidin	Dihydrokinin	Kinin	%	CH-2'	CH-8'	CH-10	CH ₃ -11
Acros	0.44 ± 0.08	3.88 ± 0.31	95.68 ± 0.39	4,37	1.044	1.044	1.000	0.131
Alfa Aesar	0.37 ± 0.04	3.95 ± 0.13	95.68 ± 0.13	4,37	1.037	1.038	1.000	0.131
BLD	0.89 ± 0.08	3.81 ± 0.32	95.30 ± 0.31	4,20	1.038	1.037	1.000	0.126
Chemenu	0.92 ± 0.09	3.68 ± 0.16	95.40 ± 0.25	4,23	1.039	1.038	1.000	0.127
Fluka	-	1.43 ± 0.18	98.57 ± 0.18	1,93	1.023	1.022	1.000	0.058
MCE	0.57 ± 0.03	2.88 ± 0.07	96.56 ± 0.10	3,23	1.026	1.027	1.000	0.097
Merck	-	0.99 ± 0.09	99.01 ± 0.09	1,27	1.012	1.013	1.000	0.038
Sigma	0.44 ± 0.14	3.80 ± 0.26	95.76 ± 0.19	4,27	1.044	1.043	1.000	0.128

Tabell 25: Kvantitative resultater fra HPLC-UV og NMR for kinin.

Tabell 26: Kvantitative resultater fra HPLC-UV og NMR for kinidin.

Produsent	HPLC-UV resultater / %			NMR resultater				
	Kinkonin	Dihydrokinidin	Kinidin	%	H ^{2'}	H ^{8'}	H ¹⁰	CH ₃ ¹¹
Acros Organics	-	13.02 ± 0.29	86.98 ± 0.29	15.30	1.151	1.155	1.000	0.459
Chemenu	1.92 ± 0.03	17.14 ± 0.12	80.95 ± 0.11	22.73	1.226	1.225	1.000	0.682
Alfa Aesar	-	13.25 ± 0.07	86.75 ± 0.07	15.80	1.155	1.155	1.000	0.474
Aldrich	-	11.27 ± 0.27	88.73 ± 0.27	13.30	1.128	1.129	1.000	0.399
Sigma Aldrich	-	11.75 ± 0.20	88.25 ± 0.20	13.93	1.132	1.132	1.000	0.418

Av tabellene over kan man se at HPLC-UV og NMR resultater er ganske like. Kinkonidin har en dårligere løselighet i alkohol (vedlegg 3), det var av den grunn ikke mulig å løse disse opp for NMR analysene uten å blande metanol med HCl.

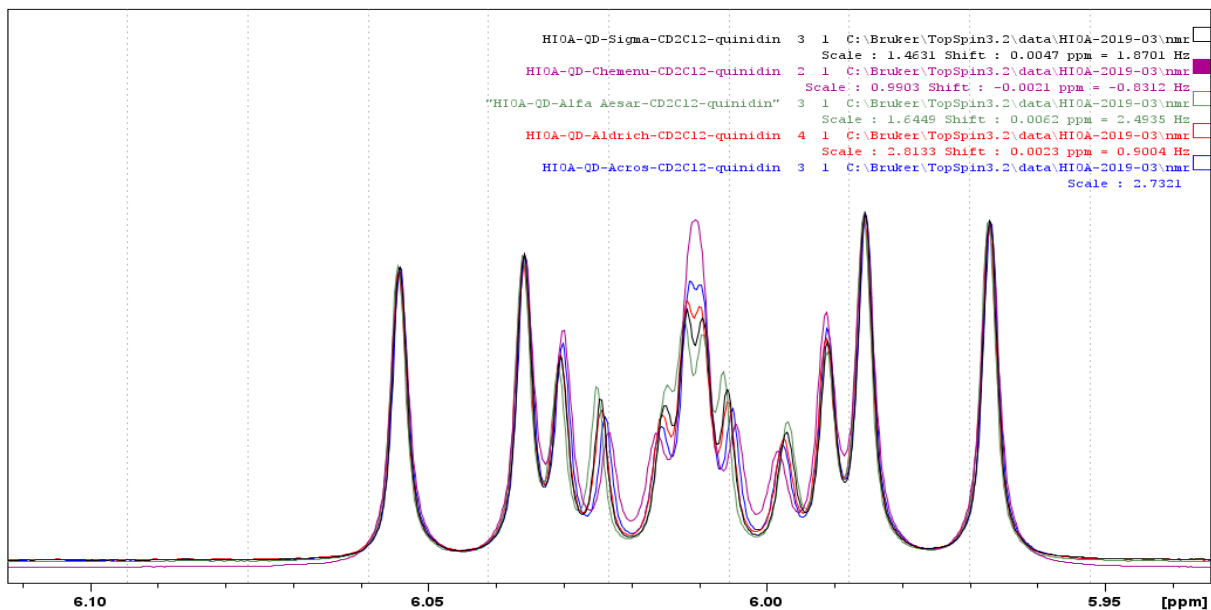
Derfor ble prøvene kjørt ved å bruke CD₂Cl₂ som løsningsmiddel på NMR prøvene. I den begrensede tid det var til rådighet ble det ikke gjort flere forsøk med ulike løsningsmidler for å analysere kinkonidins innhold i disse prøvene.

Forhold mellom kinin:dihydrokinin og kinidin:dihydrokinidin var lett å analysere meget nøyaktig ved å foreta integraler av protonene i vinylgruppen og i dens respektive dihydro- etylgruppen. Mer NMR arbeid er nødvendig for å bestemme mengden av kinkonidin og kinkonin i de ulike prøvene. Utfordring med disse to ligger i det faktum at deres spektra faller på samme områder av kinin og kinidin og det krever mer arbeid for å sikre gode integrasjons-resultater, ved eksempelvis å benytte et NMR-instrument som gir bedre oppløsning enn 400 MHz som ble benyttet i dette forsøket.

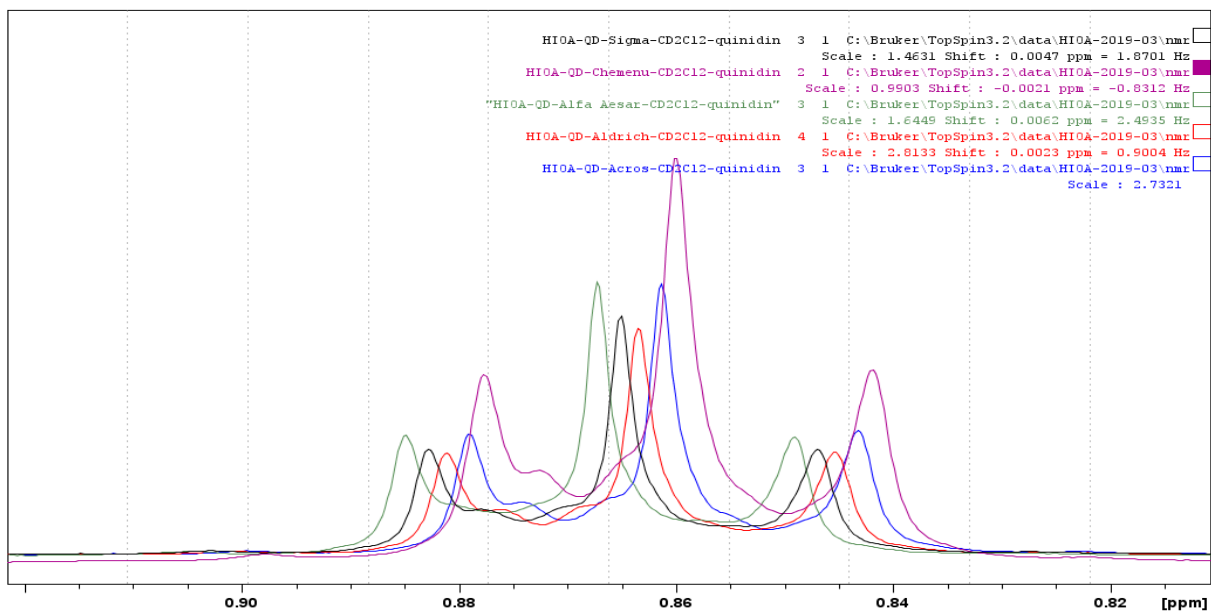
Hovedforskjellene i strukturen til de 6 analyttene, i tillegg til stereoisomeri, ligger i substituentene i C^{6'} og C¹⁰-C¹¹ enheten. Siden resten av molekylets skjelett er nokså likt, ville resonansene av like hydrogenatomer "falle" på hverandre på NMR spektrene.

I NMR ble forholdet mellom H¹⁰ som kun eksisterer i kinin og kinidin som CH gruppe, og H¹¹ som er etylgruppe i dihydro-derivatene tatt som utgangspunkt for å finne forholdet mellom disse to molekylene. Dette sikret at integralene inneholdt kun topper av rent stoff av kinin/kinidin eller rent stoff av dihydrokinin/dihydrokinidin. Siden integraler av 1H¹⁰ i kinin/kinidin i forhold til 3H i dihydro-derivatene sammenlignes, må integralet i dihydro-derivatene deles på tre.

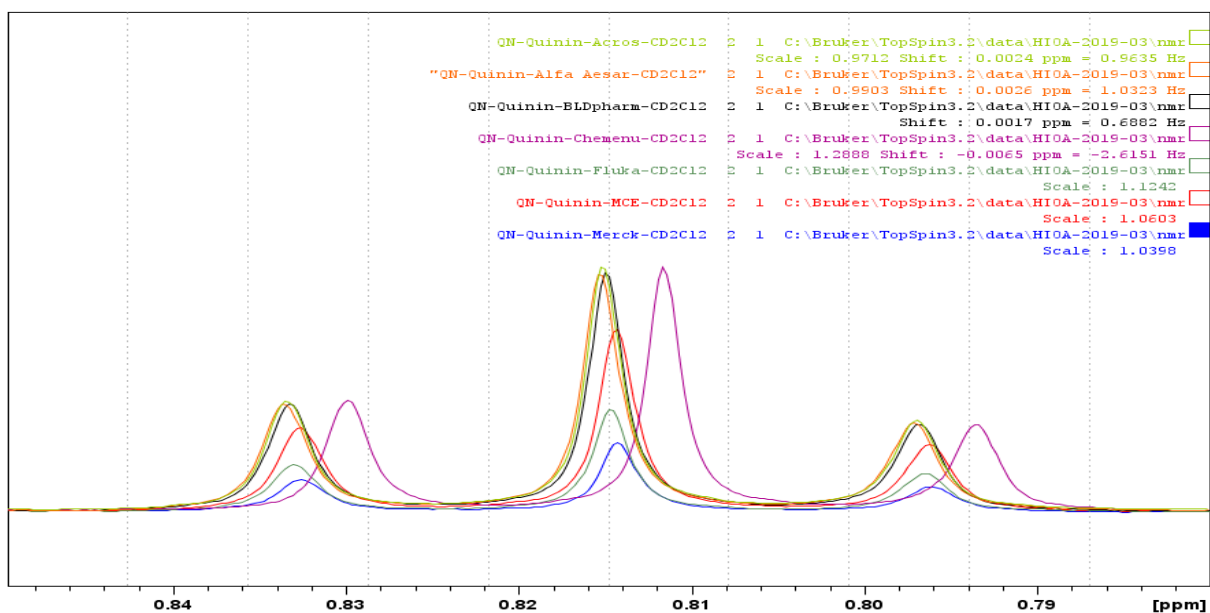
I figur 31 er H¹⁰ fra alle prøvene fra kinidin satt på hverandre for å synliggjøre renhetsgraden av stoffene fra de ulike produsentene. Det samme ble gjort i figur 32 og 33 med CH₃ for kinidin og kinin.



Figur 31: NMR resultater av "forurensninger" for kinidin.



Figur 32: NMR resultater av "forurensninger" for kinidin.



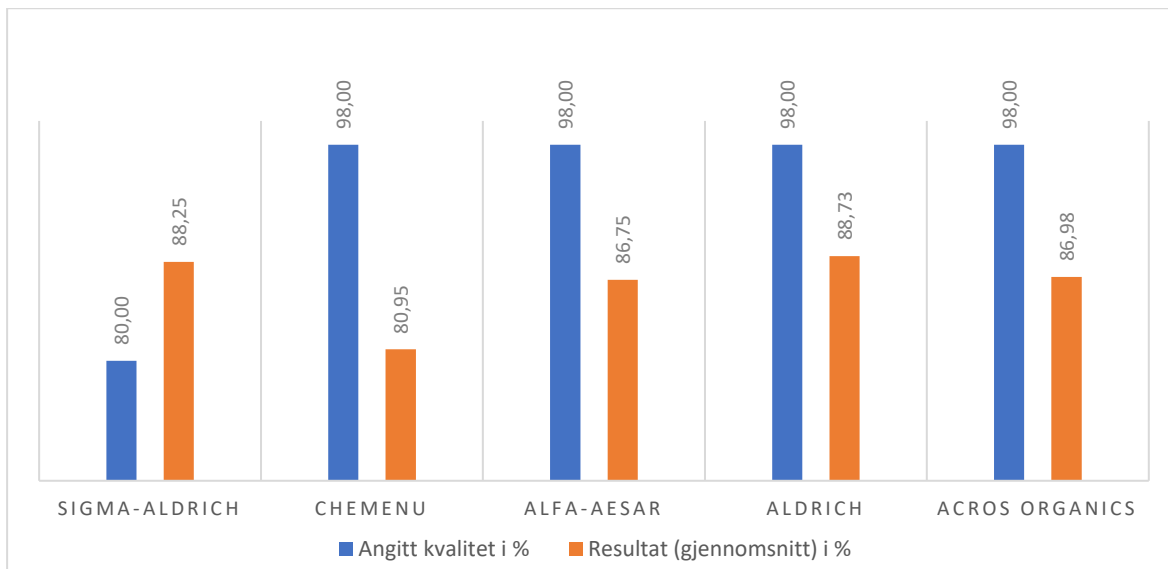
Figur 33: NMR resultater av "forensinger" for kinin.

Oppsummering resultatene fra HPLC, NMR og LC-TOF

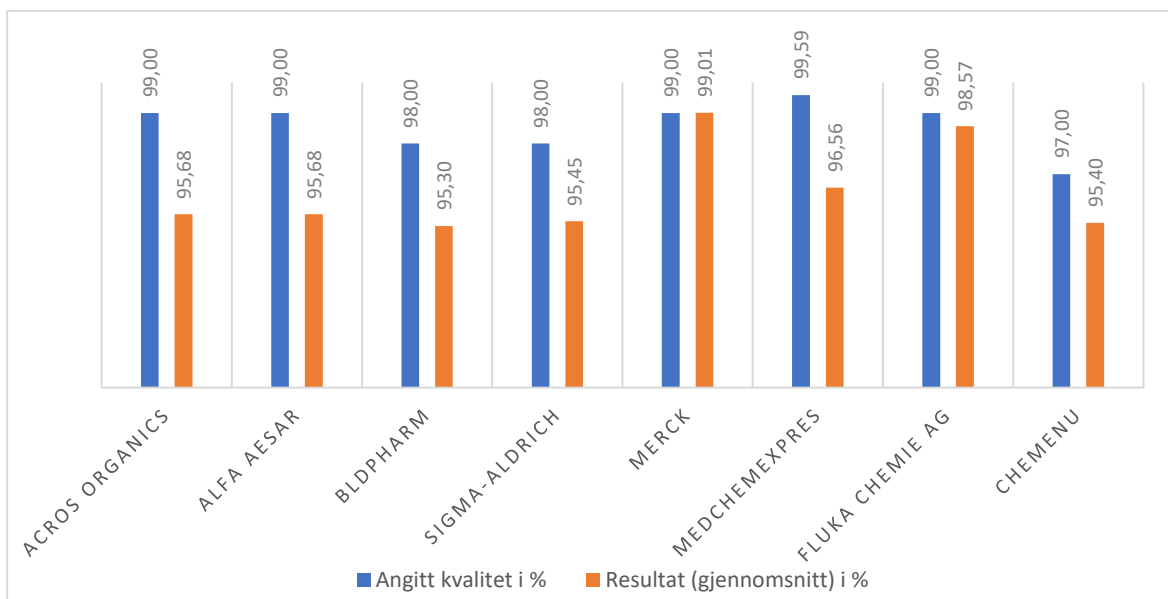
HPLC-UV ble benyttet med ulike metoder for å finne beste betingelser til å separere våre analytter som er svært like strukturelt. Både de kvantitative- og de kvalitative analysene viser til at kinin og kinidin som ble kjøpt inn fra ulike leverandører inneholdt urenheter i form av dihydro-derivater i tillegg til kinkonin og kinkonidin. Dihydro- og demetoksy-derivatene viste seg også å være urene.

Det ble benyttet analytiske kolonner og mobilfaser med ulike gradienter og ulike parametere for å få best mulig separasjon av disse analyttene på kortest mulig tid. Av resultatene kan det ses at mobilfases sammensetning har en viktig innvirkning på analyttens retensjonstid, avhengig av hva slags kolonne som benyttes til formålet. Det var mye lettere å eluere analyttene i ladede former fremfor i deres respektive nøytrale former i de kolonnene som ble benyttet i denne oppgaven. Resultatene fra metode10 viser at det tar lengre tid å eluere ut analyttene når mobilfasene ikke var tilsatt maursyre.

Den beste separasjonen med rask eluering ble oppnådd med metode 5. Forhold mellom de ulike analyttene i hver prøve er oppsummert i figurene 34 og 35. Her kan man se at de reneste kinin og kinidin prøvene utprøvd i denne oppgaven er fra produsentene Merck og Aldrich.



Figur 34: Resultater fra renhetsanalysene for kinidin kjøpt inn fra ulike leverandører.



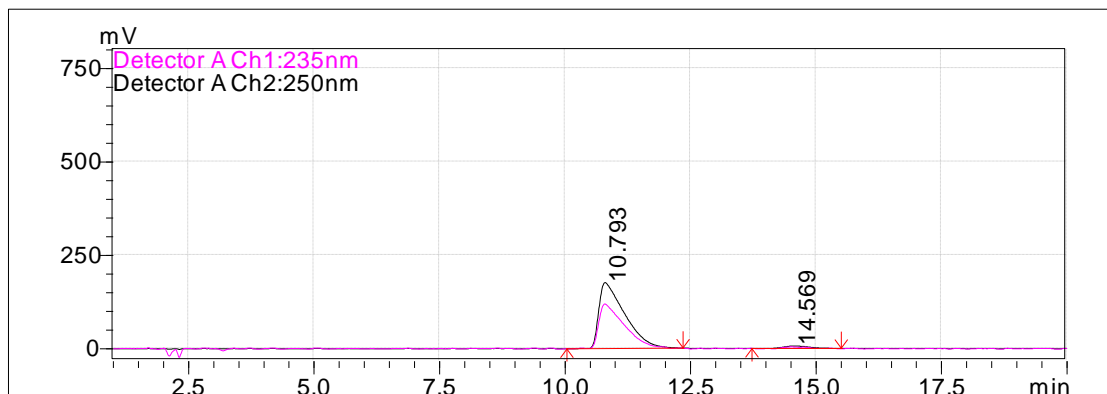
Figur 35: Resultater fra renhetsanalysene for kinin kjøpt inn fra ulike leverandører.

1.4. Kvantitativ separasjon ved bruk av HPLC-UV

For kvantitativ separasjon ble det først utprøvd ulike metoder på en analytisk C₁₈ kolonne. Videre ble det utviklet metode for separasjon av kinin og kinidin med en semipreparativ difenyl kolonne. Metoden som ga beste separasjon ble benyttet for å foreta en testfraksjon av analyttene og blindprøven (Milli-Q vann). Etter å ha fått bekreftet fraksjonens renhetsgrad ved bruk av LC-TOF ble det videre foretatt fraksjonerings, oppkonsentrering og analyse av kinin og kinidin ved hjelp av NMR.

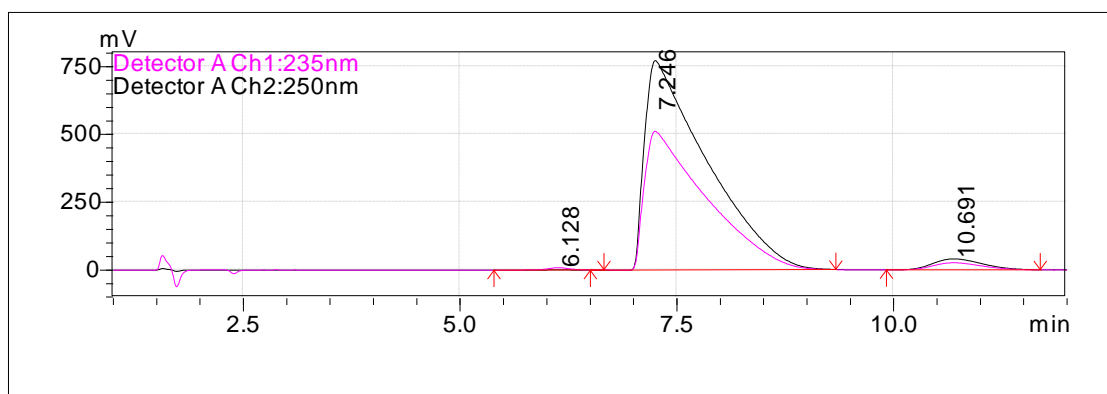
Optimalisering med semipreparativ difenyl kolonne

Totalt ble det utprøvd 13 ulike metoder for kinin (Merck) og kinidin (Aldrich) som var de reneste av alle som vi testet. Metode 18 viste seg å gi beste separasjon for kinin som ble kjørt med konsentrasjon 0,7 mg/ml.



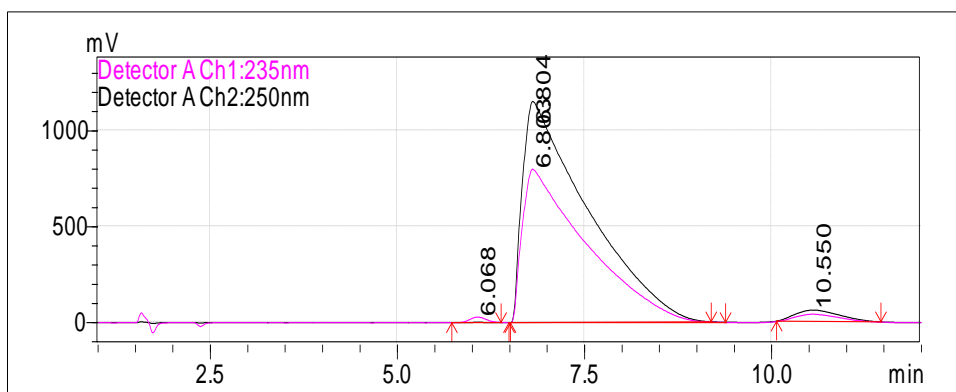
Figur 36: Separasjons resultatet for kinin ($t_R = 10.7$ min) og dihydrokiinin ($t_R = 14.5$ min).

Metode 18 ble videre optimalisert for å kjøre analysene med ulike konsentrasjoner og flow-hastigheter. Metode 25 var best hvor det ble benyttet kinin- og kinidinkonsentrasjon 0.7mg/ml med injeksjonsvolum 50mcl og flow-hastighet på 4ml/min.

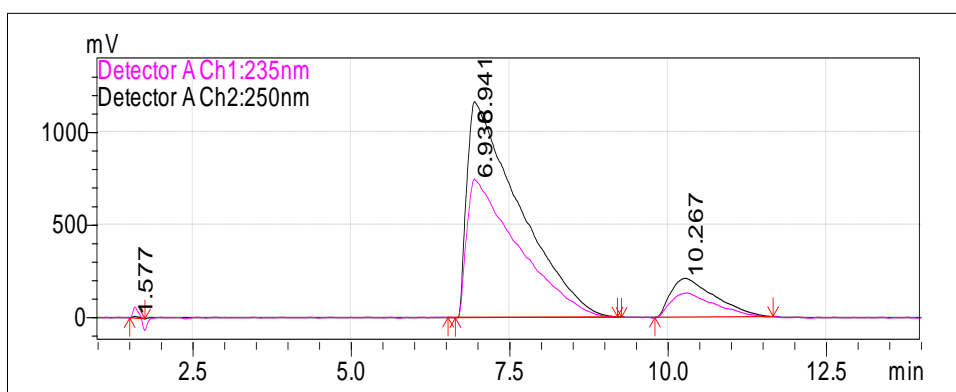


Figur 37: Separasjons resultat for kinin ($t_R = 7.2$ min) kinkonin ($t_R = 6.1$ min) og dihydrominin ($t_R = 10.6$ min)

Metode 25 ble videre benyttet for å analysere kinin og kinidin med konsentrasjon 1.4 mg/ml og med ulike injeksjonsvolum. Metode 29 ga beste resultat og ble videre benyttet for å foreta testfraksjoner av kinin og kinidin som senere ble kvalitetssikret for renhet ved bruk av LC-TOF. Resultatet for metode 29 er vist under:



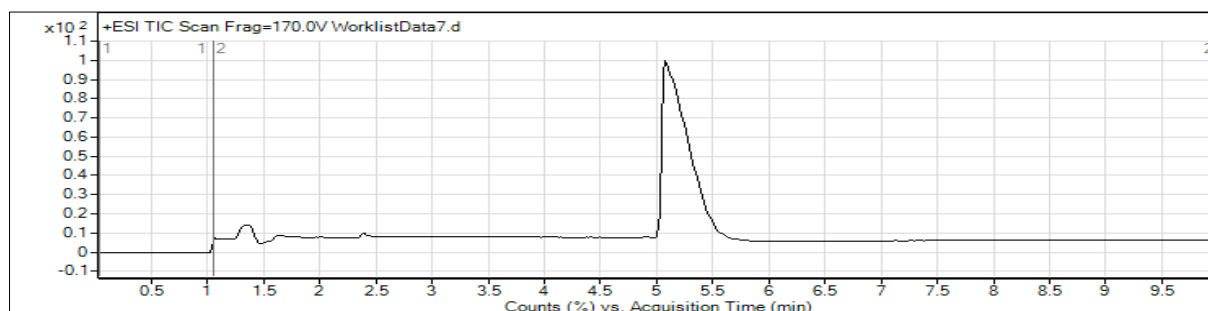
Figur 38: Separasjons resultat fra produsenten Merck for kinin ($t_R = 6.8$ min), kinkonin ($t_R = 6.0$ min) og dihydrokinin ($t_R = 10.5$ min).

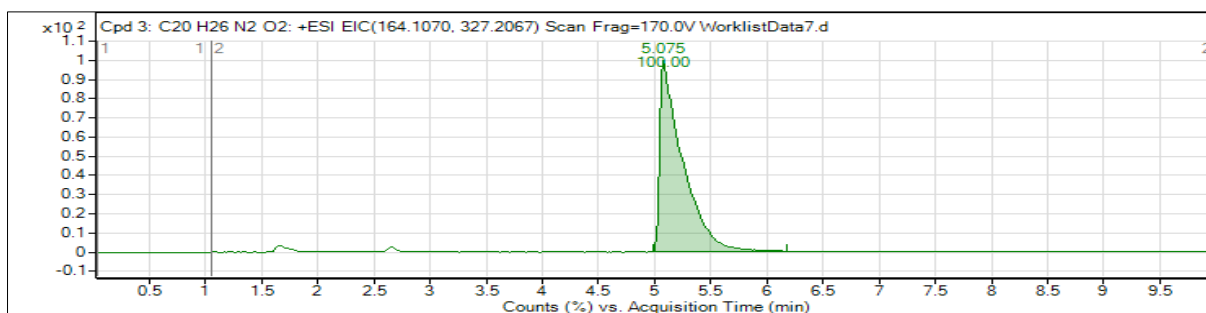


Figur 39: Separasjons resultat fra produsenten Aldrich for kinidin ($t_R = 6.9$ min) og dihydrokinidin ($t_R = 10.2$ min).

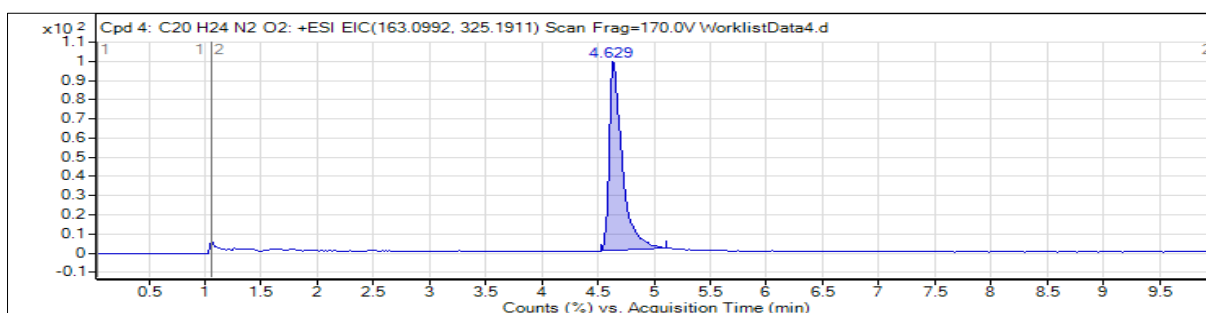
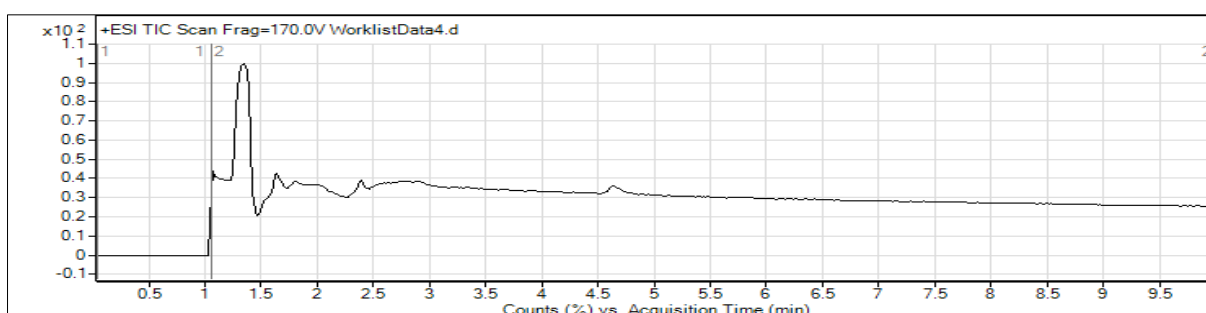
1.5. Kvalitativ analyse av testfraksjonene ved bruk av LC-TOF

Før analyse av testfraksjonene og blindprøven ble utført på en C_{18} High Load kolonne, ble retensjonstidene til både kinin og kinidin bekreftet ved å kjøre stoffene fra Merck og Aldrich med metode 16. Deretter ble de oppkonsentrerte testfraksjonene av både kinin og kinidin og blindprøven analysert og resultatene for kinin og kinidin er vist nedenfor.





Figur 40: TIC og ECI for kininfraksjon.



Figur 41: TIC og ECI for kinidinfraksjon.

1.6. Renhetsgrad analyse ved hjelp av NMR.

Etter at testfraksjonene ble verifisert for renhet og blindprøven ikke ga utslag ble det foretatt fraksjoneringer av kinin Merck og kinidin Aldrich. Fraksjonene til kinin og kinidin foreligger som salter (kininformat og kinidinformat) siden de er oppløst i metanol/vann tilsatt maursyre. For å kunne analysere renheten av analyttene ble fraksjonene pH-justert og prøveoppbeholdet ved hjelp av væske-væske-ekstraksjon med kloroform. Ekstraktene ble videre oppkonsentrert ved bruk av rotavapor og sentrifuge-inndamper. Ekstraktet ble overført til HPLC vials og lagt til inntørking beskyttet mot lys. De inntørkede stoffene ble oppbevart i kjøleskap for videre analyser med NMR.

NMR analysene viste at ekstraktene inneholdt store mengder av silanol forbindelser. Det viste seg i tillegg at det å separere analyttene fra deres respektive dihydro-derivatene ikke var vellykket, siden disse også ble detektert i NMR.

Det er sannsynlig at difenyl kolonnen som ble benyttet kan ha blitt skadet under de betingelsene som den var blitt kjørt eller at kolonnen var skadet fra forrige bruk. En annen forklaring kan være at fraksjoneringsprosessen ikke har vært optimal. Fraksjonsnålen kan ha forurenset de "rene" fraksjonene med dihydro-derivatene og forårsaket *carry over* når det ble utført flere titalls med fraksjoneringer.

Del 2: Konformasjonsanalyse, SAR og mekanistiske studier

2.1. Introduksjon til chinchona alkaloider

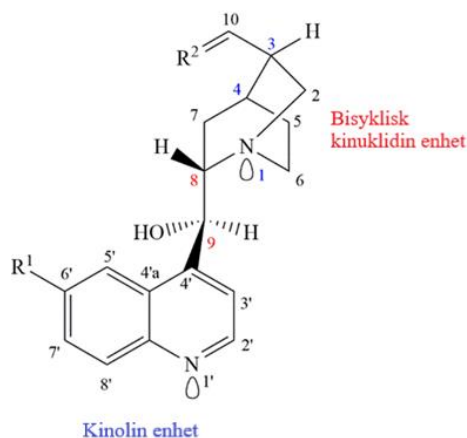
Alkaloider er molekyler som inneholder alifatisk nitrogen-atomer (sp^3) hvis de har opphav fra planter. Som svake baser befinner de seg i en dynamisk likevekt mellom deres nøytrale og ladede former, hvis forhold mellom de ulike formene er pH avhengige. Forholdet mellom de nøytrale og de ladede formene er altså avhengige av aminenes K_b , en viktig egenskap som benyttes av biologien for å introdusere en relativ sterk interaksjon mellom ladede aminogrupeer og andre grupper slik som karboksylater som også er ladede ved fysiologisk pH.

Disse egenskapene er svært viktige innen legemiddelkemi, siden omlag 70% av legemidlene inneholder en alifatisk aminogruppe som en del av molekylets farmakofor. Aminogruppene har viktig betydning for molekylenes farmakodynamikk og farmakokinetikk. De danner interaksjoner med target makromolekyl (en "ionisk" binding med eksempelvis en karboksylat gruppe) og kan ha en avgjørende effekt på molekylenes totale topologi, spesielt når nitrogenet er en del av en alifatisk 6-ring eller når den kan danne hydrogenbinding med en annen gruppe i molekylet og på denne måten stabilisere en konformasjon fremfor de andre mulige konformasjonene.

Chinchona derivater er alkaloider med kinolinkjerne i molekylskelettet og stammer fra biosyntese der aminosyren tryptofan og et terpen er benyttet. De utvinnes fra chinchona treet, som har sitt opphav fra Peru og dyrkes i India, Indonesia, Sri Lanka, Kenya, Tanzania og Bolivia. Ulike type alkaloider er blitt isolert fra chinchona barken, hvor kinin utgjør om lag 30-60%, og resten er blant annet kinidin, dihydro- og epi-derivater, kinkonin og kinkonidin.[10,14]

Chinchona barken ble opprinnelig brukt av søramerikanske indianere som febernedsettende middel. Barken ble introdusert til Europa rundt 1640-tallet og dominerte som malariamiddel i Europa frem til 1820-tallet. Blanding av krystallinske alkaloider fra barken ble først isolert i Portugal i 1810-tallet. Ti år senere ble ren kinin og kinkonin isolert av Pierre Joseph Pelletier og Joseph Benaime Caventou.[14,64]

Den viktigste effekten til chinchona-alkaloidene kommer fra kinin og kinidins effekt mot infeksjoner forårsaket av protozoer, og denne egenskapen ble benyttet mot malaria i over 400 år.



Figur 42: Grunnstruktur til chinchona alkaloider.

I tillegg til kinin og kinidin finnes det mange andre beslektede derivater i chinchona-barken og i bladene. Hovedforskjeller ligger i hvilke typer funksjonelle grupper som er koblet til C³ (R²) og C^{6'} (R¹) i molekylet (figur 42). Det kan i tillegg være ulike konfigurasjoner ved C⁸ og C⁹ som gir opphav for ulike diastereomerer (tabell 27). Kinin og kinidin er diastereomerer med fem kirale sentra. Stereokjemien rundt C⁸ og C⁹ gir opphav til ulike diastereomerer, mens de tre andre kirale sentra, N¹, C³ og C⁴, er "fanget" i en bisyklisk "diamant struktur" og eksisterer dermed kun i en bestemt konfigurasjon. Derfor har alle chinchona derivatene samme absolutt konfigurasjon rundt disse tre kirale sentra. Stereokjemien til C⁸-C⁹-N¹ enheten og hydroksylgruppen antas å være avgjørende for molekylens farmakologiske effekter.[3,14,18,23]

Tabell 27: Absolutt konfigurasjon til utvalgte chinchona alkaloider.[14]

Navn / Grupper	R ¹	R ²	Absolutt konfigurasjon				
			N-1	C-3	C-4	C-8	C-9
Kinin	OMe	Vinyl	S	R	R	S	R
Dihydrokinin	OMe	Ethyl	S	R	R	S	R
Epikinin	OMe	Vinyl	S	R	R	S	S
Kinidin	OMe	Vinyl	S	R	R	R	S
Dihydrokinidin	OMe	Ethyl	S	R	R	R	S
Epikinidin	OMe	Vinyl	S	R	R	R	R
Kinkonin	H	Vinyl	S	R	R	R	S
Kinkonidin	H	Vinyl	S	R	R	S	R

Det antas at effekten skyldes kompleksdannelse mellom kinin/kinidin og hem via charge transfer interaksjoner mellom O⁹ til kinin / kinidin og Fe³⁺ til hem. π - π interaksjoner mellom kinolin ringen og hem antas å være like viktig. En mulig intern hydrogenbinding mellom N¹ og en av de to karboksylat-

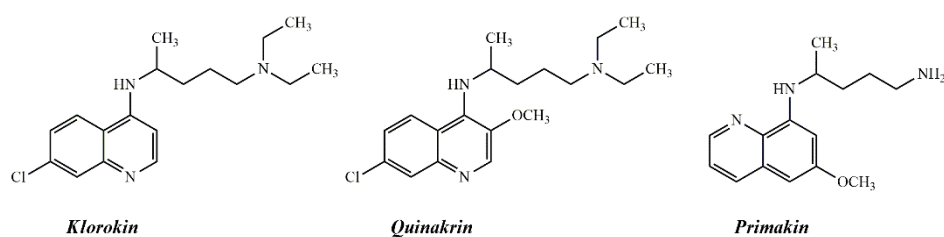
gruppene i hem kan ha betydning for ytterligere stabilisering av komplekset i riktig topologi og dermed for effekten.[2,5,18] Det ble ikke funnet litteratur som påpeker muligheter for hydrogenbinding mellom pyridinsk N^{1'} (pKa ca 4) og karboksylat eller karboksylsyre gruppe. Bidraget fra det pyridinske atomet for den totale antimalaria-effekten er derfor usikkert for kinin og kinidin. Med tanke på pH i parasittens vakuol (ca 5) er en slik interaksjon ikke usannsynlig for effekten, hvor pyridinsk nitrogen kan fungere både som hydrogenonor og -akseptor

Kinin

Kinin utvinnes fra planteslekten *chinchona officinalis* (*Rubiaceae* familien). Navnet kinin er trolig avledet fra *quina*, som betyr kininholdig bark fra *chinchona* tre (spansk). Kinin ble først isolert i ren form i 1820, og den eksakte strukturen ble bestemt i 1908. Kinin ble for første gang syntetisert og absolutt konfigurasjonen bestemt i 1944. Den første, stereoselektive syntesen ble utført i 2001 av Stork et al.[14,15]

Kinin var det første middelet som ble benyttet mot malaria og forble det eneste effektive legemiddelet fra *chinchona* slekten mot malariasykdommen i over 400 år. I dag benyttes kinin i tillegg i noen muskelsykdommer, som for eksempel nattlige kramper, på grunn av direkte effekter på muskelmembraner og natriumkanaler. Kinin brukes dessuten i begrensede mengder som smakstilsetning i enkelte drikkevarer (tonic water). Kininsulfat har sterk fluorescens, og benyttes rutinemessig i fluorescens spektroskopi.[10,14,15,65]

Grunnet begrenset tilgang til *chinchona* barken i 1930-tallet og høye kostnader i forbindelse med syntetisk fremstilling av kinin, ble det i senere tid utviklet ulike syntetiske analoger av dette stoffet. Eksempler på denne legemiddelgruppen er klorokin, quinakrin og primakin (figur 43).[14]



Figur 43: Noen eksempler på syntetiske analoger til kinin.

De fleste syntetiske analogene er mer effektive enn kinin [20,21], og hoved strukturelle forskjeller som umiddelbart bemerkes er molekylens fleksibilitet og mindre komplisert stereokjemi. De inneholder fremdeles de viktige funksjonelle gruppene i farmakoforen, men ikke alle har en alifatisk alkohol slik som i *chinchona* derivatene. Det alifatiske aminet foreligger enten som en del- av en asyklisk eller syklisk gruppe. I forhold til kinin er dette en stor strukturell forskjell både med hensyn til stereokjemien og med hensyn til molekylens konformasjonell fleksibilitet og totale topologi, noe som muligens kan være med å forklare deres høye effektivitet.

I 1930-tallet ble quinakrin tillatt som erstatning for kinin. Den ble senere erstattet med den effektive varianten klorokin i 1950-tallet.[9] Hoved forskjellen mellom quinakrin og klorokin er metoksygruppen i kinolin ringen. Den alifatiske delen er identisk på begge molekylene og tyder på at den kan tilegne seg en topologi som ligner på den bisykliske kinuklidin ringen i kinin. I den tiden som var til rådighet ble det ikke funnet noen kilder som hadde utført forsøk med metoksy-klorokin men dette burde ha vært et molekyl av interesse.

Klorokin ble i stor grad brukt istedenfor kinin i behandling av malaria på grunn av dens høye effekt, lav toksisitet og lave produksjonskostnader. På grunn av den utstrakte bruken ble *P. falciparum* parasittene etterhvert resistente mot klorokin.[64]

Kinins basiske egenskaper gjør at den alltid benyttes i saltform i legemidler, hvor dihydroklorid formen er de mest brukte (salt på både det alifatiske- og det aromatiske nitrogenet). Kinin i dens nøytrale form absorberes raskt, både oralt og parenteralt, maks konsentrasjon oppnås innen en til tre timer. Den distribueres i hele kroppen og er høygradig proteinbundet, hovedsakelig til α -1 surt glykoprotein, sannsynligvis både som ladet og som uladet form. Ekskresjon skjer raskt, cirka 80% av legemiddelet elimineres i leveren hvor den gjennomgår CYP-50 metabolisme. Cirka 20% elimineres uendret via nyrene. Kinin har lav terapeutisk vindu og halveringstiden ligger på mellom 11-18 timer.[64,65]

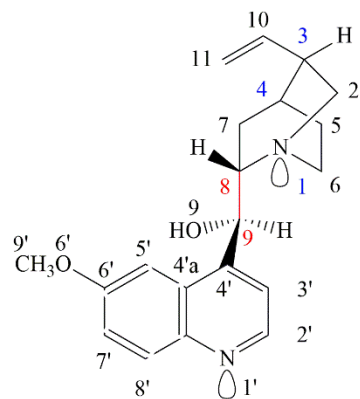
Kinin, slik som kinidin, kan forårsake hjerterytmeforstyrrelser. Legemiddelet er i tillegg kjent for å forårsake trombocytomi, en bivirkning som får kroppen til å produsere mye blodplater som kan føre til uvanlig blodpropp-dannelse eller blødning. Kinin forårsaker også *chinchonism*, en blanding av ulike uønskede effekter som hodepine, kvalme, øresus, nedsatt syn, magesmerter, utslett, diare, svimmelhet og oppkast.[64]

Kinidin

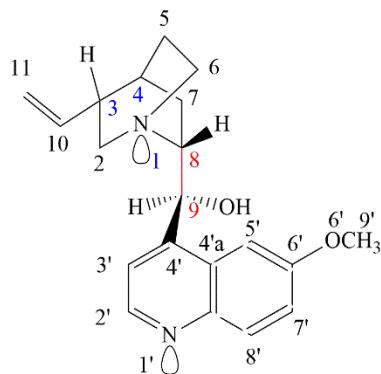
Kinidin ble først benyttet som antimalaria legemiddel i 1860 tallet. Frem til 1940 viste flere kliniske studier, at kinidin (C⁸, C⁹, R,S) var minst like effektiv som kinin (C⁸, C⁹, S,R), og noen studier viste til at kinidin var mer effektiv enn kinin. Blant de fire hoved-chinchona alkaloidene var kinidin og kinkonidin de mest aktive stoffene mot malaria etterfulgt av kinin og kinkonin (figur 44 på neste side). Kinidin er to-tre ganger mer potent enn kinin i både klorokin sensitive og resistente *P. falciparum* parasitter. Man så i senere tid at kinidin ble absorbert raskt fra gastrointestinal trakt, noe som kunne føre til overdosering og uønskede bivirkninger i hjerte (ukontrollerte muskelfiber kontraksjoner).

Kinidin ble av den grunn ikke lenger ansett som et trygt legemiddel mot malaria (benyttes nå kun når første og andre valg ikke er tilgjengelige). I dag benyttes kinidin hovedsakelig til behandling mot arytmier og markedsføres i følgende saltformer: glukonat, hydroklorid, sulfat og polygalakturonat.[5,6,66-68]

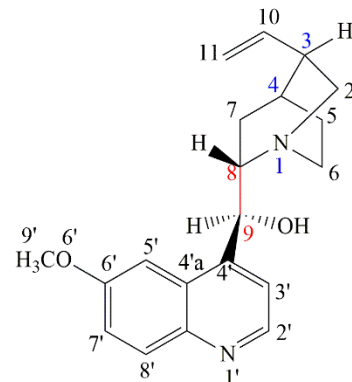
Som antiarytmika virker kinidin ved å dempe eksitabiliteten av hjerte- og skjelettmuskel-celler ved å blokkere natrium- og kaliumkanaler og forlenge aksjonspotensialer. Kinidin virker i tillegg som en konkurrerende antagonist til muskarin og α -adrenerge reseptorer. Kinidin er bundet til plasmaproteiner (80-88%) og ca 20% elimineres uforandret via nyrene når pH til urinen er under 7. Halveringstiden er 6-8 timer.[67,69]



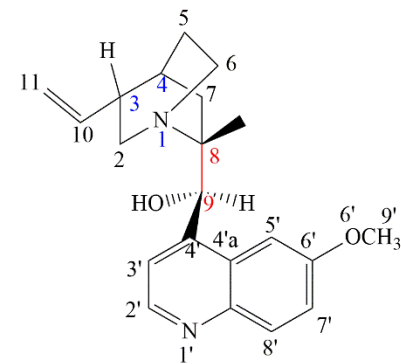
Kinin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*S*,9*R*



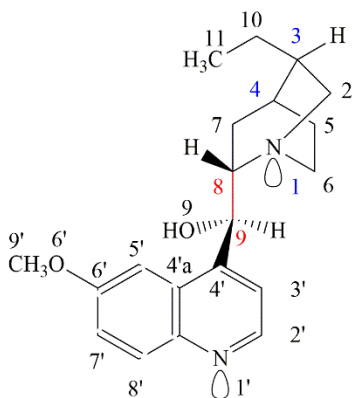
Kinidin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*R*,9*S*



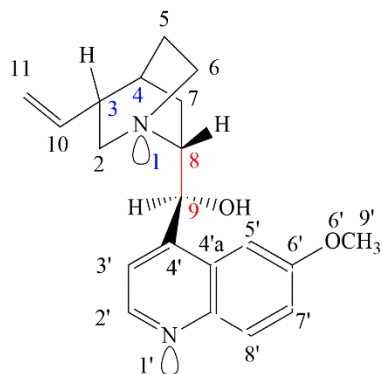
Epikinin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*S*,9*S*



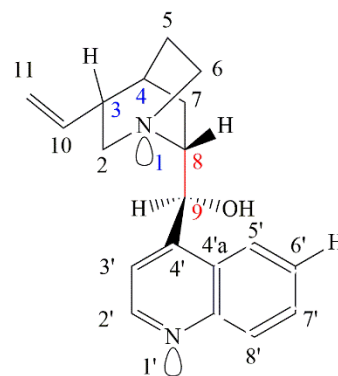
Epikinidin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*R*,9*R*



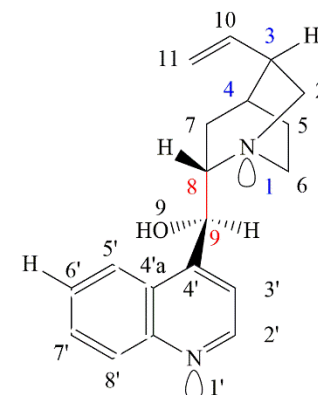
Dihydrokinin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*S*,9*R*



Dihydrokinidin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*R*,9*S*



Kinkonin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*R*,9*S*



Kinkonidin: 1*S*,3*R*,4*S*, 8*S*,9*R*

Figur 44: Chinchona alkaloider. Forskjellene ligger i stereokjemien og funksjonelle grupper.

Kinin og kinidins kjemiske- og fysikalske egenskaper er så å si identiske unntatt løselighet i vann og etanol. Denne forskjellen i løseligheten kan tyde på at OH-gruppen i kinidin har muligens en intern hydrogenbinding med det alifatiske nitrogenet noe som gjør den mindre løselig enn de andre derivatene som lager flere interne hydrogenbindinger med vann. En annen mulighet er at molekylene har ulike grad av aggregat-tilstander som dimerer og heksamerer. Det er oppsiktsvekkende at nettopp den som er mindre løselige er mer potent, noe det bør studeres videre på.

Tabell 28: Kinin og kinidins kjemiske- og fysikalske egenskaper. For fullstendig liste over alle 6 analyttene se vedlegg 3.[70-73]

Stoff	Molekyl-formel	Monoisotopisk masse g/mol	pKa 1 (R ₂ N ₁ H ⁺)	pKa 2 (R ₂ N ₁ 'H ⁺)	log P	Løselighet i		
						vann	etanol	kloroform
Kinin	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18	9.05	4.02	3.44	1 g i 1.9 L	1 g i 0.8 ml	1 g i 1.2 ml
Kinidin	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18	9.05	4.02	3.44	140 mg i 1.0 L	1 g i 36 ml	1 g i 1.6 ml

Chinchona-alkaloidbaserte kirale stasjonærphaser

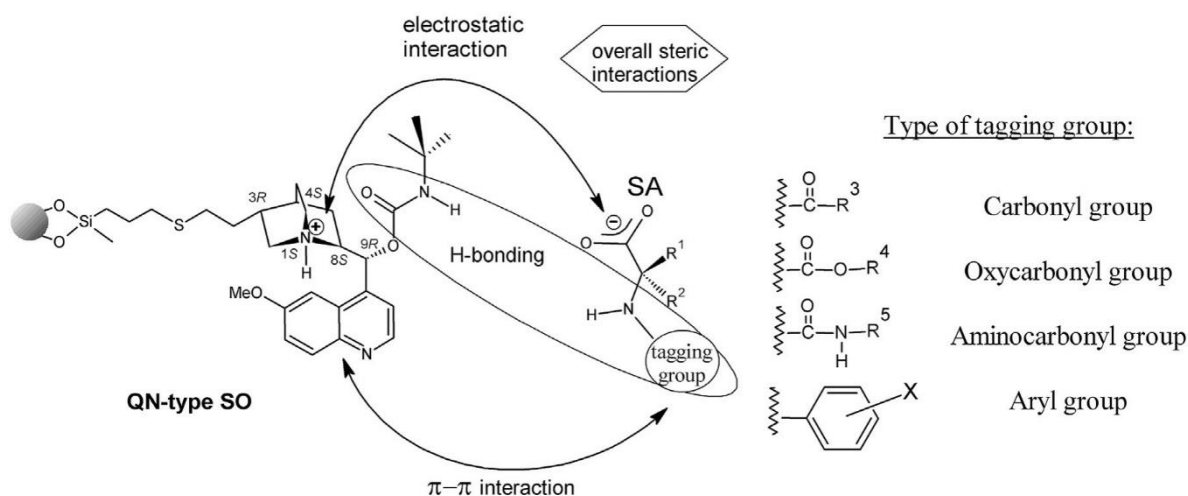
Chinchona alkaloidene og derivatene er i tillegg benyttet innen moderne kirale teknologi hvor de har en viktig rolle som kirale hjelpemidler i katalytiske, asymmetriske synteser. De benyttes i kolonner som kirale stasjonære faser (CSP), og i de siste årene ble direkte kromatografiske separasjonsteknikker med bruk av CSP blitt en populær metode i både analytiske og preparative separasjoner. Chinchona alkaloid baserte CSP benyttes regelmessig enten som svake anion-byttere til løsninger med ulike kirale syrer eller som zwitterioner for løsninger med anioniske eller kationiske forbindelser.[74]

Allerede i 1950 tallet ble kinin benyttet i LC (Liquid Chromatography). I 1980 tallet ble det utviklet en LC basert metode for å danne ionepar mellom den basiske enheten til kinin og en analytt med sure funksjonelle grupper (begge i ladet form). Ulike typer av kinin og kinidin baserte kirale *selektorer* (SO) og CSP er blitt utviklet. Felles for begge stoffene er at den alifatiske aminogruppen (pKa 9.05) i kinuklidin delen er protonerte i surt miljø og dermed kan danne elektrostatiske interaksjoner (H donor) med funksjonelle grupper med motsatt ladning i en kirale *selektant* (SA) (figur 45).[74]

Som vist i figur 45 kan kinin i tillegg til elektrostatiske interaksjoner danne intermolekylære hydrogenbindinger med hydroksylgruppen som både hydrogen akseptor og hydrogen donor. De aromatiske ringene kan danne π - π interaksjoner med tilsvarende grupper.

Det kirale materialet, som kolonnen er pakket med, danner diastereomeriske "komplekser" via interaksjoner med ulike enantiomerer. En slik interaksjon resulterer i at enantiomerer separeres som om de er diastereomerer. Kinin kan kobles via ioniske bindinger, hydrogen (H)-bindinger og π - π interaksjoner til ulike invers silika materiell. På denne måten skapes det et diastereomerisk miljø ("kompleks"). Når analyttens enantiomer danner interaksjoner med den faste fasen vil disse

"kompleksene" være av diastereomerisk karakter i forhold til hverandre, dermed kan separasjonen utføres lettere.

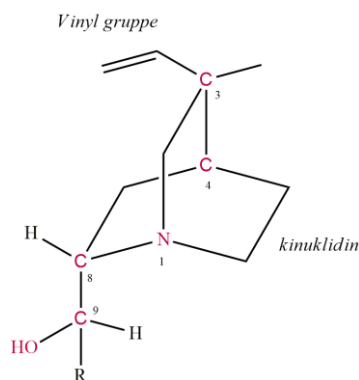


Figur 45: Eksempel på bruk av kinin som stasjonære fase (pakkemateriell) for kirale kolonner. (SA = selectand, SO = selector, QN = kinin) [74]

2.2. Konformasjonsanalyse av chinchona derivater

Strukturelle trekk ved den alifatiske delen av molekylene

Bro-ringsystemer er molekyler der ringer er koblet via tre kjeder, som kan ha enten like eller ulike lengder. Chinchona derivater inneholder en slik bisyklisk enhet med tre etylen broer (kinuklidin). Dette er en 1-azabicyklo [2.2.2] oktan med et fiksert nitrogen atom uten mulighet for inversjon (figur 46). Basisiteten av dette nitrogenet er avhengige av lengdene på broene. Med etyl broer regnes pK_b å være 4 i forhold til propyl broer der pK_b regnes å være 11.[75] Broene avgjør vinkelen mellom bindingene til nitrogen atomet og av den grunn planaritetens-graden til nitrogenet. I chinchona derivater, hvor det er to forskjellige R grupper på henholdsvis C³ og C⁹, blir både C⁴, C⁸ og N¹ kirale. Konfigurasjonene til disse fem kirale sentra skal utredes videre under.



Figur 46: Den bisykliske enheten: topologi og stereokjemi.

N¹ har kun en bestemt topologi, som er bestemt av den bisykliske enheten, med en S- konfigurasjon hos alle chinchona alkaloidene. Non-bondings elektronene til nitrogenet er orientert utenfor bro-ring enheten. Den absolutte konfigurasjonen av C³ og C⁴ er også identiske i alle chinchona alkaloidene, C³ (R) og C⁴ (S). Kinin har S-konfigurasjon ved C⁸ og R-konfigurasjon ved C⁹. Kinidin har motsatt konfigurasjon ved C⁸ og C⁹. Kinidin kan danne syklisk eter med C⁹-OH og C¹⁰-C¹¹ (vinylgruppen). Dette er kun mulig siden C⁹-OH og vinylgruppe bindingen er *cisoid* orientert. Kinin har C⁹-OH og C¹⁰-C¹¹ bindingen i *anti* orientasjon og kan dermed ikke danne hydrogenbinding.[10,23]

Kinin og kinidin molekylene har 6 bindinger som gir opphav for flere mulige konformasjoner. Unntak er for dihydroderivatene som har en ekstra rotasjon rundt C¹⁰-C¹¹. Det er fri rotasjon rund metoksy (R¹) og vinyl gruppene (R²). Vinylgruppen har rotasjon rundt C¹⁰-C³. Metoksy gruppen har rotasjon rundt både C⁶-O⁶ og O⁶-C⁹.

Rotasjonene rundt bindingene ved C⁴-C⁹ og C⁹-C⁸ resulterer i topologier som er avgjørende for molekylenes bindingsevne til target-molekylet. Rotasjonen rundt C⁹-O⁹ regnes også som viktig, siden denne bindingen gir mulighet for dannelse av interne hydrogenbindinger mellom N¹ og O⁹ og dermed påvirke molekylets stabilitet og topologi.[17] Konformasjonene rundt alle disse bindingene er videre analysert grundig i neste avsnitt.

Konformasjonsanalysen

Mekanistiske studier i denne oppgaven ble foretatt ved å utføre grundige litteratursøk, konformasjonsanalyser og topologiske studier. Konformasjonsanalysene av torsjonsvinklene til kinin og kinidin ble foretatt ved hjelp av molekylmodeller og ved å tegne Newman projeksjoner ved bruk av ChemDraw Ultra (versjon 15). SAR studiene ble basert på resultater fra konformasjonsanalysene og 3D figurer fra ChemDraw Ultra 3D (versjon 15) for å sammenligne de relative antimalaria-effektene til kinin, kinidin og deres epi-derivater.

Forskjeller i antimalaria-aktiviteter mellom kinin, kinidin og epi-derivatene ble analysert ved bruk av molekylmodeller, IC₅₀ verdier som ble hentet fra ulike kilder og ved å foreta MM2 (Molekylær Mekanikk) energi minimaliseringer av konformerene. Molekylær mekanikk benyttes for å angi nøyaktig struktur og energi til molekyler gitt at alle bindinger har en "naturlig" lengde og vinkel. MM beregninger justerer i tillegg for steriske interaksjoner som van der Waals krefter.[76]

MM2-minimaliseringer, for den mest stabile konformerene for hver av derivatene, ble foretatt for både nøytrale og ladede former ved hjelp av ChemDraw Office og resultatene er oppsummert i tabell 29. Resultatene fra disse analysene ble i tillegg sammenlignet med resultater fra doktorgradsavhandlingen til Caner H. I denne avhandlingen ble det foretatt teoretiske beregninger på MP2 nivå for å finne de mest stabile konformasjonene til kinin, kinidin og epi-derivatene, men uten metoksy- og vinyl gruppene.[17] Det er viktig å ta med, siden både vinyl – og metoksy gruppene introduserer destabiliserende steriske interaksjoner i alle mulige konformasjoner, og dermed bidrar til høyning av molekylenes entalpi uansett konformasjon. Dette ble sett i denne oppgavens analyser og skal diskuteres videre senere.

Kinin og kinidin inneholder flere roterbare bindinger. Disse gir opphav for flere mulige konformasjoner og til dels svært forskjellige topologier. Følgende to konformasjonsmuligheter ble analysert:

1. Konformasjon rundt sp^3-sp^3 binding: her ble *gauche*⁺, *anti*, *gauche*⁻ (heretter *g*⁺, *anti*, *g*⁻) analysert, som den mest stabile konformasjonen til en gitt σ binding.
2. Konformasjon rundt sp^3-s^2 binding: siden sp^2 atomet er en del av en aromatisk ring finnes det kun to konformasjoner, *syn* eller *anti*, slik som i fenol.[77]

Det ble ikke foretatt analyse av aksialt/ekvatorialt forhold siden ringinversjon ikke forekommer i chinchona derivater. sp^3 -nitrogen inversjon utelukkes også i kinolin alkaloidene siden N^1 er fiksert og dermed fanget til en bestemt topologi (kan ikke gå nitrogen inversjon). Dermed er alle mulige konformasjoner i disse molekylene et resultat av punkt 1 og 2. Disse konformasjonene er delt etter deres torsjonsvinkler (ω , også kalt dihedral vinkel) for henholdsvis kinin og kinidin.

Det er totalt 6 roterbare bindinger i kinin / kinidin molekylene. For å sikre en fullstendig konformasjonsanalyse av molekylene ble hver mulighet studert og identiske konformasjonene i hver av de relevante bindingene eliminert. I denne oppgaven defineres torsjonsvinkel med 3 muligheter som gir samme resultat. Torsjonsvinkler med identiske konformasjoner ble markert med like farger og oppsummert i tabellene 30 og 32. Newman projeksjoner ble i tillegg benyttet for å tegne konformerene slik at identiske konformasjoner vises enda tydeligere. *Eclipsed* konformasjon ble ikke tatt med videre i analysen da de regnes som overgang tilstander.

Bruk av molekylmodeller til konformasjonsanalyser og tegning av Newman projeksjoner

Ulike konformasjoner rundt en gitt binding resulterer i ulike topologier til molekylet med mindre det er et høyt symmetrisk molekyl slik som etan. Størrelsen av torsjonsvinklene i en bestemt konformasjon avgjør konformasjonens entalpi. Vinkelens absolutte verdi for en gitt konformasjon kan gis med nøyaktige verdier ved å beregne dem fra røntgenstruktur, NMR forsøk eller fra teoretiske beregninger av ulike tyngder.

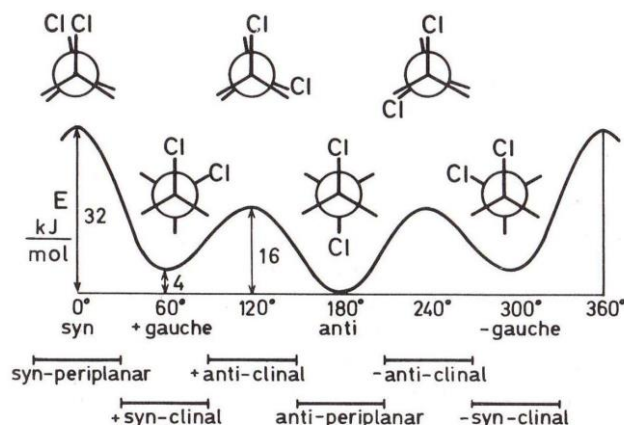
For en vanlig konformasjonsanalyse ser vi på de mest stabile konformasjonene ved å ta en 60° rotasjon om gangen. De mest stabile konformasjonene for di-klor-etan er illustrert i figur 47 hvor det kan ses at *g*⁺ og *g*⁻ er identiske konformasjoner med samme energi og *anti* har laveste energi. En rotasjon på 360° bringer oss til startpunktet.

Følgende ble benyttet for å bestemme konformasjoner rundt hver av de relevante bindingene i molekylene i denne oppgaven:

eclipsed for (ω) $\sim 0^\circ$

gauche for (ω) $\sim 60^\circ$

anti for (ω) $\sim 180^\circ$



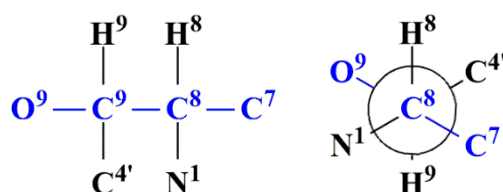
Figur 47: Konformasjoner for dikloroetan. Konformeren *anti* har lavere energi enn *gauche* fordi det er en destabiliserende interaksjon mellom de to klor atomene.[75]

For å gjøre konformasjonsanalysene enkelt ble det bygget molekylmodeller for kinin og kinidin og konformasjonene ble analysert én for én. Til SAR analysene ble det i tillegg bygget molekylmodeller for epi-derivatene og hem-molekylet. Molekylmodellene for de fire derivatene ble brukt for å studere topologien av molekylene og forskjellene ved samme konformasjoner rundt bestemte bindinger.

For kinin og kinidin ble alle mulige roterbare bindingene og torsjonsvinklene for disse bindingene identifisert ved å ta en rotasjon på omlag 60° om gangen ved hjelp av molekylmodellene. Mulige stabile konformasjoner ble definert og er gitt i tabell 29.

Ved hjelp av molekylmodeller ble det i tillegg analysert hvilke av konformerene som er mest stabile og hvilke som er minst stabile, ved å se på konformasjoner som har minst destabiliserende interaksjoner mellom atomene, muligheter for intramolekulære hydrogen (H)- bindinger mellom N^1 og O^9 eller mellom N^1 og non-bondings elektronene (nbe) til O^9 osv. Interne hydrogenbindinger antas å senke entalpien til molekylet (danner en type "5-ring"). Det ble foretatt analyser av konformasjoner som kan gi destabiliserende interaksjoner som påvirker molekylets totale entalpi, og frastøtende effekter (δ^+ mot δ^+ og δ^- mot δ^-) som øker molekylets entalpi, alene og i kompleks med hem enheten

Torsjonsvinkelen er bestemt av 4 atomer hvis sentral bindingen roteres fritt, som eksempelvis er vist i figur 48 for torsjonsvinkelen $H^9-C^9-C^8-C^7$. Atom nr 2 fra venstre (C^9 i figur 48 og i tabellene 30 og 32 for kinin og kinidin) vil ikke være synlige i Newman projeksjonene og vil bli rotert. Denne teknikken ble benyttet i denne oppgaven for å sikre eliminering av alle mulige identiske konformerer, samt å spore opp mulige konformasjoner med enantiomerisk (speilbilde) forhold.



Figur 48: Torsjonsvinkel $H^9-C^9-C^8-C^7$. For denne torsjonsvinkelen vil C^9 ikke være synlige i Newman projeksjonen (til høyre).

Konformasjonsanalyse av kinin

For kinin og kinidin kan for eksempel konformasjonene rundt C⁸-C⁹ binding (sp³-sp³) defineres ut fra 9 torsjonsvinkler. Sentralbindingen C⁸-C⁹ gir dermed 3 ulike konformasjoner (*g*⁺, *anti*, *g*⁻). For O⁶-C⁹ og C⁹-O⁹ defineres konformasjonene som α , β og γ , siden O⁹ er bundet til ett hydrogenatom og to par non-bondings elektroner og C⁹ er bundet til tre hydrogenatomer.

For å kunne utføre konformasjonsanalyser må alle roterbare bindinger i et molekyl identifiseres. På denne måten kan torsjonsvinklene og tilhørende konformasjoner analyseres, og identiske konformere elimineres. Som nevnt over er alle mulige konformasjoner for kinin og kinidin et resultat av frie rotasjoner rundt sp³-sp³ og sp³-sp² binding.

For kinin og kinidin ble alle mulige roterbare bindingene identifisert, og antall torsjonsvinkler med antall mulige konformasjoner for disse bindingene oppsummert i tabell 29. Som vist i tabellen er det totalt 27 torsjonsvinkler for de seks roterbare bindingene for henholdsvis kinin og kinidin. Det ble lagt ekstra vekt på de konformasjonene der O⁹ er ortogonalt til kinolin enheten. Dette anses som viktig i forhold til kompleksdannelse til hem, der non-bondings elektronene til O⁹ kan danne charge transfer interaksjoner med Fe³⁺ til hem.

Fra de 6 roterbare bindingene ble det funnet totalt 432 konformere. Hver av disse 423 konformerene kan eksistere i mono-, di- eller uladet form avhengig av miljøets pH. Det betyr at det foregår en svært kompleks termodynamisk likevekt mellom nøytrale, mono-ladete og di-ladete former av molekylet. Dessuten kan molekylene i tillegg eksistere i ulike aggregat-tilstander, som mono-, di- eller heksamere.

Tabell 29 ble videre benyttet som utgangspunkt for å identifisere identiske konformasjoner. Resultatene for de 27 torsjonsvinklene er oppsummert i tabell 30 og 32 og identiske konformasjonene er markert med like farger både i tabellene og Newman projeksjonene.

Tabell 29: Oversikt over antall mulige torsjonsvinkler og konformasjoner for hver binding.

Kinin/ Kinidin	Roterbare bindinger	Type binding	Antall torsjonsvinkler	Type konformasjon	Antall mulige konformasjoner for hver binding	Antall konformere
	O6'-C9'	sp ³ -sp ³	1	α , β , γ	1	
	C6'-O6'	sp ³ -sp ²	2	syn/anti	2	
	C4'-C9	sp ² -sp ³	6	syn/anti	4	
	C9-O9	sp ³ -sp ³	3	α , β , γ	3	
	C8-C9	sp ³ -sp ³	9	<i>g</i> ⁺ , <i>anti</i> , <i>g</i> ⁻	3	
	C3-C10	sp ³ -sp ²	6	<i>g</i> ⁺ , <i>anti</i> , <i>g</i> ⁻	6	
	6		27			1x2x4x3x3x6=432

Konformasjonsanalyse av kinin

Tabell 30: Dihedral vinkler og mulige konformasjoner til kinin.

T	Dihedral vinkel				Antall konformasjoner
1	C11-C10-C3-H3	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
2	C11-C10-C3-C4	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
3	C11-C10-C3-C2	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
4	H10-C10-C3-H3	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
5	H10-C10-C3-C4	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
6	H10-C10-C3-C2	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
7	H9-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
8	H9-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
9	H9-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
10	O9-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
11	O9-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
12	O9-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
13	C4'-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
14	C4'-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
15	C4'-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
16	HO9-O9-C9-H9	α	β	γ	3
17	HO9-O9-C9-C8	α	β	γ	3
18	HO9-O9-C9-C4'	α	β	γ	3
19	C4'a-C4'-C9-H9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
20	C4'a-C4'-C9-O9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
21	C4'a-C4'-C9-C8	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
22	C3'-C4'-C9-H9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
23	C3'-C4'-C9-O9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
24	C3'-C4'-C9-C8	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
25	C9'-O6'—C6'-C7'	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
26	C9'-O6'—C6'-C5'	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
27	H9'-C9'-O6'-C6'	α	β	γ	Overgangstilstand

Analyse av T1-T6

For torsjonsvinklene 1-6 ble det valgt å rotere C^{10} og deretter se forholdene mellom C^{11} eller H^{10} og H^3 , C^4 og C^2 . I og med C^{10} roteres ble betegnelsene g^+ , *anti*, g^- valgt for å definere konformasjonene. Dobbel bindingene mellom C^{10} og C^{11} (vinylgruppe) gir destabiliserende interaksjoner (*eclipsed*) som påvirker den totale entalpien til molekylet.

Fra Newman projeksjonene kan det se ut til at alle mulige konformasjonene 1-18 bidrar til en forhøyning av molekylets energi uansett konformasjon i denne delen av molekylet. Det kan derfor konkluderes med at vinylgruppen bidrar til forhøyning av den totale entalpien til kinin og dets diastereomerer.

Eclipsed topologi i denne delen av molekylt blir unngått ved overgang til dihydro-derivatene siden vinylgruppe erstattes med etylgruppe. Det forventes derfor at den totale entalpien vil være lavere for dihydro-derivatene i forhold til deres respektive vinyl derivater med mindre vinylgruppen brukes i dimer eller heksamer former, noe som denne oppgaven ikke har sett på.

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
1: C^{11} - C^{10} - C^3 - H^3			
	1	2	3
2: C^{11} - C^{10} - C^3 - C^4			
	4	5	6
3: C^{11} - C^{10} - C^3 - C^2			
	7	8	9

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
4: $H^{10}-C^{10}-C^3-H^3$			
	10	11	12
5: $H^{10}-C^{10}-C^3-C^4$			
	13	14	15
6: $H^{10}-C^{10}-C^3-C^2$			
	16	17	18

Analyse av T7-T15

C^8-C^9 er en viktig binding siden den kobler den aromatiske kinolin enheten til den alifatiske kinuklidin enheten. Konformasjoner som gir muligheter for intramolekylære hydrogenbindinger og konformasjoner som kan sette O^9 ortogonalt til kinolin enheten er oppsummert for hver av torsjonsvinklene i tabellen under. Disse konformasjonene er svært viktige med tanke molekylets stabilitet og total topologi samt antimalaria-effekter som diskuteres senere.

Tabell 31: Oversikt over mulige H-bindinger og ortogonalitet

	Interne H-binding	Ortogonalitet: kinolin - O^9
Konformasjon nr	7 g^+ , 8 g^- , 9 <i>anti</i> , 10 g^+ , 11 <i>anti</i> , 12 g^- , 13 <i>anti</i> og g^- , 14 g^+ og g^- , 15 g^+ og <i>anti</i> .	7 g^- , 8 <i>anti</i> , 9 g^+ , 10 g^- , 11 g^+ , 12 <i>anti</i> , 13 <i>anti</i> , 14 g^- og 15 g^+ .

Hydrogenbinding mellom OH-gruppen og et ladet tertiært amin, R_3NH^+ , kan foregå via en dynamisk likevekt der vann fungerer som hydrogen akseptor (base). Dermed vil H-atom deles mellom nitrogen og oksygen atomene og forårsake en stabiliserende intermolekylær hydrogenbinding (en type "5-ring").

Analysen viser at g^+ konformasjonene har frastøtende interaksjoner mellom HO^9 eller mellom non-bondings elektronene (nbe) til O^9 og H^7 . *Anti* konformasjonene har frastøtende interaksjoner mellom H^3 , H^5 og H^6 . g^- konformasjonene har ingen slike frastøtende interaksjoner og antas å være de mest stabile av disse tre konformasjonene. I disse konformasjonene bevares ortogonaliteten mellom O^9 og kinolin enheten slik at charge transfer interaksjoner mellom O^9 og Fe^{3+} er mulig.

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
7: H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸			
	19	20	21
8: H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷			
	22	23	24
9: H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹			
	25	26	27

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
10: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹			
	28	29	30
11: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷			
	31	32	33
12: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸			
	34	35	36

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
13: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -N ¹			
	37	38	39
14: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷			
	40	41	42
15: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸			
	43	44	45

Analys av T16-T18

Alle konformasjonene i denne gruppen (T 16-18) har frastøtende interaksjoner mellom HO⁹/nbe og H⁷. α konformasjon har frastøtende interaksjoner mellom H⁷ og HO⁹/nbe. β konformasjon har sterke frastøtende interaksjoner mellom HO⁹ og H⁶, nbe og H⁵ og nbe og H⁵. Det er muligheter for intramolekylære hydrogenbindinger i γ konformasjon men også den har frastøtende interaksjoner mellom HO⁹/nbe og H⁵.

Torsjonsvinkel	α	β	γ
16: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -H ⁹			
	46	47	48
17: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -C ⁸			
	49	50	51
18: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -C ^{4'}			
	52	53	54

Analyse av T19-T24

Syn konformasjonen til torsjonsvinklene 19 og *anti* konformasjonen til torsjonsvinkel 22 har frastøtende interaksjoner mellom HO⁹/nbe og H⁶, H⁵ og H⁷. De respektive *syn* og *anti* konformasjonene til disse to torsjonsvinklene gir i tillegg frastøtende interaksjon mellom H⁸ og H⁵. *Syn* konformasjonen til torsjonsvinklene 19 og 24 og *anti* konformasjonen til torsjonsvinklene 20 og 21 har frastøtende interaksjoner mellom HO⁹/nbe og H⁶, H⁵ og H⁷ i tillegg til H⁵. De respektive *syn* og *anti* konformasjonene til disse to torsjonsvinklene har i tillegg frastøtende interaksjoner mellom HO⁹/nbe og H³. Ortogonalitet mellom O⁹ og kinolin enhet er mulig i torsjonsvinklene. Disse konformasjonene er favorisert med tanke på kompleks dannelsen med Fe³⁺ til hem.

Torsjonsvinkel	<i>syn</i>	<i>anti</i>	Torsjonsvinkel	<i>syn</i>	<i>anti</i>
19: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -H ⁹			22: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -H ⁹		
	56	57		62	63
20: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -O ⁹			23: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -O ⁹		
	58	59		64	65
21: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸			24: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸		
	60	61		66	67

Analyse av T25-26

I torsjonsvinklene 25 *anti* og 26 *syn* er det frastøtende interaksjoner mellom H^{9'} og H^{5'} som antas å bidra til høy entalpi (ΔH) av molekylet.

Torsjonsvinkel	<i>syn</i>	<i>anti</i>
25: C ^{9'} -O ^{6'} -C ^{6'} -C ^{7'}		
	68	69
26: C ^{9'} -O ^{6'} -C ^{6'} -C ^{5'}		
	70	71

Analyse av T27

I og med C^{9'} er bundet til tre hydrogenatomer vil konformasjonene være identiske. For denne torsjonsvinkelen vil ett av hydrogenatomene fra metylgruppe alltid stå ortogonalt til kinolin enheten. Det er forskjell i konformasjonene i forhold til hvordan de står i forhold til H^{7'} og C^{6'}. Alt i alt gir disse konformasjonene destabiliserende interaksjoner i molekylet og regnes derfor som overgangstilstander.

Torsjonsvinkel	α	β	γ
27: H ^{9'} -C ^{9'} -O ^{6'} -C ^{6'}			

Konformasjonsanalyse av kinidin

Videre ble konformasjonene til kinidin analysert. I og med torsjonsvinklene 1-6 og 25-27 er identiske i kinin og kinidin ble disse ikke gjentatt i analysen.

Tabell 32: Dihedral vinkel og mulige konformasjoner til kinidin.

T	Dihedral vinkel				Antall konformasjoner
1	C11-C10-C3-H3	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
2	C11-C10-C3-C4	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
3	C11-C10-C3-C2	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
4	H10-C10-C3-H3	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
5	H10-C10-C3-C4	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
6	H10-C10-C3-C2	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
7	H9-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
8	H9-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
9	H9-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
10	O9-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
11	O9-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
12	O9-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
13	C4'-C9-C8-N1	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
14	C4'-C9-C8-C7	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
15	C4'-C9-C8-H8	g^+	<i>anti</i>	g^-	3
16	HO9-O9-C9-H9	α	β	γ	3
17	HO9-O9-C9-C8	α	β	γ	3
18	HO9-O9-C9-C4'	α	β	γ	3
19	C4'a-C4'-C9-H9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
20	C4'a-C4'-C9-O9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
21	C4'a-C4'-C9-C8	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
22	C3'-C4'-C9-H9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
23	C3'-C4'-C9-O9	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
24	C3'-C4'-C9-C8	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
25	C9'-O6'—C6'-C7'	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
26	C9'-O6'—C6'-C5'	<i>syn</i>	<i>anti</i>		2
27	H9'-C9'-O6'-C6'	α	β	γ	Overgangstilstand

Analyse av T7-T15

Torsjonsvinklene $7 g^+$, $8 anti$ og $9 g^-$, $10 g^+$, $11 g^+$ og $12 anti$ har frastøtende interaksjoner mellom HO^9/nbe og H^2 og H^5 . Torsjonsvinklene $7 anti$, $8 g^-$ og $9 g^+$, $10 anti$, $11 anti$ og $12 g^-$ har frastøtende interaksjoner mellom H^5 , H^2 og H^9 . Torsjonsvinklene $7 g^-$, $8 g^+$ og $9 anti$, $10 g^-$, $11 g^-$ og $12 g^+$ har frastøtende interaksjoner mellom H^2 og $\pi - \pi$ elektroner til kinolin enheten.

I kinidin er ortogonalitet mellom O^9 og kinolin enhet mulig i samtlige 9 konformasjoner. Følgende konformasjoner danner interne H-bindinger mellom O^9 og $R_3N^1H^+$:

$7 g^+$ og g^- , $8 g^+$ og $anti$ og $9 anti$ og g^-
$10 g^+$ og g^- , $11 anti$ og g^- og $12 g^+$ og $anti$
$13 g^+$ og $anti$, $14 anti$ og g^- og $15 anti$ og g^-

Torsjonsvinkel	g^+	$anti$	g^-
7: $H^9-C^9-C^8-H^8$			
	19	20	21
8: $H^9-C^9-C^8-C^7$			
	22	23	24
9: $H^9-C^9-C^8-N^1$			
	25	26	27

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
10: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹			
	28	29	30
11: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷			
	31	32	33
12: O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸			
	34	35	36

Torsjonsvinkel	g^+	<i>anti</i>	g^-
13: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -N ¹			
	37	38	39
14: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷			
	40	41	42
15: C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸			
	43	44	45

Analyse av T16-T18

Slik som for kinin gir alle konformasjoner til torsjonsvinklene 16-18 frastøtende interaksjoner mellom nbe til HO⁹ og H^{5'} og H⁷.

Torsjonsvinkel	α	β	γ
16: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -H ⁹			
	46	47	48
17: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -C ⁸			
	49	50	51
18: HO ⁹ -O ⁹ -C ⁹ -C ^{4'}			
	52	53	54

Analyse av T19-T24

Ortogonalitet mellom O⁹ og kinolin enhet er mulig i konformasjonene til torsjonsvinklene 19 og 22. Konformasjonene fra torsjonsvinklene 20-24 innehar steriske frastøtende interaksjoner mellom nbe til HO⁹ og H^{5'} og H⁷.

Torsjonsvinkel	<i>syn</i>	<i>anti</i>	Torsjonsvinkel	<i>syn</i>	<i>anti</i>
19: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -H ⁹			22: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -H ⁹		
	56	57		62	63
20: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -O ⁹			23: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -O ⁹		
	58	59		64	65
21: C ^{4'a} -C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸			24: C ^{3'} -C ^{4'} -C ⁹ -C ⁸		
	60	61		66	67

Oppsummering av konformasjonsanalysene

Ved hjelp av molekylmodeller og Newman projeksjoner ble det identifisert totalt 432 konformerer for 27 torsjonsvinkler for henholdsvis kinin og kinidin. Disse kan eksistere i nøytral form og mono- eller di-ladete former, samt i ulike aggregat-tilstander. Molekylene har med andre ord en svært kompleks termodynamisk likevekt ved fysiologisk pH som blir mer komplisert ved pH 5 i vakuolene der di-ladete former utgjør 50% av molekylene.

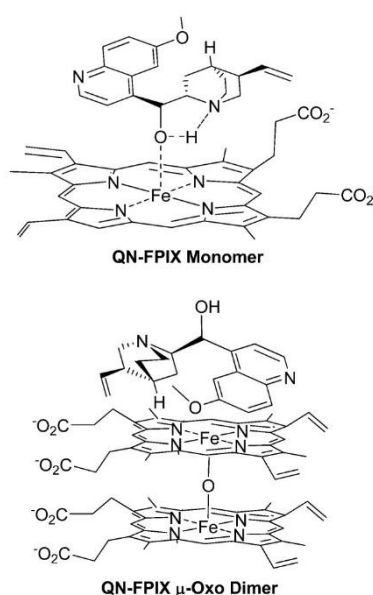
Torsjonsvinkel 27 viste seg å ha 3 konformasjoner men på grunn av destabiliserende effekter ble disse regnet som overgangstilstander.

Konformasjonsanalysene viste i tillegg at kinidin hadde flere konformasjoner enn kinin som setter O⁹ ortogonalt til kinolin enheten. Dette antar vi er viktig for å danne binding med Fe³⁺. Funnene fra konformasjonsanalysene ble videre benyttet for SAR analyser og mekanistiske studier.

1.3. SAR analyser og mekanistiske studier av chinchona derivater

Litteratursøk fra ulike kilder rapporterer om at kinidin har bedre effekt enn kinin mens epikinin og epikinidin har tilnærmet ingen antimalaria-effekter.[1,2,5,17] Ut fra konformasjonsanalysene som ble foretatt i denne oppgaven for de to diastereomerene fant vi at kinidin har flere konformasjoner som kan tilegne seg en ortogonal topologi som muliggjør kompleksdannelse med hem, enn kinin har, noe som kan forklare hvorfor kinidin er mer potent enn kinin.

I en studie utført av Roepe og medarbeidere ble det antatt at kinin og kinidin hovedsakelig binder seg til hem-monomer. Kinin og kinidin kunne danne kompleks til hem-dimer men bindingen var hovedsakelig basert på π - π interaksjoner med vinyl gruppen av hem-dimer (Figur 49). Kinolin-hem interaksjoner er rapportert fra *in vitro* studier med forslag om charge transfer interaksjoner mellom hydroksyl gruppen i kinin / kinidin og Fe³⁺ i hem.[2,4,18]



Figur 49: Kinin hem-monomer og hem-dimer kompleks.[2]

Det må bemerkes at forfatterne i denne artikkelen ikke tok høyde for at det alifatiske og pyridinske (delvis) nitrogen atomet er ladet ved pH ~5. De har i tillegg tegnet karboksylat grupper og ikke karboksylgrupper ved denne pH til tross for at omlag 50% av dem foreligger i uladet form. Svakheter ved disse forslagene til mekanismene i tillegg er at de ikke tok høyde for molekylenes totale topologi og konformasjonene av de ulike farmakofor-delene for de to diastereomerene.

Flere studier foreslår at kelatbinding (charge transfer) mellom O^{\ominus} - Fe^{3+} og π - π -interaksjoner mellom kinolin enheten og hem er viktige for antimalaria-effekter. Vi antar at interne hydrogen-bindinger mellom $R_3N^{\oplus}H$ og O^{\ominus} kan konkurrere med charge transfer binding til Fe^{3+} og at denne bindingen må brytes for å danne kompleks med hem og dermed føre til antimalaria-effekt. Andre studier viser at hydrogenbinding mellom $R_2N^{\oplus}H$ og karboksylat-gruppen til hem er viktig for antimalaria-effekten, og at en mulig hydrogen-binding mellom kinidin og karboksylat er mer stabil enn mellom kinin og karboksylat.[3,5,17]

Marques og medarbeidere foretok teoretiske beregninger for hydrogenbinding mellom $R_3N^{\oplus}H$ og karboksylat-gruppen. De konkluderte med at hydrogenbinding for kinin og kinidin var mer stabil enn for deres epi-derivater.[3]

Det ble ikke funnet studier som foreslår hydrogenbinding mellom pyridinsk nitrogen og karboksylat eller karboksylsyre gruppe, noe vi foreslår ut fra vår analyse. Siden pH i fordøyelses-vakuolen er rundt 5 er det sannsynlig at dette nitrogenatomet (pKa ca 4) vil ha et uladet ladet forhold 1:10 og derfor danne svak hydrogenbinding med karboksylat eller karboksylsyregruppe. Selve hydrogenbindingen kan isolert være en svak interaksjon, men dersom den bidrar til bedre $\pi - \pi$ interaksjoner mellom kinolin og hem enheten, kan den ha en indirekte betydning.

Lumefantrin er en syntetisk analog til kinin, og dette molekylet mangler pyridinsk nitrogen. Til tross for dette er lumefantrin mye mer potent enn kinin. Alumasa og medarbeidere undersøkte kinins antimalaria-effekt *in vitro*. I denne studien ble hydroksylgruppen og alifatisk amin fjernet fra molekylet og hemzoin inhibering ble målt. De konkluderte at begge funksjonelle gruppene er viktige for hemming av hemozoin dannelse. De har ikke utført studien ved å fjerne pyridinsk nitrogen. Det at fjerning av hydroksylgruppen og alifatisk amin reduserte effekten, til tross for at pyridinsk nitrogen ble beholdt i molekylet, stiller spørsmål om dette nitrogen atomets bidrag har betydning for den totale effekten. [18]

For å analysere forskjellen i graden av antimalaria-effekter ved å ta høyde for konformasjoner i ulike deler av molekylene, og molekylenes totale topologi for de fire diastereomerene, ble det videre benyttet molekylmodeller og resultater fra MM2 minimaliseringer vi fikk fra ChemDraw. For molekylmodellene ble det valgt å sette metoksygruppen til høyre for kinuklidin enheten (forsøkt illustrert i figur 54, side 83). Det ble i tillegg benyttet IC_{50} verdier fra en studie utført av Karle og medarbeidere, som sammenlignet effektiviteten til chinchona derivatene mot klorokin sensitive stammer *in vitro* (tabell 33).[1]

Tabell 33: IC₅₀ verdier for chinchona alkaloider.[1]

Chinchona alkaloid	IC ₅₀ (nM)
Kinin	29.3
Kinidin	13.4
Dihydrokinin	21.3
Dihydrokinidin	10.4
Epikinin	3471
Epikinidin	2700

IC₅₀ verdiene i tabell 33 viser at kinidin er omlag 2 ganger mer potent enn kinin, mens epiderivatene nærmest ikke har antimalaria effekt. Det faktum at effekten til dihydro-derivatene er mye mer større enn epiderivatene kan tyde på at årsaken ligger i C⁸ – C⁹ topologien og mindre på vinylgruppens område. Verdiene til de to parene kinin og dihydrokinin, og kinidin og dihydrokinidin er svært like. I prosent er 21,3 nM 9.8% lavere enn 29.3 nM og 10.4 nM er 7.8 % lavere enn 13.4 nM. Vi kan dermed konkludere at vinyl gruppens bidrag til effekten er om lag 10 % av den totale effekten.

Det at dihydro-derivatene har lavere IC₅₀ verdier kan muligens forklares med at etylgruppe gir en mer stabiliserende effekt for hele molekylet enn vinylgruppe. Grunnet tidsbegrensninger ble det ikke funnet flere artikler hvor IC₅₀ verdier til ulike chinchona alkaloider ble sammenlignet.

Ved hjelp av resultatene fra MM2 minimaliseringer ble det tegnet 3D figurer som skulle visualisere de mest stabile konformasjonene. Disse modellen ble benyttet som utgangspunkt for å danne et bilde av mulige topologier molekylene kan inneha ved kompleksdannelse til hem molekylet. Resultatene fra MM2 minimaliseringene (tabell 34) viser at ladede molekyler har lavere relative entalpier (ΔH) sammenlignet med deres respektive nøytrale former. I og med molekylene foreligger i ladet form i parasittens fordøyelses-vakuol ble det ikke tatt hensyn til de nøytrale molekylene i struktur-aktivitetsanalyser. Det må påpekes at disse beregningene er meget unøyaktige og de gjelder kun for konformasjonene programmet har valgt som de mest stabile. Det er 432 mulige konformerer for kinin og kinidin, som både foreligger i ladet og ikke ladet form. Det bør derfor foretas avanserte teoretiske beregninger for å få et bedre bilde av den totale topologien til de ulike konformasjonene med lavest entalpi. Dette er utenom denne oppgavens grenser. Det er igjen viktig å minne om at biologien ikke nødvendigvis velger den mest stabile topologien til et molekyl som den aktive. Det vil si at den bioaktive topologien ikke nødvendigvis må være den mest stabile når det binder seg til dets target.

Tabell 34: Resultat for MM2 beregninger (+ = ladet molekyl)

	Kinin	Kinin ⁺	Kinidin	Kinidin ⁺	Epikinin	Epikinin ⁺	Epikinidin	Epikinidin ⁺
Dipol-Dipol	0.13	0.28	0.67	0.16	0.023	0.01	0.18	0.12
Total energi (ΔH), kcal/mol	41.78	38.67	49.12	43.28	39.87	32.37	45.76	48.31

Ved bruk av molekylmodellene konkluderte vi at torsjonsvinkelen N¹-C⁸-C⁹-O⁹ hadde N¹ og O⁹ g⁺ konformasjon slik at det ble mulig å danne intern hydrogenbinding mellom O⁹ og R₃N¹H⁺. Rotasjon videre til *anti* konformasjon, som gir ortogonalitet komplekset krever, betyr også bryting av hydrogen binding. Videre kom det ut fra vår analyse at de 4 diastereomerene hadde en type "T-formet" ortogonal topologi både ved g⁺ og *anti* konformasjon (figur 54). Forskjellene viste seg å være om vinylgruppe var på samme side (*cisoid*) som metoksygruppe eller på motsatt side (*transoid*) og antall destabiliserende interaksjoner i molekylene i hver av de to konformasjonene. En mulighet for å danne hydrogenbinding mellom R₃N¹H⁺ og karboksylat til hem viste seg å være vanskelig å få til med molekylmodellene benyttet i denne oppgaven. For alle fire derivatene viste molekylmodellene at det er mulig å danne hydrogenbinding mellom pyridinsk nitrogen og karboksylat / karboksylgruppe til hem.

Muligheter for å danne charge transfer- og π-π interaksjoner med hem antas å være ganske like for de 4 diastereomerene, og forskjell i antimalaria-effekter kan forklares utfra forskjeller i topologier molekylene inntar seg ved *anti* konformasjon (som antas å være nødvendig for å danne charge transfer interaksjon mellom O⁹ og Fe³⁺) og destabiliserende effekter i molekylene som følge av denne "T-formede" topologien.

For kinin var det 6 konformasjoner hvor O⁹ er ortogonalt til kinolin enheten samtidig som det ble dannet interne hydrogenbindinger med R₃NH⁺:

H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹ <i>anti</i>	H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷ g ⁻	H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸ g ⁺	C ⁴ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹ g ⁺	C ⁴ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷ <i>anti</i>	C ⁴ -C ⁸ -C ⁹ -H ⁸ g
--	---	---	---	--	--

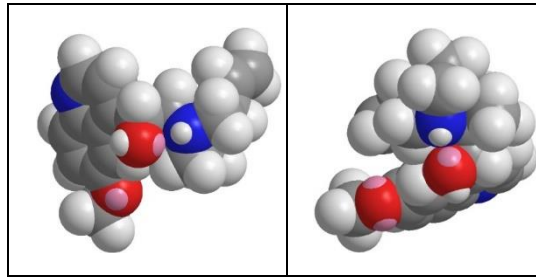
For kinidin var det 9 konformasjoner som resulterte i både ortogonalitet og intern hydrogenbinding mellom O⁹ og R₃NH⁺:

O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷ <i>anti</i>	O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹ g ⁺	O ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸ g ⁻
C ⁴ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷ g ⁻	C ⁴ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹ <i>anti</i>	C ⁴ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸ g ⁺
H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -N ¹ <i>anti</i>	H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -C ⁷ g ⁻	H ⁹ -C ⁹ -C ⁸ -H ⁸ g ⁺

3D-figur 50 illustrer fint at interne hydrogenbindinger er favorisert i begge molekylene. Dette kan muligens forklare den lavere relative entalpi (ΔH) verdien fra MM2. Analyse med molekylmodeller viste at den interne hydrogenbindingen er mer favorisert i kinin enn i kinidin.

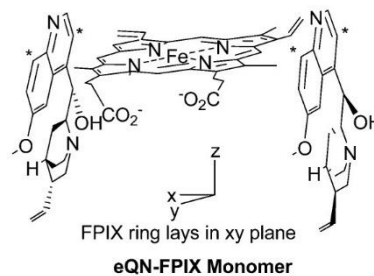
Det var mindre destabiliserende interaksjoner mellom hydrogenatomene til kinuklidin enheten og kinolin enheten for kinin, enn for kinidin.

Diastereomerene epikinin og epikinidin har meget svak til ingen effekt på hemming av hemozoin dannelse, selv om den eneste forskjellen til disse molekylene er stereokjemien rundt hydroksyl gruppen.[2,3]



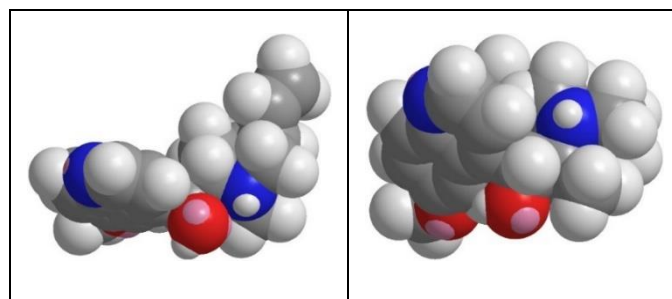
Figur 50: Kinin til venstre og kinidin til høyre. I begge molekylene har den alifatiske kinuklidin enheten og kinolin enheten en T- formet ortogonal topologi.

Roepe og medarbeidere foreslår at en meget svak antimalaria-effekt kan muligens skyldes kompleksdannelse til hem-monomer via CH- π interaksjoner mellom to epikinin og hem (2:1 forhold). Figuren deres viser ingen muligheter for kelat binding mellom O^9 og Fe^{3+} . [2,4]



Figur 51: Mulig kompleksdannelse mellom epikinin og hem monomer. [2]

Denne interaksjonen antas å være usannsynlig siden molekylene står ortogonalt til monomeren og mulighet for å danne π - π interaksjon kan være vanskelig. Det må bemerkes at det også i denne figuren er nitrogen atomene tegnet i nøytral form.





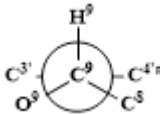
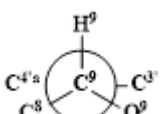
Figur 52: Epikinin til venstre og epikinidin til høyre, og begge har en T-formet topologi både på g^+ og *anti* konformasjonene.

3D-figur 52 viser at epikinin favoriserer intern hydrogenbinding. Fra molekylmodellen så vi sterke destabiliserende interaksjoner i *anti* konformasjon. Vinylgruppen dannet sterke frastøtende interaksjoner med deler av kinolin enheten og metoksygruppen. For epikinidin viste molekylmodellen destabiliserende interaksjoner mellom C^2H , H^9 og H^5 når det ble dannet intern hydrogenbinding. Dette kan muligens forklare den høyere relative entalpi (ΔH) verdien fra MM2 for epikinidin.

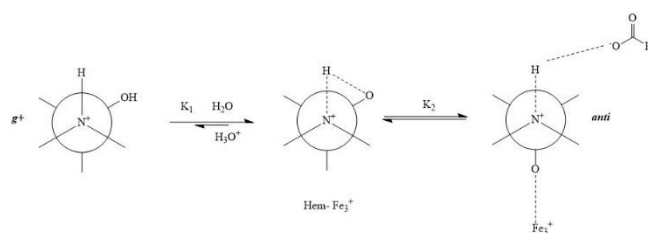
I doktorgradsavhandlingen til Caner [17] ble det som nevnt tidligere foretatt teoretiske beregninger av ulike konformasjoner til de 4 diastereomerene. For beregning av de relative entalpi verdiene ble det ikke tatt hensyn til protonering av N¹, metoksy- eller vinylgruppene. I avhandlingen ble det vist at epikinin hadde to konformasjoner med lave entalpi verdier. I begge disse topologier er det en intern hydrogenbinding mellom O⁹ og R₃N¹H⁺ men igjen vel å merke, av de nøytrale formene, som er svært lite å finne ved pH i parasittens fordøyelses-vakuol.

For epikinidin ble det også funnet to konformasjoner med lave ΔH verdier, hvor kun den ene ga muligheter for interne hydrogenbindinger. Dette kan forklare den noe lavere IC₅₀ verdien for epikinidin i forhold til epikinin (tabell 33) og vi antar at intern hydrogenbinding må brytes for å danne kompleks med hem utfra analyser gjort i denne oppgaven.

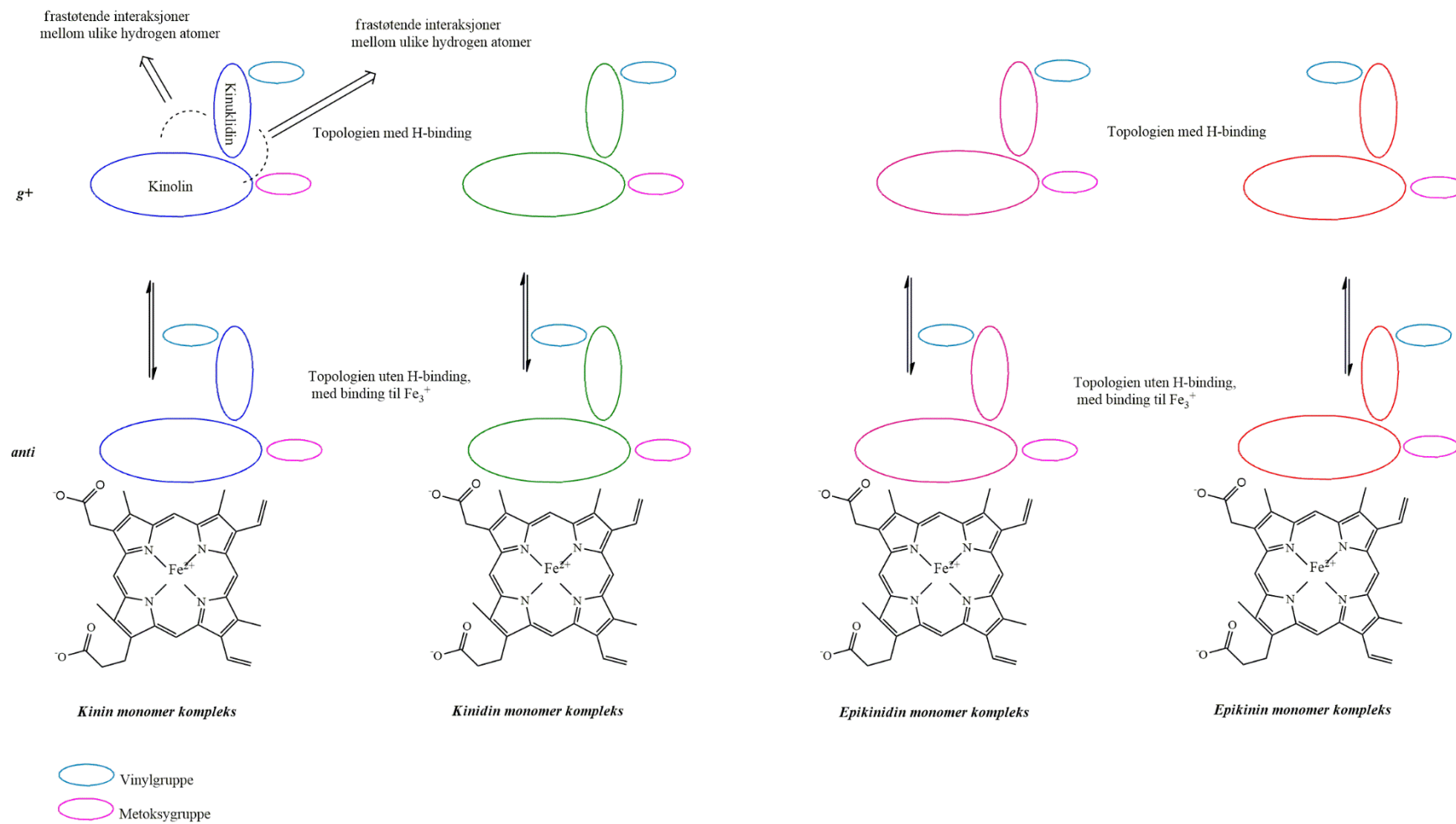
For kinidin og kinin var det følgende konformasjoner som hadde lave relative entalpi verdier:

Kinin		Kinidin	
T7: <i>anti</i> , T8 ^{g+} , T9 <i>g</i> -, T10: <i>anti</i> , T11 <i>g</i> -, T12 <i>g</i> +, T13: <i>g</i> +, T14 <i>anti</i> , T15 <i>g</i> -		T7: <i>anti</i> , T8 <i>g</i> -, T9 <i>g</i> +, T10: <i>anti</i> , T11 <i>g</i> +, T12 <i>g</i> -, T13: <i>g</i> -, T14 <i>anti</i> , T15 <i>g</i> +	
T20: <i>anti</i> , T21 <i>syn</i> , T23 <i>syn</i> og T24 <i>anti</i>		T20: <i>anti</i> , T21 <i>syn</i> , T23 <i>syn</i> og T24 <i>anti</i>	

Ingen av disse lav energi konformasjonene dannet interne hydrogenbindinger. Dette styrker antagelsen vår om at interne hydrogenbindinger mellom R₃N¹H⁺ og O⁹ kan konkurrere med charge transfer binding til Fe³⁺, og avhengige av likevektens-retningene (figur 53) kan dette svekke eller forsterke antimalaria-effekten. Siden studier viser at R₃N¹H⁺ kan danne hydrogenbinding med karboksylatet fra hem, kan denne bindingen stabilisere komplekset ytterligere.[3,5] Figur 53 illustrer likevektene mellom intern hydrogenbinding til O⁹ (K₁), charge transfer til Fe³⁺ og hydrogenbinding til karboksylat (K₂). Siden fysisk analyse med molekylmodellene og MM2- energi verdiene viste at intern hydrogenbinding er noe favorisert for kinin enn kinidin, antar vi at likevekten vil være mer forskjøvet til venstre for kinin (lavere K₂). Det vil med andre ord bety at K₂ for kinidin vil være større og likevekten vil være forskjøvet mer til høyre, som igjen kan relateres til den lave IC₅₀ verdien til kinidin i tabell 33.



Figur 53: Overgang fra *g*⁺ til *anti* antas å være nødvendig for kompleksdannelsen. Verdien til K₂ kan med andre ord være en parallell verdi til IC₅₀.



Figur 54: Forslag til kompleksdannelse av hver av de 4 diastereomerene til chinchona med hem. Overgang fra g⁺ til anti antas å være avgjørende for kompleks dannelsen og dermed for molekylens farmakologiske effekt.

Oppsummering

Molekylmodeller ble benyttet for å studere de 4 diastereomerene av chinchona. Alle de teoretisk mulige konformasjonene som resulterer i ortogonalitet mellom O⁹H og kinolin enheten antas å være viktig for å danne god O⁹ – Fe³⁺ binding. Analysene videre viste at både *g*⁺ (intern hydrogenbinding) og *anti* (binding til Fe³⁺) konformasjonene hadde en "T-formet" ortogonal topologi mellom den alifatiske kinuklidin enheten og kinolin enheten, for alle fire diastereomerene (figur 54).

I og med kinuklidin enheten er i samme ortogonal topologi i forhold til kinolin enheten, for alle 4 diastereomerene, kan forskjell i graden av antimalaria-effekter forklares utfra antall destabiliserende interaksjoner som forekommer ved *anti* konformasjon rundt N -C⁸- C⁹-O⁹ bindingen, som er den konformasjon som antas å må til for å danne charge transfer binding med Fe³⁺.

Molekylmodellene viste at vinylgruppen var på samme side som metoksygruppen for kinin, kinidin og epikinidin ved *g*⁺ konformasjon, og på motsatt side ved *anti* konformasjon. For epikinin ble det motsatte sett og *anti* konformasjon viste å ha sterke destabiliserende interaksjoner for hele molekylet. For epikinin antas at likevekten for K2 i figur 53 å være meget liten, altså at likevekten er sterk forskjøvet mot venstre enn for de andre 3 diastereomerene.

Kinin, kinidin og epikinidin har samme topologi ved *anti* konformasjon, som ble sett ved analyser med molekylmodellene. I tillegg viste det seg at kinidin hadde færrest destabiliserende interaksjoner ved *anti* konformasjon enn kinin og epikinidin:

Tabell 35: Destabiliserende effekter forårsaket av δ⁺ δ⁺ interaksjoner mellom hydrogenatomer i molekylet. Kinidin har færrest destabiliserende interaksjoner (*anti* konformasjon).

Epikinin	Sterke destabiliserende interaksjoner i <i>anti</i> konformasjon. Vinylgruppen dannet sterke frastøtende interaksjoner med deler av kinolin enheten og metoksygruppen
Epikinidin	C3'H og CH7 og H10/H11 C5'H og H9 og R ₃ NH ⁺ Vinylgruppen trans til metoksy-gruppen og peker mot kinolin enheten
Kinin	C5'H og H9 og C6H Vinylgruppen trans til metoksy-gruppen og peker vekk fra kinolin enheten
Kinidin	C'5H og H8 Vinylgruppen trans til metoksy-gruppen og peker vekk fra kinolin enheten

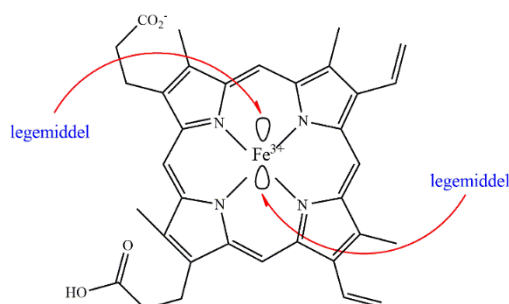
Hvorvidt resultatene fra analysene påvirker kompleksdannelsen mellom hem og legemiddel er ikke mulig å si eksakt med mindre det foretas teoretiske beregninger hvor hem er kompleksert til legemidlet i ulike konformasjoner. Det som kan foreslås ut ifra analysene gjort i denne oppgaven er at kompleksdannelsen mellom hem og legemiddel krever en ortogonalitet mellom kinolin enheten og O⁹H. Dette muliggjør at

OH kan sende sine nbe til Fe^{3+} sine tomme orbitaler. Dermed kan det dannes charge transfer interaksjoner hvor O-fungerer som et kelat.

Molekylmodellene som ble benyttet i våre analyser viste at det var vanskelig å få dannet hydrogenbinding mellom $\text{R}_3\text{N}^+\text{H}^+$ og karboksylat-gruppen til hem for alle 4 derivatene.

Det forslås videre at diastereomerenes evne for å danne interne hydrogenbindinger, og antall destabiliserende interaksjoner som følge av *anti* konformasjon er like viktige både for molekylenes totale topologi og kompleksdannelse med hem. Dette kan forklare forskjeller i antimalaria-effekten.

Det bør i tillegg pekes på at effekten også er avhengig av evnen til å kompleksere seg med henholdsvis hem som monomer, to monomere enheter eller med en hem-dimer. Dette forholdet kan være 1:1, 1:2, 2:1 eller 2:2 siden Fe^{3+} har to bindings seter (figur 55).



Figur 55: Mulig kompleksdannelse mellom hem-monomer og kinin/kinidin.

Alle analysene og forslagene gjort i denne oppgaven er hovedsakelig basert på molekylmodeller og konformasjonsanalyse. Det bør pekes på at molekylmodellene ikke kan direkte benyttes til slike beslutninger siden bindingene mellom atomene i modellene ikke kan relateres direkte til reelle bindinger mellom atomer.

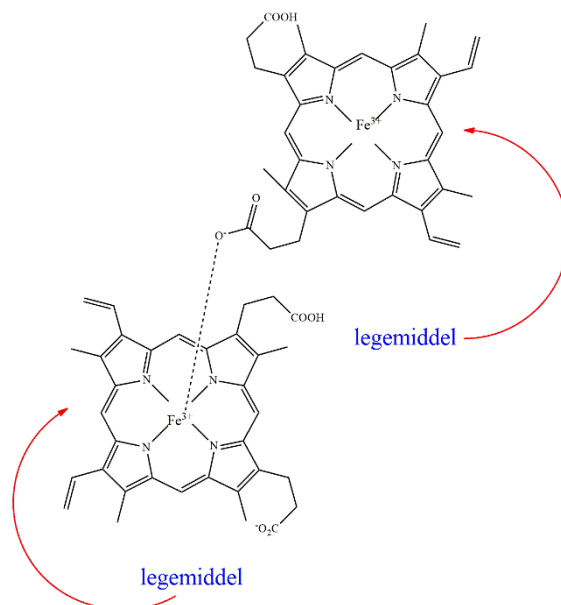
Konformasjonsanalysene viste at metoksy- og vinylgruppene gir destabiliserende interaksjoner uansett konformasjon for hele molekylet. Det bør foretas teoretiske beregninger for hver av konformasjonene funnet i denne oppgaven og for de relevante konformasjonene i kompleks med hem. Dette ville gitt et bedre helhetlig bilde av molekylenes totale topologi og dermed bedre forståelse av den store forskjellen i molekylenes farmakologiske effekt.

Resultatene fra SAR-studier ble videre benyttet for å se om de samme topologiske kravene for god kompleksdannelse med hem gjelder også for de syntetiske analogene. Det ble valgt ut noen syntetiske analoger som har lignende funksjonelle grupper som chinchona derivater, for å analysere forskjellen i antimalaria-effekter og så å se om dette kan bidra til bedre forståelse av forskjellen i chinchona derivatenes farmakologiske effekt. Analysene og resultatene er utredet i avsnittet under.

1.4. SAR analyser og mekanistiske studier av syntetiske analoger

De fleste syntetiske analogene er mer effektive enn kinin og kinidin og noen av de danner bedre kompleks med hem-dimer, men som for chinchona derivatene angis det ikke hvordan kompleks dannes på molekylært nivå.[20-22,78] Hovedforskjell mellom de syntetiske analogene og de naturlige molekylene

er fleksibilitetsgraden av den alifatiske delen med aminogruppen, noe som gjør at de kan danne kompleks med de ytterste sidene av dimeren (enten ovenfra eller under, figur 56). Dimeren er mindre fleksibel enn monomeren, og forskjell i dimerens fleksibilitet kan muligens gjøre det vanskeligere for de naturlige molekylene å kompleksere seg med den.



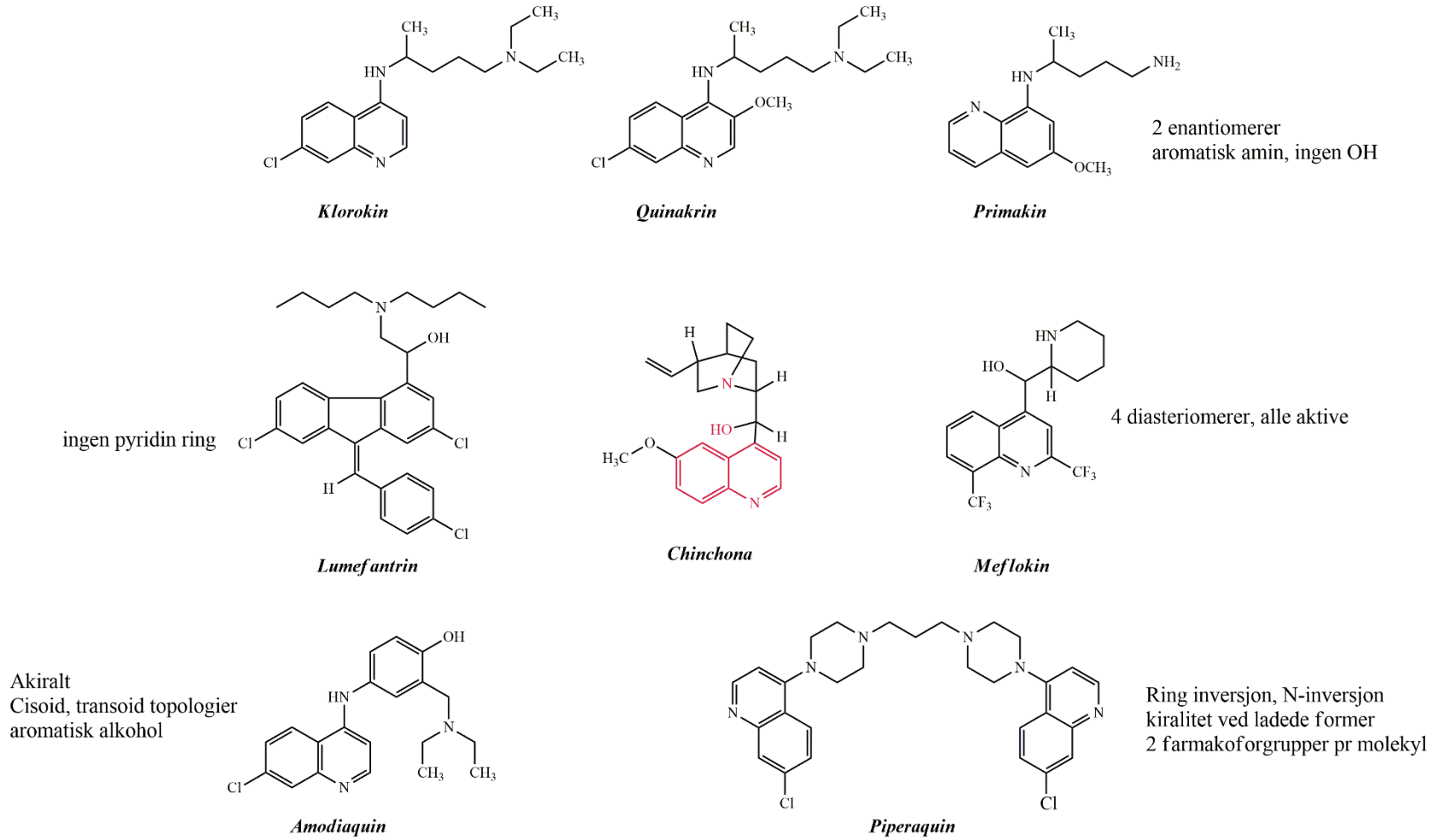
Figur 56: Syntetiske analoger danner muligens bedre kompleks med hem-dimer.

For å forstå forskjeller i antimalaria effekten til de ulike syntetiske analogene ble det utført SAR analyse av noen utvalgte derivater som har lignende og viktige funksjonelle grupper som de naturlige molekylene har i deres farmakofor. I analysene ble det tatt hensyn til kinolin enheten, OH gruppene og alifatisk amin, som er de felles og viktige funksjonelle gruppene for både syntetiske analogene og de naturlige molekylene (figur 57). IC₅₀ verdier for *in vitro* antimalaria-effekter er hentet fra 2 ulike kilder. Tabell 36a viser verdier fra *in vitro* antimalaria-aktiviteter mot klorokin resistente *P. falciparum* stammer og er hentet fra Dianxi og medarbeidernes review artikkel.[20] Tabell 36b viser verdier fra *in-vitro* antimalaria-aktiviteter mot *P. falciparum* gametocytter.[21]

Tabell 36: *in vitro* antimalaria-aktiviteter.

a*		b*	
Forbindelse	IC ₅₀ (nM/L)	Forbindelse	IC ₅₀ (nM/L)
Amodiaquin	14.3	Meflokin	50
Lumefantrine	47.9	Primakin	10 ³
Klorokin	245	Piperaquine	15
Kinin	302	Kinin	50

*Disse verdiene er ikke direkte sammenlignbare siden metodene som ble benyttet er for å oppnå disse resultatene er forskjellige. IC₅₀ verdiene er kun ment for å sammenligne antimalaria-effekter mellom kinin og de syntetiske analogene i denne oppgaven.



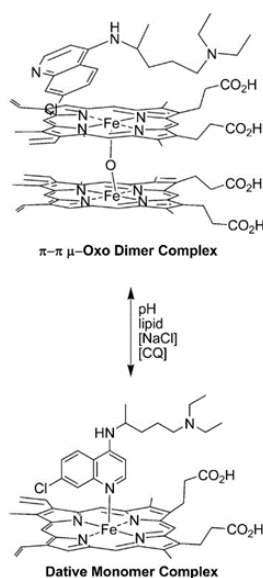
Figur 57: Utvalgte syntetiske analoger med lignende funksjonelle grupper som i kinin og kinidin

Meflokin ligner mest på de naturlige molekyler med tanke på farmakoforen. Den har en aromatisk del, OH gruppe og et alifatisk amin i en syklisk ring. Denne ringen er mye mer fleksibel i motsetning til den bisykliske ringen i de naturlige molekyler. Meflokin har ulike konformasjoner på grunn av både rotasjoner rundt enkle bindinger, ringinversjon og nitrogeninversjon i nøytral form, og kun ringinversjon i ladet form. Allikevel er meflokin mye mer fleksibel og kan få til en topologi der ortogonalitetes-kravet er innfridd, som høyst sannsynligvis er viktig for kompleksdannelse med hem. Den alifatiske amin-enheten er fanget i en ring og mulighet for å danne intern hydrogenbinding med karbonylgruppen til hem kan være lettere enn i chinchona derivatene.

For klorokin antas det i en studie utført av Casabianca og medarbeidere [78] at den kan binde seg til både hem-monomer og -dimer men likevekten mellom kompleksdannelse er mer forskjøvet mot dimer. I en review artikkel til Roepke og medarbeidere [4] foreslås det at klorokin kan danne kompleks med hem-dimer via π - π interaksjoner mens i hem-monomer dannes kompleks via kelat interaksjon mellom den pyridinske aminet og Fe^{3+} (figur 58). Monomer kompleks med klorokin er pH avhengig siden pyridinske nitrogen til klorokin danner kelat binding med Fe^{3+} .

Det er verdt å merke seg at pKa til dette nitrogen er ca. 4 [79], dvs at ved pH ca. 5 i fordøyelses-vakuol til parasitten vil forholdet mellom uladet : ladet pyridin ring være 1:10. Det er svært lite uladet form og det er dessuten vanskelig å tro at hele komplekset hviler på kelat binding hvor farmakoforen blir kun den pyridinske nitrogenatomet.

Det er mer sannsynlig å tro at effekten skyldes både π - π interaksjoner og hydrogenbinding mellom protonert alifatisk amin og / eller protonert pyridinske amin med karbonylgruppe / grupper fra hem enheten (begge vist i nøytral form i figur 58) og dermed hindre polymerisering av hem til hemozoin. I og med alifatisk amin er fleksibel kan muligens begge nitrogenene danne bedre hydrogenbindinger med karbonyl enn kinin og kinidin.



Figur 58: Kompleks mellom klorokin og hem-monomer og -dimer. I dette forslag fra Roepke og medarbeidere hviler hele kompleks dannelse på kun én interaksjon. [4,80,81]

Klorokin, primakin og quinakrin har en asyklisk, alifatisk amin og mangler OH-gruppe som er erstattet med en anilinsk NH-gruppe på den pyridinske ringen av kinolin enheten. Likeledes viktig er å peke på at N-atomet er mye nærmere kinolin enheten enn O⁹ i kinin og kinidin på grunn av mangel på C⁹. Til tross for dette er klorokin mer effektiv enn de naturlige molekylene og forklaring kan være som tidligere nevnt mer fleksibilitet, full konformasjonell frihet av tertiært amin, effektiv $\pi - \pi$ interaksjon og hydrogenbinding med hem-dimer, og effektive bindinger mellom de 2 nitrogenatomer og 2 karboksylater.

Det alifatiske aminet som er ladet ved fysiologisk pH bidrar i tillegg til løselighet i alle syntetiske analogene (kan lages i saltform som er mer løselig). I klorokin, primakin og quinakrin kan det dessuten tenkes at det dannes en svak interaksjon mellom alifatisk nitrogen og aromatisk nitrogen i uladet form hvor de deler et H-atom seg imellom. Da pyridin nitrogenet er ladet ved pH 5, kan det tenkes en dynamisk likevekt der det pyridinske nitrogenet i nøytrale form er koblet til det alifatiske aminet som er ladet og det pyridinske nitrogenet i ladet form er koblet til en karboksylat og dermed frigjør det alifatiske aminet til kobling med en karboksylat til. Dette har vi dessverre ikke hatt tid til å studere nærmere i denne oppgaven.

Det ble ikke funnet løselighet for disse molekylene for å vurdere sannsynligheten for denne interne hydrogenbindingen. Siden NH-bindingen er mindre polar en OH-binding kan intern hydrogenbinding bidra ses bort fra for disse 3 molekylene.

Amodiaquin er det mest potente virkestoffet ut fra IC₅₀ verdiene gitt i tabell 36a. Dette stoffet skiller seg fra de andre molekylene ved at dette molekylet er akiralt og har en aromatisk OH-gruppe, og ikke en alifatisk OH-gruppe som gir mulighet for bedre OH- bindinger med karboksylat grupper. OH-gruppen i amodiaquin er mer polarisert på grunn av resonans med aromaten. Det er mulighet for fenol-ringen, kinolin-enheten å være enten i *cisoid* eller i *transoid* topologi i forhold til den andre.

Cisoid geometrien gir større π - π interaksjoner med hem enheten men hvilke av disse 2 som danner kompleks er uvisst. Amodiaquin, i likhet med klorokin, primakin og quinakrin, har et oksygenatom som er koblet direkte til den aromatiske enheten. Amodiaquins lave IC₅₀ verdi kan skyldes en mye mer effektiv hydrogen-binding mellom alifatisk amin, pyridinsk amin og karboksylat-grupper i hem, og / eller bedre π - π interaksjoner med hem enheten.

Lumefantrin er det nest mest potente molekylet ifølge tabell 36a. Den har en aromatisk enhet, en alifatisk alkohol på α -karbon som i chinchona derivatene, og et alifatisk amin (tertiært), og det er frie rotasjoner mellom OH-gruppe på α -karbon og nitrogen på β -karbon. Fri rotasjon kan gjøre det mulig å danne hydrogenbinding mellom N-atom og OH-gruppe i nøytral form og likeledes i ladet form hvor et vann molekyl fungerer som en base og tar til seg H⁺. I likhet med klorokin er N-atom ikke en del av en ring. Den gir stor konformasjonell frihet og fleksibilitet med tanke på ortogonal kompleksing og eventuell kelatdannelse med hem.

Det ble ikke funnet noe litteratur som forklarer forskjellen mellom *cis* og *trans* isomerene til molekylet. Det antas at både *cis*- og *trans*-isomerene bidrar til en mye større aromatisk flate som i sin tur kan gi bedre π - π interaksjoner med hem. Disse faktorene kan muligens være forklaring på lumefantrines høye effektivitet. Fleksibilitet i alifatisk nitrogen muliggjør dessuten hydrogen-binding med karboksylat-grupper. Dette molekylet har ingen pyridinsk nitrogen, noe som bør tas med i videre studier av disse molekylene.

Klorokin, quinakrin og lumefantrin har et tertiært amin som kan bidra til en lengre halveringstid. Alle tre molekylene bør ha to aktive metabolitter grunnet N-dealkylering og di-dealkylering.

For piperakin tilsier topologien ingen mulighet til kompleksdannelse med hem-dimer. Molekylet har mulighet til å danne kompleks med to hem-monomerer som kan resultere i større aktivitet enn kinin.

Oppsummering

SAR analysene som ble utført på de syntetiske analogene i denne oppgaven, sammen med deres IC_{50} verdier, støtter ikke teorien om ortogonalitets-krav for god antimalaria effekt som vi tror er nødvendig for chinchona derivatene.

De syntetiske analogene som ikke har en alifatisk hydroksyl gruppe (klorokin, quinakrin, primakin, amodiaquine, pieparkin) og som fremdeles har relativt lav IC_{50} kan bety at selve kelat bindingen til Fe^{3+} ikke er den interaksjonen som er det mest avgjørende for komplekset. En annen mulighet kunne tenkes å være en kompleks der det er et vann molekyl mellom Fe^{3+} og legemidlet, men dette har ikke vi hatt tid til å studere i denne oppgaven.

Felles for alle analogene er π - π interaksjoner og mulighet for binding mellom det ladede alifatisk / og eller det pyridinske aminet med karboksylat/karboksylysyre gruppe. Siden kinolin enhet er beholdt i alle de syntetiske analogene som ble analysert i denne oppgaven, bortsett fra lumefantrin, er det rimelig å anta at det er en viktig del av molekylets farmakofor. Forskjellen i intern hydrogenbinding, destabiliserende effekter (analysert for chinchona derivatene) og 1 eller 2 interaksjoner med karboksylat-grupper synes dermed å være årsaker til molekylenes ulike grader av antimalaria effekter (tabell 37).

Tabell 37: Funksjonelle grupper i naturlige derivatene og syntetiske analogene som kan ha en innvirkning på antimalaria-effekt.

Molekyl	Aromat: π - π - interaksjoner	Intern H- binding	OH-gruppe	Alifatisk amin	R_3NH^+ - COO ⁻ binding	Pyridin: R_3NH^+ - COO ⁻ binding $R_3N-COOH$ binding
Kinin	✓	✓	✓	Rigid	✓	✓
Kinidin	✓	✓	✓	Rigid	✓	✓
Epikinin	✓	✓	✓	Rigid	×	✓
Epikinidin	✓	✓	✓	Rigid	×	✓
Syntetiske analoger	✓	Svakt (unntatt meflokin)	×	Fleksibel (piperakin er mindre fleksibel)	✓ (unntatt lumefantrin)	✓ (unntatt lumefantrin)

Oppsummering og konklusjoner

Denne oppgavens mål var todelt: en legemiddelanalysedel og en teoretisk-mekanistisk studiedel med hovedfokus på sistnevnte

I legemiddelanalysedelen ble det benyttet både kvantitative og kvalitative analysemetoder i tillegg til forsøk på å utvikle semipreparativ metode for kvantitativ separasjon av kinin og kinidin. HPLC-UV var hoved analytisk verktøy men vi har også brukt både LC-MS og NMR spektroskopi i analysen av prøvene.

Renhetsanalysene utført med analytiske betingelser i denne oppgaven viser at alle de 4 diastereomerene til chinchona derivatene som er solgt på markedet inneholdt spor av ulike grader av urenheter. Dette er oppsiktsvekkende siden de fleste legemidlene som markedsføres per dags dato høyst sannsynligvis produseres med stoff kjøpt inn fra de samme produsentene, og separasjon av disse urenheter viser seg å være svært krevende.

Kvantitative separasjonsanalyser viser at molekylene har en tendens til å feste seg godt til kolonnens stasjonære fase, i de kolonnene vi benyttet i denne oppgaven, uavhengig av om analyttene forelå i ladet eller i uladet form. Dette ble bekreftet ved hjelp av NMR analyser av fraksjonene som ble samlet inn ved bruk av semipreparativ kolonne. Det at alle stoffene som ble kjøpt inn fra ulike produsenter inneholdt spor av urenheter tyder på at strukturelle likheter i molekylene gjør det vanskelig å skille dem uten videre. I den tiden som vi hadde til rådighet var det ikke mulig å gjøre flere semipreparative analyser og det ble valgt å gå videre med hoveddelen av denne oppgaven som var basert på mekanistiske studier.

Det er viktig å få chinchona derivatene i deres rene former om man skal kunne studere deres dynamiske atferd ved fysiologisk pH og ved pH 5 slik som den er i parasittens vakuoler. Disse molekyler har både en kompleks konformasjonell atferd i tillegg til at de ekvilibrier mellom monomer, dimer og heksamer form. Det kreves derfor videre arbeid for å få disse molekylene i 100 % ren form om man skal kunne gå videre med NMR og DNMR.

De mekanistiske studiene i denne oppgave bestod av konformasjonsanalyser og SAR-studier av kinin og kinidin, samt SAR-studier av deres epi-derivater, i tillegg brukte vi et utvalg av syntetiske analoger med ulike strukturelle trekk for sammenligne dem med chinchona derivatene og ut fra det oppnå økt innsikt i molekylenes virkningsmekanismer.

Det ble valgt syntetiske analoger som har alifatisk amin, syklisk amin, kinolin, naftalen, primært og tertiært amin, med alifatisk alkohol og uten alifatisk alkohol og en som har dobbel farmakofor i seg, for å få best mulig bilde av de kravene som antas å være viktig for kompleksdannelse mellom molekylene og hem, samt forhold mellom strukturen til molekylene og graden til deres farmakologisk effekt.

Analysene vi har utført tyder på at den totale topologien til molekylene avgjør både muligheter for kompleksdannelse med target hem og kvaliteten av komplekset. Det viser seg i tillegg at det er ulike topologiske krav for kompleksdannelse med hem for de naturlige og syntetiske analogene. I og med alle de analyserte molekylene inneholder aromatisk enhet må π - π interaksjoner være en viktig del av farmakoforen og dermed ha en viktig betydning for effekten.

Det at de fleste syntetiske analogene inneholder anilinsk NH gruppe koblet direkte til aromaten istedenfor $-C^9O^9H$ kan muligens bety at charge transfer interaksjoner har mindre betydning for effekten.

De syntetiske analogene som ble analysert har en adskillig høyre fleksibilitet og konformasjonell frihet i forhold til chinchona derivatene. Fleksibiliteten til alifatisk amin øker sannsynligheten for bindinger med karboksylat- eller karboksyl gruppene til hem og kan være hovedforklaringen til deres forbedrede antimalariaeffekter i forhold til chinchona alkaloidene.

Denne oppgaven antas å være den første som presenterer en fullstendig konformasjonsanalyse av kinin og kinidin. Konformasjonsanalysene viste at kinin og kinidin har 432 teoretisk mulige konformerer som er i dynamisk likevekt med deres respektive ladede form ved fysiologisk pH. I tillegg er molekylene i likevekt mellom mono-, di- og heksamere former. I denne oppgaven har vi også tatt hensyn til den lave pH ved parasittens vakuoler.

Den sentrale bindingen i molekylet ($C^9-C^8-O^9-C^4'$) som kobler kinolin-enheten til kinuklidin-enheten har en avgjørende faktor i molekylets totale topologi og dermed i kvaliteten til komplekset med target hem.

Videre ble det sett at alle konformasjoner rundt metoksy- og vinylgruppene introduserte destabiliserende interaksjoner i molekylene.

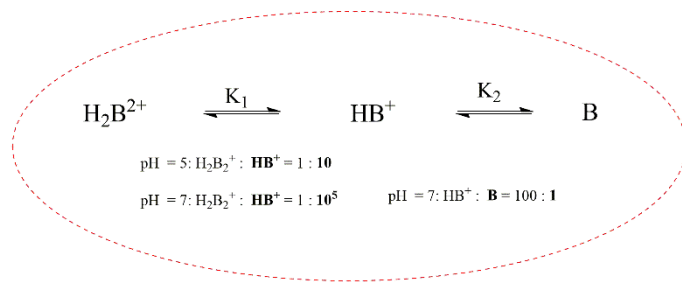
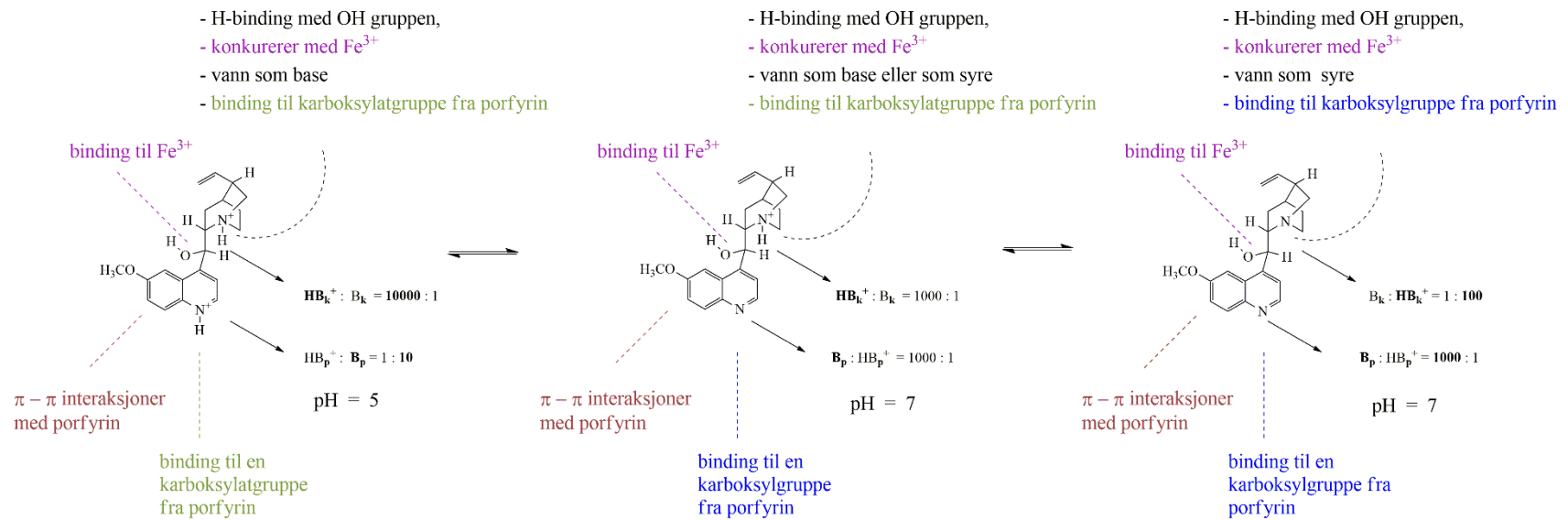
I og med at π - π interaksjoner høyst sannsynligvis er like for alle de 4 chinchona-derivatene og alle dannet en T-formet ortogonal topologi mellom den aromatiske delen og den alifatiske delen av molekylene, i *anti* konformasjon, antas det at ulike antall destabiliserende interaksjoner, samt evnen til å danne binding med karboksylat / karboksyl-grupper i hem kan forklare forskjellen i molekylenes antimalaria-effekt.

For chinchona derivatene antas det at sterk intern hydrogenbinding mellom $R_3N^1H^+$ og O^9 reduserer antimalaria-effekten, mens charge transfer interaksjon til Fe^{3+} og hydrogen-binding til karboksylat / karboksyl gruppene muligens øker effektiviteten.

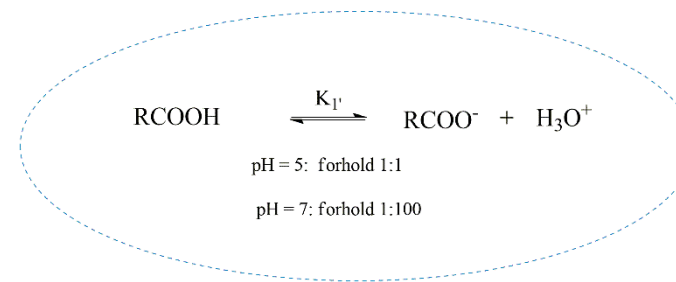
Det at kinidin hadde flere konformasjoner enn kinin som setter O^9 ortogonalt til kinolin-enheten kan være en viktig grunn til den høye effektiviteten til kinidin. "T-formet" ortogonal topologi både ved g^+ og *anti* konformasjon ble studert for alle de 4 derivatene. Forskjellene viste seg å være om vinylgruppe var på samme side (*cisoid*) som metoksygruppen eller om den var på motsatte side (*transoid*), samt antall destabiliserende interaksjoner i molekylene i hver av de to konformasjonene.

Det faktum at effekten til dihydro-derivatene er relativt mye større kan tyde på at årsaken ligger i $C^8 - C^9$ topologien og mindre på vinylgruppens område. En mulighet for å danne binding mellom $R_3N^1H^+$ og karboksylat-gruppen til hem eller interaksjon mellom R_3N^1 og karboksylgruppen til hem, viste seg å være vanskelig å få til med molekylmodellene som ble benyttet i denne oppgaven.

Kompleksdannelse mellom pyridisk nitrogen og karboksyl- eller karboksylat gruppe viste seg å være fullt mulig med molekylmodellene, noe som ikke er nevnt i samtlige artikler som ble gjennomgått i denne oppgaven.



Chinchona derivat



Proferin-hem enhet

Figur 59: pH kan spille en viktig rolle for kompleksdannelsen mellom molekylene og hem.

Figur 59 oppsummerer mulige interaksjoner mellom molekylets funksjonelle grupper og hem. Avhengig av pH vil kinin og kinidin eksistere som mono- eller di-ladet form i ulike konformasjoner og dermed i ulike topologier. Disse kan vider eksistere som mono-, di- eller heksamerer [17], noe som ikke ble analysert i denne oppgaven.

Ved pH 5 vil kinin og kinidin hovedsakelig foreligge som di-ladete molekyler. Alifatisk amin vil ved pH 5 ha et ladet : uladet forhold på 10000:1 og vil av den grunn fungere som hydrogen-donor til karboksylat gruppen, som ved denne pH vil foreligge i 50% ladet og 50% uladet form. Pyridinsk nitrogen vil ha et ladet:uladet forhold på 10:1 ved pH 5. I og med karboksylsyre foreligger både som nøytral og ladet form ved pH 5 kan det pyridinske nitrogenet fungere både som hydrogen- donor og akseptor og muligens ha en innvirkning for molekylens totale antimalaria-effekt.

Et annet viktig punkt er om kinin eller kinidin utøver deres antimalaria effekt som monomer, dimer eller heksamer. Og om de ulike aggregattilstandene foreligger som mono- eller diladete form. Derfor valgte vi å se nærmere på piperakin. Det har en mye lavere IC_{50} sammenlignet med kinin. Strukturen til piperakin kan ligne på "en dimer", med en C_2 akse som deler molekylet i 2 farmakofor-enheter. Det at molekylet er mer effektivt enn kinin kan skyldes at molekylet bruker kun den ene farmakoforen, eller 2 farmakoforer i kompleks med hem, noe som indirekte kan ligne på chinchona derivatene som kunne ha kompleksert seg med hem enten som monomer eller som dimer. Dersom dette er tilfelle bør det videre undersøkes om det er dimer monoladet eller dimer diladet som er gir beste effekt.

Avslutningsvis kan det sies at veien mot mer effektive antimalaria legemidler fremdeles er langt. Kinin og kinidin har en svært kompleks topologi. Analysene som ble gjort i denne oppgaven anses som en god start mot en bedre forståelse av molekylens antimalaria virkningsmekanismer. Denne oppgaven gir mulighet for flere videre prosjekter innen legemiddelanalyse, hvor det kan utvikles bedre metoder for fraksjonering og isolering av rene chinchona derivater. Dersom man lykkes med dette kan de rene stoffene videre benyttes til å analysere aggregat-tilstandene etterfulgt av teoretiske beregninger på konformasjons-nivå.

Mot slutten av skrivingen av denne oppgaven ble det publisert en spennende artikkel i det prestisjefylte tidsskriftet Science [82] der det rapporteres om en soppart som dreper parasitt-bærende mygg svært effektivt. Dette er et interessant funn med tanke på behovet for å bekjempe en sykdom som tar om lag en halv million menneskeliv årlig.

Referanser

1. Karle JM, Karle IL, Gerena L, Milhous WK. 1992 Stereochemical evaluation of the relative activities of the cinchona alkaloids against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internett]. 36[7]:[1538 s.] [hentet 02. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://aac.asm.org/content/36/7/1538.abstract>.
2. Roepe PD, Gorka AP, Sherlach KS, de Dios AC. 2013 Relative to Quinine and Quinidine, Their 9-Epimers Exhibit Decreased Cytostatic Activity and Altered Heme Binding but Similar Cytocidal Activity versus *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internett]. 57[1]:[365 s.] [hentet 07. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://aac.asm.org/content/57/1/365>.
3. Marques HM, Egan TJ, de Villiers KA. 2010 Structure and Function: Insights into Bioinorganic Systems from Molecular Mechanics Calculations. *Structure and Function* [Internett]. [87-109 s.] [hentet 22. mai 2019]. Tilgjengelig fra: https://doi.org/10.1007/978-90-481-2888-4_4.
4. Roepe PD, Gorka AP, de Dios A. 2013 Quinoline drug-heme interactions and implications for antimalarial cytostatic versus cytocidal activities. *Journal of medicinal chemistry* [Internett]. 56[13]:[5231 s.] [hentet 12. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y5ccy7vd>.
5. de Villiers KA, Gildenhuis J, Le Roex T. 2012 Iron(III) protoporphyrin IX complexes of the antimalarial Cinchona alkaloids quinine and quinidine. *ACS chemical biology* [Internett]. 7[4]:[666 s.] [hentet 12. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cb200528z>.
6. WHO, 2015. WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Third edition [Internett]. World Health Organization; [hentet 11. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2rm6uvr>.
7. Suissa M, Pogodin S, Agranat I. Upubliserte resultater.
8. WHO, 2018. WHO | World malaria report 2017 [Internett]. World Health Organization; [oppdatert 14. oktober 2018; hentet 11. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y4azbmqm>.
9. Fotie J. 2012 Bioactive natural products : opportunities and challenges in medicinal chemistry[3]:[223-71 s.] [hentet 29. august 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y4ado2az>.
10. Talapatra SK, Talapatra B. 2015 Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; [hentet 28. august 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y42z15wv>.
11. WHO | Q&A on the malaria vaccine implementation programme (MVIP), 2019. [Internett]. World Health Organization; [oppdatert 2019-01-14 15:34:15; hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y26njb5f>.
12. PATH Malaria Vaccine Initiative Shares Strategy For Developing 'Next-generation' Malaria Vaccines, 2009. [Internett]. Science Daily; [hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y6kysb4b>.
13. A Study to Evaluate the Safety, Immunogenicity and Efficacy of GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals' Candidate Malaria Vaccine RTS,S/AS02A, When Administered to Children Aged 1 to 4 Years Living in a Malaria-endemic Region of Mozambique. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. 2019 [hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00197041>.
14. Kacprzak KM. 2013 Chemistry and Biology of Cinchona Alkaloids. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* [Internett]. [605-41 s.] [hentet 31. august 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yxmy55gx>.
15. Dawidowicz A, Bernacik K, Typek R, Stankevič M. 2018 Possibility of quinine transformation in food products: LC-MS and NMR techniques in analysis of quinine derivatives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* [Internett]. 244[1]:[105-16 s.] [hentet 11. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y3g72ykw>.
16. Stork G, Niu D, Fujimoto A, Koft ER, Balkovec JM, Tata JR, et al. 2001 The First Stereoselective Total Synthesis of Quinine. *Journal of the American Chemical Society* [Internett]. 123[14]:[3239-42 s.] [hentet 15. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1021/ja004325r>.
17. Caner H. *Chiral Switches of Drugs* [avhandling]. Jerusalem: Hebrew University; 2005.
18. Alumasa JN, Gorka AP, Casabianca LB, Comstock E, de Dios AC, Roepe PD. The hydroxyl functionality and a rigid proximal N are required for forming a novel non-covalent quinine-heme complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011;105(3):467-75.

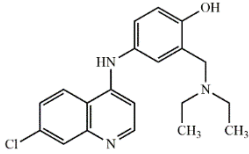
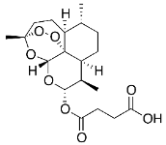
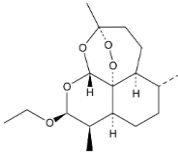
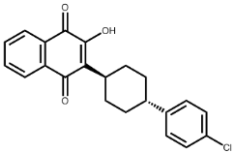
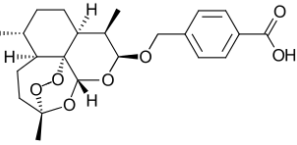
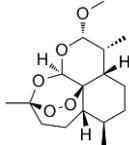
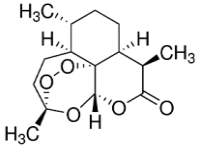
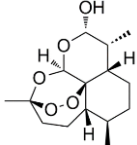
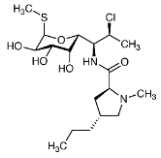
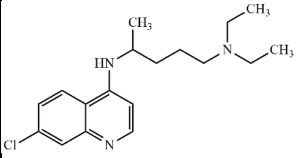
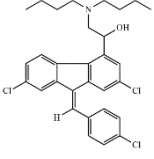
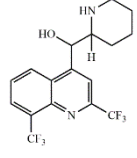
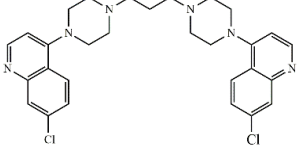
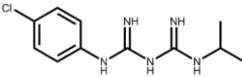
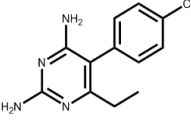
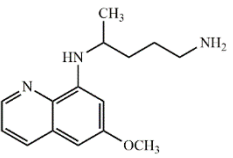
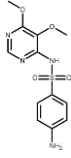
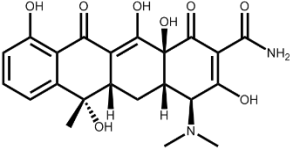
- 19.Starkl Renar K, Iskra J, Križaj I.2016 Understanding malarial toxins. *Toxicon* [Internett]. 119:[319-29 s.] [hentet 22. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.017>.
- 20.Dianxi N, Jingxing Z, Meiyi Z.2018 Chapter 7 - Artemether and Lumefantrine Tablets (Coartem). *Artemisinin-Based and Other Antimalarials* [Internett]. [4]:[415-81 s.] [hentet 29. april 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2fq5xst>.
- 21.Peatey CL, Skinner-Adams TS, Dixon MWA, McCarthy JS, Gardiner DL, Trenholme KR.2009 Effect of Antimalarial Drugs on *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *The Journal of Infectious Diseases* [Internett]. 200[10]:[1518-21 s.] [hentet 3. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1086/644645>.
- 22.Lelievre J, Almela MJ, Lozano S, Miguel C, Franco V, Leroy D, et al.2012 Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence "transmission blocking" assay. *PloS one* [Internett]. 7[4]:[e35019 s.] [hentet 04. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514702.
- 23.Suissa MR, Rønning PO. Veiledningstimer. OsloMet-storbyuniversitetet. Fakultet for helsevitenskap. 2018-2019.
- 24.FN-Sambandet, 2018. Verdens malariadag [Internett]. Norge: FN-Sambandet; [hentet 27. september 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2c3g3zr>.
- 25.WHO | High-risk groups, 2018. [Internett]. World Health Organization; [oppdatert 2018-08-14 17:26:25; hentet 27. september 2018]. Tilgjengelig fra: www.who.int/malaria/areas/high_risk_groups/en/.
- 26.Folkehelseinstituttet, 2010. Malaria [Internett]. Folkehelseinstituttet; [oppdatert 19.11.2018; hentet 01. desember 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y3m5fdym>.
- 27.Malaria, 2019. [Internett]. [Tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/malaria---veileder-for-helsepersone/>].
- 28.Milner DA, 2018. Pathogenesis of malaria - UpToDate [Internett]. UpToDate; [hentet 11. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2eb3gjj>.
- 29.Hasudungan A, 2018. Malaria Pathophysiology | Armando Hasudungan [Internett]. [hentet 09. september 2018]. Tilgjengelig fra: <https://armandoh.org/video/malaria-pathophysiology/>.
- 30.UiO, 2018. Infeksjonsmedisin - Malaria [Internett]. Universitetet i Oslo; [hentet 05. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y47d3sag>.
- 31.SML, 2018. malaria – Store medisinske leksikon [Internett]. [hentet 03. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/malaria>.
- 32.Gamboa de Dominguez ND, Rosenthal PJ.1996 Cysteine proteinase inhibitors block early steps in hemoglobin degradation by cultured malaria parasites. *Blood* [Internett]. 87[10]:[4448-54 s.] [hentet 14. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y4ka9m26>.
- 33.Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M, Goldberg DE.2002 Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internett]. 99[2]:[990-5 s.] [hentet 14. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: www.pnas.org/content/99/2/990.
- 34.Biochemistry of Plasmodium, 2018. [Internett]. [hentet 13. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: www.tulane.edu/~wiser/malaria/fv.html.
- 35.Yoshida T, Migita CT.2000 Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* [Internett]. 82[1-4]:[33-41 s.] [hentet 15. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00156-2](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00156-2).
- 36.Fitch CD.2004 Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences* [Internett]. 74[16]:[1957-72 s.] [hentet 15. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.003>.
- 37.Legemiddelhandboka, 2018. T1.19.1 Malaria | Legemiddelhandboka [Internett]. [hentet 19. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y22lrzqh>.
- 38.Helsedirektoratet, 2018. Nasjonale faglige retningslinjer-Tropemedisin [Internett]. Helsedirektoratet; [hentet 19. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2jkhbln>.
- 39.Tidsskriftet, 2018. Beredskap ved alvorlig malaria [Internett]. Tidsskriftet; [hentet 02. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2h5dvxd>.

- 40.Folkehelseinstituttet, 2018. Reseptregisteret [Internett]. Folkehelseinstituttet; [hentet 02. november 2018]. Tilgjengelig fra: www.reseptregisteret.no/.
- 41.Travassos M, Laufer MK, 2018. Antimalarial drugs: An overview - UpToDate [Internett]. [hentet 02. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y34t3voj>.
- 42.Sullivan DJ. 2012 Cinchona alkaloids: Quinine and quinidine [hentet 27. september 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2ul7vac>.
- 43.Kumar SCM. 2017 Drug resistance in malaria [hentet 27. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y5gznaav>.
- 44.WHO, 2015. BACKGROUND PAPER ON THE RTS,S/AS01 MALARIA VACCINE [Internett]. WHO; [oppdatert september; hentet 05. MARS 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2hfw258>.
- 45.EMA, 2015. Assessment report Mosquirix™ [Internett]. [hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2ou6era>.
- 46.Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F.2010 Malaria in children:[1468-81 s.] [hentet 04. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://dx.doi.org/>.
- 47.WHO | Q&A on the Phase 3 trial results for malaria vaccine RTS,S/AS01, 2018. [Internett]. World Health Organization; [oppdatert 2018-08-24 16:45:57; hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yylzwnjv>.
- 48.WHO | First malaria vaccine in Africa: A potential new tool for child health and improved malaria control, 2018. [Internett]. World Health Organization; [oppdatert 2018-08-24 16:46:58; hentet 05. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y4u3fxja>.
- 49.Karunajeewa HA. Artemisinins: Artemisinin, dihydroartemisinin, artemether and artesunate. Milestones in Drug Therapy. 2012;41:157-90.
- 50.Wikipedia, 2019. Artesunate [Internett]. [2019]. Tilgjengelig fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artesunate>.
- 51.Wikipedia, 2019. Artemisinin [Internett]. Merck KGaA; [hentet 12.mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2lhbocz>.
- 52.Wikipedia, 2019. Artemether [Internett]. Merck KGaA; [hentet 12.mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yy3d74hs>.
- 53.Mikhail Tswett - inventor of chromatography method, 2013. [Internett]. Data Research Analyst; [oppdatert 2013-03-20; hentet 11. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y6zu62bx>.
- 54.Waters, 2019. How Does High Performance Liquid Chromatography Work? [Internett]. [hentet 21. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y4faj3ge>.
- 55.Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Legemiddelanalyse. Bergen: Fagbokforlaget; 2010.
- 56.Rønning PO. Upubliserte resultater.
- 57.Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 8 utg. New York: W. H. Freeman and Company; 2010.
- 58.Chan K-G, Cheng HJ, Chen JW, Yin W-F, Ngeow YF.2014 Tandem mass spectrometry detection of quorum sensing activity in multidrug resistant clinical isolate *Acinetobacter baumannii*.(Research Article). The Scientific World Journal [Internett]. 14[hentet 17. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/891041>.
- 59.Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System, 2012. [Internett]. Agilent Technologies; [hentet 17. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2umdx59>.
- 60.Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System, Concepts Guide , The Big Picture, 2014. [Internett]. Agilent Technologies; [hentet 19. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y6eypybn>.
- 61.Lacorte S, Fernandez-Alba AR.2006 Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food25:[866-80 s.] [hentet 02. april 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y3fby478>.
- 62.PreMass, 2019. [Internett]. Waters; [hentet 03. februar 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y3ftsofv>.
- 63.Nickerson B. 2011 Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Strategies for Sample Preparation and Extraction Boston, MA: Boston, MA: Springer US; [hentet 03. mars 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yyceuc2>.

64. Achan J, Talisuna A, Erhart A, Yeka A, Tibenderana J, Baliraine F, et al. 2011 Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* [Internet]. 10[1][hentet 27. SEPTEMBER 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yyph3xap>.
65. Quinine, 2018. [Internet]. [hentet 27. september 2018]. Tilgjengelig fra: www.drugbank.ca/drugs/DB00468.
66. White N, Warrell D, Bunnag D, Looareesuwan S, Chongsuphajaisiddhi T, Harinasuta T. 1981 QUINIDINE IN FALCIPARUM MALARIA. *The Lancet* [Internet]. [1069-71 s.] [hentet 30. september 2018]. Tilgjengelig fra: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673681912757.
67. Quinidine, 2018. [Internet]. [hentet 27. september 2018]. Tilgjengelig fra: www.drugbank.ca/drugs/DB00908.
68. PubChem, 2019. Quinidine [Internet]. [hentet 29. juli 2018]. Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
69. Motulsky H, Maisel A, Snavely MD, Insel P, Motulsky HJ. 1984 Quinidine is a competitive antagonist at alpha sub(1)- and alpha sub(2)-adrenergic receptors. *CIRC. RES* [Internet]. 55[3]:[376-81 s.] [hentet 17. november 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y25d8n19>.
70. Chemicalize, 2019. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions [Internet]. [hentet 07. april 2019]. Tilgjengelig fra: <https://chemicalize.com/#/calculation>.
71. PubChem, 2019. PubChem [Internet]. [hentet 07. april 2019]. Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
72. Caymanchem, 2019. Quinine [Internet]. [hentet 11. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://www.caymanchem.com/pdfs/23958.pdf>.
73. Caymanchem, 2019. Quinidine [Internet]. [hentet 11. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://www.caymanchem.com/pdfs/20356.pdf>.
74. Ilisz I, Bajtai A, Lindner W, Péter A. 2018 Liquid chromatographic enantiomer separations applying chiral ion-exchangers based on Cinchona alkaloids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [Internet]. 159:[127-52 s.] [hentet 14. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y3qf7m8w>.
75. Dale J. Stereokjemi og konformasjonsanalyse. 1 utg. Oslo: Universitetsforlaget; 1975.
76. MP Methods | Gaussian.com, 2019. [Internet]. [hentet 25. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://gaussian.com/mp/>.
77. Larsen NW, Mathier E, Bauder A, Günthard HH. 1973 Analysis of microwave and infrared transitions of phenol by rotation-internal rotation theory. *Phenol-OD. Journal of Molecular Spectroscopy* [Internet]. 47[2]:[183-8 s.] [hentet 22. mai 2019]. Tilgjengelig fra: [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(73\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0022-2852(73)90001-5).
78. Casabianca LB, An D, Natarajan JK, Alumasa JN, Roepe PD, Wolf C, et al. 2008 Quinine and Chloroquine Differentially Perturb Heme Monomer-Dimer Equilibrium. *Inorganic Chemistry* [Internet]. 47[13]:[6077-81 s.] Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1021/ic800440d>.
79. Schroeder RL, Gerber JP. 2014 Chloroquine and hydroxychloroquine binding to melanin: Some possible consequences for pathologies. *Toxicology Reports* [Internet]. 1[C]:[963-8 s.] [hentet 13. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.019>.
80. Leed A, DuBay K, Ursos LMB, Sears D, De Dios AC, Roepe PD. 2002 Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry* [Internet]. 41[32]:[10245 s.] [hentet 07. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi020195i>.
81. de Dios AC, Tycko R, Ursos LMB, Roepe PD. 2003 NMR Studies of Chloroquine-Ferriprotoporphyrin IX Complex. *The Journal of Physical Chemistry A* [Internet]. 107[30]:[5821-5 s.] [hentet 12. oktober 2018]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1021/jp0342982>.
82. Lovett B, Bilgo E, Millogo SA, Ouattarra AK, Sare I, Gnambani EJ, et al. 2019 Transgenic *Metarhizium* rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso. *Science* [Internet]. 364[6443]:[894-7 s.] [hentet 31. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/y2uex5h5>.
83. Caymanchem, 2019. Arteether [Internet]. [hentet 29. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.caymanchem.com/product/11814.
84. Chemenu, 2019. Atovaquone [Internet]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
85. Wikipedia, 2018. Artelinic acid [Internet]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: https://en.wikipedia.org/wiki/Artelinic_acid.

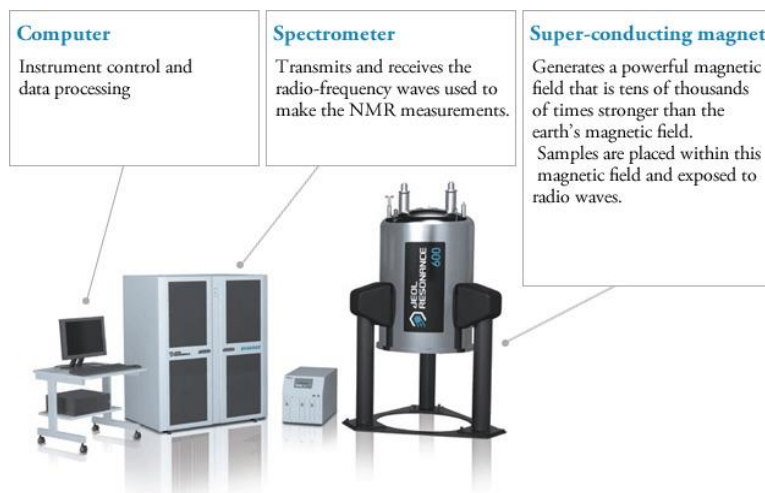
- 86.Chemenu, 2019. Dihydroartemisinin [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
- 87.Wikipedia, 2019. Clindamycin [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <https://en.wikipedia.org/wiki/Clindamycin>.
- 88.Chemenu, 2019. Proguanil [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
- 89.Chemenu, 2019. Pyrimethamine [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
- 90.Chemenu, 2019. Sulfadoxine [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
- 91.Chemenu, 2019. Tetracycline [Internett]. [hentet 28. mai 2019]. Tilgjengelig fra: www.chemenu.com/.
- 92.NMR basic knowledge | Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) | Products | JEOL, 2019. [Internett]. [2019]. Tilgjengelig fra: <https://tinyurl.com/yxatvo6d>.
- 93.Caymanchem, 2019. Hydroquinidine [Internett]. [hentet 11. mai 2019]. Tilgjengelig fra: <http://www.caymanchem.com/pdfs/22295.pdf>.
- 94.Chowdhry NA, Bonilla CF. Solubility of Chinchonine and Chinchonidine in alcohol-Water Mixtures. Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.). 1949;38(2):72-3.

Vedlegg 1: Diverse strukturer

<p>Amodiaquine</p> 	<p>Artesunat [50]</p> 	<p>Arteeter [83]</p> 	<p>Atovakon [84]</p> 
<p>Artelinate [85]</p> 	<p>Artemeter [52]</p> 	<p>Artemisinin [51]</p> 	<p>Dihydroartemisinin [86]</p> 
<p>Klindamycin [87]</p> 	<p>Klorokin</p> 	<p>Lumefantrine</p> 	<p>Meflokin</p> 
<p>Piperakin</p> 	<p>Proguanil [88]</p> 	<p>Pyrimethamine [89]</p> 	<p>Primakin</p> 
<p>Sulfadoxine [90]</p> 	<p>Tetrasyklin [91]</p> 		

Vedlegg 2: NMR-spektroskopi

NMR (nuclear magnetic resonance) er en spektroskopisk metode som brukes for å bestemme strukturen til molekyler på konformasjonsnivå, og er derfor den viktigste metoden for å studere konformasjonsatferd, dynamiske- så vel som kinetiske prosesser. Denne spektroskopiske metoden brukes også i dag som magnetresonanstomografi (MR) innen medisin til å produsere bilder av høy kvalitet av ulike organer i kroppen. De vanligste kjernene som benyttes er ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P .



Figur 60: Et NMR Instrument består av en stor magnet, radiosendere, mottakere, og datautstyr for å tolke signalene. [92]

Siden konformasjonelle overganger skjer meget hyppige ved rom temperatur, er det mulig å kjøre eksperimentene ved ulike temperaturer for å finne temperaturen der konformasjonell overgang er så sjelden slik at man kan "fange" NMR spektrum av ulike konformasjoner til et molekyl.

NMR kan benyttes til både kinetiske- og dynamiske eksperimenter. Forsøkene kan kjøres henholdsvis enten ved en bestemt konstant temperatur over tid eller ved ulike temperaturer. Med riktig NMR probe kan man kjøre NMR helt ned til $\sim -150\text{ }^\circ\text{C}$ og opp til $\sim 200\text{ }^\circ\text{C}$, avhengig av NMR instrumentet.

NMR spektroskopi er basert på paramagnetiske egenskapene til atomer med ulikt antall protoner og eller med et ulikt antall nøytroner. Dette resulterer i netto uparede elektronspinn. Paramagnetiske atomer fungerer som små magneter. Når de ikke er utsatt for noen ytre magnetisk påvirkning, har spinnene en vilkårlig retning, men dersom de settes i et sterkt magnetfelt vil spinnene innrette seg med eller mot det magnetiske feltet. De fleste vil imidlertid være parallelle med feltet siden den retningen gir det laveste energinivået, og dette er det foretrukne for atomer. Det eksterne magnetfeltet fører også til rotasjon av atomspinnene rundt det ytre feltets retning, kalt *presesjon*. Denne bevegelsen skyldes mekaniske krefter mellom atomkjernens magnetiske moment og det ytre magnetfeltet, og rotasjonsfrekvensen til bevegelsen er gitt ved Larmors ligning.

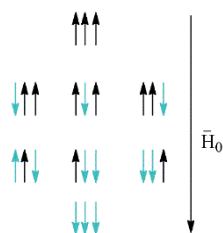
NMR er dermed et fysisk fenomen som innebærer en reaksjon mellom atomkjernen i et eksternt fast magnetisk felt, og et elektromagnetisk felt som endres ved en bestemt frekvens som tilsvarer resonansfrekvensen av materialet som testes. Ulike magnetiske tilstander i selve materialet måles ved å undersøke strålingen som sendes ut fra materialets atomkjerner. Alle kjerner spinner rundt sin egen akse og kan generere en egen lokal magnetisk dipol. Momentet kan beskrives av kjernens spinnkvantetall I ,

med verdi på 0, 1/2, 1, 3/2 osv. Kjerner med $I = 0$ har ingen spinn og kan derfor ikke studeres ved hjelp av NMR, dette gjelder blant annet ^{12}C og ^{16}O .

Mens ultrafiolett og infrarød stråling endrer elektronfordelingen rundt atomkjernene, vil stråling i radiofrekvensområdet påvirke de fleste atomkjernene; dersom disse plasseres i et kraftig magnetfelt. Som sagt de fleste atomkjerner kan betraktes som små magneter, og i forhold til et ytre magnetfelt, vil de innstille seg så parallelt som mulig da det er denne tilstanden som har lavest energi. Hvor mange parallelle- og anti-parallele tilstander er mulige for et atom varierer mellom forskjellige atomkjerner. Det magnetiske feltet kan med andre ord styrkes eller svekkes. Hydrogen har en kjerne som bare kan innta én slik parallell tilstand. Imidlertid kan hydrogenkjernen også innstille seg antiparallelt til magnetfelt. Energiforskjellen mellom de to tilstandene er imidlertid ikke stor, og ved å bestråle en prøve som inneholder ett hydrogenatom med så lavenergetisk stråling som radiofrekvensbølger, vil atomkjernen absorbere energi og gå over fra en parallell til en antiparallell tilstand. Denne energiabsorpsjonen, eller resonansen, kan måles med et spektrometer og vises ved hjelp av utskrift som et såkalt NMR-spektrum.

Mange forskjellige kjerner kan gi opphav til NMR-spektra som inneholder resonans topper av ulike atomer. Posisjonen for en slik topp blir kalt *kjemisk skift* og blir angitt ved en δ -verdi som måles i *ppm* (parts per million) i forhold til en referansesubstans. Den mest brukte referanseforbindelsen er tetrametylsilan (TMS, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$), som per definisjon har et kjemisk skift eller en δ -verdi på 0.00 ppm. Det kjemiske skiftet for et hydrogenatom er avhengig av elektrontettheten rundt hydrogenkjernen. Resonanser fra hydrogenatomer som har en relativt stor elektrontetthet rundt kjernen, kommer ved høyt felt ($\delta < 3$ ppm), mens hydrogenatomer som har relativt liten elektrontetthet rundt kjernen, vil gi resonanser ved lavt felt ($\delta > 6$ ppm). Følgelig vil et atom eller en gruppe atomer, som virker elektrontiltrekkende på et hydrogenatom, gjøre at dette hydrogenatomet gir en resonans ved lavt felt. Omvendt vil et atom eller en gruppe atomer som virker elektrongivende, føre til at hydrogenatomet gir resonans ved høyt felt.

Hydrogenatomene i en metylgruppe har lik elektrontetthet rundt seg og derfor har samme kjemiske skift (de er ekvivalente). Som nevnt, er det kjemiske skiftet, eksempelvis for en metylgruppe eller en metylengruppe, avhengig av den grad nabogruppene påvirker elektronfordelingen rundt kjernene på. Imidlertid har nabogruppene også innvirkning på mønsteret av en resonans, ved at *absorpsjonsmønsteret* for protonene på ett karbonatom, bl.a. bestemmes av antall hydrogenatomer på nabokarbonatomene. I etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, vil de 3 hydrogenkjernene i metylgruppen være ekvivalente, men de vil være forskjellige fra de 2 ekvivalente hydrogenkjernene i metylengruppen. I forhold til det ytre magnetfeltet kan de *magnetiske momentene* til de to hydrogenkjernene i metylengruppen ha samme retning ($\downarrow\downarrow$), ett kan ha samme og ett kan ha motsatt retning ($\uparrow\downarrow$, $\downarrow\uparrow$) og begge to kan ha motsatt retning ($\uparrow\uparrow$). Disse forskjellige kombinasjonene av hydrogenatomene vil ha forskjellig innvirkning på hydrogenkjernene i metylgruppen, slik at resonansen for metylkjernene kommer ut som en triplett med 1:2:1 som intensitetsfordeling ($\uparrow\downarrow = \downarrow\uparrow$). Tilsvarende finnes det 4 prinsipielt forskjellige måter å kombinere de tre hydrogenkjernene i metylgruppen på, og resonansen for metylprotonene splittes derfor opp i fire linjer, en kvartett, med en intensitetsfordeling på 1:3:3:1, fordi de fire kombinasjonene har forskjellige innvirkninger på hydrogenkjernene i metylengruppen (figur 61).



Figur 61: Posisjoner av metylprotonene relativt til et ytre magnetfelt.

Generelt gjelder det at dersom n ekvivalente hydrogenatomer på et karbonatom i nabostilling har et karbonatom med m ekvivalente hydrogenatomer, vil m kjernene gi en resonans som består av $(n+1)$ topper mens n kjernene vil gi en resonans som består av $(m+1)$ topper. Innen en *kvartett* eller en *triplett* vil avstanden mellom linjer som følger på hverandre, være den samme. Avstanden kalles *koblingskonstanten* (betegnes med J) og blir oppgitt i Hz. I etanol viser det seg at koblingskonstanten for kvartetten er den samme som for tripletten (7 Hz). Dette skyldes at metylprotonene og metylenprotonene kobler med hverandre. Generelt gjelder det at grupper som kobler med hverandre gir linjesystemer med samme koblingskonstant. Hvor stor koblingskonstanten er, varierer med den måten kjernene som kobler med hverandre, er bundet til hverandre på. Ved tolkning av NMR-spektra benyttes dette i utstrakt grad for å finne hvilke grupper som er bundet til hverandre, både 1D and 2D NMR spektra. Til slutt må det nevnes at arealet (integralet) av resonanstoppene er proporsjonalt med antall hydrogenatomer. Dette benyttes i utstrakt grad ved tolkingen av NMR-spektra og vi har benyttet integrasjon til å finne forhold mellom våre analytter og urenheter som vi fant i analyttene vi kjøpte fra ulike produsenter

Vedlegg 3:

Kjemiske- og fysiske egenskaper av chinchona derivater

Stoff	Molekyl-formel [71]	Monoisotopisk masse g/mol [71]	pKa 1 (R ₂ N ₁ H ⁺) [70]	pKa 2 (R ₂ N ₁ H ⁺) [70]	log P [70]	Løselighet i vann [71]	Løselighet i etanol/ ml
Kinin	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.184	9.05	4.02	3.44	1 g i 1.9 Liter	30 mg [72]
Kinidin	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.184	9.05	4.02	3.44	140 mg i 1 Liter	1.0 mg [73]
Dihydrokinin	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	326.199	9.18	4.02	2.82	-	-
Dihydro-kinidin	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	326.199	9.18	4.02	2.82	-	1.0 mg [93]
Kinkonin	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	294.173	9.15	3.86	2.67	-	9.9 mg* [94]
Kinkonidin	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	294.173	9.15	3.86	2.67	-	70.6 mg* [94]

* I denne artikkelen er det ikke angitt om løseligheten ble målt på rene stoffer.

Liste over løsningsmidler benyttet i denne oppgaven

Kjemikalier	Renhet / %	Leverandør
Milli-Q vann	-	-
Metanol	> 99.9	Merck
Acetonitril	> 99.9	Merck/ VWR Chemicals
Maurisyre	98.0-100.0	Merck
Kloroform	-	Merck

Vedlegg 4: Utstyrsesifikasjoner

Kolonner

Produsent	Material	Type	Kolonnelengde / cm	Indre diameter / mm	Partikkelstørrelse / μm
ACE HPLC Columns	C 18	Analytisk	12.5	4.6	5
ACE HPLC Columns	C 8	Analytisk	15.0	2.1	3
ACE HPLC Columns	C 18 HL	Analytisk	15	3	3
FORTIS	Difenyl	Semi preparativ	10.0	10.0	5
FORTIS	C 18	Semi preparativ	10.0	10.0	5

HPLC-UV

Produsent	Shimadzu	
Instrument	Prominence Degasser	DGU-20A5
	Prominence Liquid Chromatograph	LC-20AT
	Communications Bus Module	CBMI-20A
	Prominence Autosampler	SIL-20A HT
	Prominence UV/VIS Detector	SPD-20A
	Prominence Column Oven	CTO-20A
	Shimadzu Fraction Collector	FRC-10A
Programvare	LabSolutions - LcSolution Version 1.24 SP1	

LC-TOF

Produsent	Dionex Ultimate 3000	
Instrument	Pump	Ultimate 3000
	Autosampler	Ultimate 3000
	Column Compartment	Ultimate 3000
	Massespektrometer	6230 TOF LC/MS
Programvare	Agilent- MassHunter Workstation Software	Qualitative Analysis Version B.05.00
	Agilent- MassHunter Workstation Software	LC/MS Data Acquisition for 6200 series TOF/6500 series Q-TOF - Version B.05.00
	Chromeleon Client	Version 6.80 SPA

