

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANŽE KOLENKO

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANŽE KOLENKO

**SINTEZA POTENCILANIH ZAVIRALCEV ENCIMA *InhA* Z 1,2,3,4-
TETRAHIDROPIROLO[1,2-*a*]PIRAZINSKIM SKELETOM**

**SYNTHESIS OF POTENTIAL *InhA* INHIBITORS WITH 1,2,3,4-
TETRAHYDROPIRROLO[1,2-*a*]PYRAZINE SCAFFOLD**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

Zahvala

Iskrena zahvala mentorju doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. za posredovano znanje, vodenje, pomoč in nasvete pri izdelavi te magistrske naloge.

Iskrena zahvala prav tako asist. Kaji Rožman, mag. farm. za izvedena biološka testiranja spojin in vsem ostalim strokovnim sodelavcem, ki so na kakršen koli način pripomogli k nastanku te magistrske naloge.

Na koncu še iskrena zahvala družini, ki mi je stala ob strani skozi celoten čas študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Anže Kolenko

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Tuberkuloza	1
1.2	Mikobakterije.....	1
1.3	Zaviralci InhA.....	5
1.4	Interakcije zaviralcev tetrahidropiranskega tipa.....	8
2	NAMEN IN NAČRT DELA.....	10
3	MATERIALI IN METODE.....	11
3.1	Materiali.....	11
3.2	Metode	11
4	EKSPERIMENTALNO DELO	12
4.1	Sinteze <i>N</i> -(2-(1 <i>H</i> -pirol-1-il)etil)acetamida (1)	12
4.2	Sinteze 1-metil-3,4-dihidropirol[1,2- <i>A</i>]pirazina (2)	16
4.3	Sinteza 2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazina (3)	19
4.4	Sinteza 1-(2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4,-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-il)-2,2,2-trikloroetan-1-ona (4)	20
4.5	Sinteza metil 2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-karboksilata (5)	21
4.6	Sinteza metil 1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-karboksilata (6)	21
4.7	Sinteza metil 4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)benzojske kisline (7)	22
4.8	Sinteza metil 2-(4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-karboksilata (8)	23
4.9	Sinteza 2-(4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-karboksilne kisline (9)	24
4.10	Sinteza <i>N</i> -benzil-2-(4-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin-6-karboksamida (10)	25
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
5.1	Komentar sinteznih postopkov	26
5.2	Rezultati biološkega testiranja	32
6	SKLEP	33
7	VIRI	34

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Zgradba mikobakterijske celične stene (prirejeno po(7))</i>	2
<i>Slika 2: Vrste mikolnih kislin (prirejeno po (8))</i>	3
<i>Slika 3: Biosinteza mikolnih kislin (prirejeno po(9))</i>	4
<i>Slika 4: Aktivacija izoniazida (prirejeno po (13, 14))</i>	5
<i>Slika 5: Najučinkovitejši derivati zaviralcev InhA: (a) derivat triklosana, (b) piridomicin, (c) derivat 4-hidroksi-2-piridona, (d) derivat tiadiazola</i>	7
<i>Slika 6: Vezavno mesto InhA z vezanim zaviralcem tetrahidropiranskega tipa</i>	8
<i>Slika 7: Interakcije med vezavnim mestom encima InhA in tetrahidropiranskim tipom direktnih zaviralcev (povzeto po (21))</i>	9
<i>Slika 8: Spojina I</i>	9
<i>Slika 9: Strukture načrtovanih spojin</i>	10
<i>Slika 10: Mehanizem reakcije po Paal-Knorrju (povzeto po (23))</i>	26
<i>Slika 11: Mehanizem reakcije po Bischler-Napieralskiju (povzeto po (24))</i>	27
<i>Slika 12: Mehanizem Grignardove reakcije (prirejeno po (26))</i>	28
<i>Slika 13: Mehanizem elektrofilne aromatske substitucije (povzeto po (27))</i>	28
<i>Slika 14: Nastanek estra (povzeto po (28))</i>	29
<i>Slika 15: Mehanizem substitucije pirazola na mestu 1</i>	29
<i>Slika 16: Mehanizem nastanka acil klorida (povzeto po (29))</i>	30
<i>Slika 17: Mehanizem tvorbe amidne vezi (povzeto po (30))</i>	30
<i>Slika 18: Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU (povzeto po (31))</i>	31

POVZETEK

Tuberkuloza, ki jo povzroča bakterija *Mycobacterium tuberculosis* in najpogosteje prizadene pljuča, je vzrok za veliko število smrti po celem svetu. Zdravilo prvega izbora je izoniazid, ki velja za predzdravilo, saj preide v aktivno obliko s pomočjo encima mikobakterijske katalazne peroksidaze (KatG). Aktivna oblika zdravila tako zavira encim InhA, ki je ključen za izgradnjo celične ovojnice oz. sintezo mikolnih kislin. Isoniazid pa ne velja za edino zdravilo, saj se mora terapija, glede na tip odpornosti seva, prilagoditi z uporabo različnih kombinacij antibiotikov. Iz tega sledi, da je encim InhA obetavna tarča za zaviranje z direktnimi zaviralci.

V okviru magistrskega delu smo sintetizirali tri nove analoge (spojine **8**, **9**, **10**) potencialnih zaviralcev encima InhA. Na začetku smo izhajali iz tetrahidropiranskega derivata (spojina **I**) in njegovih analogov, ki niso prinesli izboljšanja učinkovitosti zaviranja encima. Nato smo se odločili za drznejši pristop in zamenjali centralni tetrahidropiranski del z 1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-*a*]pirazinom, ki je bistveno bolj rigiden od tetrahidropirana. Nadalje smo z uvedbo karboksilne kisline, metilnega estra in benzilamida na pirol raziskali kemijski prostor aktivnega mesta.

Spojinam so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani na izoliranem encimu InhA določili vrednost IC_{50} . Pri spojini **8** je znašala 27 μ M, pri spojini **9** se je izboljšala na 17 μ M in pri spojini **10** prešla na najboljšo vrednost 8 μ M. Z rigidiziranimi spojinami (**8**, **9**, **10**) v primerjavi s spojino **I** (IC_{50} znaša 0,02 μ M) nismo dosegli izboljšanja aktivnosti, vendar je del aktivnosti vseeno ostal. Na osnovi strukture najmočnejšega zaviralca (spojina **10**) sklepamo, da je v okolici dovolj prostora za benzilno skupino in da ta prostor predstavlja priložnost za dodatne interakcije.

Ključne besede: tuberkuloza, zaviralci encima InhA, 1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-*a*]pirazin

ABSTRACT

Tuberculosis, which is caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* and most often affects lungs, is the most common cause of deaths in the world. The drug of the first choice against tuberculosis is isoniazid. Isoniazid is a pre-drug, because it is metabolized to its active form by mycobacterium enzyme catalase peroxidase (KatG). The active metabolite is a strong inhibitor of InhA, which is essential for synthesis of mycolic acids, which are in turn essential for the proper formation of cell's envelope. Usually isoniazid is not the only prescribed drug for the treatment. The therapy consists of combination of antibiotics, depending from the type of resistance of the strain. In most cases the resistance to isoniazid is the consequence of mutations of KatG and not InhA. Therefore a direct inhibitor of InhA would circumvent mutations of KatG.

In this master degree we synthesized three new compounds (compounds **8**, **9**, **10**) as potential inhibitors of InhA. The design of our compounds was based on tetrahydropyran type of inhibitors (compound **1**). Analogs of compound **1** were not better inhibitors of InhA. Rater, we decided to take a bold approach and substitute the central tetrahydropyran moiety with 1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrapyrrolo[1,2-*a*]pyrazine, which is more rigid than tetrahydropyran. Furthermore we investigated the chemical space of the active site, by introduction of carboxylic acid, methyl ester and benzyl amide on pyrrole ring.

The compounds were tested on isolated InhA enzyme at the Faculty of Pharmacy University of Ljubljana. Compound **10** was the best inhibitor from our small series with IC₅₀ value of 8 μM. Even though we did not achieve an improvement of activity, some inhibition activity remained. Furthermore, we proved that the active site can accommodate even a benzylamide group.

Key words: tuberculosis, enzyme inhibitor InhA, 1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrapyrrolo[1,2-*a*]pyrazine

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ocetna kislina
ACP	acil prenašalni protein
AMP	adenozin monofosfat
Ben	benzoi
Br₂	brom
CDCl₃	devteriran kloroform
CH₃ONa	natrijev metoksid
CoA	koencim A
d	dublet
dd	dublet dubleta
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
eq	molski ekvivalent
Et₃N	triethylamin
EthA	mikobakterijska mono-oksigenaza
EtOAc	etil acetat
FAS	sintaza maščobnih kislin (angl. fatty acid synthase)
FeCl₃	železov (III) klorid
H₂O	voda
HBr	bromovodikova kislina
HCl	klorovodikova kislina
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti
Hz	Hertz
IC₅₀	koncentracija zaviralca, ki zavre nek biološki proces na polovico maksimalne vrednosti (ang. Half Maximal Inhibitory Concentration)
InhA	<i>trans</i> -enoil-(acil prenašalni protein) reduktaza
<i>J</i>	sklopitvena konstanta (v Hertzih)
K₂CO₃	kalijev karbonat
KatG	mikobakterijska katalazna peroksidaza
KOH	kalijev hidroksid
LiOH	litijev hidroksid

m	multiplet
mAGP	mikolilarabinogalaktan-peptidoglikan
MeMgBr	metilmagnezijev bromid
MDR-TB	tuberkuloza odporna proti izoniazidu in rifampicinu (ang. Multidrug Resistant Tuberculosis)
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MK	maščobna kislina
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MTB/RIF	mycobacterium tuberculosis/rifampicin
Na⁺ACO⁻	natrijev acetat
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirana oblika)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirana oblika)
NAG	N-acetilglukozamin
NaH	natrijev hidrid
NaOH	natrijev hidroksid
NAM	N-acetilmuraminska kislina
NMR	jedrska magnetna resonanca
Pd/C	paladij na ogljiku
PDIM	ftiocerol dimikocerozat
PGL	fenolni glikolipid
Ph	fenil
PIM	fosfatidilnotizol manozid
POCl₃	fosforil klorid
pTsOH	para toluen sulfonska kislina
Pyr	pirol
Pyra	pirazol
PyrPy	1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2- <i>a</i>]pirazin
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
s	singlet
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (ang. Structure Activity Relationship)
t	triplet
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TCI	Tokyo Chemical Industry

TDR-TB	proti vsem učinkovinam odporna tuberkuloza (ang. Totally Drug Resistant Tuberculosis) – izraz še ni natančno definiran pri WHO
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Tt	temperatura tališča
XDR-TB	tuberkuloza odporna proti izoniazidu, rifampicinu in določenim učinkovinam drugega izbora (ang. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis)

1 UVOD

1.1 Tuberkuloza

Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča bakterija *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkuloza se prenaša po zraku s kužnim aerosolom ob kihanju, kašljanju in govorjenju. Oseba se že ob inhalaciji majhnega števila aerosolov zelo hitro okuži. Okužba najpogosteje prizadene pljuča (1).

Tuberkuloza spada med 10 najpogostejših vzrokov smrti na svetu. Leta 2016 je za tuberkulozo na novo zbolelo 10,4 milijona ljudi, kar 1,7 milijona ljudi (od tega je bilo 0,4 milijona okuženih tudi z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (HIV)) pa je za to boleznijo umrlo (1).

Bolezen poznamo v latentni in aktivni obliki. Kar četrtnina svetovnega prebivalstva ima latentno obliko tuberkuloze, pri katerih je bakterija prisotna v neaktivni obliki. Pri tej obliki se ne razvijejo znaki in simptomi bolezni in tudi sama okužba se ne more širiti na druge osebe. Pri ljudeh z latentno obliko obstaja 5–15 % verjetnosti, da se latentna oblika razvije v aktivno. Pri ljudeh z okužbo HIV, kadilcih, sladkornih bolnikov, podhranjenih, imunsko slabo odpornih pa je verjetnost razvitja v aktivno obliko veliko večja. Glavni simptomi aktivne oblike so: kašelj – včasih s krvnim sputumom, bolečine v prsih, šibkost, izguba telesne mase, vročina in nočno potenje (1).

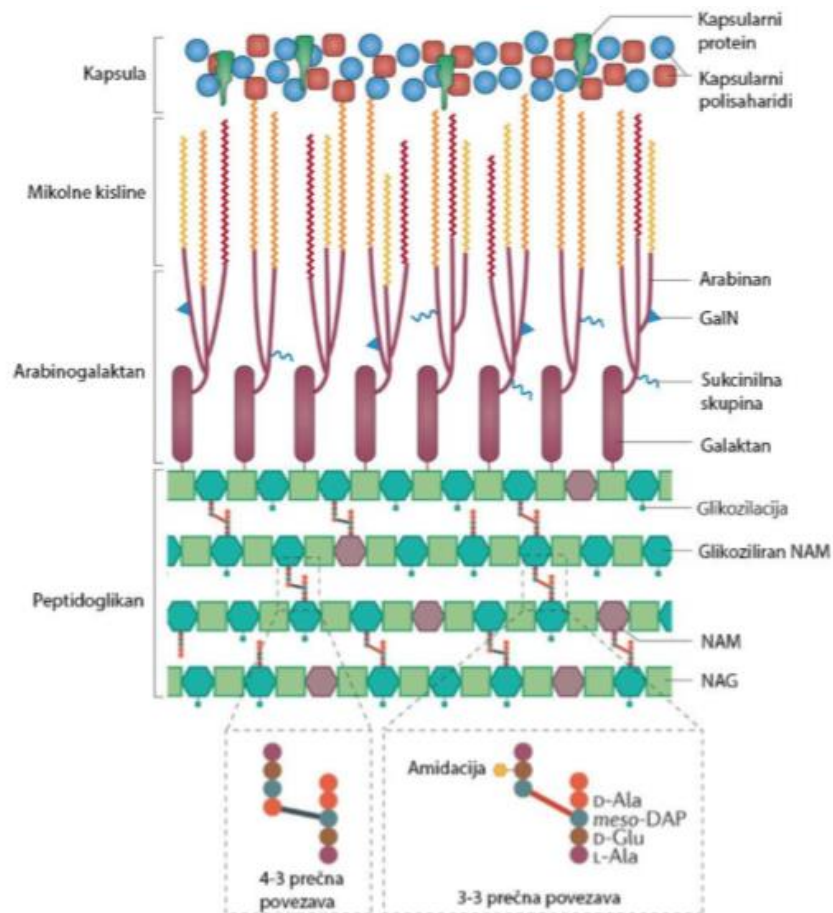
Aktivno obliko tuberkuloze v večini držav diagnosticirajo s pregledom razmaza sputuma, vendar je ta metoda uspešna samo pri polovici okuženih in ne zazna rezistence na zdravilo. Odkrivajo jo tudi z rentgenskim slikanjem, po letu 2010 pa se je uveljavil hitri test za ugotavljanje bolezni in ugotavljanje odpornosti na zdravila. Imenuje se Xpert MTB/RIF, ki zazna tuberkulozo in odpornost na rifampicin (1).

1.2 Mikobakterije

M. tuberculosis spada med grampozitivne, aerobne, znotrajcelične bakterije. Od drugih bakterij se loči po celični steni, ki vsebuje veliko maščobnih kislin. Po kemijski zgradbi se zlahka loči tako od gramnegativnih kot grampozitivnih bakterij, saj velja, da vsebnost lipidov lahko predstavlja do 40 % suhe celične mase. Pri grampozitivnih bakterijah je ta vrednost običajno največ 5 %, pri gramnegativnih pa 10 %. Zato se za njihovo barvanje uporablja tehnika po Ziehl-Neelsonu. Maščobne kisline in voski v celični steni najprej otežijo barvanje, nato pa tudi razbarvanje bakterij z alkoholom in solno kislino. Zato pravimo, da so bakterije acidorezistentne. V obarvanem preparatu vidimo rdeče bacile na modrem ozadju. *M. tuberculosis* od drugih mikobakterij ločimo z biokemičnimi testi, značilen je pozitiven niacinski test (2, 3).

1.2.1 Mikobakterijska celična stena

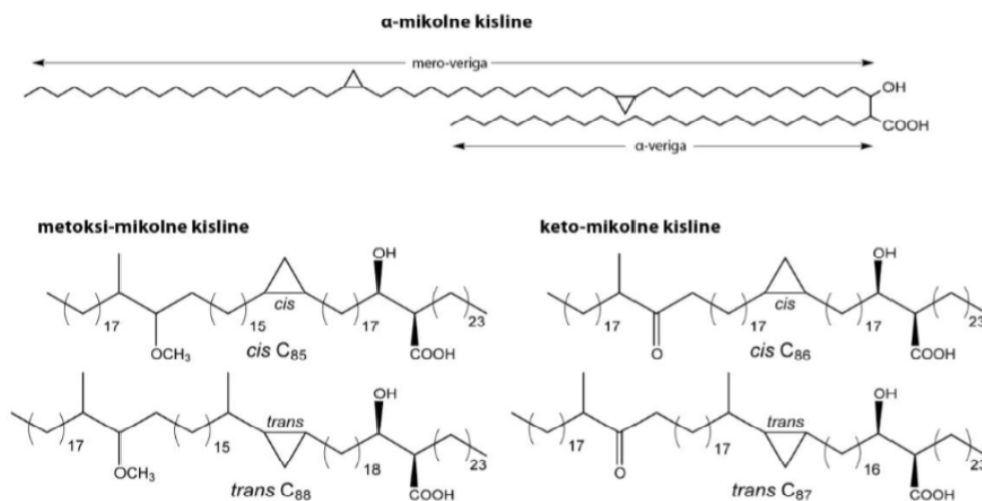
Celična ovojnica je sestavljena iz celične membrane in celične stene (4). Celična oz. plazemska membrana se ne razlikuje od tiste pri ostalih bakterijah. Edinstvena zgradba celične stene (slika 1) pa je ključna za razlikovanje od ostalih bakterij. Sestavljena je iz treh plasti, ki jih imenujemo mikolilarabinogalaktan-peptidoglikanski (mAGP) kompleks (4, 5). Kompleks je zgrajen iz plasti peptidoglikana, arabinogalaktana in mikolnih kislin. Arabinogalaktan-mikolni del se na peptidoglikansko plast povezuje s fosfodiestrskimi vezmi (kovalentna vez). Celična stena vsebuje tudi interkalirane, nekovalentno vezane lipide in lipoglikane; fosfatidilnotizol manozide (PIM), ftiocerol dimikocerozate (PDIM), fenolne glikolipide (PGL) in drugo. Na zunanji strani mikobakterijske celične stene se nahaja še plast proteinov in polisaharidov (4, 5, 6). Kovalentno vezane mikolne kisline in prosti lipidi tvorijo slabo permeabilni dvosloj, ki predstavlja močno bariero in mikobakterijam zagotavlja odpornost (5). Naštete lastnosti celične stene so ključne za nastanek selektivne toksičnosti zdravilnih učinkovin, ki jih razvijamo in sintetiziramo za zdravljenje proti mikobakterijam (6).



Slika 1: Zgradba mikobakterijske celične stene (prirejeno po(7))

1.2.2 Struktura mikolnih kislin

Po strukturi so mikolne kisline dolge maščobne kisline s hidroksilno skupino na *beta* mestu in krajšo alkilno verigo na *alfa* mestu. V celični steni najdemo tri oblike mikolnih kislin (slika 2). Pri α -mikolnih kislinah je ciklopropanski fragment v *cis* konfiguraciji. Pri metoksi in keto mikolnih kislinah pa je ciklopropanski fragment v *cis* ali *trans* konfiguraciji, med sabo pa se razlikujeta po metoksi oz. keto skupini (8).



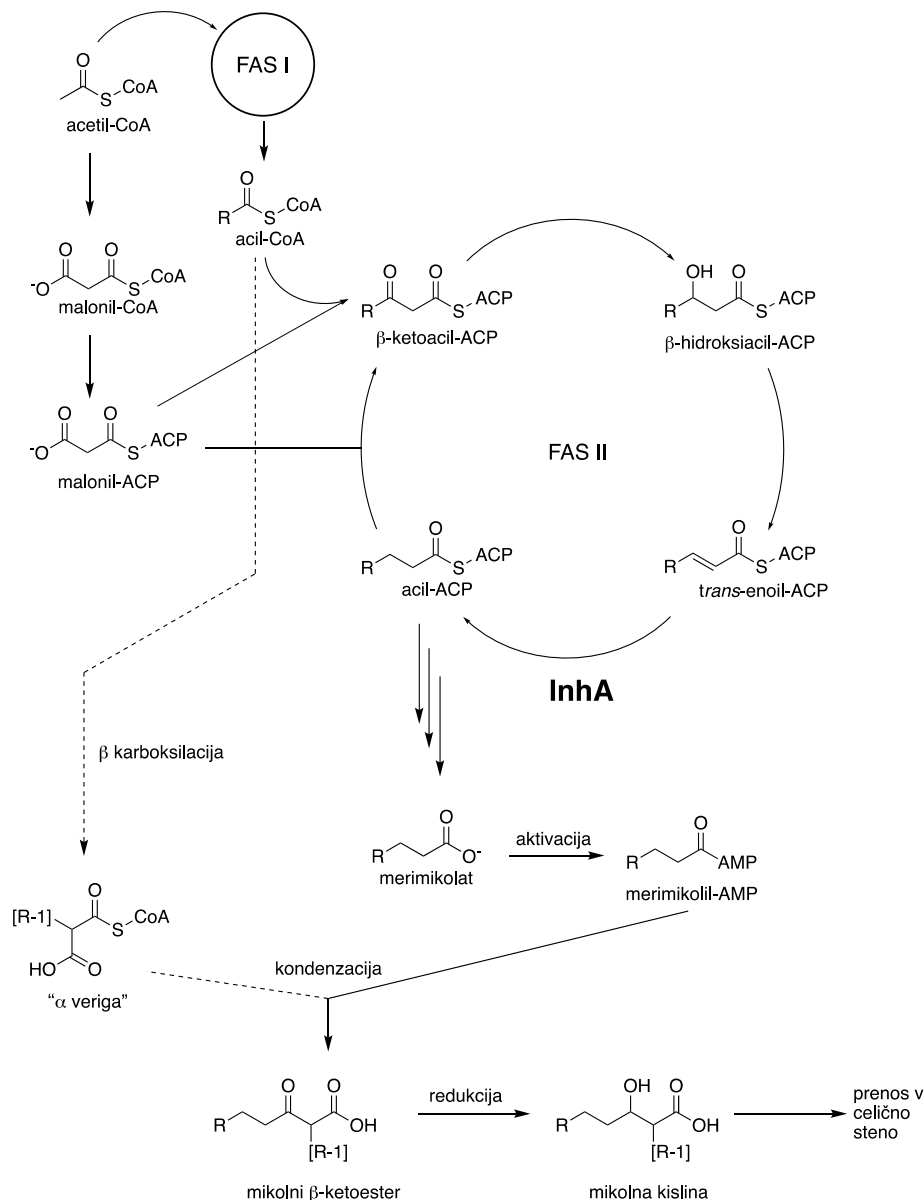
Slika 2: Vrste mikolnih kislin (prirejeno po (8))

1.2.3 Biosinteza mikolnih kislin

Sam nastanek mikolnih kislin poteka v dveh stopnjah (slika 3). Za prvo stopnjo je ključen encimski sistem sintaze maščobnih kislin-I (FAS-I) (prisoten tako v evkariontskih, kot tudi v prokariontskih organizmih), za drugo stopnjo pa FAS-II (prisoten v rastlinah in bakterijah). Sistem FAS-I podaljšuje molekulo v obliki acetil-koencima A (acetil-CoA) po dva ogljika na cikel. Produkt sistema FAS-I so maščobne kisline z dolžino 16–18 ali 24–26 ogljikovih atomov. Spremeni se samo dolžina verige atomov ogljika, polarni del tioestra z acetil-koencimom A pa ostaja enak. Sistem FAS-II pa poskrbi za sintezo do končnih mikolnih kislin (α , metoksi, keto oblike), ki vsebujejo 18–32 atomov ogljika. Tudi ta sistem podaljšuje verigo za dva atoma ogljika in poteka po zaporedju štirih reakcij. Pri prvi reakciji gre za Claisenovo kondenzacijo, pri kateri se spojita acil-CoA in malonil-acil prenašalni protein (malonil-ACP). Nastane *beta*-ketoacil-ACP, ki se z drugo reakcijo sistema reducira v *beta*-hidroksiacil-ACP. Pri tretji reakciji se odstrani voda in dobimo *trans*-2-enoil-ACP. Pri zadnji reakciji v ciklu pa encim InhA reducira *trans*-2-enoil-ACP v acil-ACP. Produkt enega cikla je acil-ACP, ki je za dva atoma ogljika podaljšan. Sam cikel reakcij se tako ponavlja do končnega števila atomov ogljika (18–32) in tudi tu se polarni del ne spremeni. V naslednji stopnji pa se acil-ACP, ki izstopi iz cikla FAS-II, s pomočjo določenih encimov spremeni iz tioestra vezanega na CoA v obliko proste karboksilne kisline. Že v tej stopnji nastanejo verige dolge 48–62 atomov ogljika, v nadaljnjih stopnjah pa pride do nastanka merimikolata oz. merimikolil-adenozin monofosfata (merimikolil-AMP oz. aktiviran merimikolat). Sledi Claisenova kondenzacija

med merimikolil-AMPjem in maščobno kislino dolžine 24–26 ogljikovih atomov, ki izstopi iz cikla FAS-I in se karboksilira na *beta* ogljikovem atomu. Odvisno od kombinacije vrste verig, se tvorijo tri vrste končnih mikolnih kislin v različnih konfiguracijah (9, 10).

Za potek zadnje reakcije v sistemu FAS-II je ključen encim *InhA*, ki je od reducirane oblike nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADH) odvisna *trans*-enoil-(acil prenašalni protein) reduktaza. Kot že ime pove, reducira dvojno vez, tako da *trans*-2-enoil-ACP spremeni v acil-ACP. Ključna je sama selektivnost encima, saj *InhA* reducira reaktante, ki imajo v nepolarnem delu vsaj 16 atomov ogljika iz sistema FAS-I (9, 10).



Slika 3: Biosinteza mikolnih kislin (prirejeno po(9))

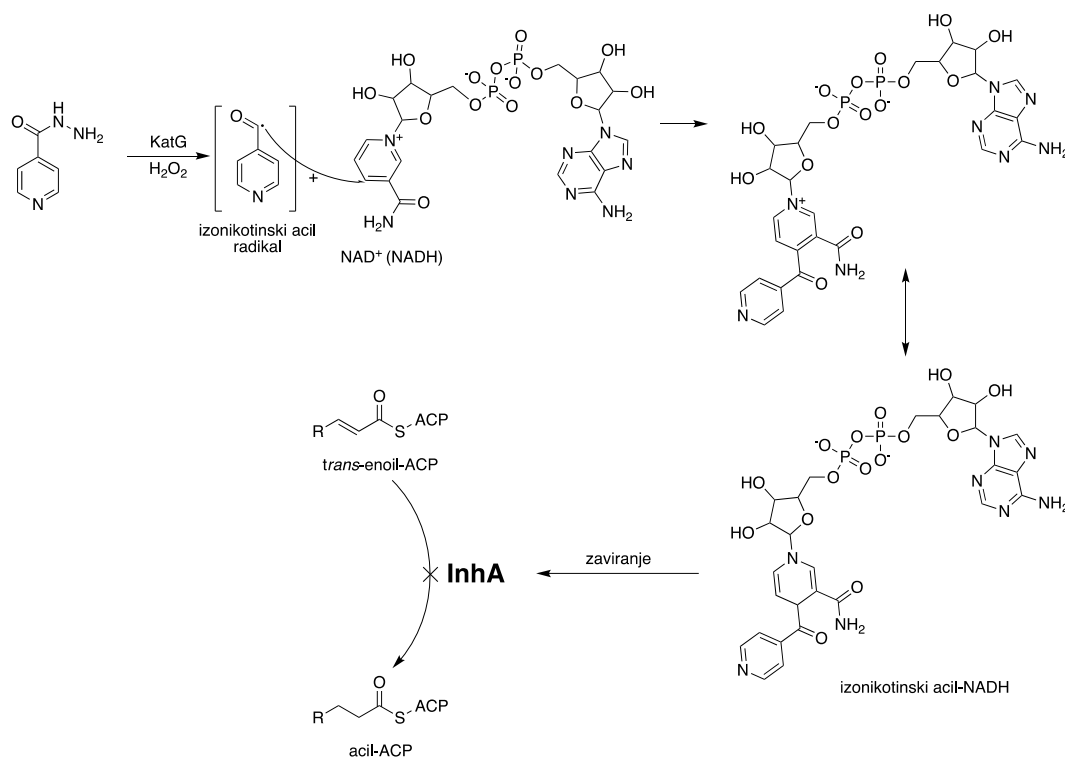
1.3 Zaviralci InhA

Encim InhA je reduktaza, ki je ključna v ciklu zadnje reakcije sistema FAS-II. Zelo pomembno je tudi, da se aktivno mesto encima nikoli ne spreminja in da ima dve ključni vezavni mesti za substrata (maščobna kislina (MK) in NADH). Sama inhibicija encima InhA privede do smrti bakterije (11, 12). Ključna je tudi selektivna toksičnost, saj maščobne kisline v človeškem organizmu nastajajo samo preko sistema FAS-I, v mikobakterijah tuberkuloze pa preko obeh sistemov (9, 10).

1.3.1 Zdravila prvega izbora

Zdravila prvega izbora uporabljamo v primeru aktivne oblike tuberkuloze, pri kateri je prisoten neodporen sev *Mycobacterium tuberculosis* (15).

Izoniazid velja za zdravilo prvega izbora pri zdravljenju tuberkuloze. Velja za predzdravilo, saj ga v mikobakteriji aktivira encim mikobakterijske katalazne peroksidaze KatG. Ko preide v aktivno obliko (izonikotinski acil-NADH), močno zavira delovanje encima InhA (slika 4) (13, 14).



Slika 4: Aktivacija izoniazida (prirejeno po (13, 14))

Zdravila prvega izbora so še rifampicin (antibiotik, ki prepreči sintezo informacijske ribonukleinske kisline (mRNA)), etambutol (zavira izgradnjo celične stene), pirazinamid (omejuje membranski aktivni transport) in streptomycin (zavira sintezo proteinov) (15).

1.3.2 Zdravila drugega izbora

Zdravila drugega izvora uporabimo v primeru aktivne oblike tuberkuloze, pri kateri je prisoten odporen sev *Mycobacterium tuberculosis*. Odpornost pri tuberkulozi lahko v grobem delimo na tri tipe – MDR-TB, XDR-TB in TDR-TB (16, 17, 18).

Pri obliki tuberkuloze odporne proti izoniazidu in rifampicinu (ang. Multi Drug Resistant Tuberculosis - MDR-TB) zaradi odpornosti na izoniazid in rifampicin, uporabljamo zdravila drugega izbora. To so analogi izoniazida (etionamid in protionamid), antibiotiki (kapreomicin, kanamicin, amikacin) in fluorokinoloni (16, 17).

Pri obliki tuberkuloze odporne proti izoniazidu, rifampicinu in določenim učinkovinam drugega izbora (ang. Extensively Drug Resistant Tuberculosis - XDR-TB) uporabimo lahko samo analoga izoniazida (etionamid in protionamid), saj je sev odporen na zdravila prvega in na vsa preostala zdravila drugega izbora (16, 17).

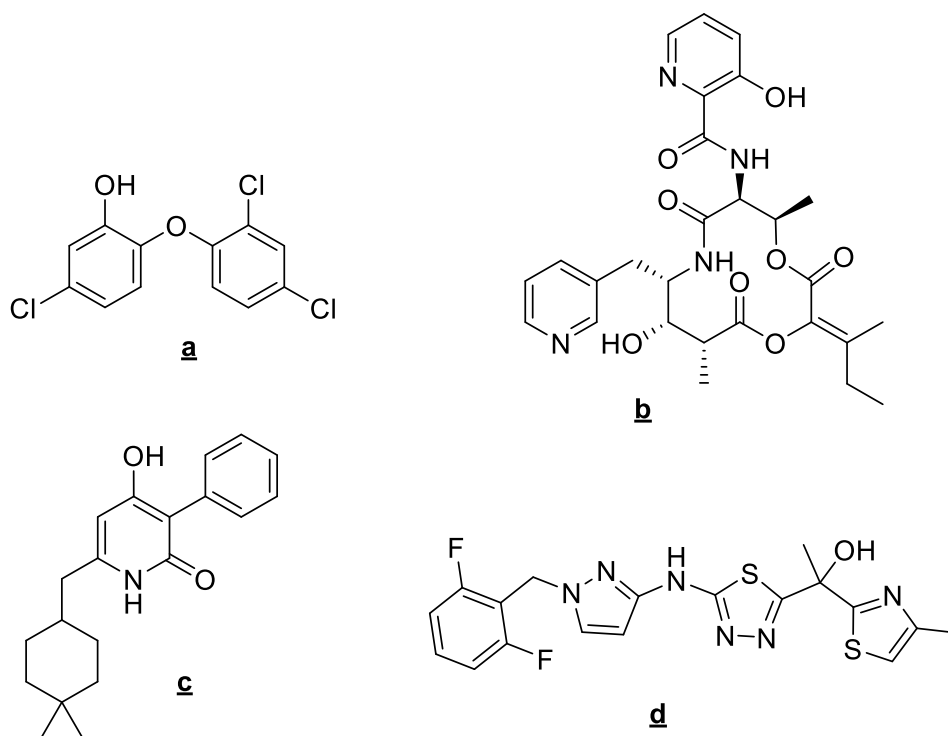
Do odpornosti na izoniazid pri obeh oblikah (MDR-TB in XDR-TB) pride zaradi mutacije encima KatG (slika 4), ki je ključen za samo aktivacijo predzdravila. Tako se ne ustvari več dovolj izonikotinskega acil-NADHja in je zato zaviranje encima InhA neučinkovito. Posledično uporabimo analoga izoniazida, ki se aktivirata preko encima mikobakterijske mono-oksigenaze (EthA), ki v zgornjih dveh primerih ni mutiran (19, 20).

Pri protični vsem učinkovinam odporni tuberkulozi (ang. Totally Drug Resistant Tuberculosis - TDR-TB) velja, da je sev odporen na vsa zdravila prvega in drugega izbora, zato je na voljo učinkovina bedakilin, ki pa ima lahko hude neželene stranske učinke na kardiovaskularni sistem (18).

Pri odpornosti mikobakterij na etionamid in protionamid govorimo takrat, ko je mutiran tudi encim EthA (20).

1.3.3 Direktni zaviralci InhA

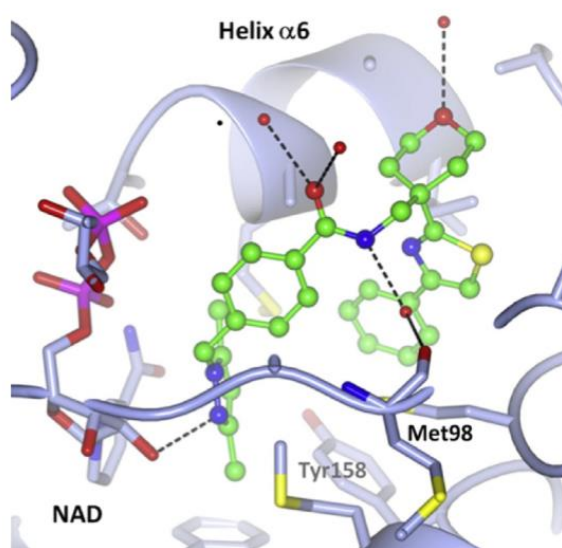
Pri direktnih zaviralcih ne potrebujemo nobenega encima za aktivacijo predzdravila, saj učinkovina direktno zavira encim InhA (21). Razdelimo jih lahko v štiri skupine: derivati triklosana, piridomicin, 4-hidroksi-2-piridoni in tiadiazoli (slika 5)(22). Kot potencialni inhibitorji InhA so se izkazali tudi derivati tetrahidropirana, ki pa smo jih pri svojem raziskovalnem delu modificirali (21).



Slika 5: Najučinkovitejši derivati zaviralcev InhA: (a) derivat triklosana, (b) piridomicin, (c) derivat 4-hidroksi-2-piridona, (d) derivat tiadiazola

1.4 Interakcije zaviralcev tetrahidropiranskega tipa

Pri podjetju GlaxoSmithKline (GSK) so z rešetanjem visoke zmogljivosti dobili zadetek, tetrahidropiranski derivat, ki zavira encim InhA. Na podlagi kristalne strukture InhA z zaviralcem spojine **I** (slika 6) je raziskovalcem uspelo opisati ključne interakcije med zaviralcem in InhA. Na podlagi tega se da opisati razmerje med aktivnostjo in strukturo spojine, t.i. SAR (ang. Structure Activity Relationship). Ugotovili so tudi, da spojina v vezavnem mestu encima zavzema konformacijo v obliki črke U. Interakcije med vezavnim mestom encima in zaviralci tetrahidropiranskega tipa so ključne, saj je od njih odvisna moč zaviranja encima (21).



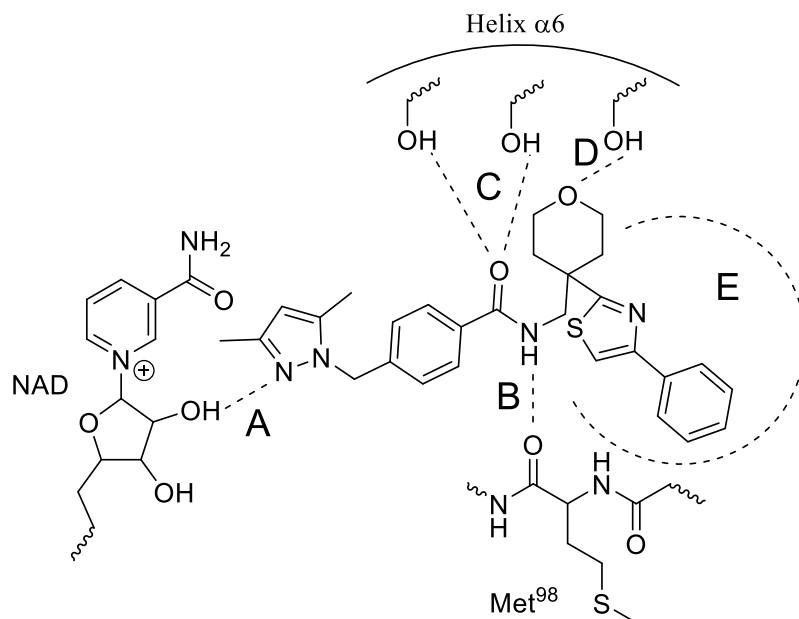
Slika 6: Vezavno mesto InhA z vezanim zaviralcem tetrahidropiranskega tipa

Interakcije (slika 6, 7):

- pirazol spojine in piridin oksidirane oblike nikotin adenin dinukleotid fosfata (NAD) stojita vzporedno drug proti drugemu, ključna pa je vodikova vez med drugim pirazolnim dušikom in 2-hidroksi skupino na NAD – **A**,
- vodikova vez med centralnim amidom in karboksilnim delom amidne vezi metionina na mestu 98 – **B**,
- vodikovi vezi med kisikovim delom amida spojine in dvema hidroksi skupinama iz vijačnice $\alpha 6$ (Helix $\alpha 6$) – **C**,
- vodikova vez med kisikovim delom tetrahidropirana in hidroksi skupine iz vijačnice $\alpha 6$ (Helix $\alpha 6$) – **D**,
- hidrofobne, nespecifične interakcije med desnim delom molekule in hidrofobnim žepom – **E**.

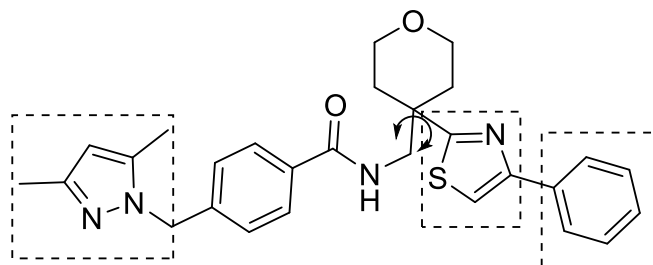
Pri sami strukturi spojine je ključen metilni distančnik med pirazolom (levi del molekule) in desnim delom molekule, saj pozicionira desno stran molekule na pravo dolžino in v pravo konformacijo. Vijačnica $\alpha 6$ je v taki poziciji, da zajema desni del molekule razen tetrahidropiranski del, ki sega iz vijačnice (slika 6, 7), kljub tvorjenju vodikove vezi (vez je

nepomembna za samo aktivnost inhibitorja). Skrajno desni del molekule (**E**), je sicer pod vijačnico α_6 , vendar se zažema v hidrofobni žep receptorja (slika 6,7) (21).



Slika 7: Interakcije med vezavnim mestom encima *InhA* in tetrahidropiranskim tipom direktnih zaviralcev (povzeto po (21))

V sklopu projekta so na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pripravili osemnajst analogov tetrahidropiranskega derivata (spojina **I**). Osredotočili so se na poskus menjave treh obročev, ki so označeni s črtkanimi okvirji na sliki 8. Ugotovili so, da so vsi analogi zadetka slabše zavirali encim *InhA*. Samo dva analoga sta izkazala primerljivost s spojino **I**, vendar je bila učinkovitost vseeno manjša oz. stopnja citotoksičnosti prevelika (21). Kot je iz raziskave razvidno, bi bilo nesmiselno spreminjati levi del spojine, saj so se interakcije pirazolovega derivata z NAD izkazale za ključne. Smiselno pa bi bilo spreminjati strukturo na desni strani, saj si z vstavljanjem lipofilnih fragmentov lahko zagotovimo dodatne interakcije v hidrofobnem žepu. Odpravimo lahko tudi samo vrtljivost molekule z rigidizacijo in s tem poskušamo povečati vezavno energijo.



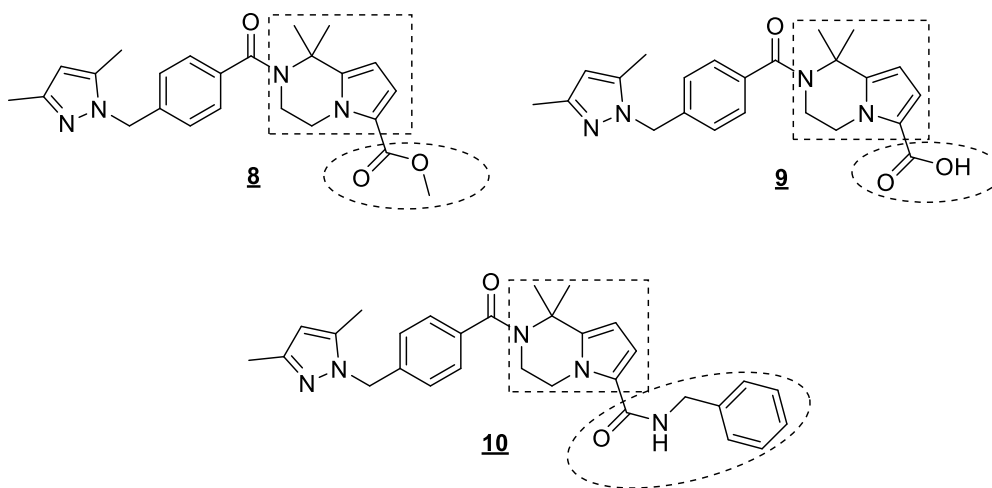
Slika 8: Spojina **I**

2 NAMEN IN NAČRT DELA

Magistrska naloga se izvaja z namenom sinteze novih analogov potencialnih zaviralcev encima InhA. Spremembe na označenih mestih na tetrahidropiranskem tipu spojine **I** (slika 8) niso prinesle izboljšav, zato smo se glede na konformacijo, ki jo izkazuje molekula ob sami vezavi v vezavnem mestu, odločili za dve spremembi.

Prva sprememba je vrtljivost centralnega dela molekule. V molekuli se namreč nahaja prosto vrtljiva C-C vez, ki je označena s puščico na sliki 8. Z rigidizacijo bomo omejili vrtljivost molekule in si s tem najverjetneje zagotovili boljšo vezavno energijo v vezavnem mestu. Na Katedri za farmacevtsko kemijo so z in silico metodami ovrednotili prileganje potencialnih zaviralcev, pri čemer so na mesto tetrahidropirana uvedli različne heterocikle. Heterocikli so bili izbrani glede na izvedljivost sinteze. 1,2,3,4-Tetrahidropirol[1,2-*a*]pirazin je bil rangiran najvišje izmed predlaganih heterociklov. Na podlagi rezultatov te študije smo se odločili za zamenjavo tetrahidropirana z 1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-*a*]pirazinom, ki je označen na vseh treh končnih produktih s črtkanimi pravokotniki (slika 9).

Druga sprememba pa bo vstavljanje lipofilnih in/ali voluminoznih fragmentov, s katerimi želimo raziskati kemijski prostor ob aktivnem mestu. Na novi fragment bomo tako pripeli metil karboksilat (spojina **8**) in *N*-benzilkarboksamid (spojina **10**). Derivat karboksilne kisline (spojina **9**) je samo predstopnja sinteze spojine **10**, vendar ga vseeno preverimo ali zavira encim InhA. Dodani fragmenti so na sliki 9 označeni s črtkanimi elipsami.



Slika 9: Strukture načrtovanih spojin

Končnim spojinam bodo na encimu InhA določili vrednost IC_{50} .

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Za izvedbo reakcij in izolacij smo uporabljali topila in reagente proizvajalcev, Acros Organics, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Carlo Erba, Kemika, Sigma Aldrich, Merck, Tokyo Chemical Industry (TCI). Kemikalije in topila smo uporabljali brez predhodnega čiščenja.

Za risanje in poimenovanje spojin ter za računanje njihovih molskih mas, smo uporabljali programsko opremo ChemDraw 16.0 (PerkinElmer). Za obdelavo spektrov jedrske magnetne resonance (NMR) smo uporabljali program MestReC 4.7.0.0 (MestreLab).

3.2 Metode

Kromatografske metode:

Za sledenje reakcij smo uporabljali tankoplastno kromatografijo (TLC). Izvajali smo jo na ploščicah TLC Silica gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu dimenzij 20 × 20 cm, proizvajalca Merck. Sestave uporabljenih mobilnih faz so navedene pri posameznih stopnjah sinteze. Lise na TLC-ploščah smo opazovali pod UV svetlobo valovne dolžine 254 nm in/ali 366 nm. Oroševali smo z raztopinama ninhidrina in/ali fosfomolibdenske kisline.

Kolonsko kromatografijo smo izvajali s silikagelom (Silikagel 60, sito 230–400) z velikostjo delcev 40–63 μm.

Spektroskopske metode:

NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, ¹H spektri so bili posneti pri 400 MHz, ¹³C spektri pa pri 100 MHz. Temperatura je bila v obeh primerih 295 K. Vzorce smo raztopili v devteriranem kloroformu (CDCl₃) in devteriranem dimetil sulfoksidu (DMSO-d₆) z internim standardom tetrametilsilana (TMS).

Tališče:

Končnim produktom smo določili **tališče** na mikroskopu Cambridge Instruments z grelno mizico Reichert.

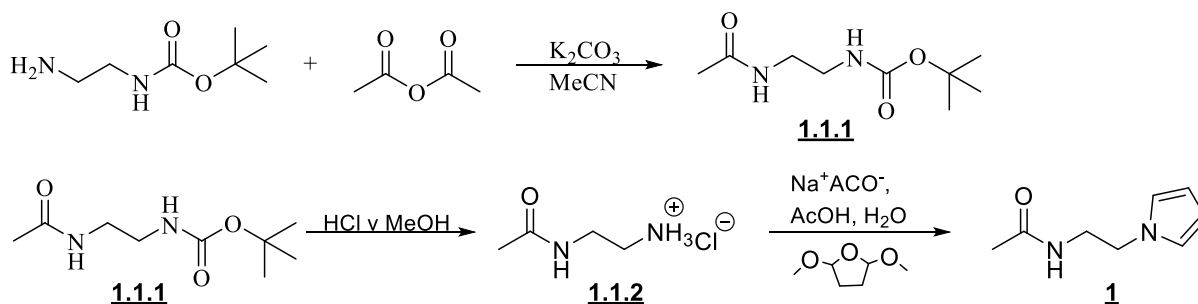
4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteze *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (**1**)

4.1.1 Poskusi sinteze *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (**1**)

4.1.1.1 Prvi poskus sinteze

Reakcija:



4.1.1.1.1 Sinteza *tert*-butil (2-acetamidoetil)karbamata (**1.1.1**)

V bučko natehtamo *tert*-butil (2-aminoetil)karbamata (4,00 g; 25,0 mmol) in 1,5 molskega ekvivalenta (eq) kalijevega karbonata (K_2CO_3) (5,18 g; 37,5 mmol) ter suspendiramo v 50 mL acetonitrila (MeCN). Ob mešanju na ledeni kopeli raztopini po kapljicah dodajamo 1,1 ekvivalenta anhidrida očetne kisline (2,59 mL; 27,5 mmol). Reakcijsko zmes mešamo na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan reakcijsko zmes filtriramo z odsesavanjem in filtratu pod znižanim tlakom uparimo MeCN. Izoliramo 4,50 g rumenega prahu. Surov produkt brez čiščenja uporabimo v naslednji reakciji.

Izkoristek: 89,2 %, **Retencijski faktor (Rf):** 0,64 (diklorometan (DKM) : metanol (MeOH) = 9:1), **1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** δ (ppm) = 1,44 (s, 9H, -O-C-(CH_3)₃), 1,98 (s, 3H, -CO- CH_3), 3,25-3,38 (m, 4H, -NH- CH_2 - CH_2 -NH-), 5,01 (s, 1H, -O-CO-NH- CH_2), 6,31 (s, 1H, - CH_2 -NH-CO- CH_3)

4.1.1.1.2 Sinteza 2-acetamidoetan-1-amonijevega klorida (**1.1.2**)

Z acetilkloridom pripravimo 2 M raztopino klorovodikove kisline (HCl) v MeOH; v 100 mL bučko odmerimo 55,8 mL MeOH, nato ob mešanju na ledeni kopeli po kapljicah dodamo acetilklorid (7,96 mL; 112 mmol). Pripravljeni raztopino 2M HCl v MeOH počasi dodamo v drugo 100 mL bučko, v katero smo predhodno dodali celotno količino spojine **1.1.1** (4,50 g; 22,3 mmol). Reakcijsko zmes mešamo 15 h pri sobni temperaturi, nato pod znižanim tlakom uparimo MeOH. Izoliramo 2,29 g oranžnega prahu. Surov produkt brez čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

Izkoristek: 94,5 %, **Rf:** 0,00 (DKM : MeOH = 9:1)

4.1.1.1.3 Sinteza *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (1)

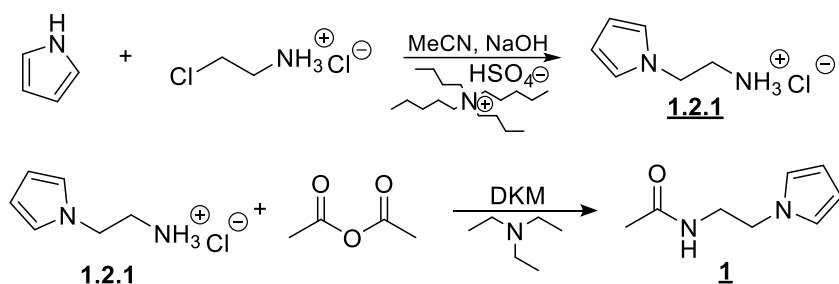
V 100 mL bučko prenesemo celotno količino spojine **1.1.2** (2,92 g; 21,1 mmol) in ji zraven dodamo razmerje reaktantov iz predpisa. Ob mešanju na oljni kopeli ($T = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) v bučko odmerimo natrijev acetat (Na^+ACO^-) (1,68 g; 20,5 mmol) in vodo (H_2O) (41 mL) ter po kapljicah dodajamo očetno kislino (AcOH) (10,2 mL). Pustimo mešati 10 min in potem po kapljicah dodajamo 2,5-dimetoksitetrahydrofuran (2,63 mL; 20,5 mmol). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli ($T = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) nadaljnjih 90 min. Po končani reakciji uparimo vodo iz reakcijske zmesi. V bučko dodamo MeOH in DKM. Dodamo še 5 g K_2CO_3 in celotno zmes filtriramo skozi plast silikagela. Filtrat sušimo z Na_2SO_4 in uparimo topila. Izoliramo 0,52 g rjavega produkta.

Izkoristek: 16,3 %, **Rf:** 0,60 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC in NMR spekter izolirana spojina ni želeni produkt.

4.1.1.2 Drugi poskus sinteze

Reakcija:



4.1.1.2.1 Sinteza 2-(1*H*-pirol-1-il)etan-1-amonijevega klorida (1.2.1)

V 50 mL bučko odpipetiramo pirol (2,08 mL; 30,3 mmol) in MeCN (16,5 mL), nato dodamo natrijev hidroksid (NaOH) (4,70 g; 115 mmol) in tetrabutilamonijev vodikov sulfat (0,400 g; 1,18 mmol). Reakcijsko zmes mešamo 30 min pri sobni temperaturi. Nato v bučko dodamo 2-kloroetil-1-amonijev klorid (4,1 g; 35,0 mmol), bučko prestavimo v oljno kopel in segrevamo na temperaturi refluxa ($T = 82\text{ }^{\circ}\text{C}$) 24 ur. Reakcijsko zmes filtriramo in uparimo topilo. Surov produkt brez dodatnega čiščenja uporabimo v naslednjem koraku.

Izkoristek: (nečist produkt), **Rf:** 0,26 (DKM : MeOH = 9:1)

4.1.1.2.2 Sinteza *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (1)

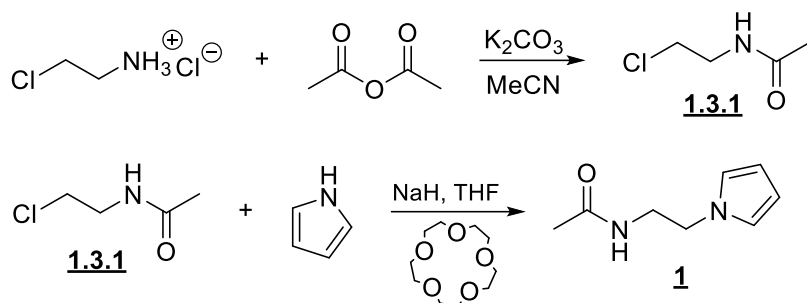
Produkt **1.2.1** raztopimo v DKM (20 mL) in ob mešanju počasi dodamo acetanhidrid (4,72 mL; 50,0 mmol) ter trietilamin (6,97 mL; 50,0 mmol). Reakcijsko zmes mešamo na sobni temperaturi preko noči. Nato uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Zaostanek raztopimo v 40 mL etil acetata (EtOAc), prenesemo v lij ločnik in spiramo z 1M HCl (2×10 mL) ter nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×15 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 in filtriramo. Uparimo EtOAc in izoliramo 1,12 g produkta svetlo rjave barve.

Izkoristek: (nečist produkt) **Rf:** 0,82 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo je produkta zelo malo, prevladujejo nečistote.

4.1.1.3 Tretji poskus sinteze

Reakcija:



4.1.1.3.1 Sinteza *N*-(2-kloroetil)acetamida (1.3.1)

V 50 mL bučko natehtamo 2-kloroetil-1-amonijev klorid (2,03 g; 17,5 mmol), K₂CO₃ (3,63 g; 26,3 mmol) in dodamo MeCN (25 mL). Ob mešanju na ledu počasi dodajamo acetanhidrid (1,82 mL; 19,3 mmol). Ob mešanju na sobni temperaturi pustimo reagirati čez noč. Naslednji dan v bučko dodamo nekaj kapljic MeOH in uparimo MeCN ter izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 40 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2×15 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo skozi filter papir. Uparimo EtOAc in izoliramo 1,47 g produkta. Surov produkt brez dodatnega čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

Izkoristek: 69,1 %, **Rf:** 0,49 (DKM : MeOH = 9:1)

4.1.1.3.2 Sinteza *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (1)

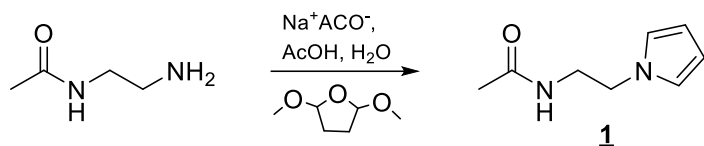
Bučko s produktom **1.3.1** (1,47 g, 12,1 mmol) iz prejšnje reakcije prepriamo z argonom in dodamo sveže predestilirani brezvodni tetrahidrofuran (THF) (12 mL). V drugi bučki, ki jo tudi prepriamo z argonom, združimo pirol (0,783 mL, 12,1 mmol) in THF (12 mL) in nato ob mešanju po kapljicah dodajamo 1,5 eq 60 % raztopine natrijevega hidrida (NaH) (0,726 g, 18,2 mmol). V slednjo bučko prelijemo vsebino bučke s produktom **1.3.1**. Ob stalnem mešanju in preprihovanju z argonom pustimo reagirati 15 ur na sobni temperaturi. Naslednji dan dodamo 5 kapljic NaHCO₃, filtriramo skozi filter papir in uparimo topilo.

Izkoristek: (nečist produkt) **Rf:** (nečist produkt) (DKM : MeOH = 9:1)

Produkt ima preveč nečistot.

4.1.2 Sinteza *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamida (1)

Reakcija:



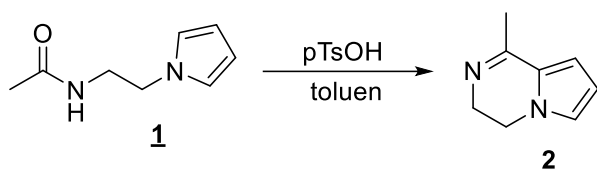
V 250 mL bučko natehtamo *N*-(2-aminoetil)acetamid (6,00 g; 58,7 mmol) in ji zraven dodamo razmerje reaktantov iz predpisa. Ob mešanju na oljni kopeli ($T = 75\text{ }^\circ\text{C}$) v bučko odmerimo natrijev acetat ($\text{Na}^+ \text{ACO}^-$) (4,67 g; 57,0 mmol) in vodo (114 mL) ter po kapljicah dodajamo AcOH (28,6 mL). Pustimo mešati 10 min in potem po kapljicah dodajamo 2,5-dimetoksitetrahidrofuran (7,53 mL; 58,7 mmol). Reakcijsko zmes segrevamo na oljni kopeli ($T = 75\text{ }^\circ\text{C}$) nadaljnjih 150 min. Po končani reakciji uparimo vodo iz reakcijske zmesi. Sledi čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM : MeOH = 10:1. Izoliramo 9,64 g temno rjavega produkta.

Izkoristek: 92,7 %, **Rf:** 0,72 (DKM : MeOH = 9:1), **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):** δ (ppm) = 1,79 (s, 3H, -CO-CH₃), 3,30 (q, 2H, $J = 6,3$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-), 3,91 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-), 5,975 (m, 2H, Pyr-³H,⁴H), 6,71 (m, 2H, Pyr-²H,⁵H), 7,96 (s, 1H, -CO-NH-CH₂-)

4.2 Sinteze 1-metil-3,4-dihidropirololo[1,2-A]pirazina (2)

4.2.1 Poskusi sinteze 1-metil-3,4-dihidropirololo[1,2-a]pirazina (2)

Reakcija:

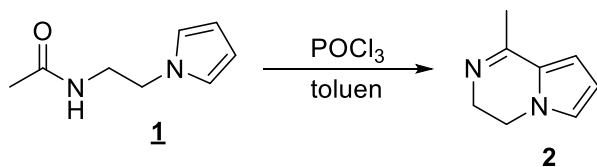


V 25 mL bučko prenesemo spojino **1** (500 mg) in dodamo 5 mL toluena. Ob mešanju po kapljicah dodajamo para toluen sulfonsko kislino (pTsOH) (100 mg). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli pri temperaturi refluxa ($T = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$) nadaljnjih 15 ur. Naslednji dan uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Zaostanek raztopimo v 5 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×5 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 in filtriramo. Po končani filtraciji uparimo EtOAc in dobimo temno rjav, tekoč produkt.

Rf: 0,04 (DKM : MeOH = 9:1)

Na TLC ploščici zaznamo premalo produkta, tudi sam Rf produkta je prenizek glede na pričakovanja.

Reakcija:

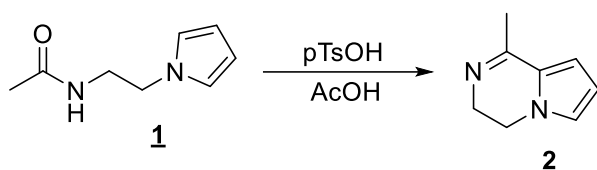


V 25 mL bučko prenesemo spojino **1** (500 mg) in dodamo 5 mL toluena. Ob mešanju po kapljicah dodajamo fosforil klorid (POCl_3) (100 mg). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli pri temperaturi refluxa ($T = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$) nadaljnjih 15 ur. Naslednji dan uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Zaostanek raztopimo v 5 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×5 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 in filtriramo. Po končani filtraciji uparimo EtOAc in dobimo temno rjav, tekoč produkt.

Rf: 0,14 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo je izkoristek reakcije premajhen.

Reakcija:

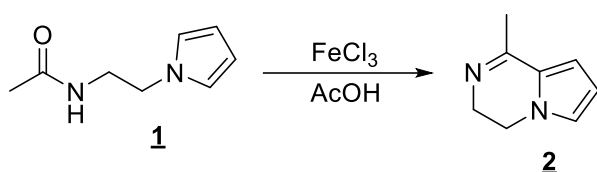


V 25 mL bučko prenesemo spojino **1** (500 mg) in dodamo 5 mL AcOH. Ob mešanju po kapljicah dodajamo para toluen sulfonsko kislino (100 mg). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli pri temperaturi refluxa ($T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$) nadaljnjih 15 ur. Naslednji dan uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Zaostanek raztopimo v 5 mL dietil etra, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaCl ($2 \times 5\text{ mL}$). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 in filtriramo. Po končani filtraciji uparimo topilo in dobimo temno rjav, tekoč produkt.

Rf: 0,16 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo je izkoristek reakcije premajhen.

Reakcija:

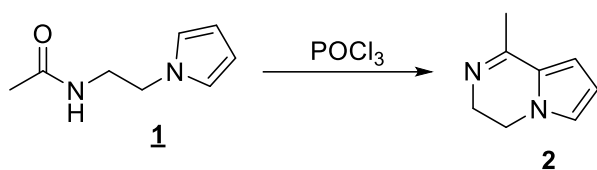


V 25 mL bučko prenesemo spojino **1** (500 mg) in dodamo 5 mL AcOH. Ob mešanju po kapljicah dodajamo železov (III) klorid (FeCl_3) (100 mg). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli pri temperaturi refluxa ($T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$) nadaljnjih 15 ur. Naslednji dan uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Zaostanek raztopimo v 5 mL dietil etra, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaCl ($2 \times 5\text{ mL}$). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 in filtriramo. Po končani filtraciji uparimo topilo in dobimo temno rjav, tekoč produkt.

Rf: 0,00 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo je izkoristek reakcije premajhen.

Reakcija:



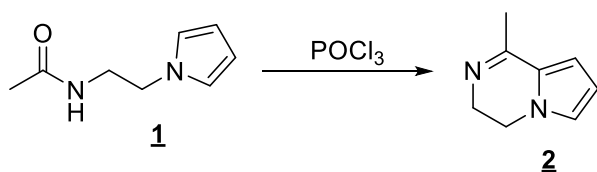
Pri tej sintezi uporabimo predpis, ki so ga razvili Ivo Jirkovsky et al. V 25 mL bučko prenesemo spojino **1** (500 mg) in ob mešanju po kapljicah dodajamo POCl₃ (2,81 mL). Reakcijsko zmes mešamo na oljni kopeli pri temperaturi refluxa (T = 107 °C) nadaljnjih 15 ur. Naslednji dan uparimo kislino na vodni črpalki in izvedemo izolacijo. Zaostanek raztopimo v 5 mL dietil etra, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino Na₂CO₃ (2×5 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo. Po končani filtraciji uparimo topilo in dobimo temno rjav, tekoč produkt.

Rf: 0,26 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo je izkoristek reakcije premajhen.

4.2.2 Sinteza 1-metil-3,4-dihidropirololo[1,2-*a*]pirazina (**2**)

Reakcija:

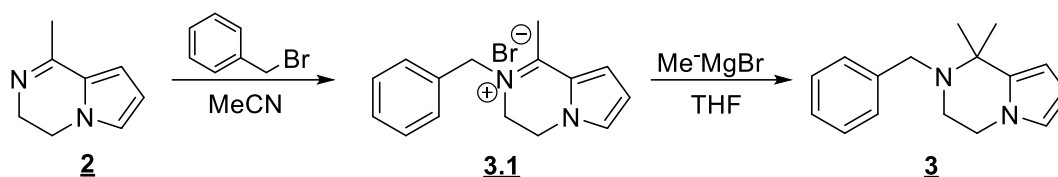


Tudi pri tej sintezi uporabimo predpis, ki so ga razvili Ivo Jirkovsky et al. Vso količino produkta **1** (9,64 g; 63,3 mmol) iz predhodne reakcije prenesemo v 100 mL bučko in ob mešanju po kapljicah dodajamo POCl₃ (54,2 mL). Reakcijsko zmes mešamo pod pogoji refluxa na oljni kopeli (T = 107 °C) eno uro. Potem uparimo kislino na vodni črpalki in izvedemo izolacijo. Zaostanek raztopimo v 50 mL dietil etra, prenesemo v lij ločnik in spiramo z 10 % raztopino NaOH (2×40 mL). Po ločbi uparimo topilo in dobimo 4,91 g temno vijoličnega, tekočega produkta.

Izkoristek: 57,8 %, **Rf:** 0,40 (DKM : MeOH = 9:1), **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ (ppm) = 2,16 (s, 3H, PyrPy-CH₃), 3,65 (m, 2H, PyrPy-³H₂), 3,875 (t, 2H, J = 6,6 Hz, PyrPy-⁴H₂), 6,10 (dd, 1H, J₁ = 2,6 Hz, J₂ = 3,8 Hz, PyrPy-⁸H), 6,44 (dd, 1H, J₁ = 1,4 Hz, J₂ = 3,8 Hz, PyrPy-⁷H), 6,92 (dd, 1H, J₁ = 1,6 Hz, J₂ = 2,4 Hz, PyrPy-⁶H)

4.3 Sinteza 2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-a]pirazina (3)

Reakcija:



4.3.1 Sinteza 2-benzil-1-metil-3,4-dihidropirololo[1,2-a]pirazin-2-ium bromida (3.1)

Ves produkt **2** (4,91 g; 36,4 mmol) prenesemo v 100 mL bučko in ga raztopimo v MeCN (60 mL). Ob mešanju po kapljicah dodajamo 1,06 eq benzil bromida (4,60 mL; 38,6 mmol) in reakcijsko zmes segrevamo pod pogoji refluxa na oljni kopeli ($T = 82\text{ }^{\circ}\text{C}$) štiri ure. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in produkt brez dodatnega čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

Rf: 0,50 (DKM : MeOH = 9:1)

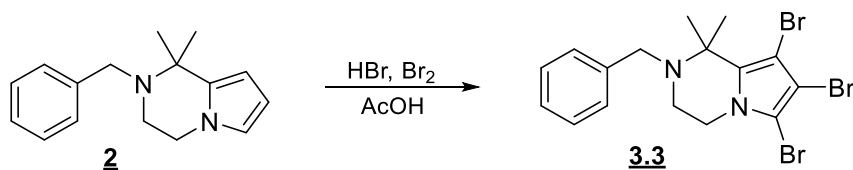
4.3.2 Sinteza 2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-a]pirazina (3)

Bučko s produktom **3.1** (1,47 g; 12,1 mmol) prepriamo z argonom in dodamo sveže predestilirani brezvodni THF (60 mL). Po petih minutah mešanja dodamo 1,64 eq metilmagnezijskega bromida (Me^-MgBr) (19,9 mL; 59,6 mmol), ki smo ga na enak način preprihali z argonom. Ob stalnem mešanju in preprihovanju z argonom pustimo reagirati 15 ur na sobni temperaturi. Po petnajstih urah reakcijo prekinemo z dodatkom acetona (5 mL) in uparimo topilo. Sledi čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo EtOAc : heksan = 1:12. Izoliramo 3,07 g oranžnordeče tekočine.

Izkoristek: 35,1 %, **Rf:** 0,70 (EtOAc : heksan = 1:6), **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)** = 1,51 (s, 6H, $\text{PyrPy}-(\text{CH}_3)_2$), 2,83 (t, 2H, $J = 5,6\text{ Hz}$, $\text{PyrPy}-^3\text{H}_2$), 3,69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 3,83 (t, 2H, $J = 5,4\text{ Hz}$, $\text{PyrPy}-^4\text{H}_2$), 5,91 (dd, 1H, $J_1 = 1,8\text{ Hz}$, $J_2 = 3,4\text{ Hz}$, $\text{PyrPy}-^8\text{H}$), 6,15 (dd, 1H, $J_1 = 2,8\text{ Hz}$, $J_2 = 3,6\text{ Hz}$, $\text{PyrPy}-^7\text{H}$), 6,43 (dd, 1H, $J_1 = 1,8\text{ Hz}$, $J_2 = 2,6\text{ Hz}$, $\text{PyrPy}-^6\text{H}$), 7,24-7,42 (m, 5H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$)

4.3.3 Poskus sinteze 2-benzil-6,7,8-tribromo-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazina (3.3)

Reakcija:



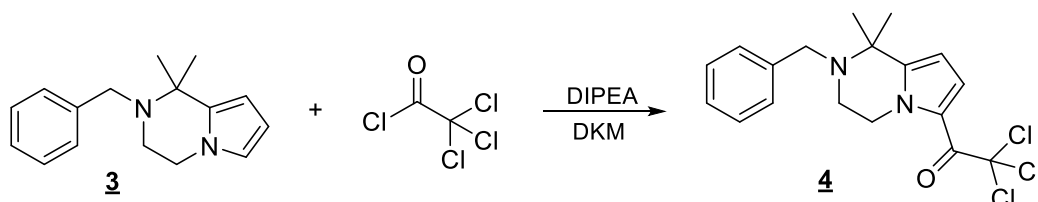
V 10 mL bučko s spojino **2** (60 mg; 0,250 mmol) po vrsti dodajamo AcOH (3 mL), 2 eq bromovodikove kisline (HBr) (112 μ L; 0,500 mmol) in 4 eq broma (Br₂) (51,2 μ L; 1,00 mmol). Pustimo mešati na sobni temperaturi 15 ur. Po predvidenem času uparimo kislino in izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 20 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z raztopino sestavljeno iz Na₂CO₃ (10 g), natrijevega tiosulfata pentahidrata (2,5 g) in vode. Po ločbi uparimo topilo in izvedemo čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo EtOAc : heksan = 1:20. Izoliramo 7,6 mg rjavorumenega, trdnega produkta.

Izkoristek: 6,4 %, **Rf:** 0,79 (EtOAc : heksan = 1:6)

Za izvajanje nadaljnje sinteze je izkoristek preslab.

4.4 Sinteza 1-(2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-il)-2,2,2-trikloroetan-1-ona (4)

Reakcija:

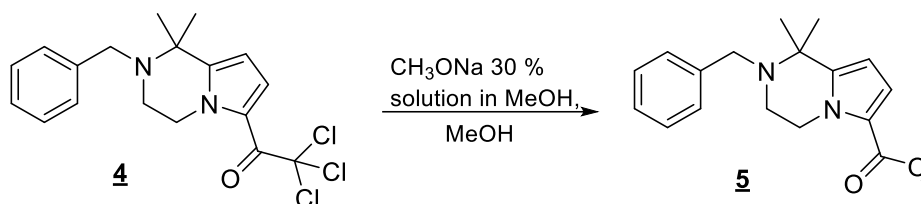


V 100 mL bučko s produktom **3** (3,07 g; 12,8 mmol) ob mešanju na ledu dodamo DKM (40 mL) in 3 eq *N,N*-diizopropiletilamina (DIPEA) (6,69 mL, 38,3 mmol). Ob istih pogojih po kapljicah dodamo še 2,5 eq trikloroacetil klorida (3,56 mL, 31,9 mmol). Ob stalnem prepihanju z argonom pustimo reagirati dve uri. Po dveh urah, reakcijo prekinemo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (40 mL). Potem uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 50 mL DKM, prenesemo v lij ločnik in spiramo z vodo (2 \times 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 \times 20 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo. Uparimo DKM in izoliramo 4,92 g rjavega, trdnega produkta.

Izkoristek: 100 %, **Rf:** 0,66 (EtOAc : heksan = 1:6)

4.5 Sinteza metil 2-benzil-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-karboksilata (**5**)

Reakcija:

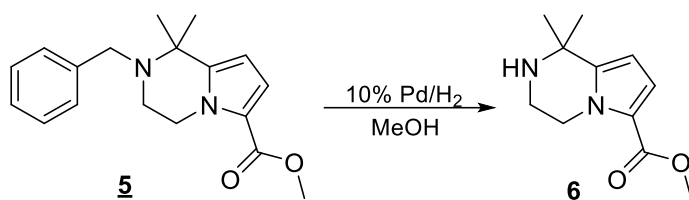


V bučko iz prejšnje reakcije, kjer smo izolirali spojino **4** (4,92 g; 12,8 mmol), dodamo MeOH (50 mL) in pa 5 eq 30 % raztopine natrijevega metoksida (CH₃ONa) (12,0 mL; 63,8 mmol). Zmes ob stalnem mešanju refluktiramo (T = 70 °C) eno uro. Za prekinitev reakcije uporabimo očetno kislino, tako da zmes nakisamo do pH = 6. Potem uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 40 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2×15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2×15 mL). Po končani ločbi, uparimo topilo in izvedemo čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo EtOAc : heksan = 1:10. Izoliramo 3,13 g belega, trdnega produkta.

Izkoristek: 82,0 %, **Rf:** 0,62 (EtOAc : heksan = 1:6), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,51 (s, 6H, PyrPy-(CH₃)₂), 2,83 (t, 2H, J = 5,4 Hz, PyrPy-³H₂), 3,69 (s, 2H, -CH₂-Ph), 3,76 (s, 3H, -O-CH₃), 4,23 (t, 2H, J = 5,6 Hz, PyrPy-⁴H₂), 5,98 (d, 1H, J = 4,0 Hz, PyrPy-⁸H), 6,94 (d, 1H, J = 4,4 Hz, PyrPy-⁷H), 7,25-7,41 (m, 5H, -CH₂-Ph)

4.6 Sinteza metil 1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-karboksilata (**6**)

Reakcija:

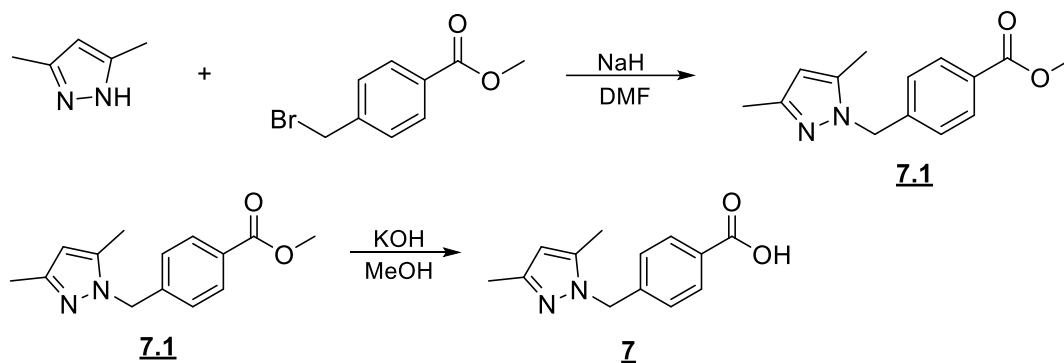


V bučko s produktom **5** (1,13 g; 10,5 mmol) dodamo MeOH (50 mL) in vse skupaj preprihamo z argonom. Po petih minutah mešanja na sobni temperaturi dodamo razmerje 10 % Pd (0,821 g) iz predpisa in še naprej preprihujemo z argonom. Potem začnemo preprihovati z vodikom. Ob stalnem mešanju in pod nadtlakom vodika pustimo reagirati 15 ur na sobni temperaturi. Po petnajstih urah reakcijo prekinemo s ponovnim preprihovanjem z argonom. Paladij na ogljiku (Pd/C) odstranimo s filtracijo in filtratu uparimo topilo. Izoliramo 2,03 g rumenozelenega, tekočega produkta.

Izkoristek: 93,1 %, **Rf:** 0,00 (EtOAc : heksan = 1:6), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,47 (s, 6H, PyrPy-(CH₃)₂), 3,27 (t, 2H, J = 5,6 Hz, PyrPy-³H), 3,78 (s, 3H, -O-CH₃), 4,28 (t, 2H, J = 5,6 Hz, PyrPy-⁴H), 5,94 (d, 1H, J = 4,0 Hz, PyrPy-⁸H), 6,92 (d, 1H, J = 4,0 Hz, PyrPy-⁷H)

4.7 Sinteza metil 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzojske kisline (7)

Reakcija:



4.7.1 Sinteza metil 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoata (7.1)

Suho bučko z 1,05 eq 3,5-dimetil-1H-pirazola (1,76 g; 18,3 mmol) prepihamo z argonom in vanjo odmerimo brezvodni dimetilformamid (DMF) (25 mL), postavimo na ledeno kopel in pustimo 15 min, da se ohladi. Nato v nastalo raztopino počasi dodamo 1,3 eq NaH (60 % disperzija v parafinskem olju, 0,908 g; 22,7 mmol). Počakamo, da se nehajo sproščati mehurčki vodika in nato dodamo 1 eq metil 4-(bromometil)benzoata (4,00 g; 17,5 mmol). Pustimo mešati na sobni temperaturi 15 ur. Po petnajstih urah reakcijo prekinemo z NaHCO₃ (2 mL). Potem uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 70 mL EtOAc, prenesemo v lij ločnik in spiramo z vodo (4×20 mL), 1M raztopino HCl (1×20 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo. Uparimo EtOAc in izoliramo 2,93 g brezbarvnih kristalov.

Izkoristek: 68,5 %, **Rf:** 0,91 (DKM : MeOH = 9:1), **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 2,14 (s, 3H, Pyra-³CH₃), 2,25 (s, 3H, Pyra-⁵CH₃), 3,90 (s, 3H, -O-CH₃), 5,26 (s, 2H, Pyra-CH₂-Ben), 5,88 (s, 1H, Pyra-⁴H), 7,10 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ben-³H⁴H), 7,97 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, Ben-²H⁵H)

4.7.2 Sinteza metil 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzojske kisline (7)

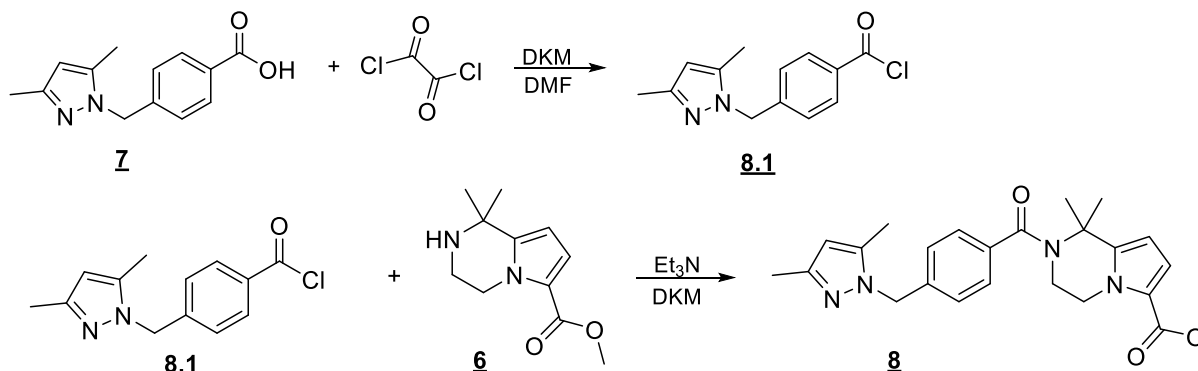
Spojino 7.1 (2,93 g; 12,0 mmol) raztopimo v MeOH (30 mL) in ji po kapljicah dodamo 2M raztopino KOH (24,0 mL; (2 mL razt. KOH na 1 mmol izhodne spojine)). Pustimo mešati na sobni temperaturi 15 ur. Potem uparimo MeOH in celotno zmes nakisamo z 1M raztopino HCl do pH = 3. Izpade bela oborina, ki jo filtriramo s presesavanjem in posušimo. Dobimo 2,71 g belega produkta.

Izkoristek: 98,2 %, **Rf:** 0,00–0,49 (DKM : MeOH = 9:1)

Glede na TLC analizo s standardom produkt ustreza.

4.8 Sinteza metil 2-(4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-a]pirazin-6-karboksilata (8)

Reakcija:



4.8.1 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoil klorida (8.1)

Suho 50 mL bučko z 1,2 eq spojine **7** (2,55 g; 11,1 mmol) glede na spojino **6**, preprihomo z argonom in vanjo odmerimo brezvodni DMF (500 μ L) ter DKM (2,00 mL). Postavimo na ledeno kopel in pustimo mešati 5 min. Nato v nastalo raztopino počasi dodamo 1,5 eq oksalil klorida (1,24 mL; 14,6 mmol) in še naprej pustimo mešati. Po petih minutah zmes prestavimo na oljno kopel in segrevamo pod pogoji refluksa ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) 30 minut, ob preprihavanju z argonom. Po predvidenem času uparimo topilo in produkt brez dodatnega čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

Rf: 0,88 (DKM : MeOH = 9:1)

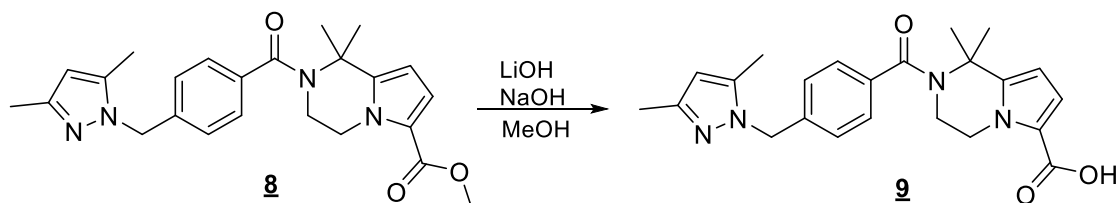
4.8.2 Sinteza metil 2-(4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-a]pirazin-6-karboksilata (8)

V 50 mL bučko, ob mešanju na ledeni kopeli, združimo 1 eq spojine **6** (2,03 g; 9,75 mmol), 1,5 eq trietilamina (Et₃N) (2,04 mL; 14,6 mmol) in DKM (30 mL). Nastalo zmes prelijemo v bučko iz prejšnje reakcije, v kateri se nahaja spojina **8.1**. Pustimo mešati na sobni temperaturi 15 ur. Po petnajstih urah uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Surov produkt raztopimo v 50 mL DKM, prenesemo v lij ločnik in spiramo z 1M raztopino HCl (1 \times 15 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 \times 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 \times 15 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo skozi filter papir. Po filtraciji uparimo topilo in izvedemo čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo EtOAc : heksan = 1:1 \rightarrow 3:2. Izoliramo 0,635 g belega, trdnega produkta.

Izkoristek: 15,5 %, **Rf:** 0,44 (DKM : MeOH = 50:1), **Temperatura tališča (T_f):** 123–126 $^{\circ}\text{C}$, **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,92 (s, 6H, PyrPy-(CH₃)₂), 2,16 (s, 3H, Pyra-³CH₃), 2,26 (s, 3H, Pyra-⁵CH₃), 3,59-3,62 (m, 2H, PyrPy-³H₂), 3,80 (s, 3H, -O-CH₃), 4,42-4,44 (m, 2H, PyrPy-⁴H₂), 5,25 (s, 2H, Pyra-CH₂-Ben), 5,88 (s, 1H, Pyra-⁴H), 6,055 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, PyrPy-⁸H), 6,95 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, PyrPy-⁷H), 7,10 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ben-³H⁴H), 7,97 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ben-²H⁵H), **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 11,08, 13,52, 27,67, 45,26, 45,39, 51,020, 52,081, 58,359, 104,89, 105,73, 117,78, 120,36, 126,75, 127,47, 136,72, 139,28, 139,76, 143,98, 147,95, 161,55, 171,90

4.9 Sinteza 2-(4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-karboksilne kisline (**9**)

Reakcija:

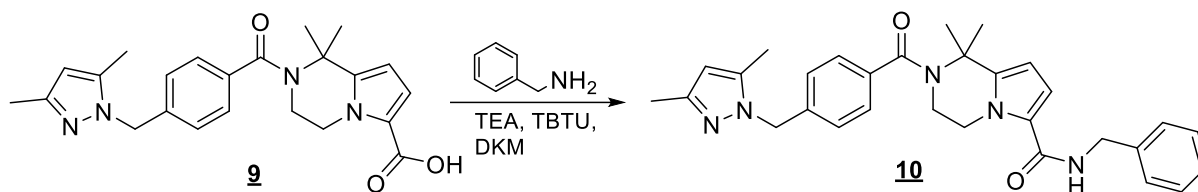


Spojino **8** (495 mg; 1,18 mmol) raztopimo v MeOH (5 mL) in zraven dodamo 2 eq raztopine litijevega hidroksida (LiOH) (56,5 mg; 2,36 mmol v 3 mL vode). Pustimo mešati na sobni temperaturi 15 ur. Po predvidenem času vidimo, da reakcija ni potekla, zato v bučko dodamo še 3 mL MeOH in 4 eq NaOH (188 mg; 4,72 mmol). Pustimo mešati 15 ur na $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ob uporabi zračnega hladilnika. Po petnajstih urah uparimo topilo in celotno zmes nakisamo z 1M raztopino HCl do $\text{pH} = 3$. Izpade bela oborina, ki jo filtriramo s presesavanjem in posušimo. Dobimo 197 mg belega produkta.

Izkoristek: 41,1 %, **Rf:** 0,49 (EtOAc : heksan = 2:1), **Ti:** 159,5–162,5 $^{\circ}\text{C}$, **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) = 1,92 (s, 6H, PyrPy-(CH_3)₂), 2,16 (s, 3H, Pyra-³ CH_3), 2,27 (s, 3H, Pyra-⁵ CH_3), 3,59 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, PyrPy-³ H_2), 4,41 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, PyrPy-⁴ H_2), 5,29 (s, 2H, Pyra- CH_2 -Ben), 5,89 (s, 1H, Pyra-⁴H), 6,08 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, PyrPy-⁸H), 7,065 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, PyrPy-⁷H), 7,12 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Ben-³ H^4H), 7,41 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Ben-² H^5H), **$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) = 11,12, 13,37, 27,67, 45,42, 51,99, 58,46, 105,27, 105, 89, 119,26, 120,30, 126,93, 127,53, 130,41, 136,73, 139,52, 139,65, 144,76, 147,96, 164,90, 172,00

4.10 Sinteza *N*-benzil-2-(4-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)benzoil)-1,1-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-karboksamida (**10**)

Reakcija:



V 25 mL bučko s spojino **9** (167 mg; 0,441 mmol) po vrsti dodajamo DKM (7 mL), 2 eq trietilamina (TEA) (115 μ L; 0,822 mmol), 1,5 eq benzilamina (67,3 μ L; 0,617 mmol) in 1,2 eq O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijevega tetrafluoroborata (TBTU) (158 mg; 0,493 mmol). Pustimo mešati na sobni temperaturi 30 minut. Po predvidenem času uparimo topilo in izvedemo ekstrakcijo. Produkt raztopimo v 20 mL DKM, prenesemo v lij ločnik in spiramo z 1M raztopino HCl (1 \times 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 \times 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 \times 10 mL). Po ločbi organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ in filtriramo skozi filter papir. Po filtraciji uparimo topilo in izvedemo čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo EtOAc : heksan = 3:2 \rightarrow 2:1. Izoliramo 48 mg brezbarvnega, trdnega produkta.

Izkoristek: 23,6 %, **Rf:** 0,65 (EtOAc : heksan = 2:1), **T_t:** 37–40 °C, **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 1,91 (s, 6H, PyrPy-(CH₃)₂), 2,16 (s, 3H, Pyra-³CH₃), 2,26 (s, 3H, Pyra-⁵CH₃), 3,59 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz, PyrPy-³H₂), 4,51 (t, 2H, *J* = 5,0 Hz, PyrPy-⁴H₂), 4,55 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz, -NH-CH₂-Ph), 5,24 (s, 2H, Pyra-CH₂-Ben), 5,88 (s, 1H, Pyra-⁴H), 6,01 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz, PyrPy-⁸H), 6,22 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, -CO-NH-CH₂), 6,58 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz, PyrPy-⁷H), 7,08 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, Ben-³H⁴H), 7,27-7,34 (m, 5H, -CH₂-Ph), 7,40 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, Ben-²H⁵H), **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ (ppm) = 11,13, 13,57, 27,87, 38,63, 43,17, 45,51, 45,77, 52,15, 58,37, 104,08, 105,79, 111,61, 123,59, 126,79, 127,48, 127,54, 127,71, 128,73, 136,84, 138,62, 139,34, 139,74, 142,52, 147,98, 161,51, 171,91

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar sinteznih postopkov

V okviru magistrske naloge nam je uspelo sintetizirati vse tri analoge zaviralcev InhA, ki smo jih načrtovali (**8**, **9**, **10**).

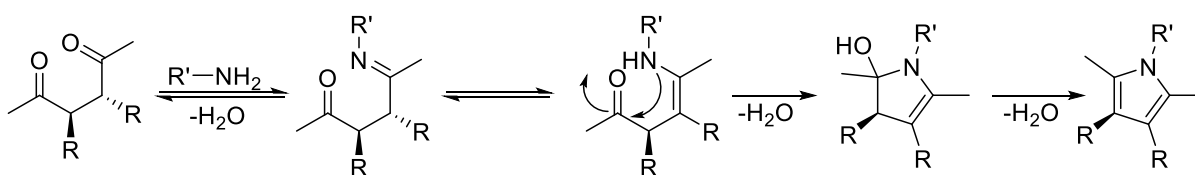
5.1.1 Prva stopnja sinteze

V prvi stopnji je bil cilj sintetizirati *N*-(2-(1*H*-pirol-1-il)etil)acetamid (**1**). Pri prvem poskusu smo izvedli sintezo po opisanem postopku, *tert*-butil (2-aminoetil)karbamat zaščitili z acetilno skupino in dobili produkt **1.1.1**. Samo strukturo spojine smo potrdili z NMR spektrom in TLC analizo, pri kateri je bil *R_f* občutno višji od izhodne spojine. V nadaljevanju smo ob prisotnosti 2 M HCl v metanolu selektivno odstranili samo Boc zaščitno skupino in tako poskušali dobiti 2-acetamidoetan-1-amonijev klorid (**1.1.2**). TLC analiza je kazala na uspešnost reakcije, vendar NMR spekter ni nedvoumno potrdil istovetnosti produkta. Kljub temu smo se odločili za nadaljevanje in tako po predpisu na mesto amonijevega klorida poskušali uvesti pirol (**1**). Reakcija ni bila uspešna zaradi reaktanta **1.1.2**, ki v drugem koraku reakcije nikoli ni nastal. Sklepamo lahko, da pri prejšnji reakciji ni prišlo samo do razpada karbamata ampak tudi amida oz. ni bilo selektivnosti pri odščiti zaščitnih skupin.

Pri drugem poskusu sinteze produkta **1** smo pričeli z 2-kloroetil-1-amonijevim kloridom in pirolom, ter preko **1.2.1** poskušali dobiti produkt **1**. Reakciji sta bili zaradi prevelikega števila nečistot na TLC ploščicah in premajhnih izkoristkov neuspešni.

Pri tretjem poskusu sinteze produkta **1** smo pričeli z 2-kloroetilamonijevim kloridom in anhidridom očetne kisline. Pri prvi reakciji smo dobili zelen produkt **1.3.1**, vendar so se pri drugi reakciji produkta **1** ponovno pokazale nečistote in premajhen izkoristek. Kot je razvidno, je pri drugem in tretjem poskusu glavni problem uvedba pirola na mesto klora in posledično nastajanje drugih produktov oz. nečistot.

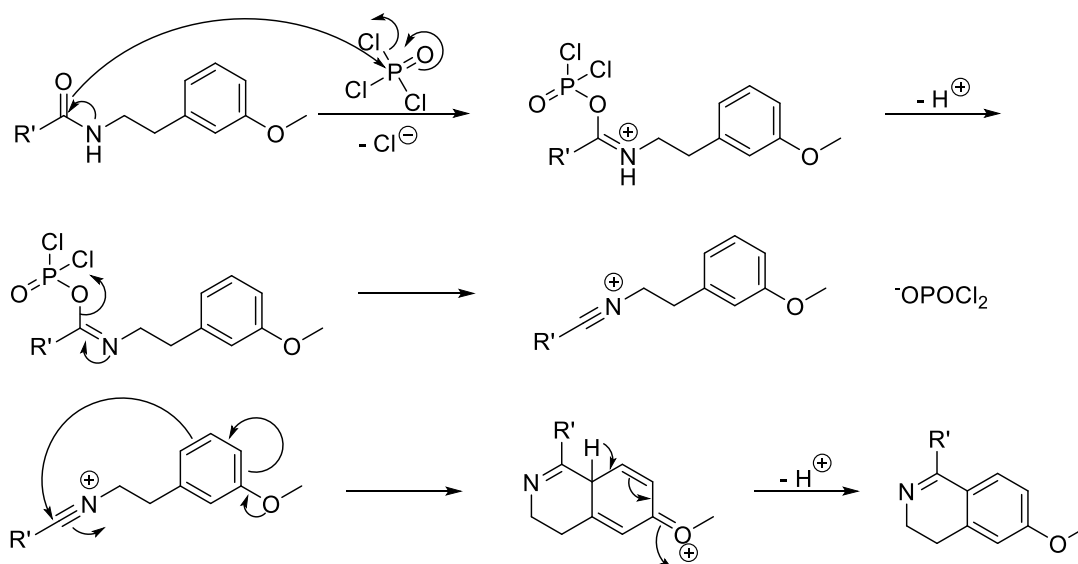
Pri četrtem poskusu smo naročili nov reagent (*N*-(2-aminoetil)acetamid) in tako z 2,5-dimetoksitetrahidrofuranom in ostalimi reagenti na aminske mesto uvedli pirol. Gre za sintezo pirola po Paal-Knorrju, kjer poteče kondenzacija 1,4-dikarbonilne komponente s primarnim aminom (slika 10). Produkt **1** smo potrdili s TLC in NMR analizo. Sklepamo lahko, da je bil za samo uspešnost in dober izkoristek reakcije ključen reagent v obliki amina. Prvi trije poskusi niso bili uspešni zaradi reagentov v obliki amonijevega klorida.



Slika 10: Mehanizem reakcije po Paal-Knorrju (povzeto po (23))

5.1.2 Druga stopnja sinteze

V tej stopnji smo po mehanizmu Bischler-Napieralskijeve reakcije sintetizirali 1-metil-3,4-dihidropirol[1,2-*a*]pirazin (**2**), ki je pomemben del za rigidizacijo končnih spojin. Gre za reakcijo, kjer amidni del molekule dehidriramo in tako ustvarimo pogoje za ciklizacijo molekule.



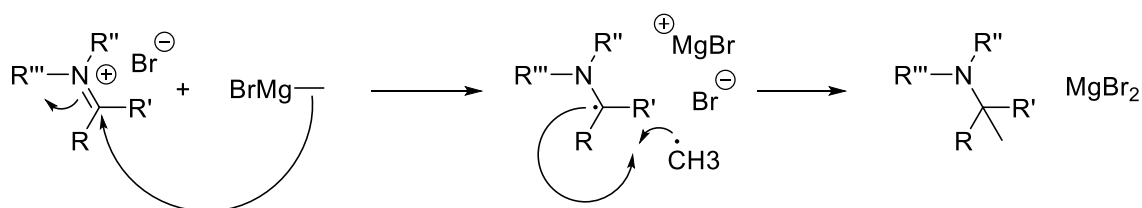
Slika 11: Mehanizem reakcije po Bischler-Napieralskiju (povzeto po (24))

Po petih poskusih z različnimi reagenti, smo šele pri šestem dobili zelen produkt **2**. Pri zadnji reakciji smo ugotovili, da ni bil problem v reagentih, ampak v izolaciji. Po koncu reakcije nismo uspeli povsem upariti kisline, posledično je bil pH po dodatku vode zelo nizek in v tem okolju je bila naša spojina v protoniranem stanju, čeprav je produkt imin, in ni prehajala v organsko fazo ob ekstrakciji. Na TLC ploščicah organskih faz smo posledično zaznavali šibke lise, ki so bile včasih nezaznavne. Pri zadnji reakciji pa smo izolacijo izvedli z 10 % raztopino NaOH. Tako je produkt prešel v organsko fazo in bil na TLC ploščici viden s temno vijolično barvo. Samo delo je bilo zaradi velike količine raztopine NaOH na meji varnega, zato je bil izkoristek reakcije nižji, ker je nekaj produkta ostalo v vodni fazi.

5.1.3 Tretja stopnja sinteze

Pri tretji stopnji sinteze smo si z Mensutkinovo reakcijo zagotovili potreben reagent za naslednjo. Pri omenjeni reakciji je potekla nukleofilna substitucija benzil bromida na imin in tako je nastala iminijeva sol (25). Produkt **3.1** smo brez čiščenja in analize uporabili v naslednji reakciji.

Pri tej reakciji pa gre za adicijo Grignardovega reagenta in tako uvedbe metilne skupine na mesto ena. Slab izkoristek reakcije lahko pripišemo nastanku velikega števila stranskih produktov. Na TLC ploščici opazimo lise, katerih R_f je pri vseh manjši od R_f produkta **3**. Nekaj produkta nam je ostalo tudi v bučki pri pripravi kromatografije s kolono. Po uparjanju se je silikagel s produktom močno lepil na stekleno površino bučke, zato v kromatografsko kolono nismo mogli prenesti celotnega silikagela s produktom.

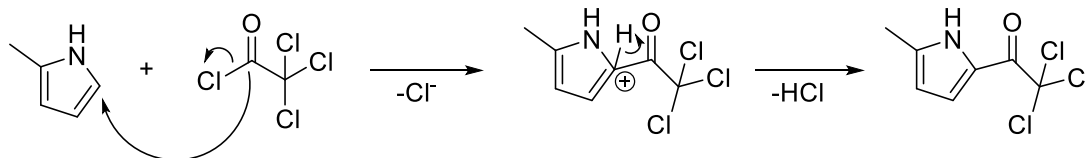


Slika 12: Mehanizem Grignardove reakcije (prirejeno po (26))

V tretji reakciji pri tej stopnji smo poskušali uvesti brom na mesta 6, 7, 8 in tako poskušali sintetizirati še eno potencialno spojino, ki bi imela na desni strani tri atome broma. Izkoristek reakcije je bil zelo slab, saj je po čiščenju s kolono nastalo premalo potencialnega produkta. Na podlagi tega podatka se nismo odločili za nadaljnjo sintezo. Najverjetneje smo izbrali napačno zaščitno skupino za amin. Gre za benzilno zaščitno skupino, ki je slabo kompatibilna z bromom. Ugodnejša bi bila uvedba npr. trifluoroacetamidne zaščite, a bi morali v tem primeru začeti sintezo znova od začetka.

5.1.4 Četrta stopnja sinteze

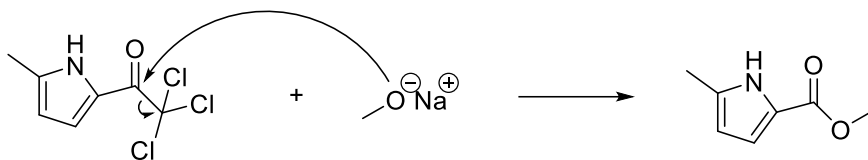
Iz reaktanta **3** smo preko elektrofilne aromatske substitucije s trikloroacetilkloridom dobili produkt **4**. Zaradi nastajanja klorovodikove kisline smo za nevtralizacijo uporabili DIPEA-o. DIPEA je nevtralizirala kislino tako pri sami reakciji kot tudi ekstrakciji. Reakcija je potekla s 100 % izkoristkom.



Slika 13: Mehanizem elektrofilne aromatske substitucije (povzeto po (27))

5.1.5 Peta stopnja sinteze

V peti stopnji smo z nukleofilno substitucijo na reaktantu **4** dobili produkt **5**. Natrijev metoksid je močna baza, kot nukleofil pa sodeluje v nukleofilnih substitucijah, kar smo tudi izkoristili pri sintezi produkta **5**.



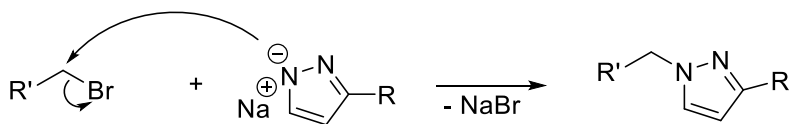
Slika 14: Nastanek estra (povzeto po (28))

5.1.6 Šesta stopnja sinteze

Pri šesti stopnji sinteze produkta **6** smo odstranili benzil preko katalitskega hidrogeniranja z vodikom ob prisotnosti katalizatorja paladija na ogljiku. Sama reakcija je potekala brez večjih posebnosti.

5.1.7 Sedma stopnja sinteze

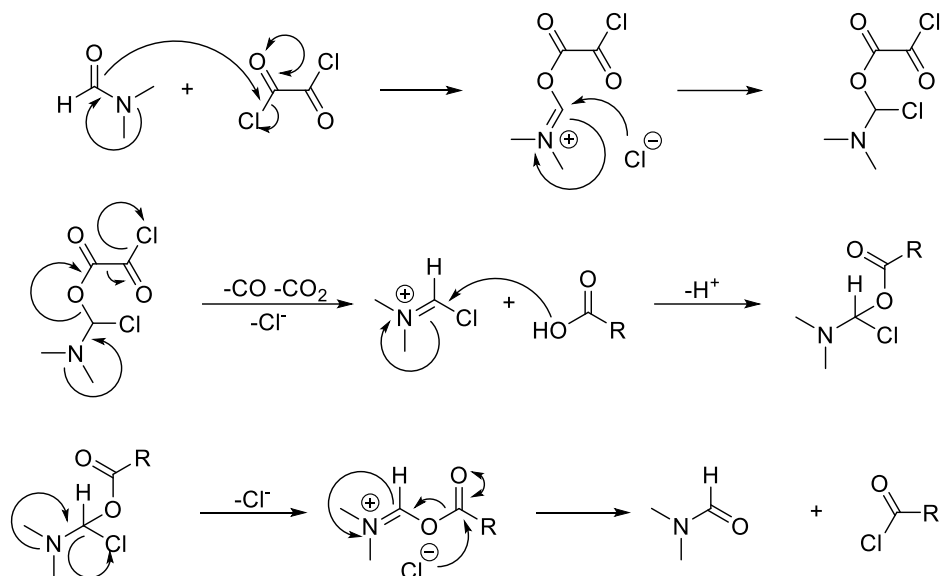
Pri sedmi stopnji smo deprotonirali 3,5-dimetil-1H-pirazol z močno bazo natrijevega hidrida v brezvodnih pogojih. Deprotonirani 3,5-dimetil-1H-pirazol je nato služil kot nukleofil, ki je napadel elektrofilno metilensko skupino na metil 4-(bromometil)benzoatu. Tako smo dobili produkt **7.1**, ki smo ga v naslednjem koraku s pomočjo KOH v metanolu hidrolizirali do produkta **7**. Oba koraka sta potekla predvidljivo in brez posebnosti.



Slika 15: Mehanizem substitucije pirazola na mestu 1

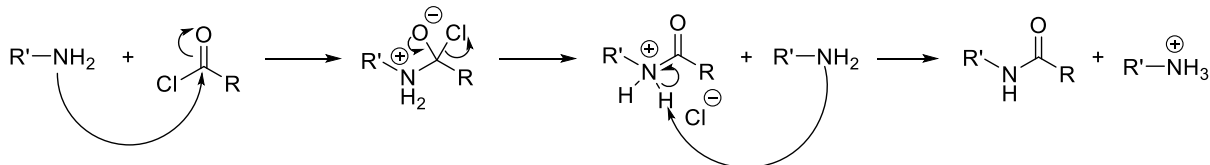
5.1.8 Osmo stopnja sinteze

V prvem delu osme stopnje sinteze smo iz derivata karboksilne kisline (**7**) dobili derivat acil klorida (**8.1**). Reakcija je katalizirana z DMF topilom, ki reagira z oksalil kloridom do nastanka iminijevega intermedata. Intermediat pa reagira s karboksilno kislino in pride do nastanka acil klorida.



Slika 16: Mehanizem nastanka acil klorida (povzeto po (29))

V drugem delu pa smo med dvema predhodnima produktoma (**8.1**, **6**) tvorili amidno vez in tako prvo končno spojino v tej sintezi. Pred tvorjenjem amidne vezi je prišlo do nukleofilnega napada amina na acil klorid in izstopa HCl. Bazo smo uporabili za nevtralizacijo nastale kisline. Iz TLC analize je razvidno, da je nastalo kar nekaj različnih stranskih produktov, katerih večina je polarnejših od produkta. S tem lahko povežemo slab izkoristek reakcije.



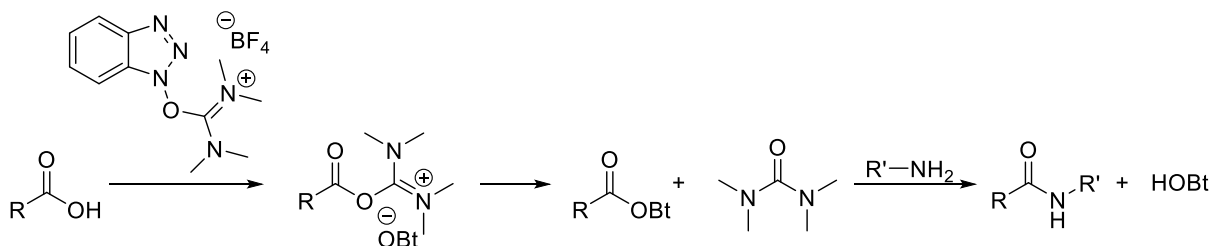
Slika 17: Mehanizem tvorbe amidne vezi (povzeto po (30))

5.1.9 Deveta stopnja sinteze

S pomočjo LiOH in NaOH v metanolu smo opravili hidrolizo reaktanta **8**. Po TLC analizi produkta **9** opazimo liso na vrhu ploščice. Iz lise in izkoristka lahko sklepamo, da se pri reakciji ni porabil ves reaktant.

5.1.10 Deseta stopnja sinteze

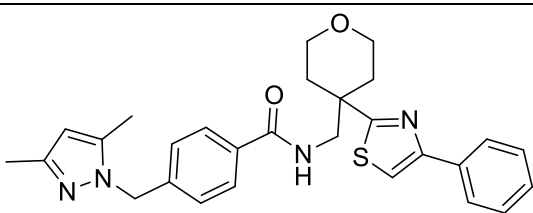
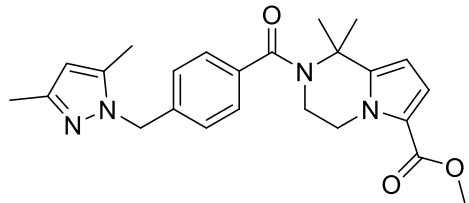
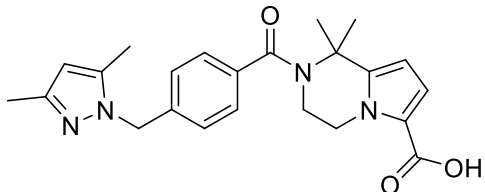
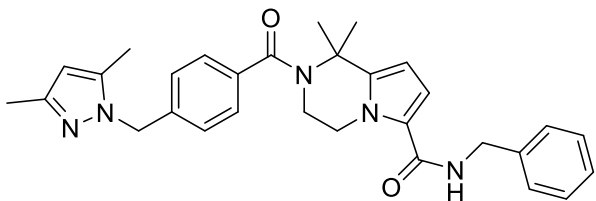
Zadnja stopnja pri sintezi je bila ponovno tvorba amidne vezi med reaktantom **9** in benzil aminom, z namenom povečanja lipofilnosti desnega dela molekule. Do nastanka vezi pride zaradi nukleofilnega napada amino skupine na aktiviran karbonilni atom ogljika, s posledničnim izstopom skupine. Za potek kondenzacije je potrebna aktivacija karboksilne kisline. Uporabili smo sklopitveni reagent TBTU, ki generira aktivirane benzotriazol-1-ilne estre. Izkoristek reakcije je slab, saj je glede na TLC analizo nastalo nekaj različnih stranskih produktov, eden izmed njih je tudi tetrametil urea (na NMR spektru signal 2,8 ppm).



Slika 18: Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU (povzeto po (31))

5.2 Rezultati biološkega testiranja

Končnim spojinam **8**, **9** in **10** so določili vrednosti koncentracije zaviralca, ki zavre biološki proces na polovico maksimalne vrednosti (IC₅₀) na izoliranem encimu InhA. Merjenje inhibitorne aktivnosti na izoliranem encimu so opravili na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. V preglednici primerjamo vrednosti IC₅₀ med spojino **I** in sintetiziranimi končnimi spojinami **8**, **9** in **10**.

spojina	struktura	InhA IC ₅₀ [μM]
I		0,02
8		27
9		17
10		8

Za korektno napoved odnosa med strukturo in delovanjem bi potrebovali veliko več spojin, vendar pa lahko sklepamo, da uvedba 1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-a]pirazinskega skeleta zmanjša afiniteto pripravljenih spojin do aktivnega mesta InhA. Kljub temu del aktivnosti ostane, kar je spodbudno za nadaljnjo sintezo derivatov.

Pričakovano je bilo, da bo zaviralna aktivnost spojine **8** manjša v primerjavi s spojino **9**. Razlog je v nastanku derivata karboksilne kisline, zaradi katerega je desni del molekule polarnejši oz. manj lipofilen. Zanimivo pa je, da derivat *N*-benzilkarboksamida (spojina **10**) najbolj zavira encim InhA. To pomeni, da je v okolici dovolj prostora za benzilno skupino in da ta prostor predstavlja priložnost za dodatne interakcije.

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali tri zaviralce encima InhA, spojine **8**, **9** in **10**. Pri sintezi učinkovin smo imeli največ težav pri reakciji po Pall-Knorr in Bischler-Napieralskijevi reakciji (sinteza spojin **1** in **2**). Pri prvi stopnji so bili glavni problem reaktanti v obliki amonijevih soli, ki smo jih zamenjali z amskim reaktantom in tako rešili problem. V drugi stopnji pa smo s pravilno izbiro reagenta za ciklizacijo in z uporabo močne baze pri ekstrakciji rešili problem nizkih izkoristkov.

Pri testiranju zaviralne aktivnosti na encimu InhA so bile učinkovite vse tri spojine. Razlog za zmanjšanje aktivnosti za faktor 400–1350 glede na spojino **1** lahko pripišemo uvedbi 1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazinskega skeleta. Vendar je možno omenjen skelet različno modificirati in bolj natančno preiskati kemijski prostor aktivnega mesta. Izmed vseh sintetiziranih spojin je spojina **10** prikazala najboljšo aktivnost. Z vključitvijo benzilne skupine v molekulo smo dokazali, da je v okolici dovolj prostora za voluminozne fragmente in tako tudi možne dodatne interakcije.

Zavedati pa se moramo, da imamo za napovedovanje odnosa med strukturo in delovanjem premajhen nabor spojin, vendar lahko iz naših rezultatov sklepamo, da je nadaljnji razvoj inhibitorjev 1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazinskega skeleta smiseln. Vsekakor pa bo sinteza derivatov lažja, saj smo sintezno pot v magistrski nalogi optimizirali.

7 VIRI

- (1) <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (dostopano 11.8.2018).
- (2) Cerar T, Ružič-Sabljić E: Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 27, 46, 53.
- (3) Daffe M: The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis* 2015: 1–4.
- (4) Brennan P: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003; 83: 91–97.
- (5) Jackson M: The Mycobacterial Cell Envelope - Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4: a021105.
- (6) Alderwick L, Harrison J, Lloyd, G, Birch, H: The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2015; 5(8): 21113.
- (7) Kieser KJ, Rubin EJ: How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12: 550–562.
- (8) Nataraj V, Varela C, Javid A, Singh A, Besra GS, Bhatt A: Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. *Mol Microbiol* 2015; 98(1): 7–16.
- (9) Marrakchi H, Lanéelle M, Daffé M: Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & Biology* (2014); 21(1): 67–85.
- (10) Takayama, K, Wang C, Besra G: Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(1): 81–101.
- (11) Wang F, Langley R, Gulten G, Dover L, Besra G, Jacobs W, Sacchettini J: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *The Journal of Experimental Medicine* 2007; 204(1): 73–78.
- (12) Gurvitz A, Hiltunen JH, Kastaniotis AJ: Function of Heterologous *Mycobacterium tuberculosis* InhA, a Type 2 Fatty Acid Synthase Enzyme Involved in Extending C20 Fatty Acids to C60-to-C90 Mycolic Acids, during De Novo Lipoic Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(16): 5078–5085.

- (13) Timmins G, Deretic V: Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* 2006; 62(5): 1220–1227.
- (14) Rawat, R, Whitty A, Tonge P: The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(24): 13881–13886.
- (15) World Health Organization. The Treatment of Tuberculosis. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44165/9789241547833_eng.pdf;jsessionid=B6F8F172932FF666E0F006217549312F?sequence=1 (dostopano 18.8.2018).
- (16) Gurvitz A, Hiltunen JH, Kastaniotis AJ: Function of Heterologous *Mycobacterium tuberculosis* InhA, a Type 2 Fatty Acid Synthase Enzyme Involved in Extending C20 Fatty Acids to C60-to-C90 Mycolic Acids, during De Novo Lipoic Acid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(16): 5078–5085.
- (17) Manjunatha UH et al.: Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2015; 7(269): 269ra3.
- (18) Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA: Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci* 2010; 19(3): 458–474.
- (19) Vale N, Gomes P, Santos HA: Metabolism of the Antituberculosis Drug Ethionamide. *Curr. Drug Metab.* 2013; 14: 151–158.
- (20) Wang F, Langley R, Gulten G, Dover LG, Besra GS, Jacobs Jr WR, Sacchettini JC: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *JEM* 2007; 204(1): 73–78.
- (21) Pajk S, Živec M, Šink R, Sosič I, Neu M, Chung C w, Martínez-Hoyos M, Pérez-Herrán E, Álvarez-Gómez D, Álvarez-Ruiz E, Mendoza-Losana A, Castro-Pichel J, Barros D, Ballell-Pages L, Young R J, Convery M A, Encinas L, Gobec S: New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 112: 252–257.
- (22) Rožman K, Sosič I, Fernandez R, Young R, Mendoza A, Gobec S, Encinas L: A new ‘golden age’ for the antitubercular target InhA. *Drug Discovery Today* 2017; 22(03): 492–502.

- (23) Venkataraman Amarnath, Douglas C Anthony, Kalyani Amarnath, William M Valentine, Lawrence A Wetterau, and Doyle G Graham: Intermediates in the Paal-Knorr synthesis of pyrroles. *J Org Chem* 1991; 56 (24): 6924–6931.
- (24) Fodor G, Nagubandi S: Correlation of the von Braun, Ritter, Bischler-Napieralski, Beckmann and Schmidt reactions via nitrilium salt intermediates. *Tetrahedron* 1980; 36: 1279–1300.
- (25) Keith J Stanger, Jung-Jae Lee, Bradley D Smith: Dramatic Acceleration of the Menschutkin Reaction and Distortion of Halide Leaving-Group Order. *J Org Chem* 2007; 72 (25): 9663–9668.
- (26) Maruyama K, Katagiri T: Mechanism of the Grignard reaction. *J Phys Org Chem* 1989; 2: 205–213.
- (27) Smith M B, March J: *March's advanced organic chemistry: Reactions, mechanisms and structure*, 7. izdaja, John Wiley & Sons, New Jersey, 2007: 569–575.
- (28) Imyanitov, Naum S: Is This Reaction a Substitution, Oxidation-Reduction, or Transfer?. *J Chem Educ* 1993; 70 (1): 14–16.
- (29) Morrison R T, Boyd R N: *Organic chemistry*, 6. Izdaja, N.J: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1992: 666–762.
- (30) March J: *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 4. izdaja, John Wiley, New York, 1992: 1345-1350.
- (31) Gowda S, Gowda D C: Application of hydrazinium monoformate as new hydrogen donor with Raney nickel: a facile reduction of nitro and nitrile moieties. *Tetrahedron* 2002; 58: 2211–2213.