

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



**SEBASTJAN NEMEC**

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



**SEBASTJAN NEMEC**

**UVEDBA KATIONSKEGA CENTRA V TIAZOLNI IN TIADIAZOLNI TIP  
ZAVIRALCEV *InhA***

**INTRODUCTION OF A CATIONIC CENTRE IN THIAZOLE AND  
THIADIAZOLE TYPE *InhA* INHIBITORS**

**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 doc. dr. Izidorju Sosiču, mag. farm. za nasvete pri sintezi spojin ter 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.

Sebastjan Nemeč

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	TUBERKULOZA	1
1.2	MIKOBakterija, SINTEZA MIKOLNIH KISLIN IN ENCIM INHA	1
1.3	ANTITUBERKULOTIKI, ZAVIRALCI INHA IN ODPORNOST	5
1.4	INTERAKCIJE ZAVIRALCEV TIAZOLNEGA IN TIADIAZOLNEGA TIPA V AKTIVNEM MESTU INHA	7
1.5	KATION-II INTERAKCIJA	8
1.5.1	PRIMERI KATION-II INTERAKCIJE V BIOLOŠKIH SISTEMIH	9
1.6	AZIDNA-ALKILNA CIKLOADICIJA IN KLIK KEMIJA	10
<b>2</b>	<b>NAMEN IN NAČRT DELA</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>14</b>
3.1	MATERIALI	14
3.2	METODE	15
<b>4</b>	<b>EKSPERIMENTALNO DELO</b>	<b>16</b>
4.1	SINTEZA N-ZAŠČITENIH 3-AMINO-1H-PIRAZOLOV	16
4.1.1	SINTEZA <i>N</i> -(1H-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (P1)	16
4.1.2	SINTEZA 2,2,2-TRIFLUORO- <i>N</i> -(1H-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (P2)	17
4.2	SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANHIDRAZIDA (A2)	18
4.3	SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (1)	19
4.4	SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (1) – OPTIMIZACIJA 1	26
4.5	SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (1) – OPTIMIZACIJA 2	28
4.6	SINTEZA SHEMA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(5-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (2)	32
4.7	SINTEZA SHEMA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (3)	35
4.8	SINTEZA SHEMA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)ETAN-1-OLA (4)	39
4.9	SINTEZA 1-(5-((1-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (5)	42
4.10	SINTEZA 1-(2-((1-(4-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (6)	46
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>48</b>
5.1	KOMENTAR IN REZULTATI TESTIRANJA AKTIVNOSTI INHIBICIJE ENCIMA INHA	48
5.2	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	49
5.2.1	SPOJINA <i>N</i> -(1H-PIRAZOL-3-IL)ACETAMID (P1)	49

5.2.2	SPOJINA 2,2,2-TRIFLUORO- <i>N</i> -(1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)ACETAMID ( <b>P2</b> )	50
5.2.3	SPOJINI ETIL 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANOAT ( <b>A1</b> ) IN 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANHIDRAZID ( <b>A2</b> )	51
5.2.4	SPOJINA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL ( <b>1</b> )	53
5.2.5	SPOJINA <b>1</b> – OPTIMIZACIJA 1	56
5.2.6	SPOJINA <b>1</b> – OPTIMIZACIJA 2	57
5.2.7	SPOJINA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(5-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL ( <b>2</b> )	58
5.2.8	SPOJINA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL ( <b>3</b> )	58
5.2.9	SPOJINA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-OL ( <b>4</b> )	60
5.2.10	SPOJINA 1-(5-((1-((1-(BENZIL-1 <i>H</i> -1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL ( <b>5</b> )	61
5.2.11	SPOJINA 1-(2-((1-((1-(BENZIL-1 <i>H</i> -1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1 <i>H</i> -PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL ( <b>6</b> )	61
<b>6</b>	<b>SKLEP</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>VIRI IN LITERATURA</b>	<b>63</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Vrste mikolnih kislin (prirejeno po (5)).	2
Slika 2:	Biosinteza mikolnih kislin (prirejeno po (5)).	4
Slika 3:	Aktivacija izoniazida (prirejeno po (10, 11)).	5
Slika 4:	Interakcije med vezavnim mestom encima InhA in tiazolnim/tiadiazolnim tipom direktnih zaviralcev (povzeto po 19, 20, 21).	8
Slika 5:	Mehanizem z bakrovimi(I) ioni katalizirane Huisgenove adicije (prirejeno po (34)).	12
Slika 6:	Slika vezavnega mesta InhA z vezanim zaviralcem tiadiazolnega tipa (modra molekula). Razvidna sta dva aminokislinska ostanka (z rdečo) - Phe <sup>149</sup> in Tyr <sup>158</sup> , s katerima bi uveden kationski center lahko tvoril kation- $\pi$ interakcijo (objavljeno z dovoljenjem avtorjev).	13
Slika 7:	Strukture načrtovanih spojin. Z modro so označeni kationski centri, aminska skupina oz. piridinilni fragment; z rumeno tiazolni oz. tiadiazolni obroč; z zeleno podaljšana leva stran spojine.	14
Slika 8:	Sintezna shema <b>P1</b> .	16
Slika 9:	Sintezna shema <b>P2</b> .	17
Slika 10:	Sintezna shema <b>A2</b> .	18
Slika 11:	Sintezna shema spojine <b>1</b> do stopnje <b>1.6</b> .	19
Slika 12:	Sinteza končne spojine <b>1</b> - poskus 1.	20
Slika 13:	Sinteza končne spojine <b>1</b> - poskus 2.	20
Slika 14:	Sintezna shema spojine <b>1</b> - optimizacija 1 (do stopnje <b>1.5-2</b> ).	26
Slika 15:	Sintezna shema spojine <b>1</b> - optimizacija 2 (do stopnje <b>1.5-3</b> ).	28

Slika 16: Sintezna shema spojine <b>2</b> .	32
Slika 17: Dodatna sintezna stopnja na spojini <b>2</b> .	32
Slika 18: Sintezna shema spojine <b>3</b> .	35
Slika 19: Sintezna shema spojine <b>4</b> .	39
Slika 20: Dodatna sintezna stopnja na spojini <b>4</b> .	39
Slika 21: Sintezna shema spojine <b>5</b> .	42
Slika 22: Sintezna shema spojine <b>6</b> .	46
Slika 23: Deprotonacija 4-metiltiazola z n-butil litijem in mehanizem sinteze <b>A1</b> .	51
Slika 24: Mehanizem stranske reakcije pri sintezi <b>A1</b> .	52
Slika 25: Hidrazinoliza <b>A1</b> - sinteza <b>A2</b> .	53
Slika 26: Mehanizem substitucije pirazola na mestu 1.	53
Slika 27: Mehanizem redukcije estrov z LiAlH <sub>4</sub> .	54
Slika 28: Mehanizem nukleofilne substitucije - zamenjava hidroksilne skupine z azidno preko mezilata.	54
Slika 29: Mehanizem pretvorbe aminske skupine v izotiocianatna s tiofosgenom.	54
Slika 30: Sklopitev izotiocianatnega fragmenta s hidrazidnim.	55
Slika 31: Ciklizacija tiosemikarbazida v tiadiazol s koncentrirano H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	55
Slika 32: Mehanizem Staudingerje redukcije - tvorba aminske skupine iz azidne.	55
Slika 33: Podrobnejše sosledje reakcij pri sintezi spojine <b>1</b> - poskus 2.	56
Slika 34: Mehanizem sinteze terciarnega hidroksilnega fragmenta v tiazolnem tipu spojin.	59

#### **KAZALO TABEL**

Tabela 1: elucijski pogoji pri čiščenju spojine <b>1</b>	26
--	----

## POVZETEK

Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča okužba z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*. Povzroči zelo veliko število smrti na svetu vsako leto. Čedalje bolj se razvija odpornost mikobakterij proti zdravilom, zlasti proti izoniazidu. Isoniazid je predzdravilo, ki se v mikobakterijah aktivira z encimom KatG. Zavira encim InhA, s katerim mikobakterija sintetizira gradnike celične stene. Nezmožnost izgradnje celične stene povzroči celično smrt. Odpornost proti izoniazidu je lahko posledica zmanjšane aktivacije učinkovine. Zato je obetaven razvoj novih spojin, ki direktno zavirajo encim InhA brez predhodne aktivacije.

Med direktne zaviralce InhA spadajo tudi spojine tiazolnega in tiadiazolnega tipa, ki smo jih poskusili sintetizirati. Z računalniško simulacijo vezave (sidranjem) novih potencialnih zaviralcev so na Fakulteti za farmacijo ugotovili možnost tvorbe dodatne kation- $\pi$  interakcije med potencialnim zaviralcem in vezavnim mestom encima. Načrtovali smo sintezo potencialnih zaviralcev encima InhA s kationskim centrom (v obliki alifatskega amina ali obročnega dušika v piridinilnem fragmentu) in sicer dve spojini tiadiazolnega tipa (spojini **1** in **3**) ter dve spojini tiazolnega tipa (**2** in **4**). Uspeli smo sintetizirati spojino **3** in njeno predstopnjo – spojino **3.4**. Načrtovali smo še sintezo dveh spojin, ki izkoriščata nespecifične interakcije v vezavnem mestu – spojini **5** (tiadiazolni tip) in **6** (tiazolni tip). Na Fakulteti za farmacijo so spojinam določili aktivnost zaviranja encima InhA. Spojini **3.4** so izmerili vrednost  $IC_{50}$  1,9  $\mu$ M in spojini **3** vrednost  $IC_{50}$  110  $\mu$ M. Na podlagi teh rezultatov, lahko sklepamo, da uvedba preprostega kationskega centra v spojinah, ki smo jih sintetizirali, ne prinese izboljšav v zaviranju encima InhA. Spojini **3.4** in **3** sta bili prvi spojini tiazolnega tipa s kationskim centrom, ki so ju testirali kot zaviralce encima InhA, zato je prostora za optimizacijo in izboljšave še veliko. Spojina **5** je imela bistveno boljšo aktivnost od spojin **3.4** oz. **3** in sicer  $IC_{50}$  318 nM. Izmerjena aktivnost nakazuje na to, da je v vezavnem mestu zadosti prostora tudi za večje (oz. daljše) lipofilne fragmente.

**Ključne besede:** tuberkuloza, *Mycobacterium tuberculosis*, direktni zaviralci InhA, kation- $\pi$  interakcija, klik kemija

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Each year it causes a great number of deaths all around the world. Resistance of mycobacteria to medicines is rising, especially towards isoniazid. Isoniazid is a prodrug that it is activated in the mycobacterial cells with the enzyme KatG. It inhibits the InhA enzyme that is used by the mycobacteria to synthesize cell wall constituents. The inability to synthesize the cell wall results in the cellular death. The resistance of mycobacteria to isoniazid is usually a consequence of diminished drug activation. Thus, the development of direct InhA inhibitors which do not need prior activation is very promising.

The compounds that we have tried to synthesize fall in the category of direct InhA enzyme inhibitors with the thiazole and thiadiazole scaffold. Computer simulation of binding (docking studies) at the Faculty of Pharmacy identified the potential for an extra cation- $\pi$  interaction. We planned the synthesis of four new potential InhA inhibitors with a cationic centre (in the form of an aliphatic amine or a ring nitrogen of the pyridyl fragment). Two compounds of the thiadiazole type (compounds **1** and **3**) and two compounds of the thiazole type (compounds **2** and **4**) were designed. We succeeded in the synthesis of the compound **3** and its pre-stage – compound **3.4**. We also planned the synthesis of potential inhibitors that would interact through unspecific interactions in the binding site – compounds **5** (thiadiazole type) and **6** (thiazole type). The InhA inhibitory activity was determined at the Faculty of Pharmacy. The  $IC_{50}$  of compound **3.4** was 1,9  $\mu$ M and the  $IC_{50}$  of compound **3** was 110  $\mu$ M. On the ground of these results we can deduce that a simple addition of a cationic centre in the molecules that we have synthesised does not improve the inhibition of the InhA enzyme. The compound **3** was the first compound containing a cationic centre that was tested on the enzyme so there is a lot of room for optimization and improvement. The compound **5** had a much better activity than compounds **3.4** or **3**. It had an  $IC_{50}$  of 318 nM. The measured activity indicates that in the binding site there is enough room to accommodate bigger (or longer) lipophilic fragments.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, direct InhA inhibitors, cation- $\pi$  interaction, click chemistry





<b>NMR</b>	jedrska magnetna resonanca	<b>Th</b>	tiazol
<b>ORCHID</b>	ang. Open Collaborative Model for Tuberculosis Lead Optimization	<b>THF</b>	tetrahidrofuran; IUPAC oksolan
<b>Ph</b>	fenil	<b>TLC</b>	tankoplastna kromatografija (ang. thin-layer chromatography)
<b>Phe</b>	fenilalanin	<b>TMS</b>	tetrametilsilan
<b>Py</b>	piridin	<b>Trp</b>	triptofan
<b>Pyr</b>	pirazol	<b>Tyr</b>	tirozin
<b>q</b>	kvartet	<b>XDR-TB</b>	tuberkuloza, odporna proti izoniazidu, rifampicinu in določenim učinkovinom drugega izbora (ang. Extensively Drug- Resistant Tuberculosis)
<b>Rf</b>	retencijski faktor		
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina		
<b>s</b>	singlet		
<b>t</b>	triplet		
<b>TDR-TB</b>	proti vsem učinkovinom odporna tuberkuloza (ang. Totally Drug Resistant Tuberculosis) – izraz še ni natančno definiran pri WHO		

## 1 UVOD

### 1.1 TUBERKULOZA

Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča okužba z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*. Najpogosteje prizadene pljuča. Je drugi najbolj pogost vzrok smrti v svetu zaradi okužbe (prvi vzrok je okužba s HIV/AIDS). Leta 2016 je zaradi tuberkuloze umrlo 1,7 milijona ljudi. 40 % bolnikov, okuženih s HIV, umre zaradi tuberkuloze. Velika večina smrti zaradi tuberkuloze je v državah v razvoju (1).

Okužba in posledično bolezen je lahko v dveh oblikah – latentni ali aktivni. Pri latentni obliki je bakterija prisotna v telesu in je neaktivna. Oseba z latentno obliko tuberkuloze ne razvije znakov ali simptomov bolezni in okužbe ne more širiti na druge osebe (1). Ocenjujejo, da ima približno ena tretjina svetovnega prebivalstva latentno obliko bolezni. Obstaja 10 % verjetnosti, da se latentna oblika razvije v aktivno obliko bolezni. Ta verjetnost je večja pri ljudeh s prisotnimi dejavniki tveganja (okužba s HIV oz. razvit AIDS, kajenje, podhranjenost in drugi). Aktivna oblika je nalezljiva. Prenaša se iz človeka na človeka kapljično (s kašljanjem, kihanjem, preko sline). Za okužbo je zadostno že zelo majhno število bakterij. Pri aktivni obliki se razvijejo značilni simptomi in znaki bolezni: kašelj – včasih s krvavim sputumom, šibkost, izguba telesne mase, vročina in nočno potenje (1).

Diagnosticiranje aktivne oblike tuberkuloze vključuje obravnavo značilnih simptomov in znakov, mikroskopski pregled razmaza sputuma za prisotnost mikobakterij, rentgensko slikanje pljuč in v novejših časih so se uveljavili hitri testi za ugotavljanje prisotnosti mikobakterijske DNA v slini bolnika (1).

### 1.2 MIKOBakterija, SINTEZA MIKOLNIH KISLIN IN ENCIM INHA

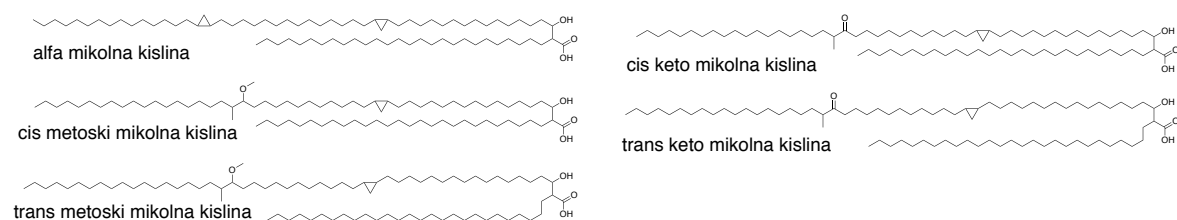
*Mycobacterium tuberculosis* je patogeni bacil iz družine Mycobacteriaceae. Od drugih bakterij se razlikuje po strukturi celične ovojnice. Obdana je z debelo plastjo maščobnih kislin in voskov (zaradi katere se ne obarva pri barvanju po Gramu, uporabljamo

specifično metodo barvanja po Ziehl-Neelsenu). Je aerobna bakterija, raste počasi in ne tvori spor. Deli se približno enkrat na dan (2).

Celična ovojnica je sestavljena iz več plasti; iz celične membrane in celične stene (3). Celična membrana je podobna celičnim membranam drugih bakterij, sestavlja jo fosfolipidni dvosloj z vgrajenimi proteini in drugimi elementi membrane (3). Zgradba celične stene pa je edinstvena za mikobakterije in se od drugih bakterij bistveno razlikuje. Sestavljena je iz debele plasti peptidoglikana, arabinogalaktana in mikolnih kislin (3, 4). Ponavljajočo osnovno enoto plasti imenujemo mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikanski kompleks (mAGP). Arabinogalaktan-mikolni fragment je na peptidoglikansko plast povezan kovalentno s fosfodiestrskimi vezmi. Med komplekse mAGP so interkalirane še druge sestavine mikobakterijske celične stene (ftiocerol dimikocerozati, fosfatidilinozitol manozidi, fenolni glikolipidi, različne acilirane trehaloze in drugi). Na zunanje konce mikolnih kislin je vezana še plast proteinov in polisaharidov (3, 4).

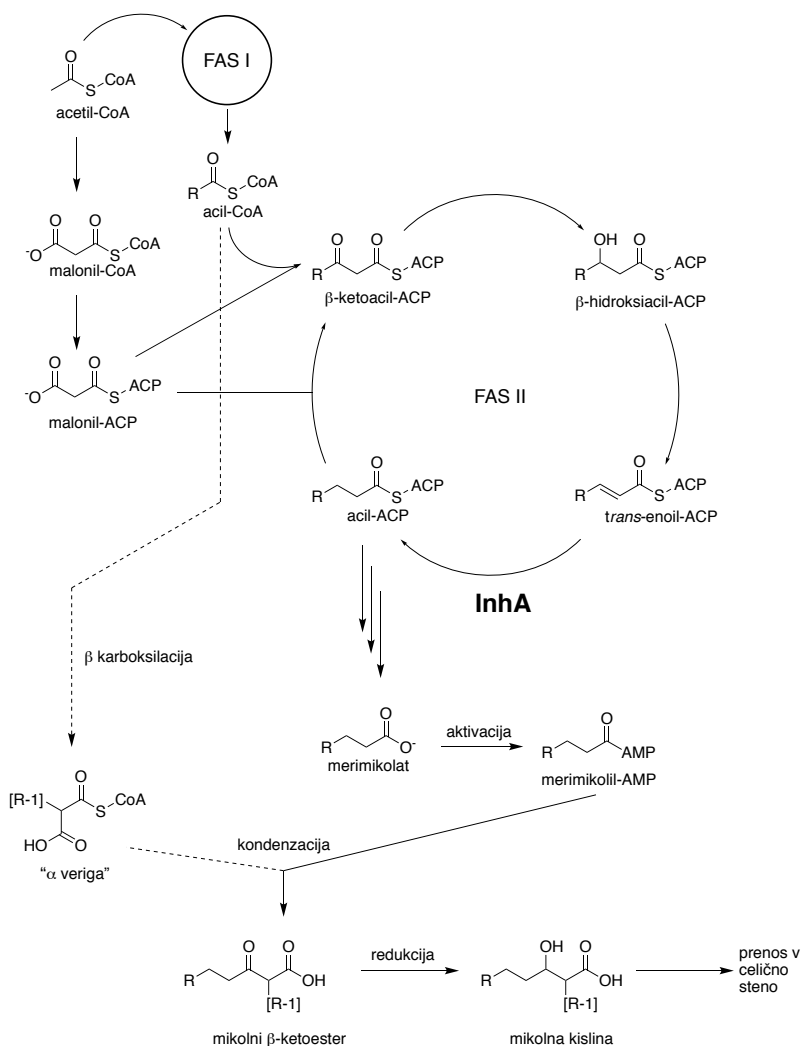
Edinstvena debela celična stena služi rigidizaciji in ohranjanju oblike celice bakterije, prenašanju visokega osmotskega tlaka (4). Predstavlja pa tudi pomemben temelj selektivne toksičnosti zdravilnih učinkovin, ki jih uporabljamo ali razvijamo za zdravljenje okužb z mikobakterijami (4).

Pomemben in večinski sestavni del mikobakterijske celične stene so mikolne kisline (slika 1) (5). To so dolge maščobne kisline (54 – 63 atomov ogljika) s hidroksilno skupino na *beta* mestu in krajšo alkilno verigo (22 – 24 atomov ogljika) na *alfa* mestu (5, 6). V *Mycobacterium tuberculosis* najdemo po strukturi tri razrede mikolnih kislin: alfa, metoksi in keto mikolne kisline. Vse tri oblike mikolnih kislin imajo v svoji zgradbi ciklopropanski fragment, s tem, da je pri alfa mikolnih kislinah v *cis* konfiguraciji, pri metoksi in keto mikolnih kislinah je konfiguracija lahko *cis* ali *trans*. Metoksi mikolne kisline vsebujejo še metoksi skupino, keto mikolne kisline pa keto skupino (5, 6).



Slika 1: Vrste mikolnih kislin (prirejeno po (5)).

Biosinteza mikolnih kislin poteka v kaskadi encimskih reakcij, kjer se v predstopnjah tvorijo krajše maščobne kisline, ki se na koncu sestavijo v daljše končne kisline. Biosinteza je razdeljena na dva dela (slika 2). Prvi del vrši encimski sistem FAS-I (ki je prisoten v evkariontskih organizmih, tudi pri človeku) (9). Sistem FAS-I sintetizira maščobne kisline (v obliki tioestrov z acetil-koencimom A) dolžine 16 – 26 atomov ogljika (prevladujejo dolžine 16 – 18 oz. 24 – 26 ogljikovih atomov). Maščobne kisline dolžine 16 – 18 atomov ogljika (v obliki acil-CoA) se v encimskem sistemu FAS-II podaljšajo postopoma (po 2 ogljikova atoma na cikel reakcij) do meromikolnih kislin dolžine 18 – 32 atomov ogljika. Zaporedje reakcij sistema FAS-II je sledeče: acil-CoA se s Claisenovo kondenzacijo spoji z malonil-ACP in tvori se *beta*-ketoacil-ACP, ki se nato reducira v *beta*-hidroksiacil-ACP. Po dehidraciji nastane nato *trans*-2-enoil-ACP. Dvojno vez, prisotno v *trans*-2-enoil-ACP-ju, encim InhA reducira v acil-ACP, podaljšan za 2 atoma ogljika glede na izhodni acil-CoA. Cikel reakcij se ponavlja do dolžine acil-ACP-ja z 18 do 32 atomi ogljika. Acil-ACP-ji te dolžine se nato še dodatno podaljšajo in modificirajo z drugimi encimi ter iz oblike tioestra vezanega na CoA preidejo v obliko proste karboksilne kisline do dolžine 48 – 62 atomov ogljika. Te se še nadalje v seriji drugih encimskih modifikacij pretvorijo v t.i. merimikolate. Glede na različen tip modifikacij se tvorijo različne vrste mikolnih kislin. Maščobne kisline z dolžino 24 – 26 ogljikovih atomov iz cikla FAS-I se karboksilirajo na *beta* ogljikovem atomu in se s Claisenovo kondenzacijo spojijo z merimikolil-AMP-jem (merimikolati, aktiviranimi z AMP) v končne mikolne kisline, ki se nato prenesejo v celično steno (5, 6).



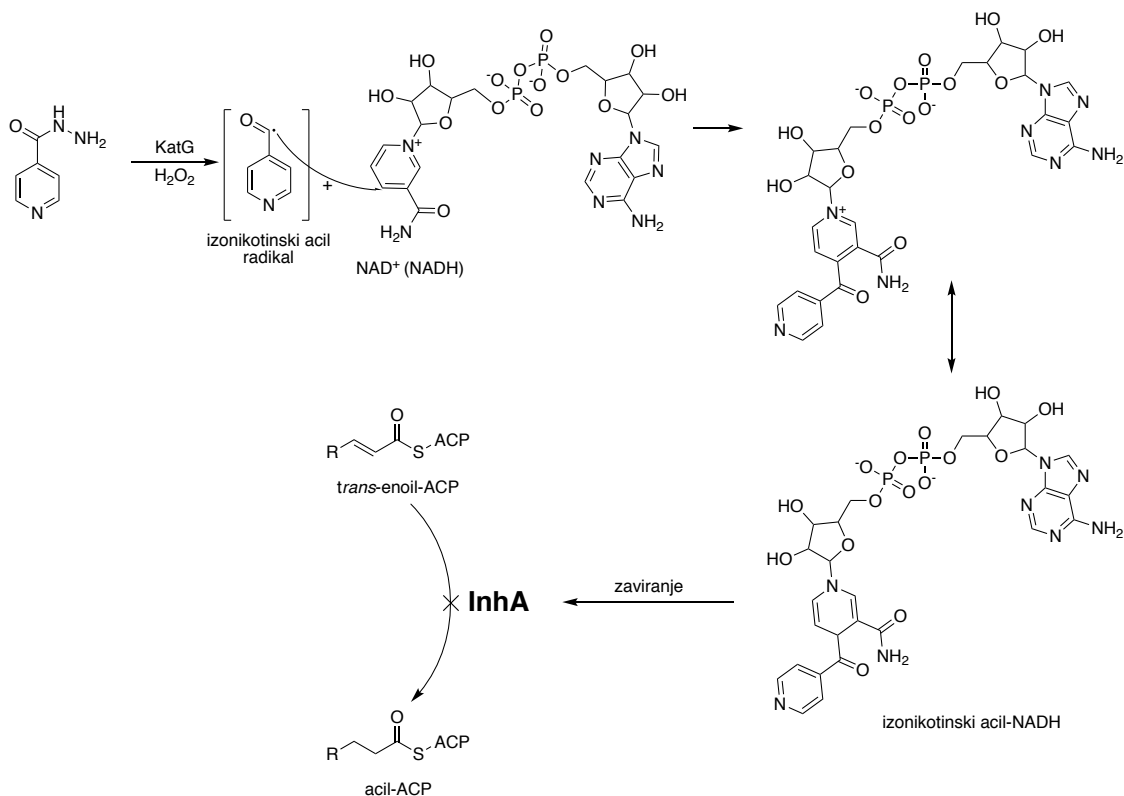
Slika 2: Biosinteza mikolnih kislin (prirejeno po (5)).

Encim InhA je od NADH odvisna *trans*-enoi-(acil prenašalni protein) reduktaza. Je sestavni del proteinskega kompleksa FASII in vrši zaključno reakcijo v ciklu podaljševanja verige ogljikovih atomov v biosintezi gradnikov mikolnih kislin. Reducira dvojno vez med drugim in tretjim ogljikovim atomom v maščobnokislinskem substratu – v *trans*-2-enoi-ACP-ju. Encim selektivno reducira dvojno vez v substratih dolgih 16 ogljikovih atomov ali več (5, 6). Aktivno mesto encima je močno ohranjeno (vsebuje stalno zaporedje aminokislinskih ostankov). Ima vezavni mesti za substrata: maščobno kislino in NADH. Substrat se poveže v globoko lipofilno vezavno mesto v obliki »podkvice« (v obliki črke U) (7, 8).

### 1.3 ANTITUBERKULOTIKI, ZAVIRALCI INHA IN ODPORNOST

Antituberkulotiki so zdravila za zdravljenje tuberkuloze. Kot že prej omenjeno je edinstvenost mikobakterijske celične pomemben temelj selektivne toksičnosti in encimi, ki sintetizirajo komponente celične stene so pomembne tarče zdravilnih učinkovin. Taka tarča je encim InhA. Zaviranje encima InhA prepreči mikobakteriji izgradnjo celične stene, kar posledično privede do smrti mikobakterije, zato je Inha pomembna in validirana tarča antituberkulotičnih zdravil. Zaviranje encima InhA in s tem sinteze maščobnih kislin z encimskim kompleksom FAS-II je selektivno toksično za mikobakterije. Človek sintetizira maščobne kisline z encimskim kompleksom FAS-I (9).

Eden izmed najbolj znanih zaviralcev encima InhA je izoniazid. Je zdravilo prvega izbora za zdravljenje aktivne oblike tuberkuloze. V uporabi je že mnogo let. Isoniazid je hidrazidni derivat izonikotinske kisline in je predzdravilo. V celici mikobakterije (kamor vstopi s pasivno difuzijo) ga aktivira encim KatG (mikobakterijska katalazna peroksidaza) – tvori se izonikotinski acil radikal, ki se spoji z NADH in tvori izonikotinski acil-NADH (slika 3). Nastala spojina močno zavira encim InhA (10, 11).



Slika 3: Aktivacija izoniazida (prirejeno po (10, 11)).

Rifampicin je antibiotik, prepreči sintezo beljakovin v mikobakteriji z vezavo na beta podenoto RNA polimeraze, s čimer je onemogočena sinteza mRNA (12).

Druga zdravila prvega izbora so še etambutol, ki zavira izgradnjo celične stene (zavira encim arabinozil transferazo, ki je vključen v sintezo arabinogalaktanov), pirazinamid, ki naj bi oviral membranski aktivni transport (je predzdravilo, aktivna oblika je pirazinojska kislina) in streptomycin, ki zavira sintezo proteinov (veže se na ribosomsko podenoto 30S in prepreči začetek translacije) (12).

Zgoraj naštetá zdravila so uporabna v primeru aktivne bolezni, ki jo povzroča proti tem zdravilom neodporen sev *Mycobacterium tuberculosis*. V primeru, ko bolezen povzročajo sevi *Mycobacterium tuberculosis* z razvito odpornostjo, pride v poštev uporaba zdravilnih učinkovin drugega izbora. To so fluorokinoloni, antibiotiki (kapreomicin, kanamicin, amikacin) in analoga izoniazida - etionamid in protionamid. Tuberkulozo glede na razvito odpornost proti zdravilom delimo na dva glavna tipa – MDR-TB (ang. Multi Drug Resistant Tuberculosis) in XDR-TB (ang. Extensively Drug Resistant Tuberculosis). MDR-TB je odporna proti izoniazidu in rifampicinu, uporabljamo lahko zdravilne učinkovine drugega izbora. Pri XDR-TB je poleg odpornosti proti izoniazidu in rifampicinu prisotna še odpornost proti katerikoli učinkovini iz skupine fluorokinolonov in proti kapreomicinu ali kanamicinu ali amikacinu (13, 14).

Poznani so tudi primeri tuberkuloze, odporne proti vsem zdravilnim učinkovinom prvega in drugega izbora – to je t.i. TDR-TB (15). Od leta 2013 je za zdravljenje rezistentnih oblik na voljo nova zdravilna učinkovina bedakilin, ki pa ima (potencialne) hude neželene stranske učinke (na kardiovaskularnem sistemu) (16).

Razvoj odpornosti proti učinkovinom, ki zavirajo encim InhA, je pogojen z mutacijami encimov, ki pretvorijo predzdravila v aktivne oblike (17, 18). Na primer, odpornost proti izoniazidu se pojavi, ko mutira encim KatG. Mutiran KatG ni več oz. je manj sposoben oksidirati izoniazid v radikalsko obliko, kar privede do manjše tvorbe izonikotinskega acil-NADH-ja in posledično je zaviranje InhA manjše oz. ga ni (17). V primeru mutacije na KatG uporabljamo učinkovini drugega izbora etionamid in protionamid, ki ju aktivira drug



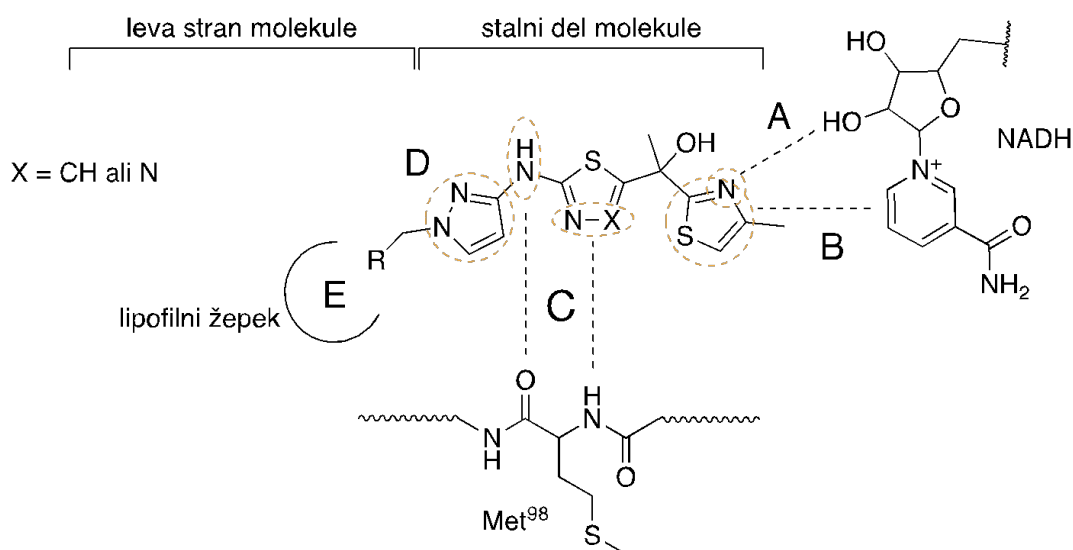
encim - EthA (flavinska monooksigenaza), ki tudi lahko mutira in privede do odpornosti proti tema dvema učinkovinama (18). Razvoj novih zdravilnih učinkovin je zato šel v smeri spojin, ki za zaviranje encima InhA ne potrebujejo predhodne aktivacije – direktni zaviralci InhA (9, 19, 20). V to skupino spadajo triklosan in njegovi derivati, 4-hidroksi-2-piridoni, tiazoli in tiadiazoli (9). V slednji dve skupini spadajo spojine, ki jih bomo poskusili sintetizirati in testirati v sklopu te magistrske naloge.

#### **1.4 INTERAKCIJE ZAVIRALCEV TIAZOLNEGA IN TIADIAZOLNEGA TIPA V AKTIVNEM MESTU INHA**

Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani so v sodelovanju s podjetjem GlaxoSmithKline (GSK) v sklopu mednarodnega projekta ORCHID optimizirali serijo spojin tiazolnega in tiadiazolnega tipa, ki zavirajo encim InhA (9, 20). Na podlagi sintetiziranih in testiranih spojin je bilo mogoče opisati razmerje med aktivnostjo in strukturo spojin, t.i. SAR (ang. Structure Activity Relationship). Med vezavnim mestom maščobne kisline in zaviralci tiazolnega in tiadiazolnega tipa se tvorijo specifične interakcije, od moči katerih je zelo odvisna aktivnost zaviranja encima. Tiazolni tip zaviralcev je izpeljan iz tiadiazolnega tipa zaviralcev z namenom poenostavitve sinteze, zato so interakcije enake pri obeh tipih. Opisane so sledeče interakcije (slika 4):

- vodikova vez med tiazolnim dušikom hidroksilno skupino na mestu 2' riboze v NADH (20, 21) - **A**,
- $\pi$ - $\pi$  interakcija med tiazolnim obročem in nikotinamidnim fragmentom v NADH (21) - **B**,
- vodikova vez med dušikom na tiazolu oz. med enim izmed dušikov na tiadiazolu (zato je bila možna v sintezi zamenjava tiadiazolnega fragmenta z tiazolnim, brez negativnih posledic na aktivnost zaviranja) z amskim delom amidne vezi metionina na mestu 98 (20, 21) - **C**,
- vodikova vez z amsko skupino med tiazolom oz. tiadiazolom in pirazolom s karboksilnim delom amidne vezi metionina na mestu 98 (20, 21) - **C**,
- pirazolni obroč služi kot distančnik, ki pozicionira levo stran molekule na pravo dolžino in v pravi konformaciji, da se veže v hidrofobni žepek (20, 21) - **D**,
- prisotne so še van der Waalove interakcije in hidrofobne interakcije med ostalimi deli zaviralca in ostanki aminokislin, predvsem pa med levim delom molekule in

- hidrofobnim žepkom v vezavnem mestu, ki vsebuje ostanke aminokislin fenilalanina, levcina, izolevcina, metionina, alanina in tirozina (19) - **E**,
- kisikov atom v terciarni hidroksilni skupini je donor vodikove vezi. Poleg tega hidroksilna skupina v molekuli celokupno izboljša farmakokinetični profil spojin – poveča hidrofilnost in vodotopnost (prve razvite spojine tiadiazolnega tipa so bile brez terciarne hidroksilne skupine. Tekom študij so ugotovili, da spojine na terciarnem ogljikovem atomu oksidirajo in se tvori fragment s terciarno hidroksilno skupino oz. ta fragment se je tvoril kot metabolit.)



Slika 4: Interakcije med vezavnim mestom encima InhA in tiazolnim/tiadiazolnim tipom direktnih zaviralcev (povzeto po 19, 20, 21).

Interakcije **A**, **B**, **C** in **D** se tvorijo med vezavnim mestom in stalnim delom molekule, ki je pri tem tipu zaviralcev vedno prisotno (9, 19, 20, 21). Z variacijo levega dela molekule – substituenti na pirazolu (skupina R) – skušamo optimizirati molekule zaviralcev in dosegati boljšo interakcijo **E** in močnejše zaviranje encima – z vstavljanjem lipofilnih in/ali voluminoznih fragmentov ali izkoriščanjem potencialnih dodatnih interakcij, kar bomo poskusili v tej magistrski nalogi.

## 1.5 KATION- $\pi$ INTERAKCIJA

Kation- $\pi$  interakcija se vzpostavi med območjem negativnega elektrostatskega potenciala (območje bogato z elektroni, kot na primer »oblak« delokaliziranih aromatskih  $\pi$

elektronov na aromatskem obroču) in kationskim centrom (kot na primer pozitivno nabiti anorganski kation oz. nabita organska aminska skupina (alifatska ali aromatska)) (22). Je nekovalentna interakcija. Po energiji vezave (red velikosti 10 - 100 kJ/mol) je primerljiva z vodikovimi vezmi. Poleg ionskih interakcij, vodikovih vezi in hidrofobnega efekta, predstavlja pomemben dejavnik pri prepoznavanju in specifični vezavi substratov (hormoni, zdravilne učinkovine, itd.) v vezavna mesta beljakovin (encimov) in pri stabilizaciji prostorske strukture beljakovin (encimov). V različnih študijah so ugotovili, da prisotnost kation- $\pi$  interakcije med substratom in vezavnim mestom encima poveča vezavno energijo za 11 – 23 kJ/mol (22). Kation- $\pi$  interakcija je pomembna tudi pri tvorbi 3D strukture beljakovin. V njih se kation- $\pi$  interakcije vzpostavljajo med bazičnimi (lizin in/ali arginin) in aromatskimi (fenilalanin, tirozin in/ali triptofan) aminokislinskimi ostanki (22). Približno polovica aromatskih aminokislinskih ostankov (Phe, Trp in Tyr) je v bližini aaminskih skupin (23). Zelo pogosto se argininski ostanek nahaja v bližini triptofanskega (24).

#### 1.5.1 PRIMERI KATION- $\pi$ INTERAKCIJE V BIOLOŠKIH SISTEMIH

Poznamo veliko primerov v bioloških sistemih, kjer kation- $\pi$  interakcija igra (pomembno) vlogo (25). V nadaljevanju so opisani trije.

Kation- $\pi$  interakcija je pomembna pri vezavi endogenega nevrottransmitterja acetilholina (ki v svoji strukturi vsebuje stalno pozitivno nabit kationski center) v holinergične receptorje. V vezavnem mestu kationski center tvori dvoje interakcij. Z aminokislinskim ostankom asparaginske kisline, ki je negativno nabit, tvori ionsko interakcijo, z ostanki triptofana pa tvori kation- $\pi$  interakcijo (26).

Poleg acetilholina, je kation- $\pi$  interakcija pomembna pri vezavi nikotina (in posledično pri nikotinski odvisnosti) v nikotinske holinergične receptorje. Zanimivo je to, da se nikotin selektivno veže in aktivira receptorje v možganih in ne v skeletnih mišicah (zato pri uživanju nikotina ni prisotnih krčev mišic), čeprav je v vezavnem mestu obeh podtipov receptorjev prisoten triptofanski ostanek. Drugačno vezavo nikotina naj bi povzročal aminokislinski ostanek, ki leži rahlo izven vezavnega mesta in nekoliko spremeni obliko vezavnega mesta. Pri možganskem podtipu receptorjev je to ostanek lizina (v študiji so

ugotovili, da bi lahko bil katerikoli aminokislinski ostanek, razen glicina). Zaradi tvorbe kation- $\pi$  interakcije med nikotinom in triptofanskim ostankom pride do aktivacije receptorja. Pri mišičnem podtipu receptorjev je na tem mestu prisoten glicin. Triptofanski ostanek je pozicioniran dlje od vezanega nikotina in kation- $\pi$  interakcija se ne vzpostavi. Posledično se receptor ne aktivira (27).

Drugo pomembno vlogo igra kation- $\pi$  interakcija pri regulaciji izražanja genov. Ena izmed posttranslacijskih modifikacij histonov je metilacija lizinskih (ter tudi argininskih in histidinskih) aminokislinskih ostankov na histonskih beljakovinah H3 in H4. Pospešitev oz. zaviranje transkripcije DNA v RNA je odvisno od tega, kateri ostanki so metilirani in koliko metilnih skupin imajo vezanih na sebi. Encim, ki prepozna dimetilirane (pri fiziološkem pH pozitivno nabit kationski center) in trimetilirane (stalno nabit kationski center) lizinske ostanke, vsebuje v vezavnem mestu dva do štiri triptofanske aminokislinske ostanke. Med pozitivno nabitimi centri in triptofanskimi ostanki se tvorijo kation- $\pi$  interakcije (28). Do vezave encima ni prišlo, če je bila namesto di- oz. trimetilirane aminske skupine prisotna *terc*-butilna skupina, ki je po velikosti primerljiva metiliranim aminom v lizinskih ostankih, a ne vsebuje kationskega centra. Prepoznavna pravih mest je torej pogojena s prisotnostjo kationskih centrov in posledično tvorbo kation- $\pi$  interakcije in ne s hidrofobnim efektom, kot so sklepali predtem (29).

## 1.6 AZIDNA-ALKILNA CIKLOADICIJA IN KLIK KEMIJA

Pojem »klik kemija« je leta 2001 uvedel in definiral ameriški kemik Karl Barry Sharpless (30). (Leta 2001 si je delil Nobelovo nagrado iz kemije za delo na kiralno kataliziranih reakcijah oksidacije (31).)

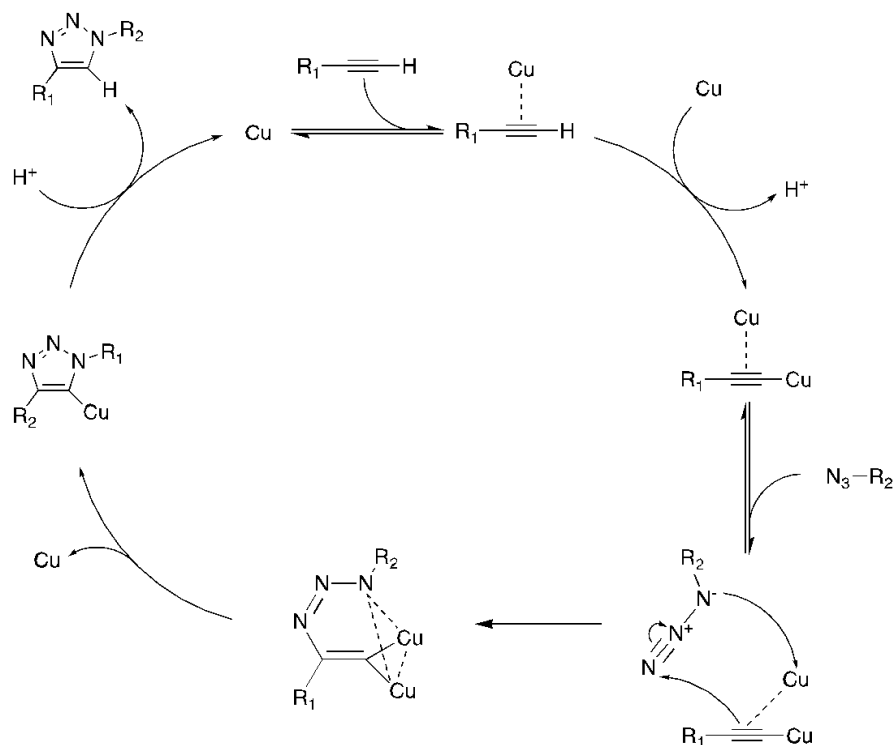
Klik kemija zajema reakcije, za katere veljajo naslednje značilnosti (po definiciji (30)):

- širok izbor,
- visoki izkoristki,
- tvorijo se neproblematični stranski produkti, ki se lahko odstranijo brez kromatografskih metod,
- stereospecifičnost,

- za izvedbo potrebujejo nezahtevne pogoje in neškodljiva topila (pogosto voda) oz. brez topil,
- dostopnost izhodnih spojin,
- preprosta izolacija produkta.

Med take reakcije spada azidna-alkilna cikloadicija, znana tudi pod imenom Huisgenova dipolarna cikloadicija (slika 5). Reakcija poteče med azidno in alkilno funkcionalno skupino in produkt ciklizacije je triazol, ki je disubstituiran (s substituenti, ki so bili prisotni v izhodnih spojinah) na mestih 1 in 4 oz. 1 in 5 (32). Ker pri reakciji ne nastane samo eden produkt, Huisgenova dipolarna cikloadicija v prvotnem predpisu (brez dodanih katalizatorjev) ne zadosti vsem zahtevam klik kemije. V modificirani obliki z dodatkom kovinskega katalizatorja – bakrovih(I) ionov (bakrov jodid ali bromid) oz. bakrovih(II) ionov (bakrov sulfat z dodatkom natrijevega askorbata – generacija bakrovih(I) poteka *in situ*) – poteče reakcija regioselektivno z 1,4 disubstituiranim produktom. Modificiran predpis je »prava« klik reakcija (33). Tako obliko predpisa smo uporabili pri sintezi spojin **5** in **6**.

Ugotovili so, da v mehanizmu reakcije sodelujeta dva bakrova iona. Vežeta se na trojno vez in nastali kompleks koordinira azidno skupino. Nastane šestčlenski organokovinski cikel, ki po odcepu bakrovih ionov ciklizira do končnega triazola (34).



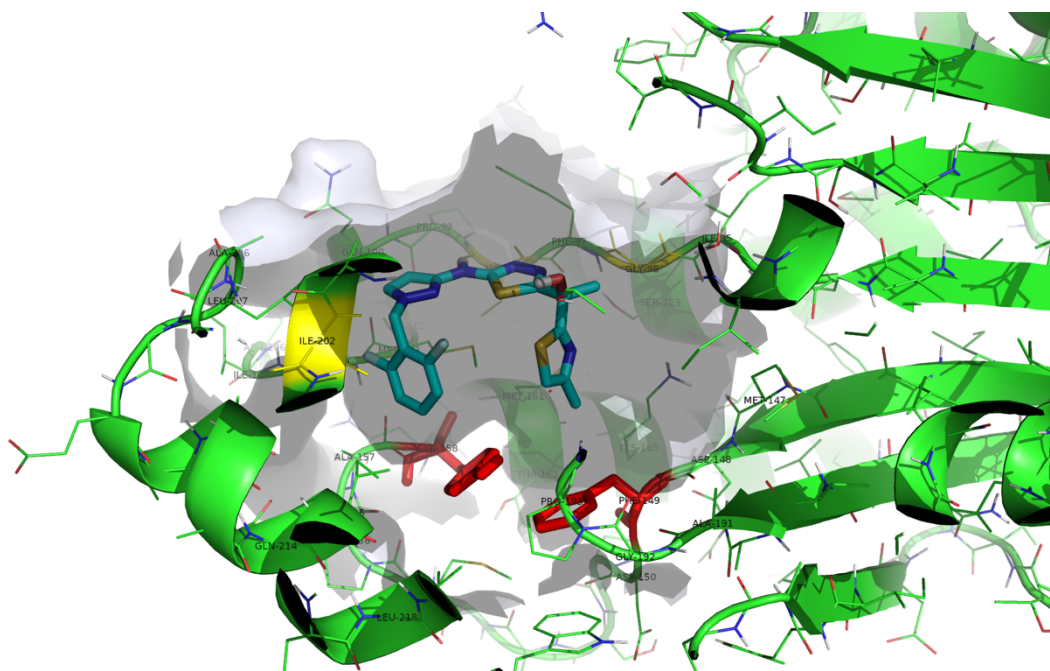
Slika 5: Mehanizem z bakrovimi(I) ioni katalizirane Huisgenove adicije (prirejeno po (34)).

Obratno, kompleksi s pentametilciklopentadienil rutenijevim kloridom (Cp\*<sub>5</sub>RuCl), kot katalizatorjem, regioselektivno katalizirajo nastanek 1,5 disubstituiranih triazolov (35).

Klik kemija dobiva čedalje večji pomen v sintezi zdravilnih učinkovin. Tvorba triazolov iz azidne skupine in trojne vezi je učinkovita tehnika sklapljanja molekul. Poleg tega je nastali triazol jezmožen tudi tvoriti dodatne interakcije z vezavnim mestom tarč zdravilnih učinkovin (36).

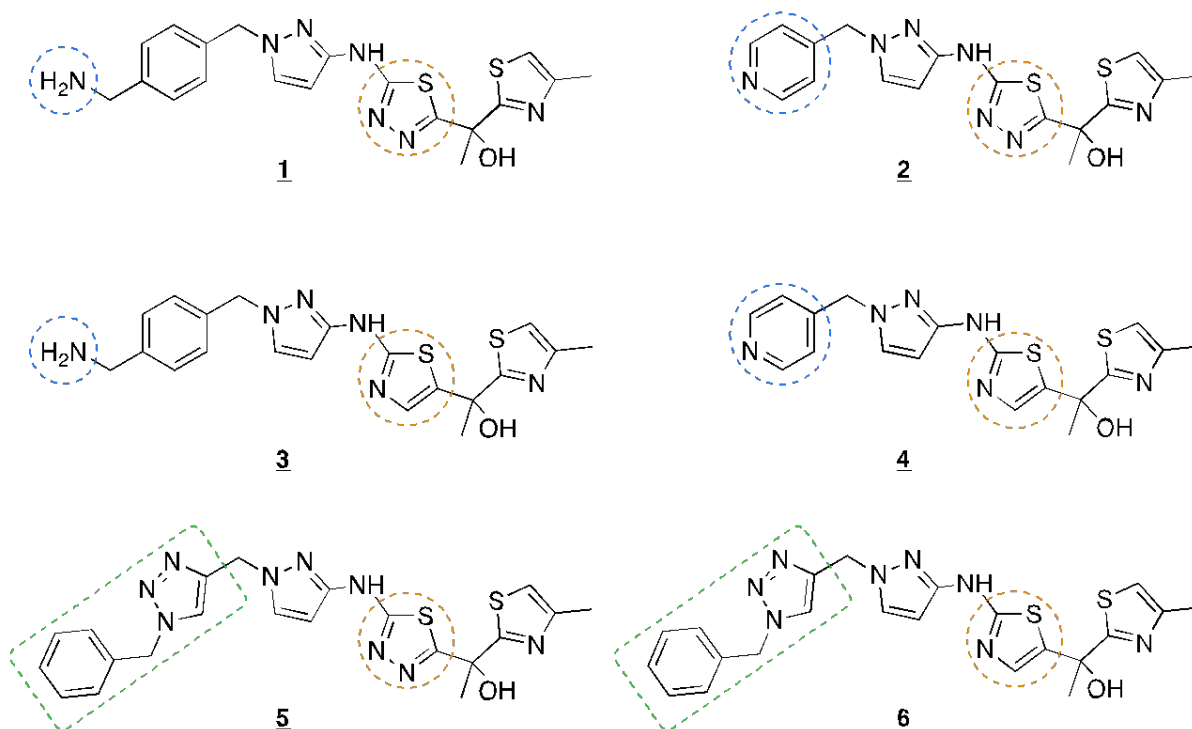
## 2 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen magistrske naloge je sintetizirati nove analoge potencialnih zaviralcev encima InhA tiazolnega in tiadiazolnega tipa, ki v svoji zgradbi vsebujejo fragment s kationskim centrom – alifatski amin ali obročni piridinski dušik in jim določiti aktivnost ( $IC_{50}$ ) na encimu InhA. Z računalniško simulacijo vezave novih potencialnih zaviralcev (t.i. sidranje, ang. docking) so na Fakulteti za farmacijo ugotovili možnost tvorbe dodatne interakcije med molekulo zaviralca in vezavnim mestom v encimu InhA. Bolj specifično, možnost tvorbe kation- $\pi$  interakcije med kationskim centrom v levem delu molekule (na pirazol vezan fragment s kationskim centrom) in tirozinskim aminokislinskim ostankom na mestu 158 v vezavnem mestu (slika 6). Načrtovali bomo sintezo dveh analogov tiazolnega tipa (spojini **3** in **4**; slika 7) in dveh analogov tiadiazolnega tipa (spojini **1** in **2**; slika 7).



Slika 6: Slika vezavnega mesta InhA z vezanim zaviralcem tiadiazolnega tipa (modra molekula). Razvidna sta dva aminokislinska ostanka (z rdečo) - Phe<sup>149</sup> in Tyr<sup>158</sup>, s katerima bi uveden kationski center lahko tvoril kation- $\pi$  interakcijo (objavljeno z dovoljenjem avtorjev).

Poleg tega, bomo načrtovali še sintezo dveh spojin s podaljšanim lipofilnim fragmentom na levi strani molekule – spojin **5** in **6** (slika 7).



Slika 7: Strukture načrtovanih spojin. Z modro so označeni kationski centri, aminska skupina oz. piridinilni fragment; z rumeno tiazolni oz. tiadiazolni obroč; z zeleno podaljšana leva stran spojine.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Za izvedbo reakcij in izolacij smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Acros Organics, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Sigma Aldrich, TCI, Maybridge, Kemika, Carlo Erba in Merck. Kemikalije in topila smo uporabljali brez dodatnega prehodnega čiščenja.

Za risanje in poimenovanje spojin ter za računanje njihovih molskih mas smo uporabljali programsko opremo ChemDraw Professional 16 proizvajalca PerkinElmer. Za obdelavo NMR spektrov smo uporabljali programa MestreNova in Mestre-C proizvajalca MestreLab.



### 3.2 METODE

Za sledenje reakcij smo uporabljali tankoplastno kromatografijo (ang. Thin Layer Chromatography - TLC). Izvajali smo jo na TLC-ploščah s silikagelom z dodanim fluorescenčnim indikatorjem – TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, proizvajalca Merck. Pred uporabo jih nismo dodatno sušili. Lise na TLC-ploščah smo opazovali pod UV svetlobo valovne dolžine 254 nm in/ali 366 nm. Za oroševanje smo uporabljali raztopino ninhidrina (0,5 g) v etanolu (50 ml) in očetni kislini (10 ml) in raztopino fosfomolibdenske kisline (1 g) v etanolu (50 ml).

Za čiščenje produktov reakcij s kolonsko kromatografijo smo uporabljali Silikagel 60 (sito 230 - 400) z velikostjo delcev 40 – 63 µm.

Brezvodni THF smo pridobili iz komercialnega THF z destilacijo z elementarnim natrijem in benzofenonom. V reakcijah, kjer smo uporabili sveže predestiliran THF, smo le-tega predestilirali dan prej oz. isti dan.

Protonske (<sup>1</sup>H) NMR spektre spojin smo snemali na Fakulteti za farmacijo na NMR spektrometru Bruker Avance III smo snemali pri 400 MHz. Za raztapljanje vzorcev smo uporabljali devteriran kloroform (CDCl<sub>3</sub>), devteriran dimetil sulfoksid (DMSO-d<sub>6</sub>) ali devteriran metanol (MeOD). Kot interni standard smo uporabljali tetrametilsilan (TMS) oziroma vrh rezidualnega nedeuteriranega topila v devteriranem topilu.

Masne spektre spojinam smo snemali na Fakulteti za farmacijo na masnem spektrometru ADVION expression CMSL. Tehnika ionizacije je bila ESI.

Visokoresolucijske masne spektre končnih spojin in njihovih predstopenj smo posneli na Fakulteti za farmacijo na masnem spektrometru Thermo Scientific QExactive Plus.

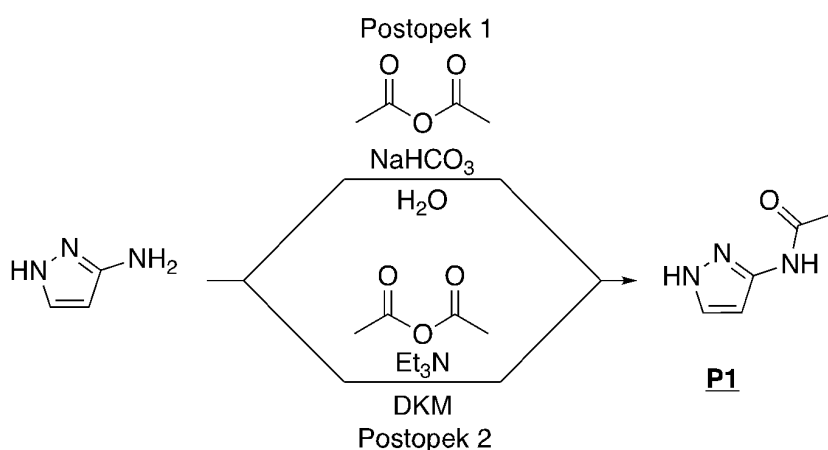
Trdnim produktom smo določili tališče na mikroskopu Cambridge Instruments z grelna mizico Reichert.

Za čiščenje nekaterih končnih produktov smo uporabili avtomatizirani kromatografski sistem Biotage Isolera One z reverzno fazno kolono Biotage SNAP KP-C18-HS. Za elucijo spojin smo uporabljali vodo in acetonitril v različnih razmerjih (navedeno bolj podrobno pri posamezni spojini).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA N-ZAŠČITENIH 3-AMINO-1H-PIRAZOLOV

#### 4.1.1 SINTEZA *N*-(1H-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (**P1**)



Slika 8: Sintezna shema **P1**.

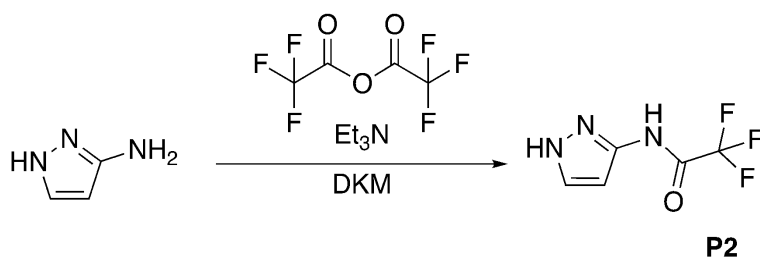
Postopek 1 (slika 8): 3-amino-1H-pirazol (6,23 g, 75 mmol) raztopimo v H<sub>2</sub>O (50 ml) in dodamo NaHCO<sub>3</sub> (18,81 g, 224 mmol, 3 eq). Ko se NaHCO<sub>3</sub> popolnoma raztopi postavimo bučko na ledeno kopel in med mešanjem po kapljicah dodamo anhidrid očetne kisline (14,15 ml, 150 mmol, 2 eq). Po končanem dodatku pustimo mešati na ledeni kopeli. Po 2 urah reakcijo preverimo s TLC, opazimo da se je izhodna spojina porabila in tvorila se je lisa z višjim R<sub>f</sub>, ki se ne barva z ninhidrinom. V reakcijski zmesi opazimo, da je izpadla bela oborina. Belo oborino iz reakcijske zmesi prefiltriramo s presesavanjem. Oborino speremo z ledeno vodo. Dobimo 3,92 g belega trdnega produkta.

Izkoristek 63 %, R<sub>f</sub> 0,26 (DKM:MeOH = 9:1)

Postopek 2 (slika 8): 3-amino-1*H*-pirazol (2,0 g, 24,1 mmol) raztopimo v diklorometanu (20 ml), dodamo trietilamin (4,0 ml, 29,0 mmol, 1,2 eq) in postavimo na ledeno kopel in med mešanjem po kapljicah dodamo anhidrid očetne kisline (2,5 ml, 26,5 mmol, 1,1 eq). Po končanem dodatku pustimo mešati na ledeni kopeli. Izpade bela oborina. Po 30 minutah naredimo TLC in ugotovimo, da je reakcija potekla do konca in da sta se tvorili dve lisi z višjim  $R_f$ , ki se ne barvata z ninhidrinom. Izpadlo oborino odfiltriramo iz reakcijske zmesi s presesavanjem. Del produkta ostane v matičnici, zato zmes prenesemo v lij ločnik in organsko fazo speremo 2× z 20 ml 1M HCl in 1× z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparimo topilo. Dobimo 1,65 g belega trdnega produkta.

Izkoristek: 55 %,  $R_f$  0,56 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  223 - 224 °C

#### 4.1.2 SINTEZA 2,2,2-TRIFLUORO-*N*-(1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (P2)

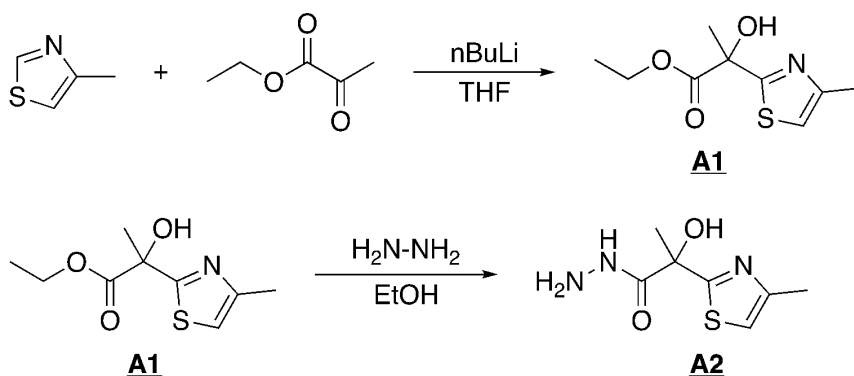


Slika 9: Sintezna shema **P2**.

3-Amino-1*H*-pirazol (1,0 g, 12 mmol) raztopimo v diklorometanu (16 ml), dodamo trietilamin (1,81 ml, 13 mmol, 1,1 eq) in postavimo na ledeno kopel in med mešanjem po kapljicah dodamo anhidrid trifluoroocetne kisline (1,67 ml, 12 mmol, 1 eq). Po končanem dodatku pustimo mešati na ledeni kopeli. Po 2 urah preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je reakcija potekla do konca in da je nastala ena lisa z višjim  $R_f$ , ki se ne barva z ninhidrinom. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in organsko fazo speremo 1× z 20 ml 1M HCl in 1× z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparimo topilo. Dobimo 1,73 g belega trdnega produkta.

Izkoristek: 80 %,  $R_f$  0,55 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  175 - 177 °C, MS (ESI/negativno) =  $m/z$  = 177,8  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $M_r$  (izračunana) = 179,1.

#### 4.2 SINTEZA 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANHIDRAZIDA (**A2**)



Slika 10: Sintezna shema **A2**.

Sinteza etil 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoata (**A1**): v bučko, ki smo jo prežarili in prepihali z argonom, dodamo sveže predestilirani brezvodni THF (30 ml). Nato dodamo 4-metil-1,3-tiazol (1,82 ml, 20 mmol). Dobljeno raztopino ohladimo na  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . Dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 12 ml, 30 mmol, 1,5 eq). Raztopina se obarva v oranžno-rjavo. Pustimo mešati 30 minut. Nato dodamo etil piruvat (2,33 ml, 21 mmol, 1,05 eq). Pustimo mešati še 1 uro na  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  in nato izklopimo potopni hladilnik in pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC. Opazimo, da je nastal željeni produkt in tri šibkejše lise. Reakcijo prekinemo z dodatkom 30 ml nasičene raztopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Odparimo THF. Dodamo zadostno količino  $\text{H}_2\text{O}$ , da se izpadle soli raztopijo in vsebino bučke prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo  $3\times$  speremo s 15 ml EtOAc. Združene organske faze osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparimo topilo. Dobimo 1,3 g oranžnega oljnatega produkta, ki ga prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1. Dobimo 0,7 g oranžno-rumenega oljnatega produkta.

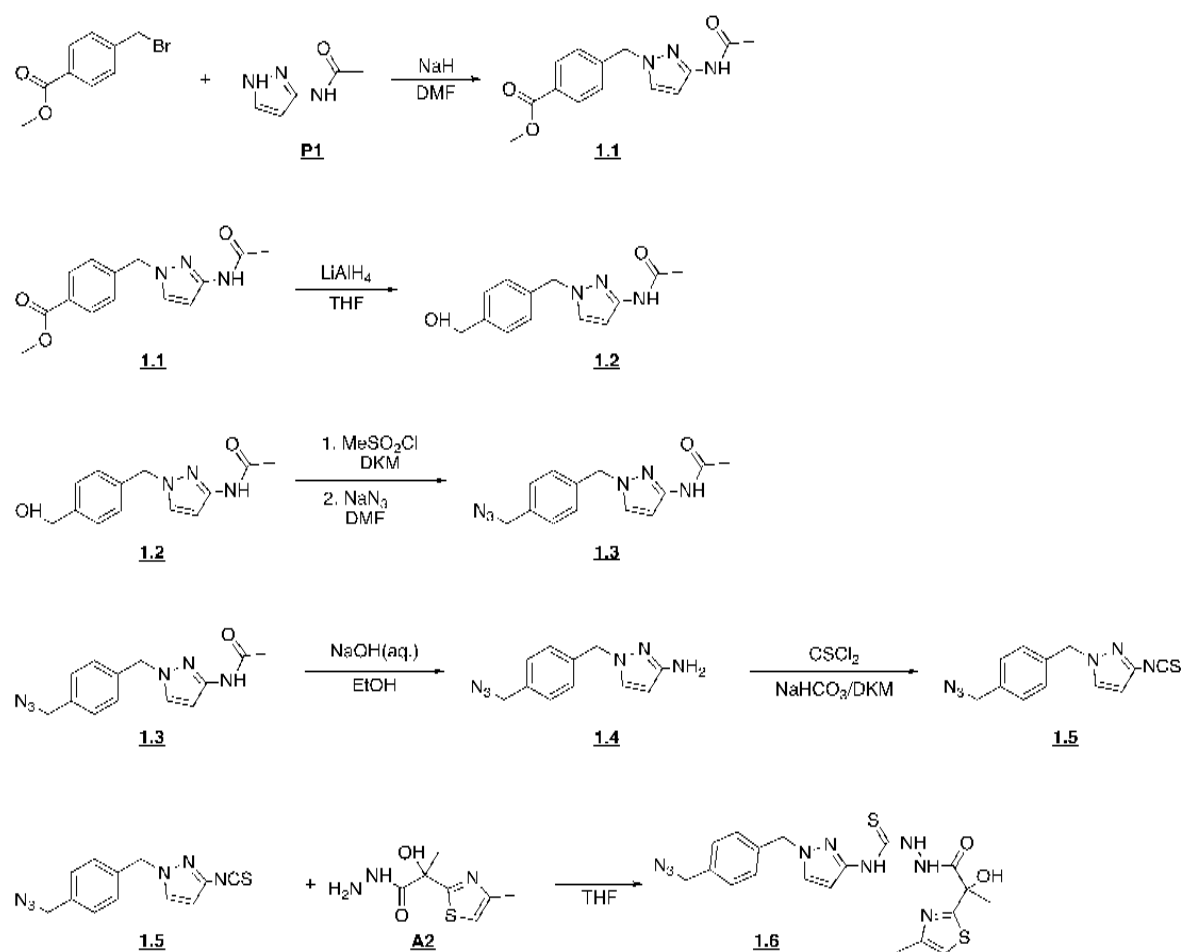
Izkoristek 32 %,  $R_f$  0,87 (DKM:MeOH = 9:1),  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1,28 (t, 3H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{H}_3\text{C-CH}_2$ ), 1,88 (s, 3H,  $\text{C(OH)-CH}_3$ ), 2,44 (d, 3H,  $J = 1,0$  Hz,  $\text{Th-CH}_3$ ), 4,28 (m, 2H,  $\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CO}$ ), 4,39 (s, 1H,  $\text{C-OH}$ ), 6,86 (m, 1H,  $\text{Th-}^5\text{H}$ ).

Sinteza 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanhidrazida (**A2**): v bučko s spojino **A1** (0,6 g, 2,8 mmol) dodamo absolutni EtOH (15 ml) in počakamo, da se spojina raztopi. Dodamo hidrazin hidrat (1,59 ml, 28 mmol, 10 eq). Bučko postavimo na kaloto in reakcijsko zmes refluktiramo 4 ure. Po tem času preverimo reakcijo s TLC in opazimo, da se je izhodna spojina porabila in je nastala ena lisa z nižjim  $R_f$ , ki se barva z ninhidrinom. Spojino

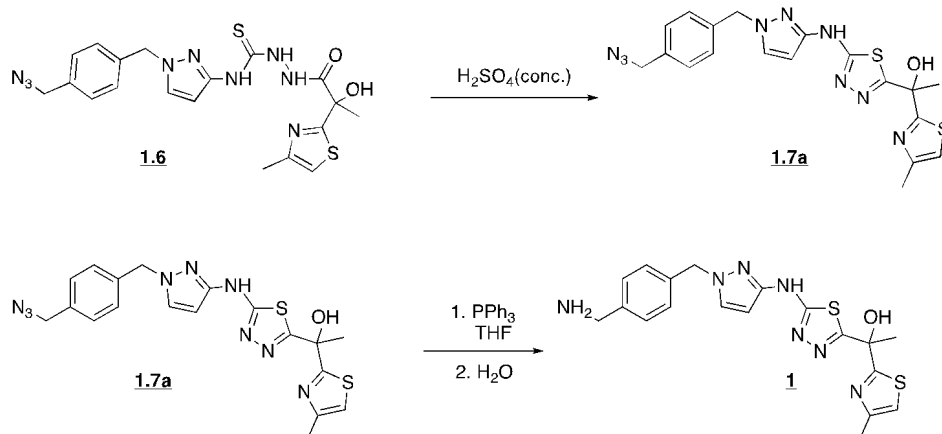
izoliramo tako, da iz reakcijske zmesi odparimo EtOH in prebiten hidrazin hidrat. Preostalega hidrazin hidrata se znebimo tako, da pustimo bučko s produktom v eksikatorju, iz katerega izčrpamo zrak, ob čaši s P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Dobimo 0,67 g rumenkastega oljnega produkta, ki ga nadalje prekristaliziramo iz zmesi dietiletra in heksana. Dobimo 0,55 g belega trdnega produkta.

Izkoristek 98 %, R<sub>f</sub> 0,46 (DKM:MeOH = 9:1), T<sub>tališče</sub> 108 - 111 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1,79 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 2,42 (d, 3H, J = 1,0 Hz, Th-CH<sub>3</sub>), 3,09 (bs, 2H, H<sub>2</sub>N-NH), 4,95 (bs, 1H, C-OH), 6,87 (m, 1H, Th-H), 8,51 (s, 1H, H<sub>2</sub>N-NH-CO).

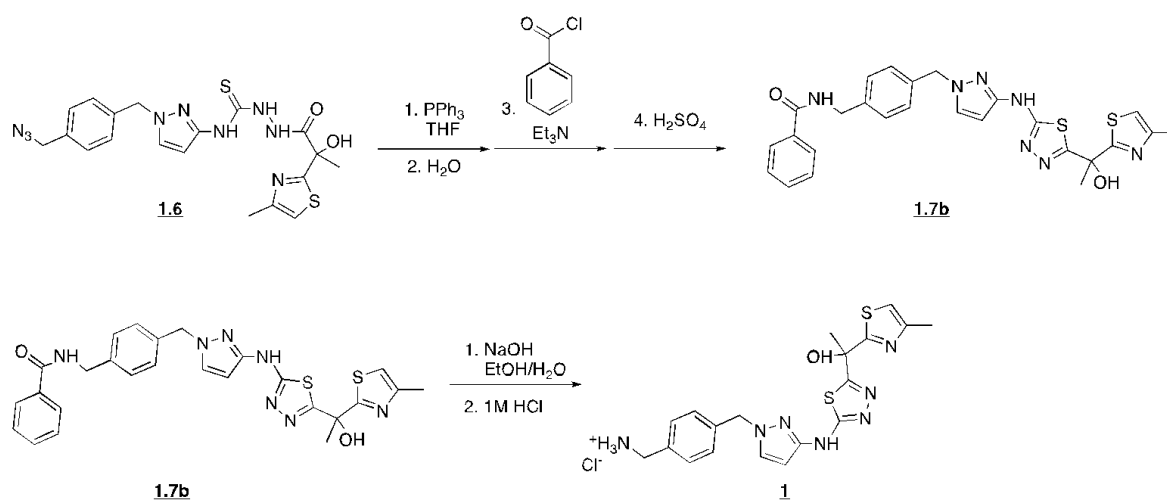
#### 4.3 SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (1)



Slika 11: Sintezna shema spojine **1** do stopnje **1.6**.



Slika 12: Sinteza končne spojine **1** - poskus 1.



Slika 13: Sinteza končne spojine **1** - poskus 2.

SINTEZA METIL 4-((3-ACETAMIDO-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZOATA (**1.1**): suho bučko s spojino **P1** (1,7 g, 13,6 mmol) preprihano z argonom in vanjo odmerimo brezvodni DMF (35 ml), postavimo na ledeno kopel in pustimo 15 min, da se ohladi. Nato v nastalo raztopino počasi dodamo NaH (60 % disperzija v parafinskem olju, 0,65 g, 16,3 mmol, 1,2 eq). Opazimo, da raztopina spremeni barvo iz umazano bele v rdečkasto. Počakamo, da se nehajo sproščati mehurčki vodika in nato dodamo po delih metil 4-(bromometil)benzoat (3,1 g, 13,6 mmol, 1 eq). Pustimo mešati na ledeni kopeli 1 uro. Reakcijo preverimo s TLC in opazimo, da se je izhodni pirazol porabil, zato reakcijo prekinemo z dodatkom 20 ml 5 % raztopine citronske kisline. Na rotavaporju odparimo večino topila in v bučko dodamo vodo in etilacetat ter prenesemo v lij ločnik. Fazi ločimo in organsko fazo še speremo 1× z nasičeno raztopino NaCl. Organsko fazo osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparimo topilo. Dobimo

nečist produkt, v katerem je še preostal parafin, ki ga prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM: MeOH = 1:0 → 9:1. Dobimo 3,35 g belega trdnega produkta.

Izkoristek 90 %, Rf 0,60 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  104 – 105 °C,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2,14 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>), 3,91 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 5,22 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,74 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,20 (m, 2H, Ph-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,34 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,00 (m, 2H, Ph-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 8,27 (s, 1H, -NH-CO), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 295,8 [M+Na]<sup>+</sup>, Mr (izračunana) = 273,1.

SINTEZA *N*-(1-(4-(HIDROKSIMETIL)BENZIL)-*1H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (**1.2**): v suho bučko natehtamo LiAlH<sub>4</sub> (1,0 g, 3,7 mmol), jo preprihomo z argonom in dodamo brezvodni THF (18 ml) ter jo postavimo na ledeno kopel. Pustimo 15 min, da se reakcijska zmes ohladi. Nato po delih dodamo raztopino spojine **1.1** (g, mmol) v brezvodnem THF (7 ml). Po 2 urah na ledeni kopeli reakcijo preverimo s TLC. Opazimo tvorbo lise z nižjim Rf in liso izhodne spojine, zato dodamo še 100 mg LiAlH<sub>4</sub>. Reakcijo pustimo mešati na vodni kopeli čez noč. Naslednji dan ponovno preverimo reakcijo s TLC in opazimo porabo izhodne spojine. V bučko dodamo 10 ml etilacetata, mešamo 30 minut in odparimo topilo. K preostanku dodamo 100 ml 10 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in po 5 minutah nevtraliziramo z NaHCO<sub>3</sub>. Zmes v bučki prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3× speremo s 20 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,7 g belo-rumenkastega trdnega produkta, v katerem je še ostal del izhodne snovi. Produkt očistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1 → 25:1. Dobimo 0,3 g trdnega belo-rumenkastega produkta in 0,6 g izhodnega produkta. Izolirano izhodno spojino **1.1** združimo z 0,5 g preostale spojine **1.1** in ponovimo sintezo spojine **1.2** po enakem postopku in dobimo še 0,6 g produkta. V celoti dobimo 0,9 g spojine **1.2**.

Izkoristek 58 %, Rf 0,48 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  132 °C,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2,12 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>), 4,69 (d, 2H,  $J = 4,4$  Hz, HO-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,16 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,70 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,18 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ph-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,31 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,34 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ph-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 7,74 (s, 1H, -NH-CO), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 267,9 [M+Na]<sup>+</sup>, Mr (izračunana) = 245,1.

SINTEZA *N*-(1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (**1.3**): spojino **1.2** (0,27 g, 1,1 mmol) raztopimo v DKM (20 ml) in dodamo Et<sub>3</sub>N (0,18 ml, 1,3 mmol, 1,2 eq) ter bučko postavimo na ledeno kopel. Pustimo mešati 15 min, da se ohladi. Nato dodamo po kapljicah MeSO<sub>2</sub>Cl (94 μl, 1,2 mmol, 1,1 eq). Po 2 urah preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je še ostalo izhodne spojine, zato dodamo še 17 μl (0,2 eq) MeSO<sub>2</sub>Cl in 60 μl (0,4 eq) Et<sub>3</sub>N in pustimo mešati čez noč. Naslednji dan ponovno preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je potekla do konca. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik in organsko fazo speremo 1× z 15 ml 1M HCl in 1× z 15 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt (0,29 g, 0,9 mmol) uporabimo takoj zatem v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja. V bučko z dobljenim produktom dodamo DMF (30 ml), NaN<sub>3</sub> (0,29 g, 4,5 mmol, 5 eq) in NaI (0,13 g, 0,9 mmol, 1 eq). Mešamo na oljni kopeli na 75 °C. Reakcija poteče hitro (30 min) (preverimo s TLC). Iz reakcijske zmesi odparimo DMF, v bučko dodamo DKM (15 ml) in vodo (30 ml) ter prenesemo v lij ločnik in ločimo fazi. Vodno fazo še 2× speremo s 15 ml DKM. Združene organske faze speremo 1× z nasičeno raztopino NaCl, jih osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,19 g belega trdnega produkta.

Izkoristek dve stopenj 64 %, R<sub>f</sub> 0,76 (DKM:MeOH = 9:1), T<sub>tališče</sub> 78 – 80 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,13 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>), 4,33 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,18 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,71 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,19 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ph-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,29 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ph-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 7,33 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,73 (s, 1H, -NH-CO), MS (ESI/pozitivno) = *m/z* = 292,9 [M+Na]<sup>+</sup>, Mr (izračunana) = 270,1.

SINTEZA 1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-AMINA (**1.4**): v bučko s spojino **1.3** dodamo EtOH (10 ml) in NaOH (1,6 g v 10 ml H<sub>2</sub>O). Postavimo na oljno kopel in mešamo na 75 °C 24 ur. Reakcijo preverjamo s TLC. Po porabi izhodne spojine uparimo EtOH in preostanek v bučki prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo speremo 3× s 15 ml etilacetata in združene organske faze speremo 1× z nasičeno raztopino NaCl, jih osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,17 g rjavkastega oljnatega produkta.

Izkoristek 70 %, R<sub>f</sub> 0,57 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,20 – 4,00 (bs, 1H, Pyr-NH<sub>2</sub>), 4,32 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,10 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,63 (d,



1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-4H), 7,16 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-5H), 7,20 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, Ph-3H,5H), 7,29 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz, Ph-2H,6H).

SINTEZA 1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-3-IZOTIOCIANATO-1H-PIRAZOLA (**1.5**): v bučko natehtamo spojino **1.4** (0,44 g, 1,9 mmol) in dodamo DKM (10 ml) in nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) in počakamo, da se spojina **1.4** raztopi v organski fazi. Nato dodamo po kapljicah CCl<sub>4</sub> (146  $\mu$ l, 1,9 mmol, 1 eq). Pustimo mešati na sobni temperaturi 45 min in po tem času naredimo TLC in ugotovimo, da je reakcija potekla do konca. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik, ločimo fazi in vodno fazo še 2 $\times$  speremo s 15 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,22 g rjavkastega trdnega produkta, ki ga takoj zatem uporabimo za naslednjo reakcijo.

Izkoristek 89 %, Rf 0,92 (DKM:MeOH = 9:1)

SINTEZA *N*-(1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)-2-(2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANOIL)HIDRAZIN-1-KARBOTIOAMIDA (**1.6**): v bučko, ki smo prežarili in prepihali z argonom, natehtamo spojino **A2** (98 mg, 0,486 mmol) in dodamo brezvodni THF (5 ml). Ko se spojina **A2** raztopi, dodamo v nastalo raztopino spojino **1.5** (131 mg, 0,486 mmol, 1 eq) raztopljen v brezvodnem THF (5 ml). Mešamo na RT. Po 1 uri reakcijo preverimo s TLC. Ugotovimo, da sta izhodni spojini še preostali, zato postavimo bučko na kaloto in refluktiramo 4 ure. Po tem času ponovno preverimo reakcijo s TLC in opazimo porabo izhodnih spojin. Nastala je lisa produkta, ki fluorescira pri svetlobi z valovno dolžino 366 nm. Iz reakcijske zmesi odparimo topilo in nastali produkt uporabimo v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

Rf 0,5 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1,91 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 2,47 (d, 3H,  $J = 0,9$  Hz, Th-CH<sub>3</sub>), 4,33 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,97 (bs, 1H, C-OH), 5,21 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,82 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-4H), 6,89 (d, 1H,  $J = 0,9$  Hz, Th-H), 7,25 (d, 1H,  $J = 2,3$  Hz, Pyr-5H), 7,28 – 7,32 (m, 4H, Ph), 8,37 (s, 1H, CO-NH-NH-CS), 11,00 (bs, 1H, Pyr-NH-CS), 12,59 (bs, 1H, SC-NH-NH-CO).

#### POSKUS 1:

SINTEZA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**1.7A**): v bučki spojino **1.6** (220 mg, 0,47 mmol) prelijemo s koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 ml) in mešamo na sobni temperaturi 2 uri. Po tem času reakcija poteče. Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli in jo naalkalimo do pH ~ 8 z 25 % vodno raztopino amoniaka. Iz reakcijske zmesi izpade rjava oborina, ki jo iz matičnice prefiltriramo s presesavanjem. Preostalo oborino na stenah bučke raztopimo v DKM (večkrat spiramo ker je slabo topna). V erlenmajerico z združenimi organskimi fazami damo še filter papir z nabrano oborino in segrejemo, da se oborina v celoti raztopi. Nekaj delcev ostane neraztopljenih, odstranimo jih s filtriranjem. Prefiltrirano raztopino osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Izoliramo 71 mg produkta, ki pa prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1 → 9:1. Izoliramo 36 mg čistega produkta.

Izkoristek 17 %, R<sub>f</sub> 0,5 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,10 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 2,43 (d, 3H, *J* = 0,9 Hz, Th-CH<sub>3</sub>), 5,00 – 5,04 (m, 1H), 5,07 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 5,30 (s, 1H), 6,03 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-H), 6,63 – 6,67 (m, 2H), 6,85 (d, 1H, *J* = 0,9 Hz, Th-H), 7,07 – 7,11 (m, 3H), 7,17 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-H).

SINTEZA 1-(5-((1-(4-(AMINOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**1**): spojino **1.7a** (22 mg, 0,048 mmol) raztopimo v THF (8 ml) in dodamo PPh<sub>3</sub> (25 mg, 0,10 mmol, 2 eq). Mešamo na sobni temperaturi. Po 15 min dodamo v reakcijsko zmes 2 kapljici H<sub>2</sub>O. Po 1 uri mešanja na sobni temperaturi preverimo reakcijo s TLC in ne opazimo sprememb, zato prestavimo bučko na kaloto in refluktiramo 4 ure. Tudi po tem času ni opaznih nobenih sprememb na TLC. Reakcija ne poteče.

#### POSKUS 2:

SINTEZA *N*-(4-((3-((5-(1-HIDROKSI-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETIL)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)AMINO)-1*H*-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZIL)BENZAMIDA (**1.7B**): spojino **1.6** (282 mg, 0,6 mmol) raztopimo v THF (5 ml) in dodamo PPh<sub>3</sub> (315 mg, 1,2 mmol, 2 eq). Mešamo na sobni temperaturi. Po 15 min dodamo 5 kapljic H<sub>2</sub>O in premaknemo bučko na reflux. Po 1 uri refluktiranja reakcija poteče. Nastane lisa, ki ne potuje in se barva z ninhidrinom.

Reakcijo ohladimo na ledeni kopeli in vanjo dodamo Et<sub>3</sub>N (100 µl, 0,72 mmol, 1,2 eq) in po 10 min še benzoil klorid (73 µl, 0,63 mmol, 1,05 eq) po kapljicah (količine reagentov izračunane na podlagi predpostavljenega 100 % izkoristka predstopnje). Po 30 minutah reakcija poteče. Nastane lisa z Rf 0,58 (DKM:MeOH = 9:1). Iz reakcijske zmesi odparimo topilo. K preostanku dodamo etilacetat in vodo in prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi. Organsko fazo še 2× speremo z 10 ml 1M HCl in 1× z 10 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt sčistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 25:1. Frakcijam s produktom odparimo topilo in v bučko dodamo koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in pustimo mešati na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli in naalkalimo do pH ~ 8 z 25 % vodno raztopino amoniaka. Prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3× speremo z 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Izoliramo 100 mg rjavkastega trdnega produkta, ki ga uporabimo takoj zatem v naslednji stopnji.

Izkoristek 31 %, Rf 0,55 (DKM:MeOH = 9:1).

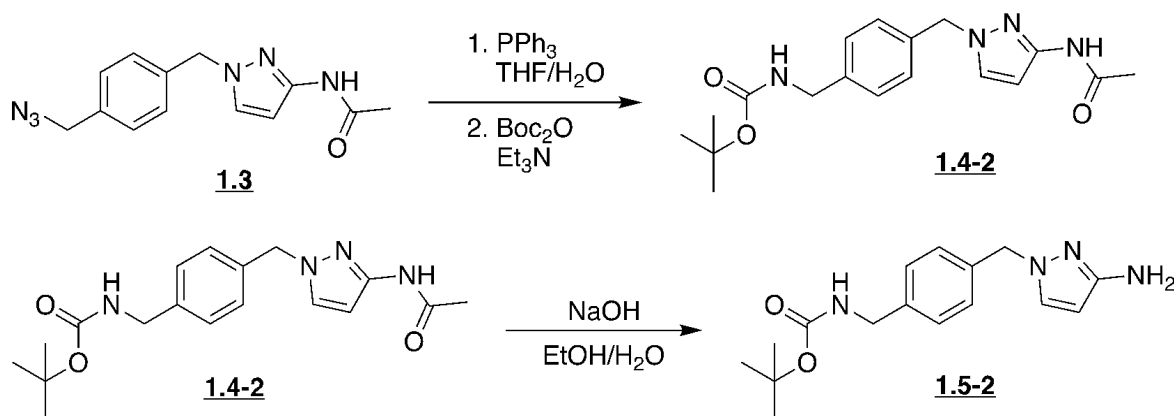
SINTEZA (4-((3-((5-(1-HIDROKSI-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETIL)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)AMINO)-1*H*-PIRAZOL-1-IL)METIL)FENIL)METANAMINIJEVEGA KLOORIDA (**1**): v bučko natehtamo spojino **1.7b** (97 mg, 0,18 mmol) in jo raztopimo v absolutnem EtOH (15 ml). Nato dodamo raztopino KOH (4 g) v H<sub>2</sub>O (3 ml). Reakcijsko zmes refluktiramo čez no. Naslednji dan reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je potekla. Reakcijsko zmes nakisamo s koncentrirano HCl do pH ~ 3. Izpade bela oborina, ki jo odnučamo (preverimo s TLC, ugotovimo, da izpadla oborina ni naš produkt). Iz matičnice odparimo topilo in nato še 3× dodamo in odparimo 5 ml toluena. Dobljen trden produkt prečistimo na Isoleri s kolono SNAP-KP-C18-HS. Pogoji elucije so podani v tabeli. Izoliramo 18 mg trdnega rjavkastega produkta v obliki klorida.

Tabela 1: Elucijski pogoji pri čiščenju spojine **1** na Isoleri.

Čas (min)	H <sub>2</sub> O (delež v %)	MeCN (delež v %)
0,00 – 7,12	5	95
7,12 – 38,00	5 → 55	95 → 45
38,00 – 45,00	55 → 90	45 → 10
45,00 – 48,26	90	10
48,26 – 50,26	90 → 95	10 → 5
50,26 – 55,26	95	5

Izkoristek 23 %, R<sub>f</sub> 0,25 (DKM:MeOH = 9:1 + NH<sub>3</sub>), T<sub>tališče</sub> 154 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD): δ (ppm) = 2,69 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 4,09 (s, 2H, H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,31 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,06 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,38 – 7,48 (m, v multipletu se nahaja signal za Th-H), 7,63 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,50 (bs, 2H, NH<sub>2</sub> oz. NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

#### 4.4 SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**1**) – OPTIMIZACIJA 1



Slika 14: Sintezna shema spojine **1** - optimizacija 1 (do stopnje **1.5-2**).

SINTEZA TERC-BUTIL (4-((3-ACETAMIDO-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZIL)KARBAMATA (**1.4-2**): v bučko natehemo spojino **1.3** (60 mg, 0,22 mmol), dodamo THF (8 ml) in PPh<sub>3</sub> (117 mg, 0,44 mmol, 2 eq). Po 10 min mešanja na sobni temperaturi dodamo v reakcijsko zmes nekaj kapljic H<sub>2</sub>O in postavimo bučko na kaloto na reflux. Po 2 urah refluktiranja reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je potekla. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in vanjo dodamo Et<sub>3</sub>N (34 µl, 0,24 mmol, 1,1 eq) in Boc<sub>2</sub>O (53 µl, 0,23 mmol, 1,05 eq). Mešamo na sobni temperaturi 30 min, nato reakcijo ponovno preverimo s TLC.

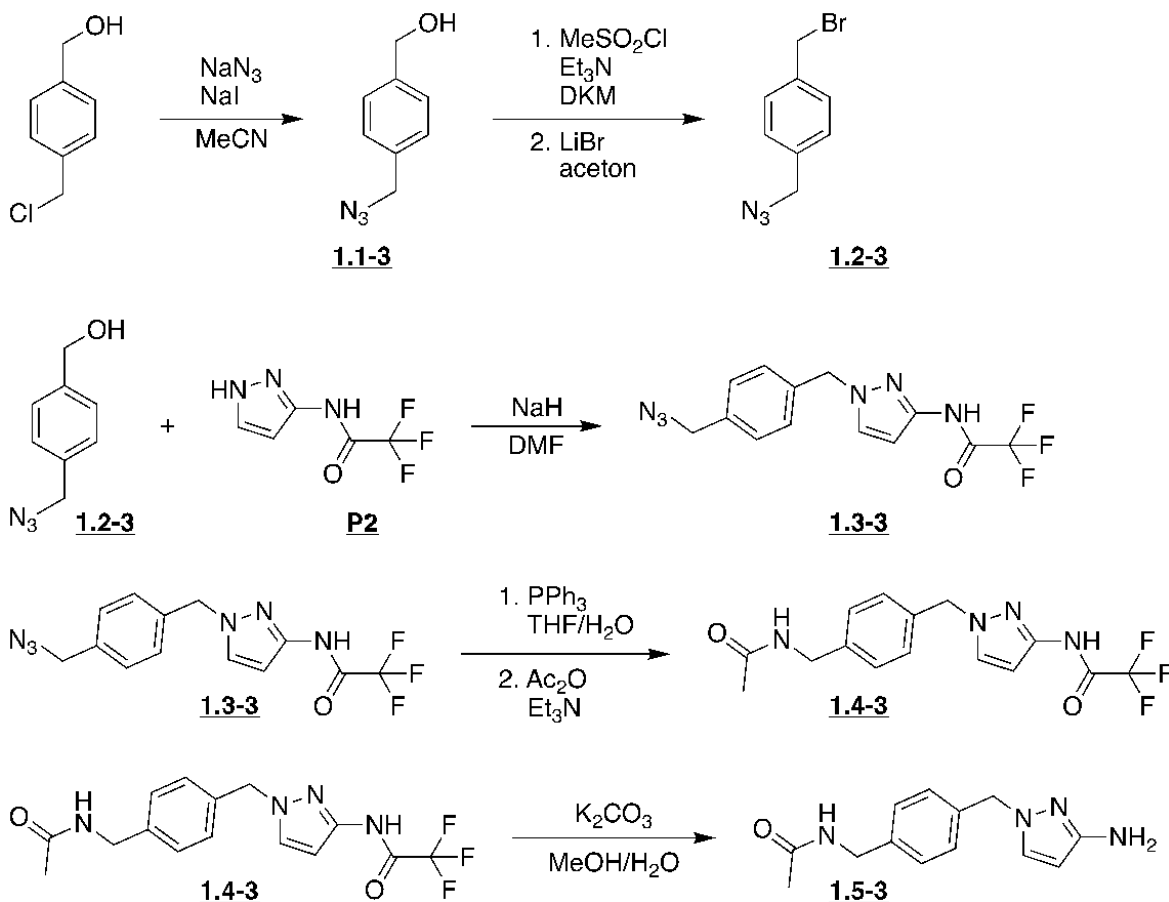
Opazimo, da je potekla do konca. Iz reakcijske zmesi odparimo THF, dodamo etilacetat (10 ml) in vodo (10 ml), prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi in organsko fazo še 2× speremo z 10 ml 1M HCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 247 mg nečistega rjavkastega belega trdnega produkta, ki ga uporabimo v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

Rf 0,06 (pred zaščito z Boc – prosti amin), Rf 0,58 (z Boc zaščiten amin) (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1,45 (s, 9H, Boc), 2,12 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>), 4,29 (d, 2H, *J* = 5,8 Hz, -NH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,91 (bs, 1H, Boc-NH-CH<sub>2</sub>), 5,10 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,72 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,18 (dd, 4H, *J*<sub>1</sub> = 7,9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 48,2 Hz, Ph), 7,27 (m, 1H, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,68 (bs, 1H, Pyr-NH-CO).

SINTEZA *TERC*-BUTIL (4-((3-AMINO-1*H*-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZIL)KARBAMATA (**1.5-2**): v bučko s spojino **1.4-2** (230 mg - nečista) dodamo raztopino NaOH (100 mg) v vodi (4 ml) in etanol (15 ml). Bučko postavimo na kaloto in reakcijsko zmes refluktiramo 4 ure. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC). Iz reakcijske zmesi odparimo etanol, dodamo etilacetat (10 ml) in vodo (10 ml). Ločimo fazi in vodno fazo še 4× speremo z 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen nečist produkt sčistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1 in izoliramo 36 mg čistega rjavkastega trdnega produkta.

Izkoristek (glede na izhodno spojino **1.4**) 54 %, Rf 0,44 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1,45 (s, 9H, Boc), 3,65 (bs, 2H, Pyr-NH<sub>2</sub>), 4,29 (s, 2H, *J* = 5,7 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-Ph), 4,86 (bs, 1H, CO-NH,CH<sub>2</sub>), 5,07 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,62 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,14 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,22 (dd, 4H, *J*<sub>1</sub> = 7,9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 48,2 Hz, Ph).

4.5 SINTEZNA SHEMA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**1**) – OPTIMIZACIJA 2



Slika 15: Sintezna shema spojine **1** - optimizacija 2 (do stopnje **1.5-3**).

SINTEZA 4-(AZIDOMETIL)FENIL)METANOLA (**1.1-3**): v bučko natehtamo 4-(klorometil) fenil) metanol (1,0 g, 6,4 mmol), dodamo acetonitril (16 ml) in počakamo, da se izhodna spojina raztopi. Nato dodamo  $\text{NaN}_3$  (2,1 g, 32 mmol, 5 eq) in  $\text{NaI}$  (0,96 g, 6,4 mmol, 1 eq). Reakcijsko zmes refluktiramo čez noč. Naslednji dan reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je potekla – lisa produkta ima enak  $R_f$  kot izhodna spojina, ampak se različno obarva po orositvi s fosfomolibdensko kislino. V reakcijsko zmes dodamo vodo (15 ml) in odparimo acetonitril. Preostanek v bučki prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3× ekstrahiramo s 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparimo topilo. Izoliramo 0,95 g belega trdnega produkta.

Izkoristek 89 %, Rf 0,65 (DKM:MeOH = 9:1),  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4,33 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ), 4,70 (d, 2H,  $J = 5,7$  Hz,  $\text{Ph-CH}_2\text{-OH}$ ), 7,35 (dd, 4H,  $J_1 = 8,3$  Hz,  $J_2 = 28,8$  Hz, Ph).

SINTEZA 1-(AZIDOMETIL)-4-(BROMOMETIL)BENZENA (**1.2-3**): v bučko s spojino **1.1-3** (0,9 g, 5,4 mmol) dodamo DKM (20 ml). Počakamo, da se izhodna spojina raztopi in nastalo raztopino ohladimo na 0 °C na ledeni kopeli. Dodamo  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,83 ml, 5,92 mmol, 1,1 eq) in nato počasi po kapljicah dodamo  $\text{MeSOCl}_2$  (0,44 ml, 5,65 mmol, 1,05 eq). Po 30 min mešanja na ledeni kopeli reakcija poteče (preverimo s TLC). Izvedemo izolacijo. V reakcijsko zmes dodamo nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (20 ml) in prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi. Organsko fazo še 1× speremo z nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (20 ml). Organsko fazo osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparimo topilo. K preostanku v bučki dodamo aceton (20 ml), ohladimo reakcijsko zmes na ledeni kopeli in dodamo  $\text{LiBr}$  (1,4 g, 16,25 mmol, 3 eq). Pustimo mešati čez noč, da se reakcijska zmes počasi segreje na sobno temperaturo. Naslednji dan reakcijo preverimo s TLC, opazimo, da je potekla in izoliramo nastali produkt. Iz reakcijske zmesi odparimo aceton. K preostanku dodamo DKM (15 ml) in vodo (15 ml). Organsko fazo še 1× speremo s 15 ml vode. Organsko fazo osušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparimo topilo. Dobimo 1,2 g čistega brezbarvnega oljnatega produkta. Dobljen produkt uporabimo takoj v naslednji stopnji.

Izkoristek 100 %, Rf 0,90 (DKM:MeOH = 9:1).

SINTEZA *N*-(1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)-2,2,2-TRIFLUOROACETAMIDA (**1.3-3**): bučko s spojino **1.2-3** priklopimo na vakuumsko črpalko. Iz nje izčrpamo zrak, ki ga nadomestimo z argonom (pri tem izgubimo del spojine **1.2-3** zaradi njenega nizkega vrelišča). K preostali spojini dodamo brezvodni DMF (7,5 ml). Drugo bučko prežarimo in preprihano z argonom. Vanjo dodamo spojino **P2** (0,8 g, 4,4 mmol) in brezvodni DMF (7,5 ml). Nastalo raztopino spojine **P2** ohladimo na ledeni kopeli in vanjo počasi dodamo  $\text{NaH}$  (60 % disperzija v parafinu, 0,42 g, 10,6 mmol). Ko se prenehajo razvijati mehurčki  $\text{H}_2$ , počasi dodamo raztopino spojine **1.2-3**. Pustimo mešati na ledeni kopeli čez noč. Naslednji dan reakcijo preverimo s TLC in opazimo porabo spojine **1.2-3**. Izvedemo izolacijo. V reakcijsko zmes dodamo 40 ml 0,5 M  $\text{HCl}$ . Vsebino bučke prenesemo v lij ločnik in ločimo fazi. Vodno fazo še 3 ekstrahiramo s 15 ml etilacetata. Združene organske faze

osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Preostanek v bučki prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo čisti DKM. Izoliramo 0,58 g čistega belega trdnega produkta.

Izkoristek / (ne vemo natančno koliko spojine **1.2-3** smo izgubili med črpanjem zraka), R<sub>f</sub> 0,84 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 4,34 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,22 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,77 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,26 (dd, 4H, *J*<sub>1</sub> = 8,2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 42,2 Hz, Ph), 7,40 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,64 (bs, 1H, Pyr-NH-CO).

SINTEZA *N*-(1-(4-(ACETAMIDOMETIL)BENZIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)-2,2,2-TRIFLUOROACETAMIDA (**1.4-3**): v bučko s spojino **1.4-2** (100 mg, 0,31 mmol) dodamo THF (15 ml), počakamo da se izhodna spojina raztopi in nato dodamo PPh<sub>3</sub> (161 mg, 0,61 mmol, 2 eq). Mešamo 15 min na sobni temperaturi in nato dodamo par kapljic vode. Pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC in opazimo, da se je tvorila lisa z nižjim R<sub>f</sub>, ki se barva z ninhidrinom. Izhodna spojina se je porabila. V reakcijo dodamo Et<sub>3</sub>N (48 μl, 0,34 mmol, 1,1 eq), mešamo 15 min in anhidrid očetne kisline (31 μl, 0,33 mmol, 1,05 eq). Po eni uri mešanja na sobni temperaturi, reakcijo znova preverimo s TLC. Opazimo, da se je lisa, ki je nastala v prejšnjem delu reakcije, pomaknila višje in se ne barva več z ninhidrinom. Odparimo THF. K preostanku v bučko dodamo etilacetat. Prenesemo v lij ločnik. Organsko fazo speremo 2× s 15 ml 1M HCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Izoliramo 209 mg rjavkastega trdnega produkta, onečiščenega s trifenilfosfin oksidom. Dobljen produkt uporabo takoj v naslednji stopnji, brez dodatnega čiščenja.

Izkoristek / (nečist produkt), R<sub>f</sub> 0,03 (pred dodatkom anhidrida očetne kisline), R<sub>f</sub> 0,54 (po dodatku anhidrida očetne kisline) (DKM:MeOH = 9:1).

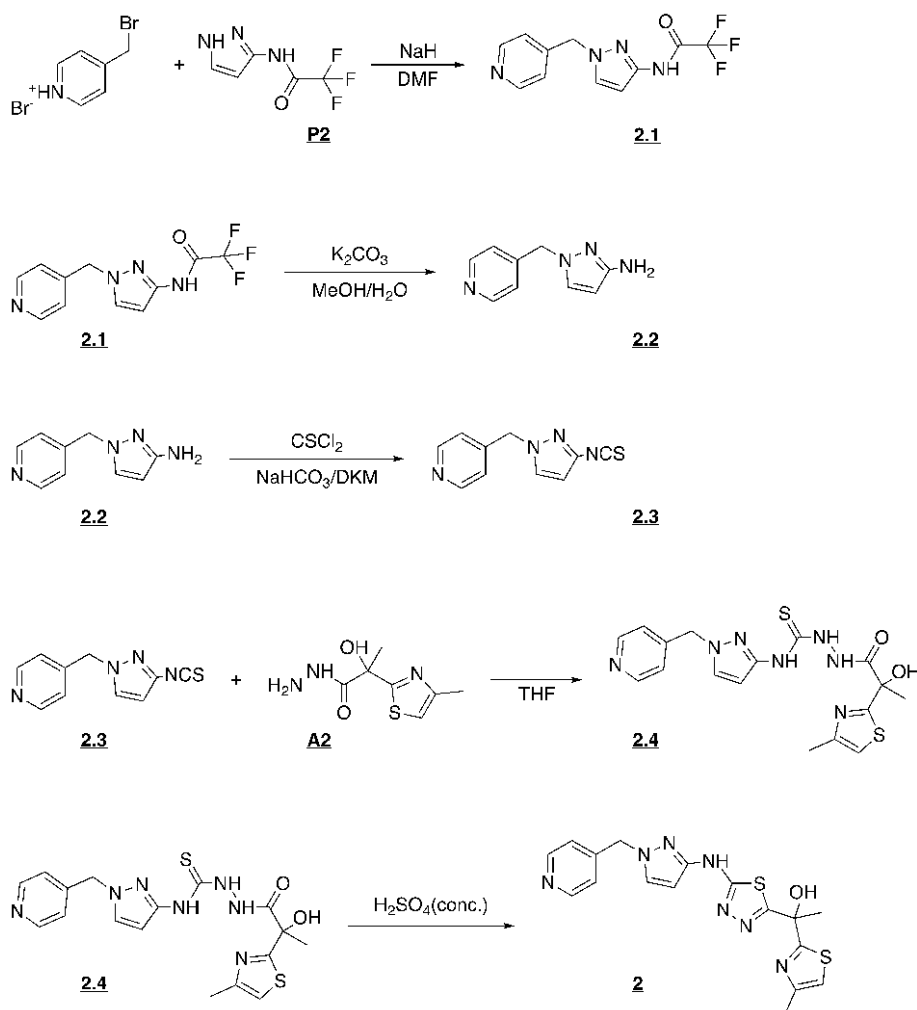
SINTEZA *N*-(4-((3-AMINO-1*H*-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZIL)ACETAMIDA (**1.5-3**): v bučko z nečisto spojino **1.4-3** (200 mg) dodamo MeOH (20 ml) in raztopino K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (320 mg) v H<sub>2</sub>O (5 ml). Reakcijsko zmes postavimo na kaloto in refluktiramo 3 ure. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC). Iz reakcijske zmesi odparimo MeOH. K preostanku dodamo etilacetat in vodo. Prenesemo v lij ločnik in ločimo fazi. Organsko fazo speremo 3× s 15 ml etilacetata. Produkt ostaja v vodni fazi, zato v vodno fazo dodamo 15 ml 2M NaOH in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Speremo še 3× s 15 ml etilacetata. Združene



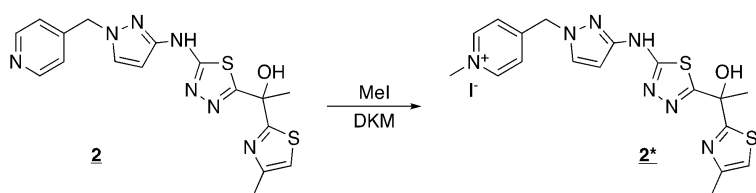
organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Del produkta je še ostal v vodni fazi, zato prav tako vodno fazo odparimo. V bučki ostane produkt in soli. K temu preostanku dodamo 15 ml DKM in nastalo suspenzijo prefiltriramo. Filtrat osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo DKM. Iz prvotne organske faze izoliramo 23 mg belkasto rjavkastega trdnega produkta, iz vodne faze še dodatnih 14 mg trdnega produkta enakega izgleda. Obem produktom zmerimo <sup>1</sup>H NMR spekter in potrdimo, da je to enaka snov ter ju združimo. Skupno smo izolirali 37 mg produkta.

Izkoristek / (nečista izhodna spojina), R<sub>f</sub> 0,45 DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,00 (s, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 3,63 (bs, 2H, Pyr-NH<sub>2</sub>), 4,40 (d, 2H, J = 5,7 Hz, NH-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,07 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,62 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 5,81 (bs, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 7,14 – 7,17 (m, 3H, Ph + Pyr-<sup>5</sup>H), 7,24 (d, 2H, J = 8,2 Hz, Ph).

#### 4.6 SINTEZA SCHEMA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(5-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**2**)



Slika 16: Sintezna shema spojine **2**.



Slika 17: Dodatna sintezna stopnja na spojini **2**.

SINTEZA 2,2,2-TRIFLUORO-*N*-(1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (**2.1**): v suho bučko natehtamo spojino **P2** (2,0 g, 11,2 mmol) in jo preprihamo z argonom. Dodamo brezvodni DMF (20 ml) in prestavimo na ledeno kopel. Počakamo 15 min, da se reakcijska

zmes ohladi. Nato počasi dodamo NaH (60 % disperzija v parafinu, 1,1 g, 28,0 mmol, 2,5 eq) in počakamo, da se nehajo razvijati mehurčki vodika. Opazimo spremembo barve reakcijske zmesi iz umazano bele v rdečkasto. Nato dodamo po delih 4-(bromometil)piridinijev bromid (2,8 g, 11,2 mmol, 1,0 eq). Pustimo mešati na ledeni kopeli 1 uro. Preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da reakcija še ni potekla in zato pustimo mešati še nadaljnji 2 uri. Po tem času reakcija poteče (glede na TLC). V reakcijsko zmes dodamo 100 ml 10 % raztopine citronske kisline in odparimo topilo. K preostanku v bučki dodamo vodo in etilacetat, prenesemo v lij ločnik, ločimo fazi in vodno fazo ekstrahiramo 4× z 10 ml etilacetata. Nato vodno fazo naalkalimo do pH ~10, dodamo nasičeno raztopino NaCl in še dodatno ekstrahiramo 5× z 10 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 3,1 g nečistega rjavkastega trdnega produkta, ki ga prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1 → 9:1. Dobimo 2,0 g trdnega belega produkta.

Izkoristek 66 %, R<sub>f</sub> 0,49 (DKM:MeOH = 9:1 + 3 gtt NH<sub>3</sub>), T<sub>talishiče</sub> 171 – 173 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5,24 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,83 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,04 (d, 2H, J = 5,9 Hz, Py-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,46 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,59 (d, 2H, J = 5,9 Hz, Py-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 9,23 (s, 1H, -NH-CF<sub>3</sub>), MS (ESI/negativno) = m/z = 269,0 [M-H]<sup>-</sup>, Mr (izračunana) = 270,2.

SINTEZA 1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-AMINA (**2.2**): spojino **2.1** (1,3 g, 4,9 mmol) raztopimo v MeOH (30 ml). Nato v nastalo raztopino dodamo raztopino K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,1 g, 15,0 mmol, 3 eq) v H<sub>2</sub>O (~5 ml, toliko da se raztopi celoten K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Reakcijsko zmes refluktiramo na kaloti do porabe izhodne spojine (4 ure). Po končani reakciji odparimo iz reakcijske zmesi MeOH. V bučko dodamo vodo in DKM in prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi. Vodno fazo naalkalimo do pH ~11, dodamo nasičeno raztopino NaCl in jo ekstrahiramo 10× z 10 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,85 g rumenkastega oljnatega produkta.

Izkoristek 100 %, R<sub>f</sub> 0,44 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,70 (s, 2H, Pyr-NH<sub>2</sub>), 5,11 (s, 2H, Py-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,68 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,02 – 7,04 (m, 2H, Py-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,22 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 8,56 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 1,6 Hz, J<sub>2</sub> = 4,5 Hz, Py-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), MS (ESI/pozitivno) = m/z = 175,1 [M+H]<sup>+</sup>, Mr (izračunana) = 174,2.

SINTEZA 4-((3-IZOTIOCIANATO-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)PIRIDINA (**2.3**): v bučko s spojino **2.2** (0,11 g, 0,6 mmol) dodamo DKM (5 ml) in nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (5 ml) ter počakamo, da se spojina **2.2** raztopi v organski fazi. Nato po kapljicah dodamo CCl<sub>2</sub> (50 µl, 0,6 mmol, 1 eq). Raztopina spremeni barvo iz rumenkaste v črno. Po 20 min mešanja na sobni temperaturi naredimo TLC in ugotovimo, da je reakcija potekla do konca. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik, ločimo fazi in vodno fazo še 2× ekstrahiramo s 15 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 0,14 g trdnega produkta črne barve. Uporabimo takoj zatem v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

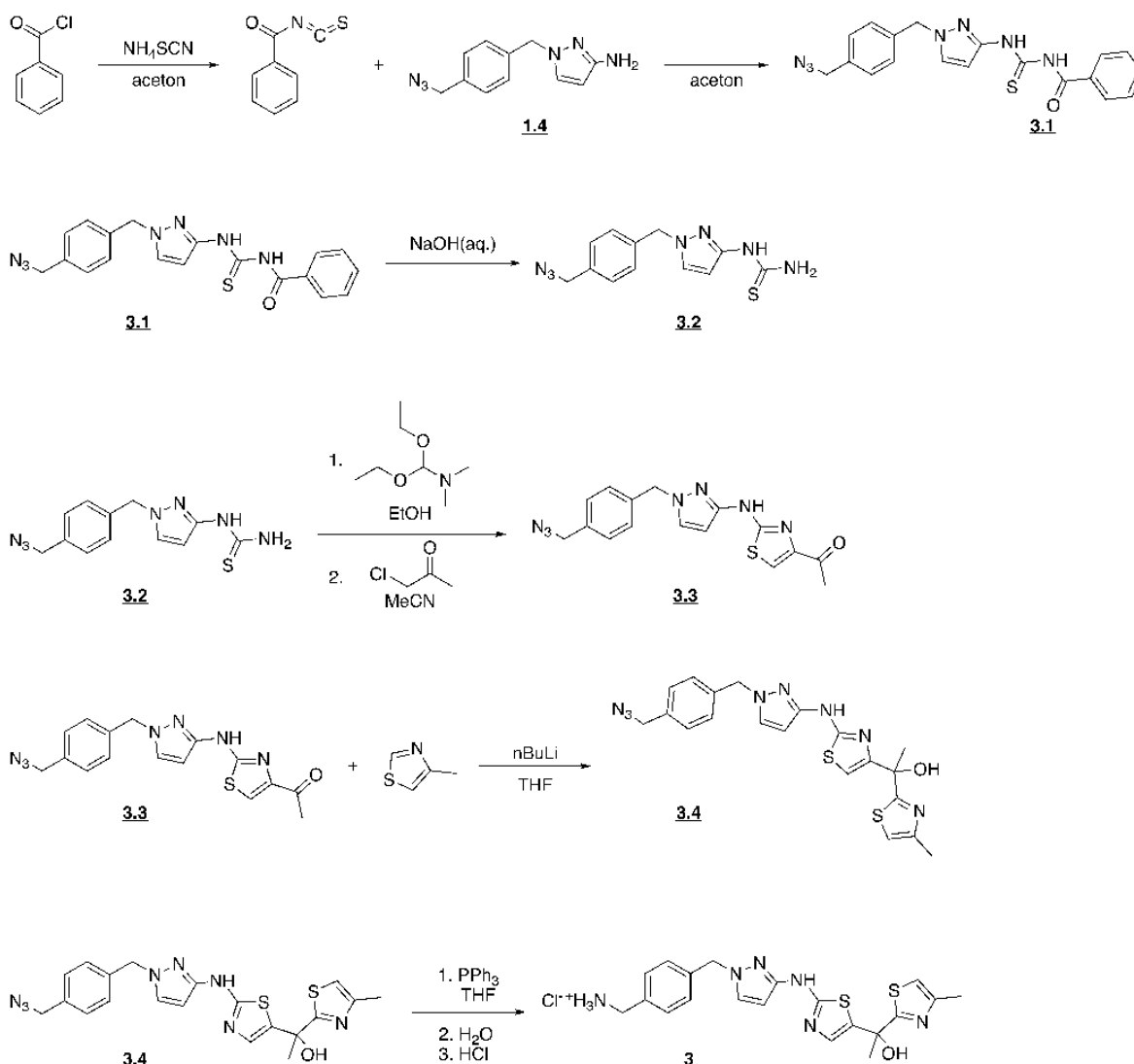
Rf 0,91 (DKM:MeOH = 9:1).

SINTEZA 2-(2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANOIL)-N-(1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)HIDRAZIN-1-KARBOTIOAMIDA (**2.4**): v bučko natehtamo spojino **A2** (186 mg, 0,92 mmol), jo raztopimo v brezvodnem THF (7 ml) in prepriamo z argonom. Nato nastali raztopini počasi dodamo raztopino spojine **2.3** (200 mg, 0,92 mmol, 1 eq) v brezvodnem THF (7 ml). Reakcijsko zmes postavimo na reflux in refluktiramo 4 ure. Po 4 urah opazimo porabo izhodne spojine **A2**. Iz reakcijske zmesi odparimo topilo in preostanek v bučki prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1 → 9:1. Izoliramo 10 mg morebitnega produkta, ki ga uporabimo direktno v naslednji stopnji.

Rf 0,56 (DKM:MeOH = 9:1).

SINTEZA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(5-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**2**): v bučko s produktom iz prejšnje stopnje (40 mg) dodamo koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 ml) in pustimo mešati preko noči na sobni temperaturi. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC in opazimo, da ni prišlo do sprememb, prisotna je samo izhodna spojina. Reakcijo pustimo mešati še en dan. Po dodatnem dnevu mešanja prav tako ni prišlo do nobene spremembe. Reakcija ni potekla.

**4.7 SINTEZA SHEMA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (3)**



Slika 18: Sintezna shema spojine **3**.

**SINTEZA** *N*-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)KARBAMOTIOIL)BENZAMIDA (**3.1**): v bučko natehtamo  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (62,4 mg, 0,82 mmol, 1,2 eq) in dodamo acetone (10 ml). Počakamo, da se raztopi. Nato po kapljicah in med mešanjem dodamo benzoil klorid (79  $\mu\text{l}$ , 0,68 mmol, 1 eq). Pojavi se bela oborina. Bučko postavimo na oljno kopel na 60 °C in segrevamo 15 min. Nato v reakcijsko zmes dodamo raztopino spojine **1.4** (156 mg, 0,683 mmol, 1 eq) v acetone (5 ml). Mešamo na oljni kopeli na 60 °C nadaljnjo uro. Po eni uri preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je potekla do konca. Reakcijsko zmes zlijemo v čašico z malo ledu. Ko se led stali, izpadlo oborino filtriramo iz reakcijske zmesi

s presesavanjem. Produkt na Büchnerjevem liju še speremo s hladno vodo. Dobimo 235 mg rumenkasto belega trdnega produkta.

Izkoristek 88 %, Rf 0,94 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  120 – 123 °C,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4,34 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ), 5,26 (s, 2H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-Pyr}$ ), 7,22 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{Pyr-}^4\text{H}$ ), 7,25 (dd, 4H,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 14,9$  Hz,  $\text{Ph}$ ), 7,36 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{Pyr-}^5\text{H}$ ), 7,54 (t, 2H,  $J_1 = 7,7$  Hz,  $J_2 = 7,7$  Hz,  $\text{Ph-}^3\text{H,}^5\text{H}$ ), 7,64 (m, 1H,  $\text{Ph-}^4\text{H}$ ), 7,86 – 7,90 (m, 2H,  $\text{Ph-}^2\text{H,}^6\text{H}$ ), 9,03 (s, 1H,  $\text{SC-NH-CO}$ ), 12,93 (s, 1H,  $\text{Pyr-NH-CS}$ ).

SINTEZA 1-(1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)TIOUREE (**3.2**): v bučko s spojino **3.1** (230 mg, 0,59 mmol) dodamo 5 ml 2M NaOH (dobimo suspenzijo). Postavimo na oljno kopel in segrevamo na 75 °C 1 uro. Med mešanjem reakcijska zmes ostaja suspenzija. Po 1 uri preverimo reakcijo s TLC in opazimo, da je potekla do konca. V reakcijsko zmes dodamo  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) in oborino iz reakcijske zmesi izoliramo s filtriranjem s presesavanjem. Oborino speremo še enkrat s hladno vodo. Dobimo 135 mg oranžnorjavega trdnega produkta.

Izkoristek 80 %, Rf 0,82 (DKM:MeOH = 9:1),  $T_{\text{tališče}}$  133 – 136 °C,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4,34 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-Ph}$ ), 5,20 (s, 2H,  $\text{Ph-CH}_2\text{-Pyr}$ ), 5,85 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{Pyr-}^4\text{H}$ ), 6,65 (s, 1H,  $\text{SC-NH}_a$ ), 7,18 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz,  $\text{Ph-}^3\text{H,}^5\text{H}$ ), 7,28 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz,  $\text{Pyr-}^5\text{H}$ ), 7,31 (d, 2H,  $J = 8,1$  Hz,  $\text{Ph-}^2\text{H,}^6\text{H}$ ), 8,46 (s, 1H,  $\text{SC-NH}_b$ ), 9,28 (s, 1H,  $\text{Pyr-NH-CS}$ ).

SINTEZA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-ONA (**3.3**): bučko s spojino **3.2** (130 mg, 0,45 mmol) preprihomo z argonom in vanjo dodamo absolutni EtOH (10 ml) in DMF-DEA (233  $\mu\text{l}$ , 1,36 mmol, 3 eq). V bučko še dodamo aktivirana molekulska sita velikosti 4 Å. Postavimo na oljno kopel in segrevamo na 70 °C 1 uro. Po tem času iz reakcijske zmesi odparimo topilo in dodamo brezvoden MeCN (10 ml) in kloroaceton (54  $\mu\text{l}$ , 0,68 mmol, 1,5 eq). Segrevamo na oljni kopeli na 70 °C čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je reakcija potekla. Tvorila se je lisa, ki fluorescira pri svetlobi z valovno dolžino 366 nm. Iz reakcijske zmesi odparimo MeCN. K preostanku dodamo etilacetat. Molekulska sita odstranimo s filtriranjem. Filtrat prenesemo v lij ločnik in organsko fazo 1× speremo s 15 ml nasičene

raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 105 mg rjavkastega trdnega produkta, ki ga prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1. Dobimo 94 mg čistega trdnega rumeno-rjavega produkta.

Izkoristek 59 %, R<sub>f</sub> 0,76 (DKM:MeOH = 9:1), T<sub>tališče</sub> 165 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,50 (s, 3H, -CO-CH<sub>3</sub>), 4,38 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,27 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,10 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,27 – 7,32 (m, 4H, Ph), 7,34 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,95 (s, 1H, Th-<sup>5</sup>H), 10,63 (bs, 1H, Pyr-NH-Th).

SINTEZA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METHILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**3.4**): v bučko, ki smo jo prežarili in prepihali z argonom, dodamo sveže predestilirani brezvodni THF (5 ml). Nato dodamo 4-metil-1,3-tiazol (28 μl, 0,31 mmol, 1,15 eq). Dobljeno raztopino ohladimo na -78 °C. Dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 133 μl, 0,33 mmol, 1,25 eq). Raztopina se obarva rahlo rumenkasto. Pustimo mešati 30 minut. Nato počasi dodamo raztopino spojine **3.3** (94 mg, 0,27 mmol) v brezvodnem THF (5 ml). Pustimo mešati še 1 uro na -78 °C in nato izklopimo potopni hladilnik in pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC. Opazimo, da reakcija ni potekla. Izhodna spojina **3.3** se ni porabila. V drugi bučki ponovimo prvi del reakcijskega postopka (do dodatka raztopine spojine **3.3**): v prežarjeno in z argonom prepihano bučko odmerimo brezvodni THF (1 ml) in 4-metil-1,3-tiazol (112 μl, 1,22 mmol, 4,6 eq). Ohladimo na -78 °C in dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 533 μl, 1,33 mmol, 5 eq). Raztopina se obarva rahlo oranžno. Po 30 min dodamo v bučko reakcijsko zmes iz prvega poskusa. Pustimo mešati na -78 °C 1 uro in po tem času ugasnemo potopni hladilnik. Po nadaljnjih 2 urah reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je večina izhodne še ostala, ampak sta nastali še dve dodatni lisi, ena višje in ena nižje. Reakcijo prekinemo z 10 ml nasičene raztopine NH<sub>4</sub>Cl. Naslednji dan izvedemo izolacijo. Iz reakcijske zmesi odparimo THF, preostanek prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3× ekstrahiramo z 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt sčistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1 → 25:1 in izoliramo izhodno spojino (42 mg) in nižjo liso, ki se izkaže, da je željen produkt, kar potrdimo z <sup>1</sup>H NMR in HR-MS. Izoliramo 11 mg produkta.

Z izolirano izhodno spojino ponovimo reakcijo po enakem postopku. Uporabimo vso izhodno spojino (42 mg, 0,12 mmol), 4-metil-1,3-tiazol (32,7  $\mu$ l, 0,36 mmol, 3 eq) in *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 168  $\mu$ l, 0,42 mmol, 3,5 eq). Izoliramo in očistimo prav tako po enakem postopku in dobimo še dodatnih 12 mg produkta.

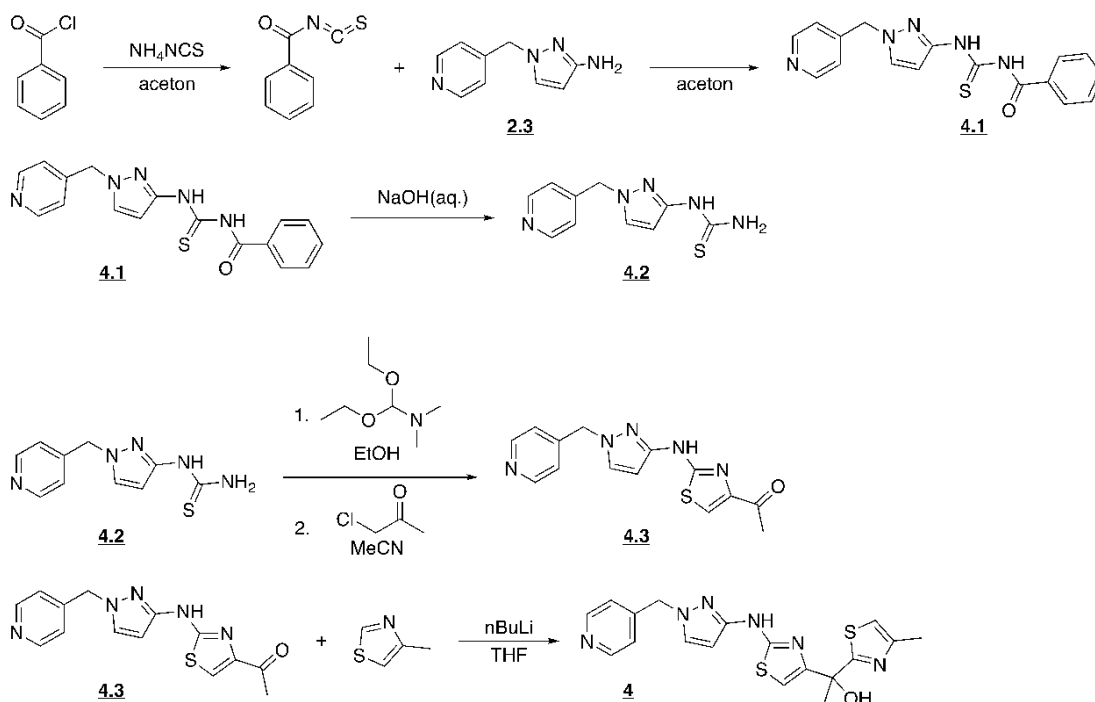
Izkoristek 16 % (povprečje obeh ponovitev), Rf 0,49 (DKM:MeOH = 9:1), T<sub>tališče</sub> 164 - 166 °C, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2,05 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 2,42 (d, 3H, J = 1,0 Hz, Th'-CH<sub>3</sub>), 4,00 - 4,30 (bs, 1H, C-OH), 4,32 (s, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,21 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,02 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 6,84 (d, 1H, J = 1,0 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,14 (s, 1H, Th-<sup>5</sup>H), 7,24 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Th'-<sup>5</sup>H), 7,25 - 7,29 (m, 4H, Ph), 9,52 (bs, 1H, Pyr-NH-Th), HR-MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 453,12 [M+H<sup>+</sup>], Mr (izračunana) = 452,12 g/mol, atomska sestava C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>8</sub>OS<sub>2</sub>

SINTEZA (4-((3-((5-(1-HIDROKSI-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETIL)TIAZOL-2-IL)AMINO)-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)FENIL)METANAMINIJEVEGA KLORIDA (**3**): v bučko s spojino **3.4** (12 mg, 0,027 mmol) dodamo THF (1 ml) in počakamo, da se raztopi. Nato dodamo PPh<sub>3</sub> (13,9 mg, 0,053 mmol, 2 eq). Po 30 minutah mešanja na sobni temperaturi dodamo v reakcijsko zmes 5 kapljic H<sub>2</sub>O. Po dodatni uri mešanja na sobni temperaturi reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da se izhodna spojina še ni porabila, zato bučko prestavimo na kaloto in reakcijsko zmes refluktiramo 30 minut. Po tem času reakcijo ponovno preverimo s TLC in opazimo, da je potekla do konca. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in vanjo dodamo 45  $\mu$ l 1M HCl. Iz zmesi odparimo topila. Preostanek v bučki speremo 5 $\times$  z 2 ml etilacetata in pustimo, da se preko vikenda posuši. Nastanek željene spojine smo potrdili z <sup>1</sup>H NMR in HR-MS.

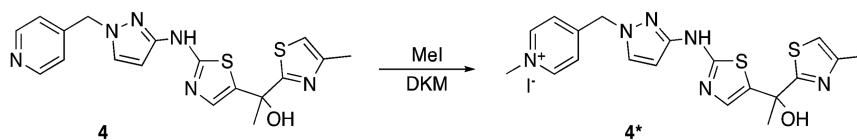
Izkoristek 81 %, Rf 0,00 (DKM:MeOH = 9:1), T<sub>tališče</sub> / (nad 270 °C začne razpadati), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1,91 (s, 3H, C(OH)-CH<sub>3</sub>), 2,32 (d, 3H, J = 1,0 Hz, Th'-CH<sub>3</sub>), 3,99 (m, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph), 5,27 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-Pyr), 6,05 (d, 1H, J = 2,3 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,19 (d, 1H, J = 1,0 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,25 (d, 1H, J = 6,5 Hz, Th-<sup>5</sup>H), 7,30 (d, 2H, J = 8,3 Hz, Ph-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,35 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Th'-<sup>5</sup>H), 7,44 (m, 2H, J = 8 Hz, Ph-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 8,33 (bs, 3H, H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), HR-MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 427,14 [M+H<sup>+</sup>], Mr (izračunana) = 426,14 g/mol, atomska sestava C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>OS<sub>2</sub>.



#### 4.8 SINTEZA SHEMA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)ETAN-1-OLA (4)



Slika 19: Sintezna shema spojine 4.



Slika 20: Dodatna sintezna stopnja na spojini 4.

SINTEZA *N*-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)KARBAMOTIOIL)BENZAMIDA (**4.1**): v bučko natehtamo  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (235 mg, 3,1 mmol, 1,2 eq) in dodamo acetone (20 ml). Počakamo, da se raztopi. Nato po kapljicah in med mešanjem dodamo benzoil klorid (298  $\mu\text{l}$ , 2,6 mmol, 1 eq). Pojavi se bela oborina. Bučko postavimo na oljno kopel na 60 °C in segrevamo 15 min. Nato v reakcijsko zmes dodamo raztopino spojine **2.3** (442 mg, 2,6 mmol, 1 eq) v acetone (10 ml). Mešamo na oljni kopeli na 75 °C nadaljnjo uro. Po eni uri preverimo reakcijo s TLC in ugotovimo, da je potekla do konca. Reakcijsko zmes zlijemo na led in izpade bela oborina, ki jo izoliramo s filtriranjem s presesavanjem (ko se led stali). Produkt je še prisoten v matični, zato izvedemo še ekstrakcijo. Matičnico prenesemo v lij ločnik, dodamo 10 ml 1M vodne raztopine NaOH in 10 ml nasičene raztopine NaCl.

Vodno fazo 5× ekstrahiramo z 10 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Oba dobljena produkta združimo in dobimo 524 mg rumenkasto belega trdnega produkta.

Izkoristek 61 %, R<sub>f</sub> 0,66 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5,28 (s, 2H, Py-CH<sub>2</sub>-Pyr), 7,09 (m, 2H, Py-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 7,29 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 7,44 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H), 7,46 – 7,67 (m, 5H, Ph), 7,88 – 7,90 (m, 2H, Py-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 9.20 (s, 1H, SC-NH-CO), 12,98 (s, 1H, Pyr-NH-CS).

SINTEZA 1-(1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)TIOUREE (**4.2**): v bučko s spojino **4.1** (0,5 g, 1,5 mmol) dodamo 5 ml 2M vodne raztopine NaOH, postavimo na oljno kopel in segrevamo na 80 °C 4 ure. Po 4 urah reakcijo preverimo s TLC in opazimo porabo izhodne spojine. V reakcijsko zmes dodamo 10 ml H<sub>2</sub>O in 15 ml nasičene raztopine NaCl in prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo speremo 10× z 10 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 346 mg rjavkastega trdnega produkta.

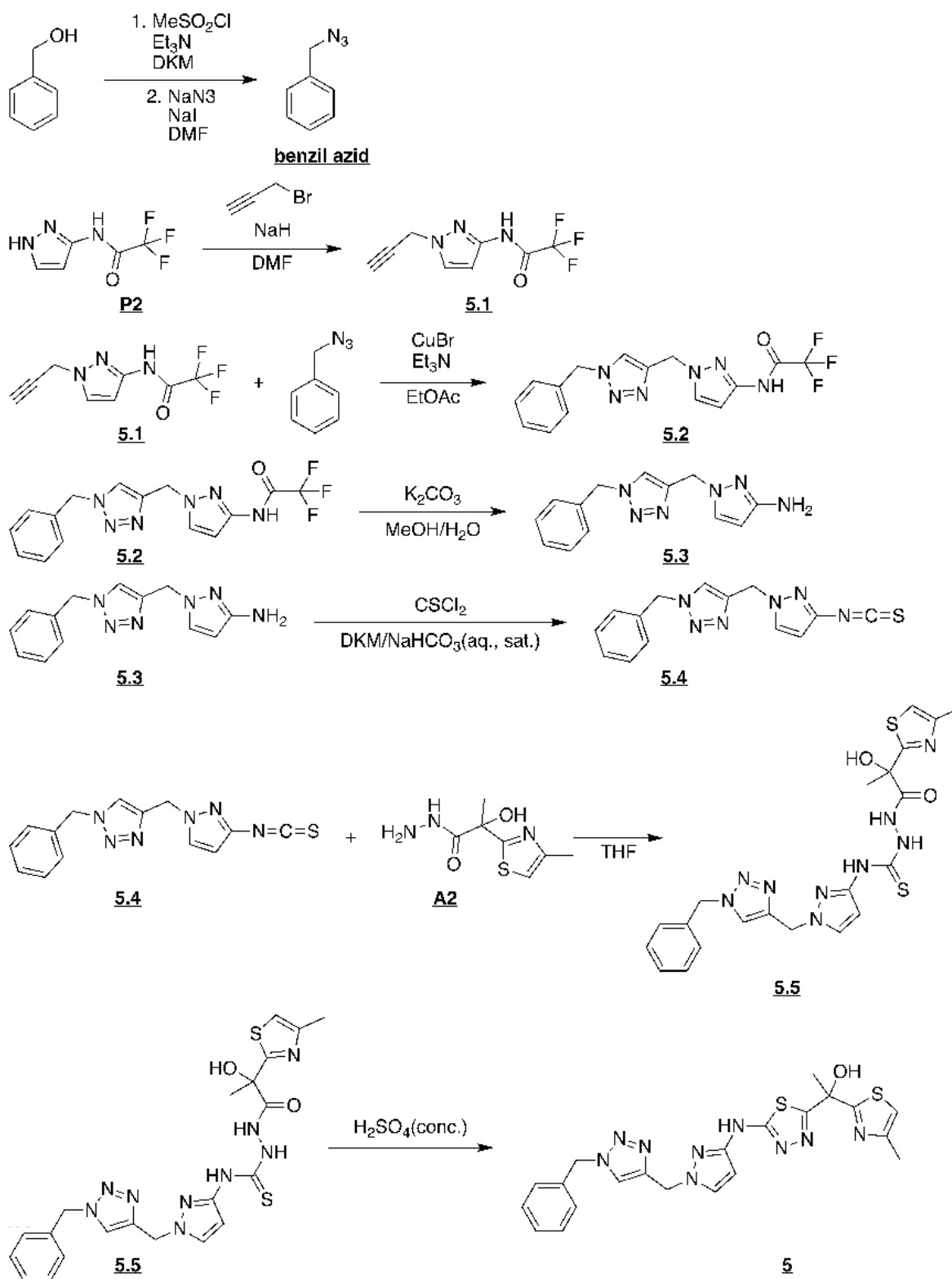
Izkoristek 100 %, R<sub>f</sub> 0,50 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5,23 (s, 2H, Py-CH<sub>2</sub>-Pyr), 5,93 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>4</sup>H), 6,32 (bs, 2H, SC-NH<sub>2</sub>), 6,75 (bs, 1H, Pyr-NH-CS), 7,01 (m, 2H, Py-<sup>2</sup>H,<sup>6</sup>H), 7,31 (m, 2H, Py-<sup>3</sup>H,<sup>5</sup>H), 7,37 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-<sup>5</sup>H).

SINTEZA 1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-ONA (**4.3**): v bučko natehtamo spojino **4.2** (0,34 g, 1,46 mmol) in prepriamo z argonom. Dodamo absolutni EtOH (10 ml), DMF-DEA (0,75 ml, 4,4 mmol, 3 eq) in aktivirana molekulska sita 4 Å. Postavimo na oljno kopel in segrevamo na 70 °C 1 uro. Naredimo TLC in opazimo, da je reakcija potekla. Odparimo topilo. K preostanku dodamo brezvodni MeCN (15 ml) in kloroaceton (176 µl, 2.2 mmol, 1,5 eq). Vrnemo na oljno kopel in segrevamo na 70 °C čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC in nastala je lisa z enakim R<sub>f</sub> kot spojina po prvi stopnji reakcije, z razliko, da po drugi stopnji lisa fluorescira pri svetlobi z valovno dolžino 366 nm. Iz reakcijske zmesi odstranimo molekulska sita s filtriranjem in odparimo topilo. Sledi čiščenje na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1 → 9:1. Izoliramo 120 mg svetlo rjavkastega trdnega produkta.

Izkoristek 27 %, R<sub>f</sub> 0,50 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,49 (s, 3H), 5,24 (s, 2H), 5,28 (s, 2H), 6,10 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 6,14 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 7,10 (m, 4H), 7,35 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 7,40 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 7,94 (s, 1H), 8,57 (m, 4H), 10,00 (bs, 2H).

SINTEZA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-OLA (**4**): v bučko, ki smo jo prežarili in prepihali z argonom, dodamo sveže predestilirani brezvodni THF (5 ml). Nato dodamo 4-metil-1,3-tiazol (36 μl, 0,40 mmol, 1,15 eq). Dobljeno raztopino ohladimo na -78 °C. Dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 172 μl, 0,43 mmol, 1,25 eq). Raztopina se obarva rahlo rumenkasto. Pustimo mešati 30 minut. Nato počasi dodamo raztopino spojine **4.3** (103 mg, 0,34 mmol) v brezvodnem THF (5 ml). Pustimo mešati še 1 uro na -78 °C in nato izklopimo potopni hladilnik in pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan preverimo reakcijo s TLC. Reakcija ni potekla. Izhodna spojina **4.3** se ni porabila. V drugi bučki ponovimo prvi del reakcijskega postopka (do dodatka raztopine spojine **4.3**): v prežarjeno in z argonom prepihano bučko odmerimo brezvodni THF (1 ml) in 4-metil-1,3-tiazol (160 μl, 1,8 mmol, 5 eq). Ohladimo na -78 °C in dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 816 μl, 2,0 mmol, 6 eq). Raztopina se obarva rahlo oranžno. Po 30 min dodamo v bučko reakcijsko zmes iz prvega poskusa. Pustimo mešati na -78 °C 1 uro in po tem času ugasnemo potopni hladilnik. Po nadaljnjih 2 urah reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da se je izhodna spojina porabila. Nastala je lisa z višji R<sub>f</sub>. Reakcijo prekinemo z 10 ml nasičene raztopine NH<sub>4</sub>Cl. Iz reakcijske zmesi odparimo THF, preostanek prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3× ekstrahiramo z 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt očistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1 → 25:1 in izoliramo nastalo spojino (13 mg), ki jo preverimo z <sup>1</sup>H NMR. Nastala spojina ni naš željeni produkt.

**4.9 SINTEZA 1-(5-((1-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (5)**



Slika 21: Sintezna shema spojine **5**.

SINTEZA **BENZIL AZIDA**: v bučko odmerimo benzil alkohol (2,6 ml, 25 mmol), dodamo DKM (15 ml), Et<sub>3</sub>N (4,16 ml, 30 mmol, 1,2 eq) in ohladimo na ledeni kopeli. Nato po kapljicah dodamo MeSO<sub>2</sub>Cl (2,13 ml, 27,5 mmol, 1,1 eq). Mešamo na ledeni kopeli 30 min. Po tem času reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je potekla. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik. Organsko fazo speremo 2× s 15 ml 1M HCl in 1× s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt – brezbarvno olje – uporabimo takoj zatem v naslednji stopnji. V bučko s produktom prejšnje stopnje dodamo DMF (20 ml), NaI (0,37 g, 2,5 mmol, 0,1 eq) in NaN<sub>3</sub> (8,13 g, 125 mmol, 5 eq). Mešamo na 75 °C 30 min. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC). V reakcijsko zmes dodamo vodo (50 ml) in prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo speremo 3× s 15 ml EtOAc. Združene organske faze speremo nato še 2× s 15 ml nasičene vodne raztopine NH<sub>4</sub>Cl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo 3,3 g oljnatega brezbarvnega produkta.

Izkoristek 100 %, Rf 0,55 (etilacetat:heksan = 1:1).

SINTEZA 2,2,2-TRIFLUORO-*N*-(1-(PROP-2-IN-1-IL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMIDA (**5.1**): bučko prežarimo in prepriamo z argonom, vanjo natehtamo spojino **P2** (1,0 g, 5,6 mmol). Dodamo brezvodni DMF (20 ml) in ohladimo na ledeni kopeli. Nato po delih počasi dodamo NaH (270 mg, 6,7 mmol, 1,2 eq). Ko se nehajo razvijati mehurčki vodika, počasi dodamo 3-bromoprop-1-in (80 % raztopina v toluenu, 557 µl, 5,9 mmol, 1,05 eq). Mešamo na vodni kopeli in pustimo, da temperatura počasi naraste na sobno čez noč. Naslednji dan reakcijo prekinemo z dodatkom 30 ml 10 % citronske kisline. vsebino bučke prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo ekstrahiramo 3× s 15 ml EtOAc. Združene organske faze nato še speremo 2× s 15 ml nasičene raztopine NH<sub>4</sub>Cl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobimo –g nečistega belkastega produkta, ki ga prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 100:1. Dobimo 273 mg čistega belega trdnega produkta.

Izkoristek 23 %, Rf 0,57 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,96 (s, 1H, CH), 4,85 (d, 2H, *J* = 2,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 6,78 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-H), 7,55 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-H), 8,76 (bs, 1H, NH).

SINTEZA  $N$ -(1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)-2,2,2-TRIFLUOROACETAMIDA (**5.2**): v bučko natehtamo spojino **5.1** (100 mg, 0,46 mmol), dodamo EtOAc (5 ml), CuBr (50 mg, 0,1 mmol, 0,2 eq) in Et<sub>3</sub>N (50  $\mu$ l, 0,36 mmol, 0,8 eq). Nato dodamo še benzil azid (61,3 mg, 0,46 mmol, 1 eq). Mešamo na sobni temperaturi 30 min. Reakcija v tem času poteče (preverimo s TLC). Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik. Organsko fazo speremo 2 $\times$  s 15 ml 1M HCl in 1 $\times$  s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt uporabimo v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

Izkoristek /, Rf 0,10 (DKM:MeOH = 9:1), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 351,2 [M+H]<sup>+</sup>, Mr (izračunana) = 350,3.

SINTEZA 1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-AMINA (**5.3**): nečist produkt iz prejšnje stopnje (133 mg) raztopimo v MeOH (5 ml) in dodamo raztopino K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,76 g) v H<sub>2</sub>O (5 ml). Mešamo na oljni kopeli na 70 °C do poteka reakcije (preverjamo s TLC) – 3 ure. Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo ekstrahiramo 2 $\times$  s 15 ml EtOAc. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Produkt nadalje sčistimo na kolini s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 60:1  $\rightarrow$  20:1. izoliramo 255 mg belkastega trdnega produkta.

Izkoristek / (nečista izhodna spojina), Rf (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3,95 (bs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 5,17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,56 (d, 1H,  $J$  = 2,31 Hz), 7,20 – 7,26 (m, 3H), 7,31 – 7,37 (m, 3H), 7,42 (s, 1H, triazol-H).

SINTEZA 1-BENZIL-4-((3-IZOTIOCIANATO-1*H*-PIRAZOL-1-IL)METIL)-1*H*-1,2,3-TRIAZOLA (**5.4**): v bučko s spojino **5.3** (150 mg, 0,59 mmol) dodamo DKM (10 ml) in nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 ml). Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli. Nato dodamo po kapljicah CCl<sub>4</sub> (46  $\mu$ l, 0,60 mmol, 1,01 eq). Reakcija poteče v 20 min (preverimo s TLC). Reakcijsko zmes prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi in vodno fazo še 1 $\times$  speremo z DKM (15 ml). Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Izoliramo 157 mg rjavkastega trdnega produkta, ki ga ne dodatno čistimo.

Izkoristek 100 %, Rf (DKM:MeOH = 9:1),  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 5,30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,51 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,15 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-H), 6,26 – 7,29 (m, 2H), 7,36 – 7,40 (m, 3H), 7,44 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-H), 7,49 (s, 1H, triazol-H), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z = 297,1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , Mr (izračunana) = 296,3.

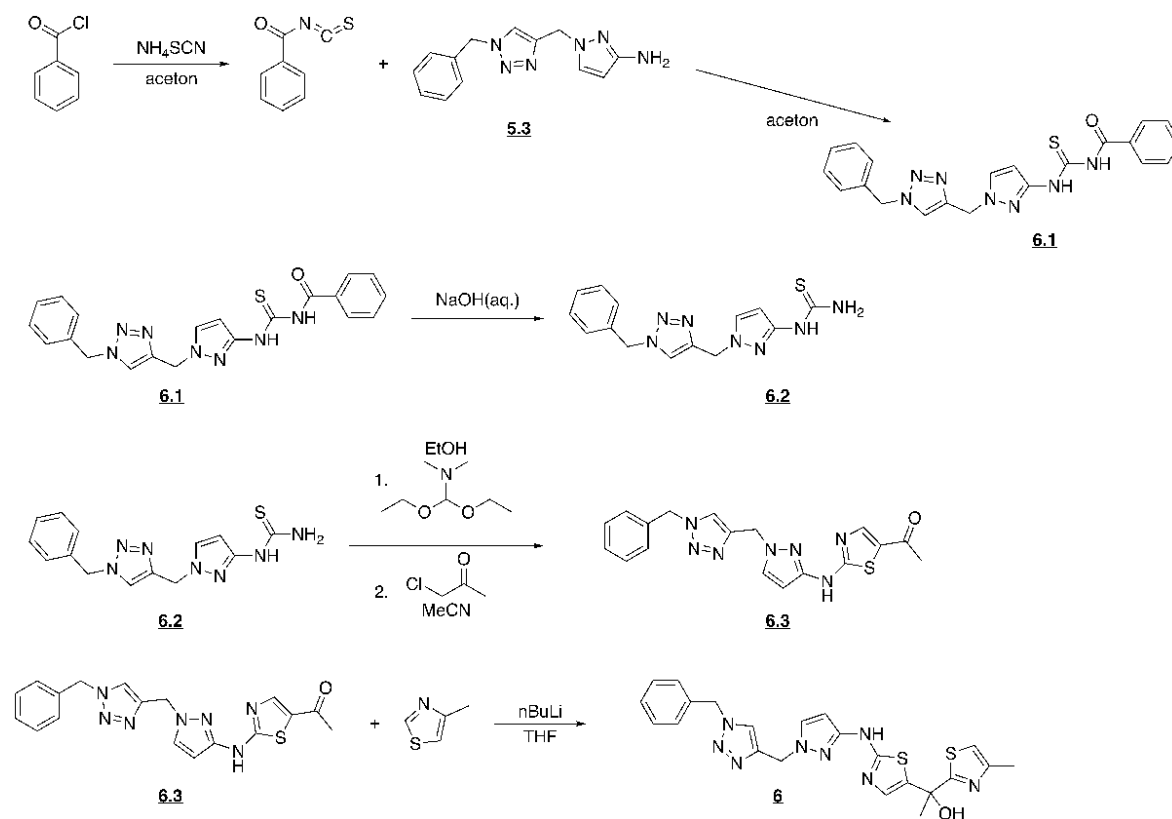
SINTEZA  $N$ -(1-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)-2-(2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANOIL)HIDRAZIN-1-KARBOTIOAMIDA (**5.5**): v z argonom prepihani bučki, spojino **5.4** (70 mg, 0,24 mmol) raztopimo v brezvodnem THF (5 ml) in v nastalo raztopino dodamo raztopino spojine **A2** (47,5 mg, 0,24 mmol, 1 eq) v brezvodnem THF (5 ml). Reakcijsko zmes refluktiramo 3 ure. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC, nastane lisa, ki fluorescira pod svetlobo valovne dolžine 366 nm). Natali produkt izoliramo tako, da odparimo THF. Preostanek v bučki prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1. Pridobimo 53 mg čistega belkastega trdnega produkta, ki ga uporabimo takoj v naslednji stopnji.

Izkoristek 45 %, Rf 0,10 (DKM:MeOH = 9:1).

SINTEZA 1-(5-((1-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**5**): v bučko s spojino **5.5** (53 mg) dodamo koncentrirano  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (~ 5 ml) in mešamo na sobni temperaturi 3 ure. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC). Reakcijsko zmes nato na ledeni kopeli naalkalimo do pH ~ 11 s 25 % vodno raztopino  $\text{NH}_3$  (dodajamo jo počasi in pazljivo, nevtralizacija je zelo eksotermna in burna). Produkt izpade v obliki rjavkaste trdne snovi, ki jo odfiltriramo s presesavanjem. Izoliran nečist produkt prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 20:1. Izoliramo 23 mg čistega belkastega trdnega produkta.

Izkoristek 50 %, Rf 0,30 (DKM:MeOH = 9:1),  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2,09 (s, 3H, C(OH)- $\text{CH}_3$ ), 2,41 (d, 3H,  $J = 0,9$  Hz, Th- $\text{CH}_3$ ), 5,30 (s, 1H, OH), 5,32 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,50 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,07 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-H), 6,86 (d, 1H,  $J = 0,9$  Hz, Th-H), 7,24 – 7,27 (m, 2H), 7,32 – 7,36 (m, 3H), 7,39 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, Pyr-H), 7,53 (s, 1H, triazol-H), 10,51 (bs, 1H, NH), HR-MS (ESI/negativno) =  $m/z = 478,1240$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ , Mr (izračunana) = 478,1227, atomska sestava  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ON}_9\text{S}_2$ .

**4.10 SINTEZA 1-(2-((1-(4-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (6)**



Slika 22: Sintezna shema spojine 6.

**SINTEZA** *N*-((1-((1-(4-((1-BENZIL-1H-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)KARBAMOTIOIL)BENZAMIDA (**6.1**): v bučko natehtamo  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (45 mg, 0,59 mmol, 1,2 eq) in dodamo acetone (5 ml). Počakamo, da se raztopi. Nato po kapljicah dodamo benzoil klorid (57  $\mu\text{l}$ , 0,49 mmol, 1 eq). Zelo hitro prične izpadati bela oborina. Reakcijsko zmes postavimo na oljno kopel in jo segrevamo 15 min na 70 °C. Po tem času dodamo v reakcijsko zmes raztopino spojine **5.2** (125 mg, 0,49 mmol, 1 eq) v acetone (5 ml) in nadaljujemo s segrevanjem dodatnih 45 min. Po tem času reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je potekla. Reakcijsko zmes zlijemo v majhno količino ledu (~ 20 g) in vode (~ 10 ml). Ko se led stali, izpadlo oborino prefiltriramo s presesavanjem. Izoliramo 138 mg trdnega belega produkta, ki ga ne dodatno čistimo.

Izkoristek 68 %,  $R_f$  0,73 (DKM:MeOH = 9:1), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z$  = 418,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $M_r$  (izračunana) = 417,5.



SINTEZA 1-(1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)TIUREE (**6.2**): v bučko natehtamo spojino **6.1** (128 mg) in vanjo dodamo raztopino NaOH (400 mg) v H<sub>2</sub>O (5 ml). Mešamo na 80 °C 3 ure. Po tem času reakcija poteče (preverimo s TLC). V bučko dodamo 15 ml DKM (ker se je večina produkta zalepila na mešalni magnetek) in prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo ekstrahiramo še 2× s 15 ml DKM. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Izoliramo 90 mg rumenkastega trdnega produkta, ki ga ne dodatno čistimo.

Izkoristek 93 %, R<sub>f</sub> 0,70 (DKM:MeOH = 9:1), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z = 314,2 [M+H]^+$ , Mr (izračunana) = 313,4.

SINTEZA 1-(2-((1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-ONA (**6.3**): bučko s spojino **6.2** (90 mg, 0,29 mmol) preprihano z argonom, vanjo dodamo absolutni EtOH (8 ml) in dodamo aktivirana molekulska sita velikost 4 Å. Nato v reakcijsko zmes dodamo DMF-DMA (147 µl, 0,86 mmol, 3 eq). Mešamo na oljni kopeli na 70 °C 1 uro. Reakcija v tem času poteče (preverimo s TLC). Iz reakcijske zmesi odparimo EtOH. Dodamo brezvodni MeCN (8 ml) in kloroaceton (35 µl, 0,44 mmol, 1,5 eq). Mešamo na 80 °C čez noč. Naslednji dan prevrmo reakcijo s TLC, ugotovimo da je potekla (nastala je lisa, ki fluorescira pod svetlobo valovne dolžine 366 nm). Odparimo MeCN. Preostanek v bučki raztopimo v EtOAc in odstranimo molekulska sita s filtracijo. Filtrat prenesemo v lij ločnik in ga 1× speremo s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo posušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Dobljen produkt prečistimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1. Izoliramo 40 mg trdnega belkastega produkta.

Izkoristek 36 %, R<sub>f</sub> 0,30 (DKM:MeOH = 9:1), <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5,36 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,02 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-H), 7,30 – 7,40 (m, 5H, Ph), 7,49 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, Pyr-H), 7,66 (s, 1H, triazol-H), 9,06 (bs, 1H, NH), MS (ESI/pozitivno) =  $m/z = 380,3 [M+H]^+$ , Mr (izračunana) = 379,4.

SINTEZA 1-(2-((1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OLA (**6**): v bučko, ki smo jo

prežarili in prepihali z argonom, dodamo sveže predestilirani brezvodni THF (1 ml). Nato dodamo 4-metil-1,3-tiazol (15  $\mu$ l, 0,16 mmol, 1,5 eq). Dobljeno raztopino ohladimo na -78 °C. Dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 80  $\mu$ l, 0,20 mmol, 1,9 eq). Raztopina se obarva rahlo rumenkasto. Pustimo mešati 30 minut. Nato počasi dodamo raztopino spojine **6.3** (40 mg, 0,11 mmol) v brezvodnem THF (3 ml). Pustimo mešati še 1 uro na -78 °C in nato izklopimo potopni hladilnik in pustimo mešati še 2 uri na sobni temperaturi. Reakcijo preverimo s TLC. Opazimo, da ni potekla. Izhodna spojina **6.3** se ni porabila. Pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan ni sprememb. Izoliramo izhodno spojino. V reakcijo dodamo 10 ml nasičene vodne raztopine NH<sub>4</sub>Cl, dodamo 10 ml vode in prenesemo v lij ločnik. Vodno fazo ekstrahiramo 2 $\times$  s 15 ml EtOAc. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Ponovimo reakcijo. V prežarjeno in z argonom prepihano bučko odmerimo brezvodni THF (1 ml) in 4-metil-1,3-tiazol (34  $\mu$ l, 0,37 mmol, 3 eq). Ohladimo na -78 °C in dodamo *n*-butil litij (2,5 M v heksanu, 200  $\mu$ l, 0,5 mmol, 4 eq). Raztopina se obarva rumenkasto. Po 30 min dodamo v bučko raztopino izolirane spojine **6.3** v brezvodnem THF (3 ml). Pustimo mešati na -78 °C 1 uro in po tem času ugasnemo potopni hladilnik. Po nadaljnjih 2 urah reakcijo preverimo s TLC in ugotovimo, da je izhodna spojina se porabila in nastali sta dve lisi. Reakcijo prekinemo z 10 ml nasičene raztopine NH<sub>4</sub>Cl. Dodamo še 10 ml vode, prenesemo v lij ločnik in vodno fazo 3 $\times$  ekstrahiramo z 10 ml etilacetata. Združene organske faze osušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparimo topilo. Lisi ločimo na koloni s silikagelom z mobilno fazo DKM:MeOH = 50:1. analiziramo z NMR. Naš željeni produkt ni nastal.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR IN REZULTATI TESTIRANJA AKTIVNOSTI INHIBICIJE ENCIMA INHA

V okviru magistrske naloge smo se lotili sinteze štirih analogov zaviralcev InhA (dva analoga s tiazolnim fragmentom in dva s tiadiazolnim) s kationskim centrom – alifatskim aminom oz. obročnim piridinskim dušikom in določanja aktivnosti zaviranja (IC<sub>50</sub>) na encimu InhA. Kandidati za testiranje inhibitorne aktivnosti InhA bi bile končne stopnje (spojine **1**, **2**, **3** in **4**) in predkončne stopnje pri spojinah s tiadiazolnim fragmentom (spojini **1.7a** in **3.4**). Uspelo nam je sintetizirati končni spojin **3** (in njeno predstopnjo **3.4**) in **5**.

Spojina **(3.4, 3 in 5)** so na Fakulteti za farmacijo (37) izmerili  $IC_{50}$  na izoliranem encimu InhA. Določanje aktivnosti inhibicije temelji na spektrofotometričnem merjenju hitrosti oksidacije NADH v reakcijski zmesi, ki vsebuje encim InhA, NADH, nenasičeno maščobno kislino vezano z CoA in testirano spojino (potencialni inhibitor). Spojina **3.4** je imela  $IC_{50}$  1,9  $\mu$ M, spojina **3** je imela  $IC_{50}$  110  $\mu$ M in spojina **5** je imela  $IC_{50}$  318 nM. Zanimivo je to, da ima spojina **3.4** (z azidno skupino) v primerjavi s spojino **3** (z aminske skupino) boljšo aktivnost. Bistveno boljšo pa ima spojina **5**. Lahko bi sklepali, da so za večjo aktivnost bolj ključnega pomena lipofilne interakcije v aktivnem mestu encima kot pa kation- $\pi$  interakcija. Možno je, da kationski center ni bil na pravem mestu v aktivnem mestu encima in zato se kation- $\pi$  interakcija ni mogla vzpostaviti. Aromatska aminokislinska fragmenta, s katerimi bi kationski center lahko tvoril kation- $\pi$  interakcijo, sta dinamična in gibljiva. Računalniška simulacija vezave potencialnega zaviralca nam pokaže »zamrznjeno« stanje, ki se lahko bistveno razlikuje od realnega stanja. Pravo pozicijo kationskega centra bi lahko ugotovili s sintezo serije spojin s kationskim centrom na različnih mestih in/ali oddaljenostih.

## 5.2 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

### 5.2.1 SPOJINA *N*-(1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMID (**P1**)

Spojino **P1** smo sintetizirali po dveh postopkih (slika 8). Po originalnem predpisu smo reakcijo izvajali v vodni raztopini natrijevega hidrogenkarbonata z anhidridom očetne kisline na ledeni kopeli. Acetilirani produkt je iz reakcijske zmesi izpadel in izolirali smo ga s filtriranjem s presesavanjem. Težava tega postopka je bila ta, da je pri nizkih temperaturah iz reakcijske zmesi izpadel tudi prebitni natrijev hidrogenkarbonat, ki je ostajal na filter papirju skupaj z našim produktom. Zato je bilo problematično čiščenje produkta. Druga težava je bila ta, da je lahko med dodatkom anhidrida očetne kisline, zaradi nenadne prevelike tvorbe ogljikovega dioksida (ob nevtralizaciji nastajajoče očetne kisline), reakcijsko zmes vrglo iz bučke, kljub zelo pazljivemu in počasnemu dodatku anhidrida in ob hlajenju reakcijske zmesi.

Zaradi zgoraj opisanih težav smo se odločili poskusiti izvesti sintezo po spremenjenem postopku – postopek 2. Reakcijo smo izvedli v diklorometanu s trietilaminom kot bazo in z anhidridom očetne kisline. Reakcijo smo hladili na ledeni kopeli. Del produkta je izpadel

iz reakcijske zmesi, del je ostal raztopljen. Izpadli produkt smo odfiltrirali s presesavanjem, raztopljeni produkt pa izolirali z ekstrakcijo. S tem postopkom smo si olajšali izolacijo produkta (glede na postopek 1). Težava tega postopka pa je, da sta nastali, glede na TLC, dve lisi. Obstaja možnost, da je pri takih pogojih potekla acetilacija na 3-aminopirazol dvakrat in smo dobili zmes mono- in diacetiliranega produkta. Poskusili smo izvesti reakcije s tako »mešanico« zaščitnih pirazolov na spojini **1** in reakcije so potekle brez večjih težav. Zaščitnega 3-aminopirazola, ki je zaradi morebitne dvojne zaščite ostal nezreagirani, smo se znebili med postopki čiščenja produktov sledečih sintez.

Zaradi težav, ki smo jih imeli z acetilno zaščito 3-aminopirazola, smo se odločili poskusiti 3-aminopirazol zaščititi še z drugimi primernimi zaščitnimi skupinami (glede na nadaljnje reakcije, ki bi jih morala zaščitna skupina preživeti). Poleg spodaj opisane zaščite s trifluoroacetilom, smo poskusili še z Boc- (*tert*-butiloksikarbonilno) zaščito in z Z- (benziloksikarbonilno) zaščito. Pri obeh vrstah zaščite sta prav tako nastali dve lisi (možna enojno in dvojno zaščitena produkta). Poleg tega bi lahko pri odstranitvi Z-zaščitne skupine z vodikom in paladijem na ogljiku (kot katalizatorjem) zaradi neselektivnosti odstranitve zaščitne skupine, cepili še druge benzilne fragmente, ki so prisotni v spojinah. Zaradi navedenih težav 3-aminopirazolov zaščitnih z Boc- oz. Z-zaščito, nismo uporabljali za sinteze.

### 5.2.2 SPOJINA 2,2,2-TRIFLUORO-*N*-(1*H*-PIRAZOL-3-IL)ACETAMID (**P2**)

Kot izboljšavo zaščite 3-aminopirazola smo poskusili še s trifluoroacetilno zaščitno skupino (slika 9). Za uvedbo zaščitne skupine smo uporabili anhidrid trifluoroocetne kisline. Kot topilo smo uporabili DKM in trietilamin kot bazo. Reakcija je lepo in hitro potekla in, sodeč po TLC-analizi, je nastal en sam produkt, ki smo ga izolirali z ekstrakcijo. 3-aminopirazol, zaščitni s trifluoroacetilom, smo uporabili v sintezi spojine **2** in pri optimizaciji 2 sinteze spojine **1**.

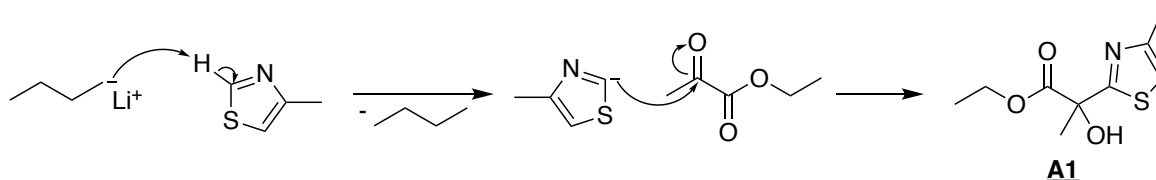
Trifluoroacetilna zaščitna skupina je bolj labilna od acetilne zaščitne skupine. Odstrani se že pri milejših bazičnih pogojih – s kalijevim karbonatom v zmesi metanol/voda ob segrevanju (acetilna se odstrani z natrijevim hidroksidom v zmesi etanol/voda ob segrevanju). Za odstranitev je pomembna prisotnost vode, ker je reakcija po mehanizmu

bazična hidroliza. 3-aminopirazol, zaščiten s trifluoroacetylom, smo uporabili v reakciji z natrijevim hidridom, ki je močna baza. Ampak ker smo pri reakciji uporabili brezvodne pogoje, hidroliza ni bila mogoča in trifluoroacetylna zaščita je preživela kljub labilnosti. To pomeni, da je v izvedeni sintezi trifluoroacetylna zaščita primerna.

### 5.2.3 SPOJINI ETIL 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANOAT (**A1**) IN 2-HIDROKSI-2-(4-METILTIAZOL-2-IL)PROPANHIDRAZID (**A2**)

Sinteza fragmenta spojine, ki vsebuje terciarno alkoholno skupino (spojina **A2**), značilno za tak tip zaviralcev InhA, sestoji iz dveh stopenj (slika 10). V prvi stopnji sintetiziramo spojino etil 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoat (**A1**). Uporabili smo izhodni spojini 4-metiltiazol in etil piruvat (oz. etil 2-oksopropanoat). Po mehanizmu je reakcija adicija 4-metiltiazolidnega aniona na ketonsko skupino etil piruvata. Deprotonacijo 4-metiltiazola na mestu 2 izvedemo z močno bazo *n*-butil litij v brezvodnih pogojih in v argonovi atmosferi pri temperaturi -78 °C. Kot topilo smo uporabili sveže predestilirani brezvodni THF. *n*-Butil litij je zelo občutljiv na vodo, tudi če je ta prisotna v sledovih in v stiku z zrakom se spontano vžge (je piroforen oz. samovnetljiv). Zato smo vso steklovino pred izvedbo reakcije prežarili in stalno prepihovali z argonom.

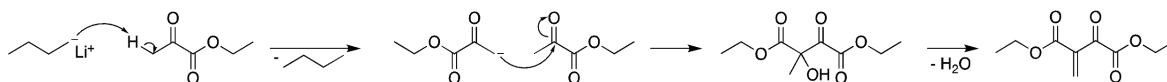
Na 4-metiltiazolu (oz. tiazolih na splošno) poteče deprotonacija preferenčno na mestu 2, ker je tamkajšnji proton najbolj kisel zaradi resonančne stabilizacije nastalega aniona. Nastali anion napade elektropozitiven ketonski ogljik na etil piruvatu in iz ketona nastane terciarna hidroksilna skupina (slika 23).



Slika 23: Deprotonacija 4-metiltiazola z *n*-butil litijem in mehanizem sinteze **A1**.

Stranska reakcija pri tej sintezi je najverjetneje aldolna kondenzacija med dvema molekulama etil piruvata (slika 24). *n*-Butil litij odcepi kisel proton iz alfa metilne skupine ob ketonski skupini in ta napade elektropozitiven ketonski ogljik na drugi molekuli etil

piruvata. Nastane intermediat s terciarno hidroksilno skupino iz katerega izstopi molekula vode (dobimo dvojno vez). Nastala voda vpliva na slabši potek sinteze želenega produkta in pripomore k zmanjšanju izkoristka reakcije. Poleg tega se tvorijo še stranski produkti, ki jih moramo odstraniti po reakciji.

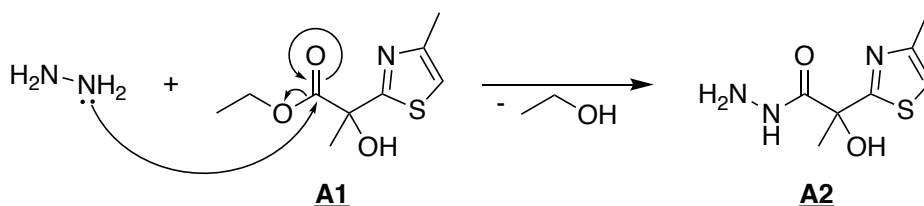


Slika 24: Mehanizem stranske reakcije pri sintezi **A1**.

Sinteza spojine **A1** ima v splošnem slab izkoristek (v povprečju 23 % - najslabši 9,5 %, najboljši 38 %). Poskušali smo jo optimizirati, da bi izkoristek povečali. Poskusili smo s povečevanjem količine *n*-butil litija (iz 1,2 eq na 1,5 eq). Sumili smo, da uporabljen *n*-butil litij (ki je raztopina v heksanu) ni vseboval več deklarirane koncentracije *n*-butil litija (reagent skozi čas razpada). Poskusili smo različno hitrost dodatka 4-metilpirazola – ali smo ga dodali počasi po kapljicah ali pa hitro med intenzivnim mešanjem. Imeli smo na voljo etil piruvat dveh različnih proizvajalcev. Posneli smo  $^1\text{H}$  NMR-spektra obeh in ugotovili, da eden vsebuje večje število nečistot od drugega, ki je bil čist. Nečist etil piruvat je bil starejši od čistega, zato je najverjetneje razlog nečistosti degradacija reagenta skozi čas.

Ne glede na poskus optimizacije ali na kakovost izhodnih spojin in reagentov je reakcija praviloma potekla s slabim izkoristkom, včasih pa z boljším, ampak nismo uspeli ugotoviti, kateri dejavniki imajo vpliv na višanje izkoristka. Ko smo poskusili izvesti sintezo spojine **A1** s sveže odprtim *n*-butil litijem, novim 4-metiltiazolom, čistim etil piruvatom in skrbno predpripravo reakcije, sinteza ni potekla bistveno boljše od drugih (izkoristek 27 %).

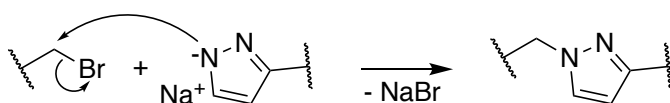
Spojino 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanhidrazid (**A2**) sintetiziramo iz spojine etil 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoat (**A1**) s hidrazinolizo etilnega estra s hidrazinom (v obliki hidrata – čist hidrazin je poleg toksičnosti tudi eksploziven, v obliki hidrata je bolj stabilen in varnejši za uporabo) (slika 25). Reakcija poteče brez težav in skoraj kvantitativno (98 % izkoristek).



Slika 25: Hidrazinoliza **A1** - sinteza **A2**.

#### 5.2.4 SPOJINA 1-(5-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL (**1**)

Izhodni spojini za sintezo spojine **1** (slika 11) sta bili metil 4-(bromometil)benzoat in z acetilom zaščiten 3-aminopirazol (spojina **P1**)<sup>1</sup>. Za deprotonacijo pirazola smo uporabili močno bazo natrijev hidrid v brezvodnih pogojih. Deprotonirani pirazol je nato služil kot nukleofil, ki je napadel elektrofilno metilensko skupino na metil 4-(bromometil)benzoatu (slika 26).

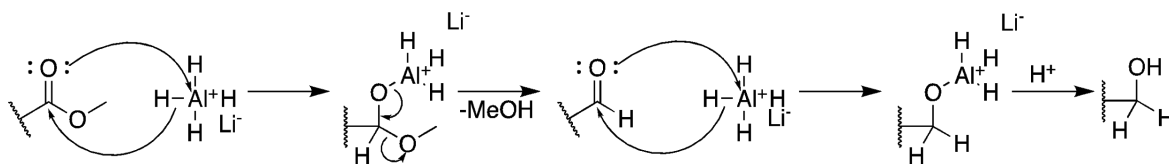


Slika 26: Mehanizem substitucije pirazola na mestu 1.

V naslednji stopnji smo reducirali estrsko skupino v alkohol. Kot reducent smo uporabili litijev aluminijev hidrid, ki služi kot vir hidridnih anionov (slika 27). Reagent je občutljiv na vodo (hidrolizira), zato smo reakcijo izvajali v brezvodnih pogojih. V izhodni spojini je bilo prisotno še topilo iz prejšnje stopnje – dimetilformamid, ki se je reduciral med reakcijo v trimetilamin, ki smo ga zaznali zaradi njegovega specifičnega vonja (podobnega npr. trietilaminu – po ribah; pri sobni temperaturi je v plinastem stanju). Kljub delni porabi reagenta zaradi prisotnosti dimetilformamida je reakcija potekla do konca, ker smo uporabili presežek litijevega aluminijevega hidrida. Nezareagirani reagent po koncu reakcije »nevtraliziramo« z dodatkom etilacetata (ta se reducira v etanol in porabi prebitni nezreagirani litijev aluminijev hidrid). V zmes dodamo žveplovo(VI) kislino, da razbijemo nastale komplekse med reagentom in produktom ter tako sprostimo produkt v želeno

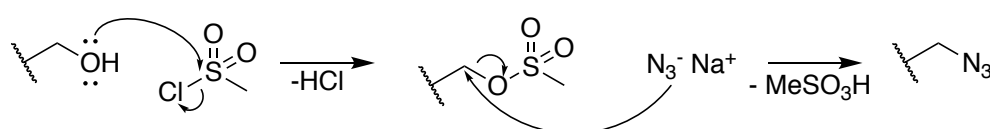
<sup>1</sup> Uporabili smo 3-aminopirazol zaščiten z acetilom, ker ko smo poskušali sintetizirati spojino **1**, še nismo sintetizirali 3-aminopirazola zaščitenega z trifluoracetamidom. Le-tega smo sintetizirali kasneje pri poskusih optimizacije zaščite 3-aminopirazola.

obliko (v našem primeru alkohol). Ostanki reagenta tvorijo z žveplovo(VI) kislino sulfate, ki so vodotopni. Ob dodatku drugih kislin, kot npr. klorovodikove, se tvori gel, ki zelo oteži postopek izolacije z ekstrakcijo.



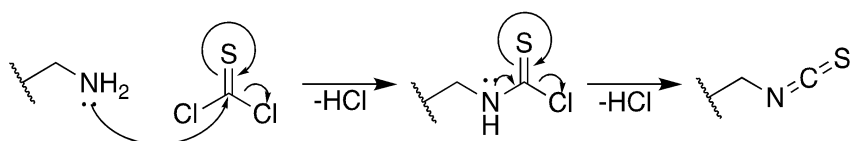
Slika 27: Mehanizem redukcije estrov z  $\text{LiAlH}_4$ .

Azidni derivat (**1.3**) smo sintetizirali tako, da smo hidroksilno skupino na spojini **1.2** zamenjali z mezilatom (metansulfonilom), ki je zelo dobra izstopajoča skupina. Tega smo nato zamenjali z azidno skupino. Vir azidnega aniona ( $\text{N}_3^-$ ) je bil natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) (slika 28). Obe reakciji sta potekli brez težav.



Slika 28: Mehanizem nukleofilne substitucije - zamenjava hidroksilne skupine z azidno preko mezilata.

Acetilno zaščito na pirazolu smo odstranili z bazično hidrolizo z etanolno/vodno raztopino natrijevega hidroksida in tako smo dobili spojno **1.4** s prosto aaminsko vezjo, ki smo jo nadalje pretvorili v izotiocianatno skupino s tiofosgenom (spojina **1.5**) (slika 29).

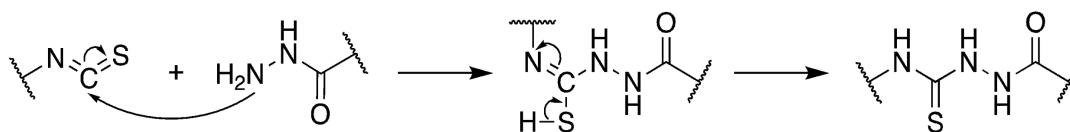


Slika 29: Mehanizem pretvorbe aminske skupine v izotiocianatna s tiofosgenom.

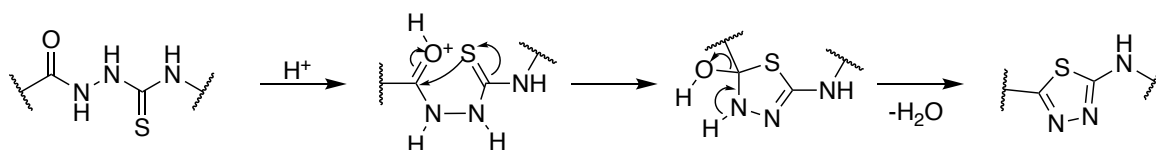
V naslednjem koraku smo spojili izotiocianatni fragment (spojina **1.5**) s hidrazinskim fragmentom (spojina **A2**) in tvoril se je tiosemikarbazidni derivat (spojina **1.6**) (slika 30), ki smo ga nadalje ciklizirali v tiadiazolni derivat (spojina **1.7a** in **1.7b**) (slika 31). Reakcija ciklizacije je dehidracija. Kot reagent uporabimo koncentrirano  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ki protonira karbonylni kisik v prvem delu reakcije in veže nastalo vodo v drugem delu reakcije ter tako



pomika ravnotežje v smeri nastanka produkta. Pomembno pri tej stopnji je zadosten čas mešanja izhodne spojine v koncentrirani žveplovi(VI) kislini in čistost izhodne spojine.

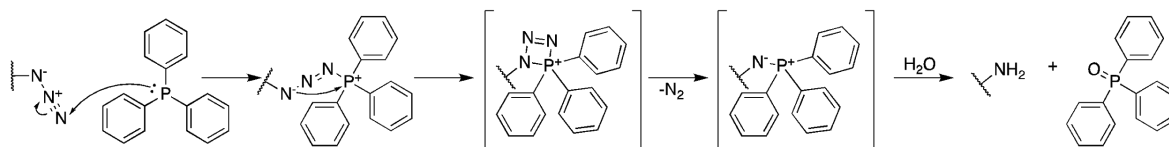


Slika 30: Sklopitev izotiocianatnega fragmenta s hidrazidnim.



Slika 31: Ciklizacija tiosemikarbazida v tiadiazol s koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

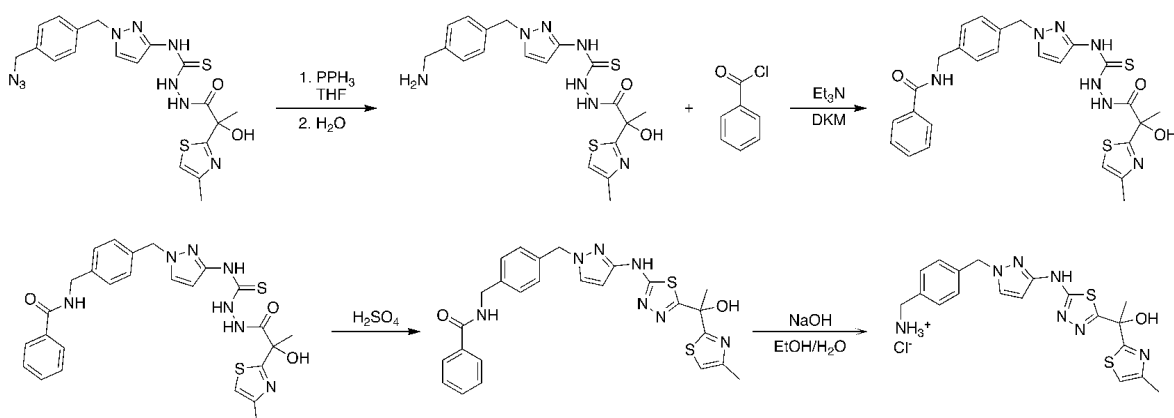
V zadnji stopnji smo želeli pretvoriti azid v spojini **1.7a** v amin (končna spojina **1** po poskusu 1) (slika 12). Izvedli smo Staudingerjevo reakcijo, ki je blag kemijski postopek za redukcijo azidne funkcionalne skupine v amsko funkcionalno skupino (slika 32). Azid zreagira s trifenilfosfinom in tvori fosfazidni intermediat. Iz tega se odcepi molekula dušika in tvori se iminofosforanski intermediat, ki po dodatku vode hidrolizira v amin in trifenilfosfin oksid kot stranski produkt.



Slika 32: Mehanizem Staudingerje redukcije - tvorba amske skupine iz azidne.

Reakcijo smo sprva poskušali izvesti pri sobni temperaturi in z majhnim presežkom trifenilfosfina (1,5 eq). Ker tudi po daljšem času reakcija ni poteka, smo povečali delež trifenilfosfina na 3 eq in reakcijsko zmes refluktirali. Reakcija tudi pri takih pogojih ni potekla, zato sumimo, da v spojini **1.7a** azid sploh ni več prisoten. Obstaja možnost, da azidna skupina ni preživela prejšnje stopnje s koncentrirano žveplovo(VI) kislino. Po analizi <sup>1</sup>H NMR-spektra spojine **1.7a** opazimo odsotnost signala za eno metilensko skupino in prisotnost signala pri 5,30 ppm, ki se integrira z 1.

Zato smo poskusili sintetizirati končano spojino še po drugi poti (poskus 2) (slika 13). Po tem postopku smo izvedli tri zaporedne reakcije – spojitev izotiocianatnega fragmenta s hidrazinskim fragmentom (tvorba tiosemikarbazida), redukcijo azida v amin s Staudingerjevo reakcijo in zaščito nastalega amina z benzoilnim fragmentom. Produktov vmesnih stopenj nismo izolirali ali čistili. Vsako posamezno stopnjo smo spremljali s TLC in reakcije so potekle. Izolirali smo spojino po zaščiti amina z benzoilnim fragmentom in jo sčistili na koloni s silikagelom. Nato smo izvedli ciklizacijo tiosemikarbazida v tiadiazol s koncentrirano žveplovo(VI) kislino (spojina **1.7b**) in z bazično hidrolizo odcepili benzoilni fragment (morebitna končna spojina **1** po poskusu 2) (slika 33). Nastalo spojino smo očistili na Isoleri in jo analizirali. Glede na dobljeni spekter  $^1\text{H}$  NMR spojini manjka signal za metil ob terciarni hidroksilni skupini pri premiku okoli 1,90 ppm.



Slika 33: Podrobnejše sosledje reakcij pri sintezi spojine **1** - poskus 2.

### 5.2.5 SPOJINA **1** – OPTIMIZACIJA 1

Pri sintezi spojine **1** smo spoznali, da azid najverjetneje ne preživi ciklizacije tiosemikarbazida v tiadiazol (poskus 1). Pri poskusu 2 smo spoznali, da lahko azid pretvorimo v amin (ki ga takoj zatem zaščitimo) že pred ciklizacijo. Odločili smo se, da poskusimo optimizirati sintezo spojine **1** (slika 14) tako, da podobno kot pri poskusu 2 azid reduciramo v amin pred ciklizacijo in da ga zaščitimo tokrat z drugačno zaščitno skupino - z Boc-zaščito. Odstranitev Boc-zaščite poteče v kislih pogojih (po navadi s trifluoroacetno kislino). Ideja je bila, da bi med ciklizacijo tiosemikarbazida v tiadiazol s koncentrirano žveplovo(VI) kislino hkrati potekla tudi odstranitev z Boc-zaščitene amina in bi v

stopnji ciklizacije že dobili končno spojino z nezaščitenim aminom (v obliki soli s sulfatom). Do te stopnje nismo prišli zaradi premajhne količine spojine **1.5-2** za nadaljnje stopnje.

#### 5.2.6 SPOJINA **1** – OPTIMIZACIJA 2

Sinteza spojine **1** po prvotnem predpisu sestoji iz devetih stopenj (poskus 1) oz. desetih stopenj (poskus 2), poleg tega sta še dve stopnji pri sintezi spojine **A2** in dodatna stopnja pri zaščiti 3-aminopirazola **P1** oz. **P2**. Skupno 13 oziroma 14 stopenj. Težave sinteze s toliko stopnjami je dolgotrajnost in zaradi slabših izkoristkov določenih vmesnih stopenj, majhne količine produktov reakcij proti koncu sinteze, kar je nemalokrat privedlo do tega, da smo imeli zadosti izhodne snovi le za en poskus določene stopnje sinteze. Za ponovitve ter poskuse izboljšanja te stopnje, smo morali ponoviti sintezo izhodne spojine, kar je bilo časovno potratno. Zato smo se odločili poskusiti optimizirati sintezno pot spojine **1**, da bi imela boljše izkoristke in da bi sintezo predstopenj izvedli na lažje načine. Sestavili smo sintezno shemo z oznako »optimizacija 2« (slika 15). Za izhodno spojino smo uporabili (4-(klorometil)fenil)metanol in 3-aminopirazol zaščiten s trifluoracetilno skupino (**P2**)<sup>2</sup>. Sinteza shema pri optimizaciji 2 sestoji sicer iz podobnega števila stopenj kot prvotni predpis, ampak so določeni postopki lažji. Na primer v prvotnem predpisu sintetiziramo hidroksilno skupino (v spojini **1.2**), ki jo nadalje zamenjamo z azidno skupino z redukcijo estra (v spojini **1.1**) z LiAlH<sub>4</sub>. Postopek zahteva brezvodne pogoje in brezvodno topilo, kar podaljša čas predpriprave reakcije. Poleg tega je LiAlH<sub>4</sub> zelo reaktiven, kar zahteva pazljivo ravnanje in izkoristek te stopnje je bil relativno nizek – 58 %. V optimizaciji 2 uvedemo azidno skupino direktno na izhodno spojino z zamenjavo že prisotne kloridne skupine. Reakcija poteče z dobrim izkoristkom – 89 %. Sinteza spojine **1.1** oz. **1.3-3** zahteva pristnost bromometilnega fragmenta v izhodni spojini, ki ga nato vežemo na obročno NH-skupino na mestu 1 zaščitenega pirazola. V prvotnem predpisu ta fragment že vsebuje kupljena izhodna spojina, v optimizaciji 2 pa ga sintetiziramo z zamenjavo hidroksilne skupine (v spojini **1.1-3**) v bromidno skupino (v spojini **1.2-3**) v dvostopenjski reakciji. V prvi stopnji na hidroksilno skupino vežemo mezilatno skupino, ki je dobra

---

<sup>2</sup> Uporabili smo 3-aminopirazol zaščiten s trifluoracetilno skupino, ker smo amin, nastal po redukciji azida, zaščitili z acetilno zaščitno skupino. Za selektivno odstranitev trifluoracetilne zaščitne skupine v naslednji stopnji smo izkoristili večjo labilnost trifluoracetamida od acetamida pri bazični hidrolizi.

izstopajoča skupina in se v naslednji stopnji brez težav zamenja z bromidno skupino. Izvedba reakcije ni težavna in izkoristek je 100 %.

Če primerjamo skupni izkoristek prvih dveh stopenj pri prvotnem predpisu in pri optimizaciji 2, lahko opazimo, da je slednji pri optimizaciji 2 boljši – 89 %, kot pri prvotnem predpisu – 52 %. Pravilneje bi bilo primerjat izkoristke glede na spojini **1.3** in **1.3-3**, ampak tega ne moremo zaradi manjkajočih podatkov o izkoristkih pri sintezi spojine **1.3-3** (ker smo izgubili neznan del izhodne spojine **1.2-3** med pripravo reakcije)<sup>3</sup>.

#### 5.2.7 SPOJINA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(5-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL (**2**)

Izhodni spojini sta bili 4-(bromometil)piridinijev bromid in s trifluoacetilom zaščiten 3-aminopirazol (spojina **P2**) (slika 16). Reakcijski pogoji so bili enaki kot pri spojini **1**. Razlika je pri sintezi spojine **2.2**, kjer smo uporabili metanolno/vodno raztopino kalijevega karbonata za odstranitev trifluoroacetilne zaščitne skupine. Reakcije so potekale brez težav do stopnje s ciklizacijo tiosemikarbazida v tiadiazol (pretvorba spojine **2.4** v **2**). Reakcijo smo izvedli po enakem postopku kot pri ciklizaciji spojine **1.7a** oz. **1.7b**, s koncentrirano žveplovo(VI) kislino. Reakcija tudi po daljšem času mešanja (48 ur) ni potekla. Sumimo, da prisotnost piridinilnega fragmenta moti ciklizacijo tiosemikarbazida v tiadiazol.

Končno spojino **2** smo še želeli metilirati na piridinskem dušiku (slika 17), da bi tvorila stalno nabit kationski center (spojina **2\***). Ker pa nam ni uspelo sintetizirati spojine **2** te reakcije nismo izvedli.

#### 5.2.8 SPOJINA 1-(2-((1-(4-(AZIDOMETIL)BENZIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-5-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL (**3**)

Izhodni reagenti za sintezo končne spojine **3** so bili benzoil klorid, amonijev tiocianat in spojina **1.4** (slika 18). Iz benzoil klorida in amonijevega tiocianata smo sintetizirali *in situ*

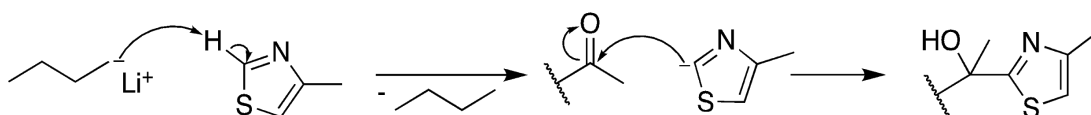
---

<sup>3</sup> Če predpostavimo enak izkoristek sinteze spojine **1.3-3**, kot ga je imela podobna reakcija sinteze spojine **1.1**, ki je bil 90 %, bi bil celokupni izkoristek sinteze do spojine **1.3-3** 80 %, kar je boljše od 52 % pri prvotnem predpisu.

benzoi izotiocianat, ki smo ga takoj po tvorbi (brez izolacije) spojili z aaminskim fragmentom – s spojino **1.4**. Dobili smo spojino **3.1**, ki je »zaščiten« derivat tiosečnine z benzoilom.

Tiosečninski derivat **3.1** smo v naslednji stopnji »odščitili« z bazično hidrolizo amidne vezi in dobili spojino **3.2**. Spojino **3.2** smo nato v dveh stopnjah pretvorili v spojino **3.3**. Iz tiosečninskega fragmenta smo z dimetilformamid-dietilacetalom tvorili iminski intermediat, ki ga nismo izolirali. Iminski intermediat smo nato pretvorili v 4-acetiltiazolni fragment s kloroacetonom. Mehanizem nastanka tiazolnega fragmenta in iminskega fragmenta ni natančno poznan. Spojini **3.2** in **3.3** se razlikujeta v tem (poleg različnega retencijskega faktorja na TLC), da spojina **3.3** fluorescira pri obsevanju s svetlobo z valovno dolžino 366 nm, spojina **3.2** pa ne. To je bil glavni pokazatelj, da smo uspeli tvoriti tiazolni fragment v spojini **3.3**, preden smo izoliran in očiščen produkt potrdili z <sup>1</sup>H NMR in HR-MS.

V naslednji stopnji (sinteza spojine **3.4**) smo vezali na ketonsko skupino 4-acetiltiazolnega fragmenta (v spojini **3.3**) 4-metiltiazol in tvorili terciarni alkohol (slika 34). Deprotonacijo šibko kislega protona na mestu 2 na 4-metiltiazolu smo izvedli z močno bazo *n*-butil litij. Reakcija je zelo občutljiva na vodo, tudi če je ta prisotna v sledovih, zato smo vso steklovino prežarili, reakcijo izvajali pod argonovo atmosfero in uporabili sveže predestilirani brezvodni tetrahidrofuran kot topilo. Ker je *n*-butil litij zelo reaktiven in piroforen (samovnetljiv; na zraku se spontano vžge), smo reakcijo hladili s potopnim hladilnikom na -78 °C. S tako temperaturo smo tudi zagotovili večjo selektivnost reakcije. Po odcepu protona nastali tiazolidni anion kot nukleofil, napade ketonsko skupino na 4-acetiltiazolnem fragmentu izhodne spojine. Kljub skrbni predpripravi in izvedbi reakcije, ta poteče s slabim izkoristkom, zato smo jo ponovili dvakrat, da smo si zagotovili dovolj izhodne spojine za končno sintezno stopnjo.



Slika 34: Mehanizem sinteze terciarnega hidroksilnega fragmenta v tiazolnem tipu spojin.

Končno spojino **3** smo sintetizirali s pretvorbo azidne funkcionalne skupine v aminske funkcionalno skupino. Kot je že opisano pri sintezi spojine **1.7a**, smo uporabili Staudingerjevo reakcijo za redukcijo azida v amin, s presežkom trifenilfosfina in povišano temperaturo (refluks). Spojino smo po končani reakciji pretvorili v sol z 1 M HCl. Ker je v taki obliki končna spojina **3** netopna v večini nepolarnih organskih topil smo se lahko znebili nastalega stranskega produkta (trifenilfosfin oksida) s spiranjem z etilacetatom.

#### 5.2.9 SPOJINA 1-(4-METILTIAZOL-2-IL)-1-(2-((1-(PIRIDIN-4-ILMETIL)-1H-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)ETAN-1-OL (**4**)

Izhodne spojine so bile benzoil klorid, amonijev tiocianat in spojina **2.3** (19). Sintezo predstopenj (spojine **4.1**, **4.2** in **4.3**) smo izvedli po postopkih, kot so opisani pri ustreznih predstopenjih spojine **3**. Težava je nastopila pri sintezi končne spojine **4**.

Sintezo končne spojine **4** smo izvedli po enakem postopku, kot pri sintezi spojine **3.4**. Želeli smo vezati 4-metiltiazol na ketonsko mesto 4-acetiltiazolnega fragmenta v spojnini **4.3**. Kljub skrbni predpripravi in brezvodnim pogojem reakcija ni potekla. Po uporabi večjega presežka 4-metiltiazola in *n*-butil litija je vsa izhodna spojina zreagirala, ampak po analizi z <sup>1</sup>H NMR in MS smo ugotovili, da ni nastala želena spojina **4**, ampak nek derivat 4-metiltiazola. Izhodna spojina **4.3** pa je najverjetneje razpadla. Podobno kot pri spojnini **2** sumimo, da je tudi tukaj piridinilni fragment v molekuli na nek način motil potek reakcije. Velika verjetnost je, da je ta fragment motil že sintezo spojine **4.3**, ker po analizi <sup>1</sup>H NMR-spektra spojine **4.3** opazimo dodatne signale poleg signalov zelene spojine. Ciklizacija do 4-acetiltiazolnega fragmenta je potekla, kar nakazuje pojav fluorescence pri svetlobi z valovno dolžino 366 nm. Spojini **4.2** in **4.3** imata enak retencijski faktor na TLC (mobilna faza DKM:MeOH = 9:1), zato je tudi v tem primeru pojav fluorescence pokazatelj potekle reakcije (podobno kot pri sintezi spojine **3.3**). Možno je, da so potekle še stranske reakcije in smo dobili produkt, ki je vseboval tiazolni fragment in še druge fragmente, ki jih nismo identificirali.

Podobno kot pri končni spojnini **2**, smo končno spojino **4** želeli metilirati na piridinskem dušiku (slika 20), da bi tvorila stalno nabit kationski center (spojina **4\***), ampak, ker nam ni uspelo sintetizirati spojine **4**, te stopnje nismo izvedli.

5.2.10 SPOJINA 1-(5-((1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL (**5**)

Izhodne spojine so bile benzil azid, 3-aminopirazol zaščiten z trifluoroacetamidom (spojina **P2**) in propargil bromid (bromopropin) (slika 21). Benzil azid smo sintetizirali v dvostopenjski sintezi – s pretvorbo hidroksilne skupine v mezilatno in nato substitucijo mezilata z azidom. Propinilni fragment smo uvajali s propargil bromidom (bromopropinom) na zaščiten 3-aminopirazol po postopku z natrijevim hidridom (kot pri spojinah **1.1** in **2.1**).<sup>4</sup>

Benzil azid in 2,2,2-trifluoro-*N*-(1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirazol-3-il)acetamid smo nato spojili z modificirano Huisgenovo dipolarno adicijo (klik kemija). Kot katalizator smo uporabili bakrov(I) bromid in reakcija je potekla regioselektivno do 1,4 disubstituiranega triazola.

Preostale reakcije so bile izvedene na enak način, kot podobne reakcije pri spojinah **1** in **2**. Ciklizacija tiosemikarbazida v tiadiazol s koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je potekla brez težav.

5.2.11 SPOJINA 1-(2-((1-((1-BENZIL-1*H*-1,2,3-TRIAZOL-4-IL)METIL)-1*H*-PIRAZOL-3-IL)AMINO)TIAZOL-4-IL)-1-(4-METILTIAZOL-2-IL)ETAN-1-OL (**6**)

Izhodne spojine so bile benzoil klorid, amonijev tiocianat in spojina **5.3** (slika 22). Sintezo smo izvedli po enakih postopkih, kot pri podobnih stopnjah pri spojinah **3** in **4**. Reakcije so potekle brez večjih težav oz. posebnosti do sinteze spojine **6**. Pri tej stopnji, podobno kot pri podobnih stopnjah pri spojinah **3** in **4**, smo želeli vezati na tiazolno ketonsko skupino metiltiazolni fragment. Deprotonacijo smo izvedli z *n*-butil litijem. Reakcija ni potekla, najverjetneje iz podobnih razlogov, kot so opisani v komentarju sinteze spojine **4**.

---

<sup>4</sup> V literaturi smo zasledili članek (38), kjer so avtorji uvajali propinilni fragment direktno na nezaščiten 3-aminopirazol – v ideji, da je obročni dušik na mestu 1 bolj nukleofilni odaminske skupine. Kljub dvomom smo preskusili in ponovili predpis (uporabili smo propargil bromid (80 % raztopina v toluenu), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kot bazo, NaI kot katalizator, aceton kot topilo in mešali smo na temperaturi refluxa čez noč). Izhodna spojina se je porabila in nastali sta dve lisi. Pripadajoči spojini smo ločili s kolonsko kromatografijo in ju analizirali z NMR. Želen produkt ni nastal. Propinilna skupina se je vezala naaminsko skupino in obročni dušik oz. naaminsko skupino dvakrat. Preskušeni postopek ni bil primeren.

## 6 SKLEP

Izmerjeni aktivnosti zaviranja encima InhA za spojini **3** in **3.4** sta glede na najboljše sintetizirane zaviralce nizki. Aktivnost spojine **5** je bistveno boljše. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da uvedba preprostega kationskega centra v tiazolni oz. tiadiazolni tip zaviralcev InhA ne prinese (bistvene) izboljšave aktivnosti. Poleg tega lahko opazimo, da imajo velik pomen nespecifične interakcije med vezavnim mestom in levo stranjo molekule zaviralca, kar je bilo ugotovljeno že v predhodnih delih (9, 19-21).

Zanimivo bi bilo sintetizirati še analoge zaviralcev tega tipa s kationskim centrom na mestu 5 na 4-metiltiazolnem fragmentu molekule.

Nadalje bi bilo zanimivo podrobneje raziskati in poiskati natančno mesto kation- $\pi$  interakcije v aktivnem mestu. S takim znanjem bi lahko sintetizirali analoge zaviralcev, ki bi vsebovali kationski center na optimalni razdalji od aromatskih aminokislinskih ostankov, bogatih s  $\pi$  elektroni, in bi tako omogočili čim bolj neovirano tvorbo kation- $\pi$  interakcije, kar bi povečalo aktivnost zaviralcev. Nadaljnja optimizacija takih analogov bi lahko bila tudi kombinacija bolj lipofilnega fragmenta s kationskim centrom na pravilnem mestu. Mogoče bi s tako spojino uspeli doseči boljše zaviranje encima.

Z zadostno mero gotovosti in optimizma lahko trdimo, da direktni zaviralci InhA (tiazolnega/tiadiazolnega tipa in drugi), ki so trenutno v razvoju, obetajo veliko in lahko upamo, da (nam) bo raziskovalcem v (bližnji) prihodnosti uspelo sintetizirati spojino, ki si bo utrla pot v klinične študije in nato v terapevtsko uporabo.



## 7 VIRI IN LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. Dostopano: 10.3.2018.
2. Gordon S, Parish T: Microbe Profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology* 2018; 164(4): 437-439.
3. Brennan P: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83: 91-97.
4. 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.
5. Marrakchi H, Lanéelle M, Daffé M: Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & Biology* (2014); 21(1): 67-85.
6. 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.
7. 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.
8. Rozwarski D, Vilchèze C, Sugantino M, Bittman R, Sacchettini J: Crystal Structure of the Mycobacterium tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 Fatty Acyl Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(22): 15582-15589.
9. 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.
10. Timmins G, Deretic V: Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* 2006; 62(5): 1220-1227.
11. 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.
12. World Health Organization. The Treatment of Tuberculosis. <http://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/>. Dostopano 11.3.2018.
13. World Health Organization. TB drug resistance types. Dostopno na: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/types/en/>. Dostopano 22.3.2018.

14. Cdc.gov. CDC | TB | Drug-Resistant TB. Dostopno na: <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.htm> [Dostopano 22.3.2018].
15. Udawadia Z, Amale R, Ajbani K, Rodrigues C: Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 54(4): 579-581.
16. Fox G, Menzies D: A Review of the Evidence for Using Bedaquiline (TMC207) to Treat Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Infectious Diseases and Therapy* 2013; 2(2):123-144.
17. Hazbon M, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero M, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, Garcia-Garcia, L, Leon C, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach K, Sifuentes-Osornio J, Cave M, Ponce de Leon A, Alland D: Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50(8): 2640-2649.
18. Morlock G, Metchock B, Sikes D, Crawford J, Cooksey R: ethA, inhA, and katG Loci of Ethionamide-Resistant Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(12): 3799-3805.
19. Martínez-Hoyos M, Perez-Herran E, Gulten G, Encinas L, Álvarez-Gómez D, Alvarez E, Ferrer-Bazaga S, García-Pérez A, Ortega F, Angulo-Barturen I, Rullas-Trincado J, Blanco Ruano D, Torres P, Castañeda P, Huss S, Fernández Menéndez R, González del Valle S, Ballell L, Barros D, Modha S, Dhar N, Signorino-Gelo F, McKinney J, García-Bustos J, Lavandera J, Sacchetti J, Jimenez M, Martín-Casabona N, Castro-Pichel J, Mendoza-Losana A: Antitubercular drugs for an old target: GSK693 as a promising InhA direct inhibitor. *EBioMedicine* 2016; 8: 291-301.
20. Šink R, Sosič I, Živec M, Fernandez-Menendez R, Turk S, Pajk S, Alvarez-Gomez D, Lopez-Roman E, Gonzales-Cortez C, Rullas-Triconado J, Angulo-Barturen I, Barros D, Ballell-Pages L, Young R, Encinas L, Gobec S: Design, Synthesis, and Evaluation of New Thiadiazole-Based Direct Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) for the Treatment of Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 58(2): 613-624.
21. Shirude P, Madhavapeddi P, Naik M, Murugan K, Shinde V, Nandishaiah R, Bhat J, Kumar A, Hameed S, Holdgate G, Davies G, McMiken H, Hegde N, Ambady A, Venkatraman J, Panda M, Bhandodkar B, Sambandamurthy V, Read, J: Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56(21): 8533-8542.
22. Burley S, Petsko G: Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Letters* 1986; 203 (2): 139-143.

23. Nandi C, Singh J, Thornton J: Atomic environments of arginine side chains in proteins. *Protein Engineering, Design and Selection* 1993; 6 (3): 247-259.
24. Dougherty D: The Cation- $\pi$  Interaction. *Accounts of Chemical Research* 2012; 46(4): 885-893.
25. Gallivan J, Dougherty D: Cation- $\pi$  interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96(17): 9459-9464.
26. Zhong W, Gallivan J, Zhang Y, Li L, Lester H, Dougherty D: From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: A cation- $\pi$  binding site in the nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(21): 12088-12093.
27. Xiu X, Puskar N, Shanata J, Lester H, Dougherty D: Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- $\pi$  interaction. *Nature* 2009; 458(7237): 534-537.
28. Tavernai S, Li H, Ruthenburg A, Allis C, Patel D: How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007; 14(11): 1025-1040.
29. Hughes R, Wiggins K, Khorasanizadeh S, Waters M: Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(27): 11184-11188.
30. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB: Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 2001; 40(11): 2004-2021.
31. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2001/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2001/). Dostopano: 23.3.2018.
32. Huisgen R: Centenary Lecture – 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proceedings of the Chemical Society* 1961; october: 357.
33. Rostovtsev V, Green L, Fokin V, Sharpless K: A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* 2002; 41(14): 2596-2599.
34. Worrell B, Malik J, Fokin V: Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* 2013; 340(6131): 457-460.
35. Boren B, Narayan S, Rasmussen L, Zhang L, Zhao H, Lin Z, Jia G, Fokin V: Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 2008; 130(28): 8923-8930.
36. Kolb H, Sharpless K: The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* 2003; 8(24): 1128-1137.

37. Testiranje je izvajala asist. Kaja Rožman, mag. farm. Neobjavljeni rezultati.
38. Kurumurthy C, Veeraswamy B, Sambasiva Rao P, Santhosh Kumar G, Shanthan Rao P, Loka Reddy V, Venkateswara Rao J, Narsaiah B: Synthesis of novel 1,2,3-triazole tagged pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives and their cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24(3): 746-749.