

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA NOVAK

**MAGISTRSKA NALOGA**

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA NOVAK

**VPLIV BIOIZOSTERNE ZAMENJAVE OSREDNJE FENILNE SKUPINE NA  
ZAVIRALNO DELOVANJE ENCIMA *InhA* PRI TETRAHIDROPIRANSKEM  
TIPU ZAVIRALCEV**

**EFFECT OF BIOISOSTERIC REPLACEMENT OF CENTRAL PHENYL GROUP  
ON THE INHIBITORY ACTIVITY OF THE TETRAHYDROPIRAN TYPE  
*InhA* INHIBITORS**

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo. Meritve masne spektrometrije in jedrske magnetne resonance so bile opravljene s strani mentorja doc. dr. Staneta Pajka. Testiranje IC<sub>50</sub> je opravila dr. Kaja Rožman.

### **Zahvala:**

*Zahvalila bi se mentorju Stanetu Pajku za vse strokovne nasvete in pomoč pri nastajanju magistrskega dela, tako pri eksperimentalnem delu kot pri pisanju magistrskega dela. Prav tako bi se rada zahvalila dr. Kaji Rožman, mag. farm., za izvajanje analiz za določitev IC<sub>50</sub>.*

*Zelo rada bi se zahvalila tudi staršem za podporo tekom celotnega študija ter Tadeji in Urošu za vse spodbudne besede in pomoč pri nastajanju magistrskega dela. Zahvala tudi prijateljem, ki so verjeli vame in so bili med pisanjem prikrajšani za moj čas. Vsem se iz srca zahvaljujem.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka.

Janja Novak

# Kazalo vsebine

1. Uvod.....	1
1.1 Tuberkuloza.....	1
1.2 Zaviralci InhA.....	3
1.2.1 Isoniazid.....	3
1.2.2 Direktni zaviralci InhA.....	4
1.3 Bioizosternost pri načrtovanju zdravilnih učinkovin .....	7
1.4 Radikalno halogeniranje - BROMIRANJE.....	10
1.5 Redukcija nitrila do amina .....	12
2. Načrt dela .....	13
3. Materiali in metode .....	15
3.1 Materiali.....	15
3.2 Metode.....	15
3.2.1 Kromatografske metode .....	15
3.2.2 Spektroskopske metode.....	16
3.2.3 Določanje tališča .....	16
4. Eksperimentalni del .....	17
4.1 Sinteza dela a: (4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-4-il)metanamina.....	17
4.1.1 Sinteza 2-(4-feniltiazol-2-il)acetonitrila.....	18
4.1.2 Sinteza 4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-4-karbonitrila.....	18
4.1.3 Sinteza (4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-4-il)metanamina.....	19
4.2 Sinteza dela b: s tiofenom.....	21
4.2.1 Sinteza etil 5-metiltiofen-2-karboksilata.....	22
4.2.2 Sinteza etil 5-(bromometil)tiofen-2-karboksilata .....	23
4.2.3 Sinteza etil 5-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)tiofen-2- karboksilata .....	24
4.2.4 Sinteza 5-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)tiofen-2-karboksilne kisline .....	25
4.2.5 Sklopitvena reakcija dela a in b: Sinteza 5-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)- <i>N</i> -((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamida .....	26
4.3 Poskus sinteze dela b: s tiazolom.....	28
4.3.1 Sinteza etil 2-(3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetata .....	29
4.3.2 Poskus sinteze 2-(3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)acetamida.....	30
4.4 Poskus sinteze dela b: s pirazolom .....	31
4.4.1 Sinteza 3,5-dimetil-1-(prop-2-in-1-il)-1 <i>H</i> -pirazola .....	32

4.4.2 Poskusi sinteze etil 5-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-karboksilat .....	33
4.5 Sinteza dela b: s tiazolom (4-karboksilatom).....	34
4.5.1 Sinteza etil 2-(bromometil)tiazol-4-karboksilata .....	35
4.5.2 Sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)tiazol-4-karboksilata.....	36
4.5.3 Sinteza 2-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)tiazol-4-karboksilne kisline.....	37
4.5.4 Sklopitvena reakcija: Sinteza 2-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)- <i>N</i> -((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-4-il)metil)tiazol-4-karboksamid .....	39
4.6 Poskus sinteze dela b: s tiazolom (5-karboksilatom).....	41
4.6.1 Sinteza etil 2-(bromometil)tiazol-5-karboksilata .....	42
4.6.2 Sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)metil)tiazol-5-karboksilata.....	43
5. Rezultati in razprava .....	44
5.1 Komentar sinteznih postopkov .....	44
5.2 Testiranje encimske kinetike IC <sub>50</sub> .....	49
5.3 Preverjanje čistote spojin s HPLC.....	50
6. Sklep.....	51
7. Literatura in viri .....	52

## Kazalo slik:

<i>Slika 1: Tridimenzionalna struktura encima InhA (roza barva predstavlja NADH, modra pa maščobne kisline) (prirejeno po (3)).</i>	3
<i>Slika 2: Strukturna formula izonizida.</i>	3
<i>Slika 3: Mehanizem aktivacije INH s KatG (prirejeno po (6)).</i>	4
<i>Slika 4: Struktura spojine vodnice tetrahidropiranskega derivata (povzeto po (1)).</i>	4
<i>Slika 5: Struktura triklosana.</i>	5
<i>Slika 6: Strukturna formula piridomicina (povzeto po (12)).</i>	5
<i>Slika 7: Struktura spojine vodnice derivatov 4-hidroksi-2-piridona.</i>	6
<i>Slika 8: Struktura spojine vodnice s tiadiazoli.</i>	6
<i>Slika 9: Strukturna formula sulfadiazina.</i>	8
<i>Slika 10: Strukturna formula sulfametoksazola.</i>	8
<i>Slika 11: Shematski prikaz radikalskih reakcij z bromom (prirejeno po (16)).</i>	10
<i>Slika 12: Bromiranje z NBS.</i>	11
<i>Slika 13: Shema prikaza razpada iniciatorjev na radikale, s katerimi aktiviramo NBS za potek reakcije (prirejeno po (16)).</i>	11
<i>Slika 14: Tetrahidropiranski tip direktnih InhA zaviralcev in načrtovane bioizosterne zamenjave za fenil.</i>	13
<i>Slika 15: Sklopitvena reakcija, ki bo sestavljena iz dela a (sintez do amina) in dela b (sintez do karboksilne kisline).</i>	14

## Povzetek

Bakterijska okužba z *M.tuberculosis* lahko povzroči tuberkulozo, bolezen, ki v večini primerov prizadane pljuča, lahko pa tudi ostale organe. V nekaterih primerih je lahko tudi smrtna. Standardno zdravljenje poteka s protibakterijskimi učinkovinami, natančneje z izoniazidom ali več učinkovinami hkrati (rifampicin, etambutol). Za učinkovito zdravljenje tuberkuloze je potrebno sočasno jemanje več zdravil. Čeprav se je pojavnost in smrtnost bolezni v zadnjih letih močno zmanjšala, je ta napredek pogosto spregledan zaradi naraščanja razširjenosti okužb z večkrat odpornimi bakterijami tuberkuloze ali še hujše oblike rezistence. Zaradi odpornosti določenih sevov na obstoječe metode zdravljenja se razvijajo nove oblike zdravilnih učinkovin za zdravljenje tuberkuloze, gre za t.i. direktne zaviralce encima InhA: tetrahidropiranski derivati, triklosan, piridomicin, 4-hidroksi-2-piridoni, tiadiazoli.

Pri eksperimentalnem delu smo se osredotočili na bioizosterno zamenjavo osrednje fenilne skupine na tetrahidropiranskem tipu InhA zaviralcev. S pomočjo obročnih ekvivalentov smo fenilni obroč zamenjali s tiofenom in tiazolom. Med eksperimentalnim delom smo se srečali z določenimi tipi reakcij, kot npr.: radikalno halogeniranje – bromiranje; redukcijo nitrilov do aminov; sklopitvenimi reakcijami, kjer se je tvoril karboksamid. Uspeli smo sintetizirati dve končni spojini: spojino **8**: 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamid in spojino **16**: 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiazol-4-karboksamid.

Po končani sintezi smo analizirali končne spojine z jedrsko magnetno resonanco (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) in masno spektrometrijo visoke ločljivosti. Preverili smo tudi čistost dobljenih spojin s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Končnim spojinam so na encimu InhA določili vrednost zaviralne koncentracije (IC<sub>50</sub>) na encimu. Glede na rezultate analiz se je tiofen izkazal za ustrežnejšo zamenjavo fenila. Uspelo nam je pripraviti bolj čist tetrahidropiranski derivat s tiofenom kot s tiazolom, poleg tega je izkazal tudi nižjo IC<sub>50</sub> vrednost od tiazola.

**Ključne besede:** tuberkuloza, direktni zaviralci InhA, tetrahidropiranski derivat, bioizosterna zamenjava.

## Abstract

The bacterial infection with *M.tuberculosis* can cause tuberculosis, a disease that in most cases affects the lungs, but it can also affect other organs. Sometimes, it can also be deadly. The standard treatment uses antibacterial substances, specifically isoniazid or more substances at the same time (rifampicin, etambutol). For an effective treatment, it is necessary to take several medications simultaneously. Although the incidence and mortality of the disease lowered in the last years, this achievement is often overlooked because of increasing infections with multiple drug-resistant *M. tuberculosis* or an even worse form of resistance. Due to the resistance of strains to the existing methods of treatment, new forms of active substances for treatment of tuberculosis are being developed, these are direct inhibitors of enzyme InhA: tetrahydropyran derivatives, triclosan derivatives, pyridomycin, 4-hydroxy-2-pyridones, thiadiazoles.

In the experimental part of our work, we focused on the effect of bioisosteric replacement of central phenyl group on the inhibitory activity of the tetrahydropyran type InhA inhibitors. With the help of ring equivalents, we replaced phenyl group with thiophene and thiazole. During this part of our work, we encountered a certain type of reactions, e.g. radical halogenation – bromination, reduction of nitriles to amines and coupling reactions. We synthesized two final compounds: compound **8**: 5-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*((4-(4-phenylthiazol-2-yl)tetrahydro-2*H*pyran-4-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide, and compound **16**: 2-((3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-*N*((4-(4-phenylthiazol-2-yl)tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)methyl)thiazole-4-carboxamide.

After the synthesis was completed, we analyzed the final compounds with nuclear magnetic resonance and high resolution mass spectrometry. We also checked the purity of the compounds with high performance liquid chromatography. The final compounds were tested on enzyme InhA for the values of IC<sub>50</sub>. Based on the results of the analysis, thiophene proved to be the better replacement of phenyl. We also managed to prepare a purer tetrahydropyran derivative with thiophene than with thiazole and it showed a lower IC<sub>50</sub> value than thiazole.

**Key words:** tuberculosis, direct InhA inhibitors, tetrahydropyran derivatives, bioisosteric replacement.



## Seznam okrajšav

ACP	acil prenašalni protein (ang. acyl carrier protein)
ACN	acetonitril
AIBN	azobisisobutironitril (2-(azo(1-ciano-1-metiletil))-2-metilpropan nitril)
CDCl <sub>3</sub>	devterirani kloroform
d	dublet
DCM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
ESI	elektrozapršilna ionizacija (ang. electrospray ionization)
Et <sub>3</sub> N	trietilamin
EtOH	etanol
EtOAc	etil acetat
FAS	sintaza maščobnih kislin (ang. fatty acid synthase)
GSK	GlaxoSmithKline
HATU	1-[Bis(dimetilamin)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i> ]piridin 3-oksidi heksafluorofosfat
Hex	heksan (ang. hexane)
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (ang. human immunodeficiency virus)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
HTS	rešetanjem visoke zmogljivosti (ang. high throughput screening)
IC <sub>50</sub>	srednja zaviralna koncentracija
INH	izoniazid
InhA	mikobakterijska enoil ACP reduktaza
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
KatG	mikobakterijska katalaza-peroksidaza
MDR-TB	tuberkuloza odporna na izoniazid in rifampicin (ang. multidrug resistant tuberculosis)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektroskopija

NAD <sup>+</sup> /H	nikotinamid adenin dinukleotid
NBS	<i>N</i> -bromosukcinimid
NMR	jedrska magnetna resonanca
q	kvartet
R <sub>f</sub>	retencijski faktor
s	singlet
t	triplet
TB	tuberkuloza
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoplastna kromatografija
TDR-TB	tuberkuloza odporna na vse protituberkulozne spojine prvega in drugega izbora (ang. totally drug-resistant tuberculosis)
<i>t<sub>r</sub></i>	retencijski čas (min)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)
XDR-TB	tuberkuloza odporna na vsaj tri od šestih razredov antituberkulotikov drugega izbora (ang. extensively drug-resistant tuberculosis)
ZU	zdravilna učinkovina
$\lambda$	valovna dolžina
$\eta$	izkoristek
$\delta$	kemijski premik

# 1. Uvod

## 1.1 Tuberkuloza

Tuberkuloza (TB) je bolezen, ki jo povzroči bakterija *Mycobacterium tuberculosis*, gre za nalezljivo in nevarno bolezen, v nekaterih primerih tudi smrtno. *Mycobacterium tuberculosis* je mikobakterija, ki je paličaste oblike in dolžine 1-10  $\mu\text{m}$  (1, 2).

Vsako leto odkrijejo devet milijonov novih okužb, za katero umre približno milijon in pol bolnikov. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) poroča, da je v letu 2011 zaradi tuberkuloze umrlo skoraj milijon ljudi in pol milijona ljudi, ki so že bili okuženi z virusom HIV. V letu 2016 je bilo odkritih 6,3 milijona novih okužb s tuberkulozo, uspešnost zdravljenja pa je bila 83 %, podobno prejšnjim letom (3, 4).

Znaki okužbe s TB so dolgotrajen kašelj, bolečina v prsih, povišana temperatura, nočno znojenje in hujšanje. V veliki večini bolezen prizadene pljuča, lahko pa tudi ostale organe (kosti, ledvica, jajčnike, bezgavke,...) razen mišic. Tuberkuloza se prenaša z okuženim aerosolom oziroma z vdihavanjem okuženega zraka. Aerosol nastaja pri kašljanju, kihanju, glasnem govorjenju ali petju oseb s pljučno obliko tuberkuloze (5).

Standardno zdravljenje poteka s protibakterijskimi učinkovinami, natančneje z izoniazidom ali več učinkovinami hkrati (rifampicin, etambutol). Za učinkovito zdravljenje tuberkuloze je potrebno sočasno jemanje več zdravil, ki se jih postopoma ukinja, ko se stanje pacienta izboljša. Čeprav se je pojavnost in smrtnost boleznih v zadnjih letih močno zmanjšala, je ta napredek pogosto spregledan zaradi naraščanja razširjenosti okužb z večkrat odpornimi bakterijami tuberkuloze (MDR-TB) in še hujše oblike odpornosti bakterij tuberkuloze (XDR-TB) (3, 6).

Mikobakterije so razvile odpornost na izoniazid in rifampicin, ki sta zdravilni učinkovini (ZU) prve izbire pri zdravljenju tuberkuloze. V tem primeru govorimo o MDR-TB, pri taki okužbi pacienta ne moremo zdraviti z zgoraj omenjenimi ZU. Prvi odporen bakterijski sev na antibiotično zdravljenje tuberkuloze so odkrili v New Yorku. V štirih letih so prepoznali, da je sev odporen na zdravilni učinkovini prve izbire. Potreben je bil velik napor in velik denarni vložek (10 milijonov dolarjev), da so ga spravili pod nadzor (1, 7).

V globalnem merilu je z MDR-TB okuženih 3,7 % novih pacientov in 20 % tistih, ki so se že zdravili za tuberkulozo. Najvišji odstotek okuženih prihaja iz centralne Azije in vzhodne

Evrope. Najnovejši podatki iz leta 2016 govorijo, da je bilo 600.000 novih okužb z MDR-TB, pri čemer je približno 50 % teh primerov bilo iz Indije, Kitajske in Rusije (3, 4).

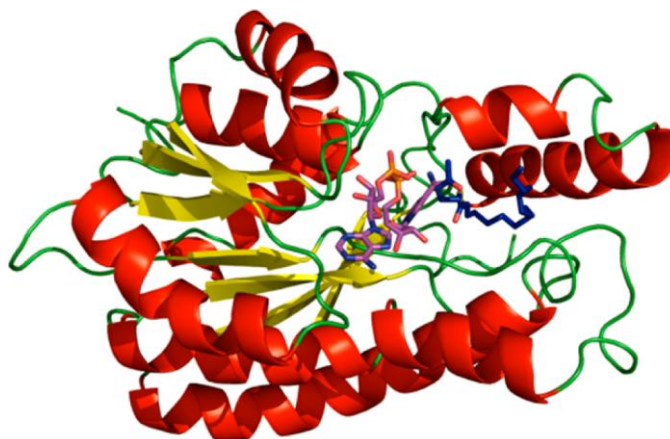
Smrtnost bi lahko zmanjšali s pomočjo zgodnejšega diagnosticiranja in primernejšega zdravljenja. V nekaterih državah je postalo zelo težko zdraviti to obliko tuberkuloze, saj druge ZU za zdravljenje TB niso na voljo, so dražje in z več neželenimi učinki. Lahko se razvije tudi hujša oblika odpornosti XDR-TB, kjer so različni sevi bakterij razvili odpornost na še več ZU za zdravljenje TB (vsaj 4 različne ZU hkrati in vsaj na tri od šestih razredov antituberkulotikov druge linije), s čimer se zmanjšajo možnosti za zdravljenje. Bakterije so odporne na izoniazid in rifampicin, poleg tega pa tudi na nekatere vrste fluorokinolonov (kot npr. levofloksacin ali moksifloksacin) in vsaj še na eno vrsto zdravil druge linije, kot sta amikacin, kanamicin. Pred kratkim se je začel pojavljati tudi izraz »totally drug-resistant tuberculosis« (TDR-TB), kar bi lahko prevedli kot popolna odpornost sevov bakterij na zdravilne učinkovine tuberkuloze. Natančneje pa pomeni, da okužbe ni mogoče zdraviti z antituberkulotiki prve in druge linije (3, 6).

Veliko težavo pri zdravljenju predstavlja tudi sočasna okužba z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) in TB. Vendar je večina okužb s TB ozdravljivih. S trenutnim dolgim in kompleksnim režimom zdravljenja, ki lahko privede do odpornosti in s tem slabšega učinkovanja ter večjega števila neželenih učinkov, samo zdravljenje ni optimalno. Še vedno je nujen razvoj novih antituberkulotikov, z novimi kemijskimi skeleti/strukturami, s točno določenimi zaviralnimi načini in novimi mehanizmi delovanja (8).

Poleg tega bi morali z novimi zdravilnimi učinkovinami skrajšati čas zdravljenja, morali bi imeti dober farmakokinetični profil ob manjših odmerkih oz. manjši frekvenci odmerjanja, minimalnih neželenih učinkih in interakcijah z drugimi zdravili (3).

## 1.2 Zaviralci InhA

InhA je encim, ki je odvisen od reducirane oblike nikotinamid adenin nukleotida (NADH), natančneje gre za 2-trans-enoil-acil prenašalno proteinsko reduktazo, kjer se maščobne kisline sintetizirajo po sintezni poti 2 (FAS II) v bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* (1, 9).

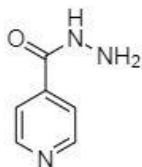


Slika 1: Tridimenzionalna struktura encima InhA (roza barva predstavlja NADH, modra pa maščobne kisline) (prirejeno po (3)).

Proteinska reduktaza je odgovorna za zadnjo stopnjo pri procesu podaljševanja maščobnih kislin pri FAS II biosintezni poti. InhA, katerega tridimenzionalna struktura je predstavljena na sliki 1, je klinično validirana tarča pri iskanju zdravilnih učinkovin za tuberkulozo, saj zaviranje encima privede do smrti bakterije (3).

### 1.2.1 Isoniazid

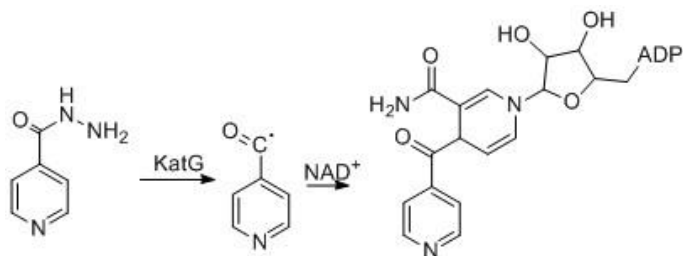
Zaviranje InhA je zelo učinkovito za ubijanje *M. tuberculosis*, kar dokazuje tudi izoniazid, ki je eden izmed najučinkovitejših antituberkulotikov. Isoniazid pride v mikobakterijsko celico s pasivno difuzijo. Strukturna formula izoniazida (INH) je prikazana na sliki 2.



Slika 2: Strukturna formula izoniazida.

Isoniazid je predzdravilo, ki ga aktivira mikobakterijski encim KatG. KatG je multifunkcionalna katalaza-peroksidaza, ki ima tudi NADH-oksidazno aktivnost. Predvidevajo, da aktivacija izoniazida s KatG ob prisotnosti različnih oksidantov vodi do nastanka izonikotinoil acilnega radikala. KatG preko uporabe peroksidov katalizira

oksidacijo izoniazida. Izonikotinoil acilni radikal se nato kovalentno poveže z  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , pri čemer nastane aktivna oblika, adukt izoniazid-NADH, za katerega je ugotovljeno, da je močan zaviralec encima InhA. Mehanizem aktiviranja izoniazida z KatG je prikazan na sliki 3 (6, 10, 11).

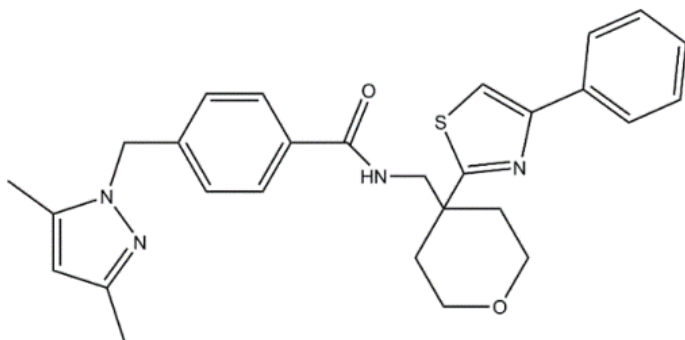


Slika 3: Mehanizem aktivacije INH s KatG (prirejeno po (6)).

Isoniazid so odkrili leta 1952 in je še vedno v uporabi pri zdravljenju TB. V večini primerov zdravljenja je učinkovit, vendar obstajajo tudi sevi, ki so nanj odporni. Odpornost je posledica mutacij na encimu KatG, zato se pospešeno išče nove, direktne zaviralce InhA, ki za svoje delovanje ne potrebujejo bioaktivacije in posledično niso podvrženi rezistenci (6, 9).

### 1.2.2 Direktni zaviralci InhA

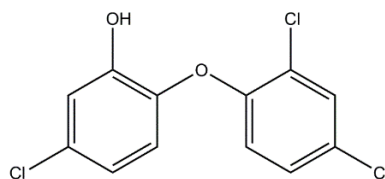
Odpornost na obstoječa zdravila izbire za zdravljenje TB je privedla do intenzivnejšega razvoja novih zdravilnih učinkovin, ki za svoje delovanje ne potrebujejo aktivacije. V zadnjih nekaj letih odkrivajo številne obetavne, strukturno različne skupine direktnih zaviralcev InhA. Ena izmed na novo odkritih zaviralcev InhA so tudi **tetrahidropiranski derivati**, ki so bili odkriti s pomočjo rešetanja visoke zmogljivosti (HTS). Spojina vodnica je bila re-sintetizirana in je učinkovito zavirala InhA pri *in vitro* testih, izkazala antimikobakterijsko aktivnost tudi pri zaviranju *M. tuberculosis* v okuženih pljučnih granulomih. Strukturna formula spojine vodnice je prikazana na sliki 4 (1).



Slika 4: Strukturna formula spojine vodnice tetrahidropiranskega derivata (povzeto po (1)).

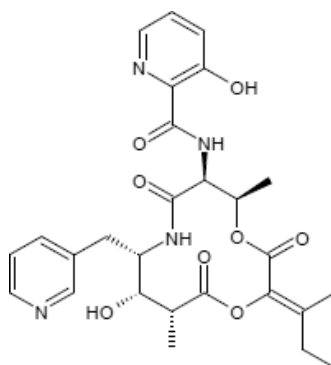
Ostali novejši direktni zaviralci InhA spadajo v štiri skupine:

Derivati **triklosana**: **Triklosan** ima širok spekter antimikrobne aktivnosti, ima omejeno terapevtsko okno, potrebna je intravenska aplikacija. Čeprav njegova antimikobakterijska aktivnost ni najvišja, je še vedno atraktiven za nadaljnjo optimizacijo in raziskovanje njegovih derivatov. Strukturna formula triklosana je prikazana na sliki 5 (3, 8).



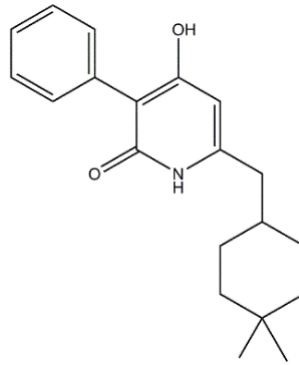
Slika 5: Strukturna triklosana.

**Piridomicin**: **Piridomicin** je naravni produkt, ki ga proizvaja *Dactylosporangium fulvum*. Z genetskimi eksperimenti so ugotovili, da je direktni kompetitivni zaviralec na NADH-vezavnem mestu encima InhA. Ta naravni produkt je pokazal dobro zaviralno delovanje na InhA z baktericidnim učinkom na *M. tuberculosis*. Strukturna piridomicina je prikazana na sliki 6 (8).



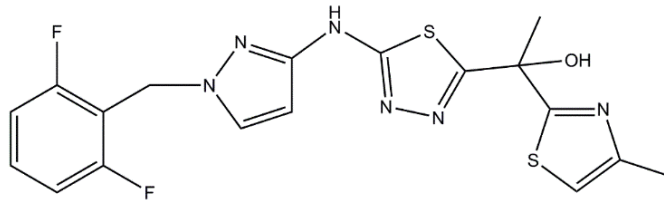
Slika 6: Strukturna formula piridomicina (povzeto po (12)).

**4-hidroksi-2-piridoni**: **4-hidroksi-2-piridon** je bil odkrit z HTS, gre za učinkovino, ki jo lahko apliciramo *per os*, z baktericidnim učinkom na nekatere seve, ki so odporni na izoniazid. Strukturna spojine vodnice derivatov 4-hidroksi-2-piridonov je prikazana na sliki 7 (8).



Slika 7: Struktura spojine vodnice derivatov 4-hidroksi-2-piridona.

**Tiadiazoli:** Ta skupina zaviralcev je bila odkrita s pomočjo HTS v podjetju GlaxoSmithKline (GSK). Spojina vodnica je dober zaviralec InhA ( $IC_{50} = 4 \text{ nM}$ ), z delovanjem tudi na bakterije *M. tuberculosis* ( $MIC = 0,2 \mu\text{M}$ ). Struktura spojine vodnice je prikazana na sliki 8 (3, 8).



Slika 8: Struktura spojine vodnice s tiadiazoli.



### 1.3 Bioizosternost pri načrtovanju zdravilnih učinkovin

Bioizosteri so atomi ali molekule, ki ustrezajo definiciji za izostere. Kar pomeni, da imajo kemijske in fizikalne podobnosti, ki privedejo do podobnih bioloških lastnosti v kemijski spojini oz. potencialni zdravilni učinkovini. V biološko aktivni spojini zamenjava atoma oz. skupine atomov z drugim, ki ima enake fizikalno-kemijske lastnosti, temelji na konceptu izosternosti (13).

Izosternost je leta 1919 predstavil Langmuir, opisal je podobnosti v fizikalnih značilnostih med atomi, funkcionalnimi skupinami, radikali in molekulami. Izosterne skupine imajo enako število elektronov in posledično tudi enako število atomov. Bistvena razlika med izosteri je omejena na naboj jedra med konstituiranimi atomi. Sledil je Grimmov zakon hidridnih zamenjav, ki razlaga, da adicija vodika k atomom da nastalemu pseudoatomu značilnosti atoma, ki je v sosednji desni skupini (13).

Bioizosteri so izosteri z enakim oziroma podobnim biološkim učinkom (po Friedmanu). Burger je leta 1990 že bolj specificiral, da gre za atome, skupine, ione ali molekule, ki imajo podoben volumen, podobno obliko, podobno število elektronov in njihovo razporeditev v zunanji lupini, torej podobne fizikalne lastnosti in enako tarčo (13).

Pri načrtovanju učinkovin z bioizosterno zamenjavo želimo spremeniti:

- biološke lastnosti spojine vodnice, brez velikih sprememb na kemijski strukturi,
- povečati varnost oz. zmanjšati toksičnost,
- vplivati na učinkovitost, jakost in selektivnost,
- spremeniti metabolizem potencialne učinkovine,
- vplivati na stroške sinteze.

Farmacevtski kemiki uporabljajo majhne spremembe v spojini vodnici, tako da uporabijo preproste organske reakcije, kot so hidrogeniranje, hidroksiliranje, metiliranje, acetiliranje, kiralno ločbo, sprememba substituentov in **bioizosterne zamenjave**. Z majhnimi modifikacijami lahko dosežemo povečanje učinka, povečanje selektivnosti in zmanjšanje neželenih učinkov (14).

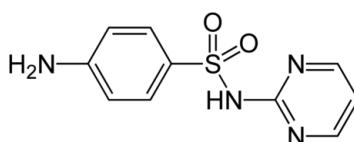
Klasifikacija bioizosternosti: **klasični** in **neklasični** bioizosteri.

Med klasične bioizostere uvrščamo: **monovalentne, dvovalentne, trivalentne, tetravalentne bioizostere** ter **obročne ekvivalente**. V preglednici I lahko vidimo, kateri bioizosteri spadajo v posamezno skupino.

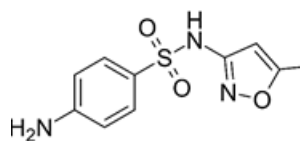
*Preglednica I: Monovalentni, dvovalentni, trivalentni in tetravalentni bioizosteri.*

1-valentni	2-valentni	3-valentni	4-valentni
-OH, -NH <sub>2</sub> , -CH <sub>3</sub> , -OR	-CH <sub>2</sub> -	=CH-	=C=
-F, -Cl, -Br, -I, -SH, -PH <sub>2</sub>	-O-	=N-	=Si=
-Si <sub>3</sub> , -SR	-S-	=P-	=N <sup>+</sup> =
	-NH-	=As-	=P <sup>+</sup> =
	-Se-	=Sb-	=As=
	-Te-		=Sb <sup>+</sup> =

Primeri zamenjav pri obročnih ekvivalentih so na primer pri sulfonamidnih protibakterijskih učinkovinah. Pri slednjih lahko fenilno skupino zamenjamo s heterociklično skupino, pri čemer ni bistvene razlike v aktivnosti spojine med originalno učinkovino in njenim izosterom. Obe strukturi zdravilnih učinkovin vidimo na slikah 9 in 10 (13).



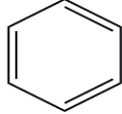
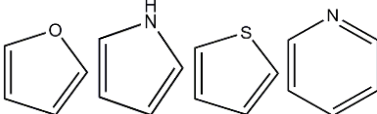
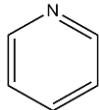
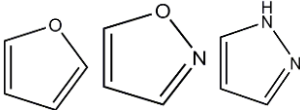
*Slika 9: Strukturna formula sulfadiazina.*



*Slika 10: Strukturna formula sulfametoksazola.*

Obročni ekvivalenti, predstavljeni v preglednici II, ki se najbolj pogosto uporabljajo pri bioizosternih zamenjavah.

Preglednica II: Obročni ekvivalenti.

Med **neklasične bioizostere** pa uvrščamo tiste, za katere ne velja definicija za klasične izostere (glede sterične in elektronske definicije klasičnih izosterov), poleg tega ponavadi nimajo enakega števila atomov s tistim, katerega želimo zamenjati. Med neklasične bioizostere uvrščamo **ciklične-neciklične bioizosterne zamenjave** ter **neklasične bioizosterne zamenjave funkcionalnih skupin** (13).

Bioizosterna zamenjava je v veliko pomoč pri načrtovanju in odkrivanju novih učinkovin, optimizaciji in izboljšanju lastnosti učinkovin. Namen zamenjave enega bioizostera z drugim je v izboljšanju zelenih bioloških in fizikalnih lastnosti spojin brez velikih sprememb v kemijski strukturi. Ne gre za enostavno zamenjavo z drugim izosterom, ampak je potencialne izostere pred tem potrebno analizirati glede strukture, topnosti, preveriti elektronske parametre, da molekula ohrani podobno biološko aktivnost (13).

Pravilo majhnih sprememb pri optimiziranju spojin vodnic se v praksi velikokrat spregleda, čeprav lahko že z majhnimi spremembami, ki so relativno poceni, dosežemo odlične rezultate (14).

## 1.4 Radikalno halogeniranje - BROMIRANJE

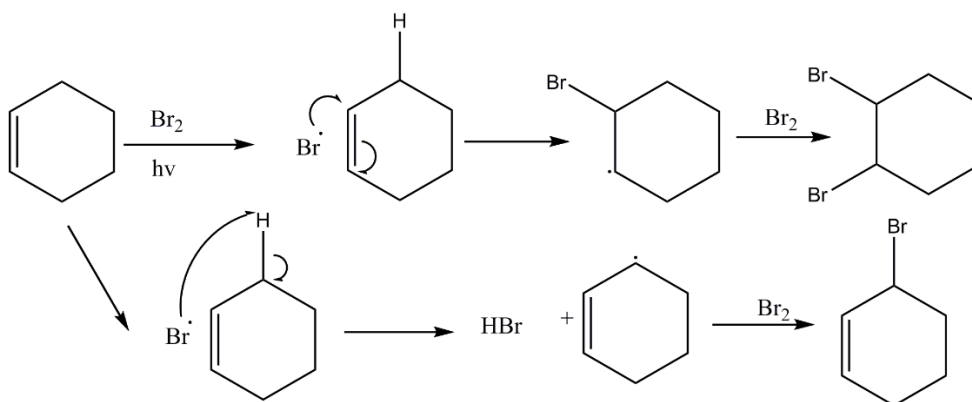
Gre za tipičen primer radikalske verižne reakcije: substitucije. Od radikalskih substitucij je najbolj raziskano in uporabljeno halogeniranje. Reakcijo običajno sprožimo s fotolizo in hitrost je odvisna od stopnje, v kateri se vodik odcepi iz spojine (15).

Reakcija poteka tako, da v prvi stopnji (iniciiranje, sprožitev) nastanejo radikali halogena (npr. fotokemijsko), ki jih potrebujemo za sprožitev reakcije. Ti potem v drugi stopnji (propagacija, širitev) reagirajo tako, da odcepijo vodikov atom, pri čemer nastane reaktivni ogljikov radikal. Ta v tretji stopnji (terminacija, prekinitev) reagira z reagentom (halogenom), pri čemer nastane končni produkt in nov halogenov radikal, ki vstopi v začetno stopnjo (16).

Selektivnost radikalskih reakcij je odvisna od jakosti vezi, ki se cepijo in nastajajo, pri čemer se upošteva tudi razmerje med številom vodikovih atomov, vezanih na primarne, sekundarne in terciarne ogljikove atome. Bromiranje je bolj selektivno od kloriranja alkanov (16).

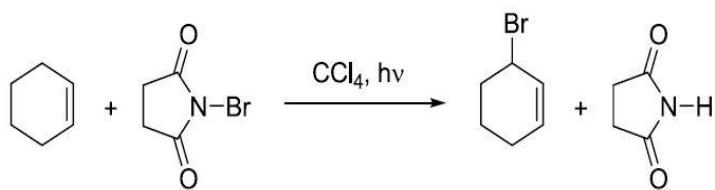
### Selektivne radikalske substitucije: alilno bromiranje

Radikalska reakcija z bromom **ni** selektivna. Fotoliza broma sproži reakcijo in se nato širi, kot je prikazano na sliki 11 (zgornji del sheme). Tekom reakcije poteka v omejenem obsegu tudi alilno bromiranje (spodnji del sheme na sliki 11); brom se veže na alilno C-H vez, ki je šibkejša kot sekundarna C-H vez, pri tem izhaja HBr (16).



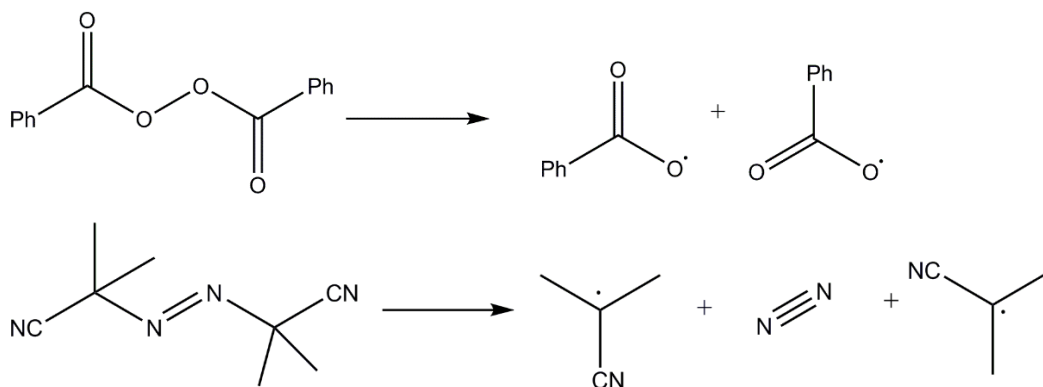
Slika 11: Shematski prikaz radikalskih reakcij z bromom (prirejeno po (16)).

Tipična reakcija alilnega bromiranja je predstavljena na sliki 12. Radikalska reakcija z *N*-bromosukcinimidom (NBS), ki tvori majhno količino Br<sub>2</sub> in ohranja njegovo koncentracijo nizko, **je selektivna**. Pri reakciji kot topilo uporabljamo tetraklorometan (16).



Slika 12: Bromiranje z NBS.

Namesto svetlobe oz. fotolize za sprožitev reakcije lahko uporabimo tudi iniciator (npr. dibenzoil peroksid ali azobisizobutironitril (2-(azo(1-ciano-1-metiletil))-2-metilpropan nitril), krajše AIBN). Na sliki 13 sta predstavljena oba iniciatorja, zgornji je dibenzoil peroksid, ki ob temperaturi med 60 in 80°C razpade na dva radikala in s tem aktivira NBS za potek reakcije. Spodnji iniciator na sliki 14 pa je AIBN, pri katerem homoliza poteče pri temperaturi okoli 65°C. Nastanejo stabilizirani nitrilni radikali (16, 17).



Slika 13: Shema prikaza razpada iniciatorjev na radikale, s katerimi aktiviramo NBS za potek reakcije (prirejeno po (16)).

Po podatkih iz literature reakcija najbolj optimalno poteče v dveh urah ob konstantnem mešanju pri temperaturi okoli 80 °C in kot topilo uporabljenim tetraklorometanom (18).

## 1.5 Redukcija nitrila do amina

Redukcijo širokega spektra nitrilov do primarnih aminov lahko dosežemo z nikljevimi boridom, ki nastane *in situ* ob prisotnosti suhega etanola pri sobni temperaturi (19).

$\text{NaBH}_4$  je šibkejši reducent kot litijev aluminijev hidrid. Če ju primerjamo, je  $\text{NaBH}_4$  cenejši, lažji in varnejši za uporabo.  $\text{NaBH}_4$  ponavadi ne reducira funkcionalnih skupin, kot so estri, nitro skupine, amidi in nitrili.  $\text{NaBH}_4$  je boljši reducent, če se v reakciji uporabijo tudi kovinske soli. Med temi se največkrat omenjajo Ni(II) soli, saj močno vplivajo na reaktivnost  $\text{NaBH}_4$  (19).

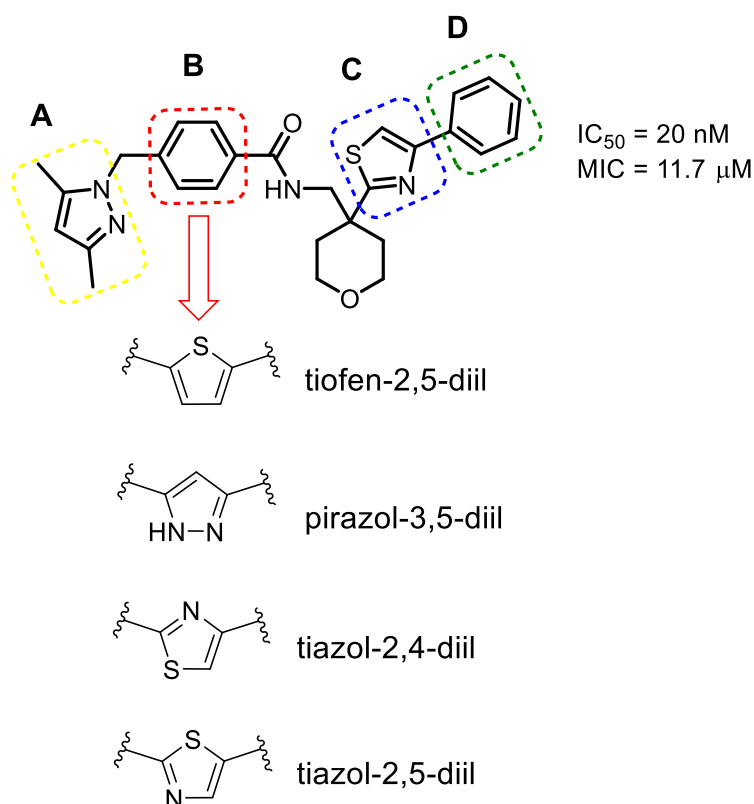
*In situ* pripravljen nikljev borid se uporablja kot katalizator, ki močno pospeši reakcijo redukcije nitrilov do primarnih aminov pod vodikovo atmosfero (19).

Poročali so tudi, da je redukcija nitrilov do primarnih aminov mogoča z nikljevimi boridom, ki nastane *in situ* iz nikljevega (II) klorida in  $\text{NaBH}_4$ . V reakciji nastanejo tudi majhne količine sekundarnih aminov, kar niso uspeli preprečiti ne glede na pogoje reakcije (19).

Redukcija nitrila do amina lahko poteka še na druge načine, eden od njih je tudi redukcija z  $\text{NaBH}_4$  in  $\text{CoCl}_2$ . Kombinacija  $\text{NaBH}_4$  s kovinskimi halidi, kot so Co (II), Ni (II), Cu (II) in Rh (III) reducira funkcionalne skupine, kot so nitrili, amidi in olefini, kateri brez prisotnosti kovinskih halidov ne reagirajo z  $\text{NaBH}_4$  (20).

## 2. Načrt dela

Pri eksperimentalnem delu se bomo osredotočili na bioizosterno zamenjavo osrednje fenilne skupine na tetrahidropiranskemu tipu InhA zaviralcev. Tetrahidropiranski derivat, natančneje 4-((3,5-dimetil-1*H*-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)benzamid, katerega strukturno formulo vidimo na sliki 14, je bil rezultat rešetanja visoke zmogljivosti (HTS) v družbi GlaxoSmithKline. Razvoj zaviralcev na osnovi zadetka pa se je nadaljeval na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, natančneje na Katedri za farmacevtsko kemijo (1).

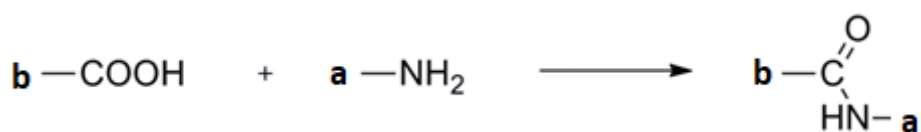


Slika 14: Tetrahidropiranski tip direktnih InhA zaviralcev in načrtovane bioizosterne zamenjave za fenil.

Spojina na sliki 14 je izkazala dobre zaviralne lastnosti encima InhA, IC<sub>50</sub> je znašal 20 nM in MIC 11,7 μM. Nadalje je bil razvoj usmerjen v raziskovanje kemijskega prostora obroča A (rumen), obroča C (moder) in obroča D (zelen) na sliki 14. Sprememb niso uvajali na mestu amida, slednji tvori vodikove vezi, in na mestu tetrahidropirana, ki povzroči, da spojina zavzame konformacijo, ki spominja na podkev. Tetrahidropiran sicer ne tvori specifičnih interakcij z aktivnim mestom InhA (1).

V našem primeru se bomo osredotočili na zamenjavo fenilnega obroča B, ki je na sliki 14 obkrožen z rdečo. Na mesta A, C in D pa ne bomo uvajali sprememb. Obroč B nameravamo zamenjati s strukturami, kot so heterociklične aromatske spojine (tiofen, tiazol, pirazol), ki služijo kot bioizosterna zamenjava fenilni skupini.

Eksperimentano delo bo potekalo na naslednji način: sinteze bodo sestavljene iz dveh delov, dela **a (amin)** in dela **b (karboksilna kislina)** (slika 15), ki ju bomo na koncu združili s sklopitvenimi reakcijami (z amidno vezjo). Del **a** bo enak za vse sklopitvene reakcije, del **b** pa bo vseboval različne bioizosterne zamenjave osrednje fenilne skupine (tiofen, pirazol, tiazol).



Slika 15: Sklopitvena reakcija, ki bo sestavljena iz dela a (sintez do amina) in dela b (sintez do karboksilne kisline).

Po končani sintezi bomo analizirali končne spojine z NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) in HRMS. Preverili bomo tudi čistost dobljenih spojin s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Končnim spojinam bodo na encimu InhA določili vrednost  $\text{IC}_{50}$ .



## 3. Materiali in metode

### 3.1 Materiali

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu, so bili naslednjih proizvajalcev:

- Sigma Aldrich,
- Apollo Scientific,
- Acros Organics,
- Fluka,
- Carlo Erba,
- Merck.

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali programsko opremo ChemDraw Profesional 12.0. Obdelava NMR spektrov je potekala v programu MestReNova. Obdelava HPLC analiz pa v programu Chromeleon.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Kromatografske metode

Pri **tankoplastni kromatografiji** (TLC) smo uporabljali plošče TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> proizvajalca Merck. Na aluminijastem nosilcu je nanos 0,2 mm silikagela, plošče so dimenzije 20 × 20 cm. Kot mobilno fazo (MF) smo uporabljali različne kombinacije topil, ki so navedene pri posamezni sintezi. Spojine smo na TLC ploščah detektirali z UV svetlobo ( $\lambda = 254$  nm) ter orositvenima reagentoma ninhidrinom in fosfomolibdensko kislino.

**S kolonsko kromatografijo** smo čistili produkte, pri čemer smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel 60 z velikostjo delcev od 0,04 do 0,063 mm proizvajalca Merck. Mobilne faze so navedene pri posameznih sintezah.

**Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti** (HPLC) je kromatografska metoda, ki smo jo uporabili za določitev čistote oz. prisotnosti nečistoč v končnih spojinah, izvajali smo jo na instrumentu Thermo Scientific UltiMate 3000. Uporabili smo kolono Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 × 100 mm, izvajali smo gradientno ločbo.

Kot mobilno fazo smo uporabljali vodo in acetonitril (ACN), katerima smo spreminjali deleža s časom. V preglednici III vidimo spreminjanje deleža ACN in vode med samo analizo.

Preglednica III: Sestava mobilne faze med analizo.

Čas (min)	Voda (%)	ACN (%)
0	80	20
20	10	90
25	10	90
28	80	20

Koncentracija vzorcev za izvedbo analize je znašala 0,2 mg/mL. Injiciran volumen posameznega vzorca je bil 10 µL, pretok je med potekom analize znašal 0,3 mL/min. Posamezna analiza je potekala 28 min. Kot stacionarno fazo smo uporabili kolono C18 1.7 µm, dimenzije 2,1 × 100 mm. Kot detektor je bil uporabljen detektor z diodnim nizom, angleško »diode array detector« (DAD), merili pa smo pri valovni dolžini 254 nm.

### 3.2.2 Spektroskopske metode

**Jedrska magnetna resonanca (NMR):** NMR spektri so bili posneti na instrumentu Bruker Avance III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranem topilu CDCl<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H spektri so bili posneti pri 400 MHz, <sup>13</sup>C spektri pa pri 100 MHz.

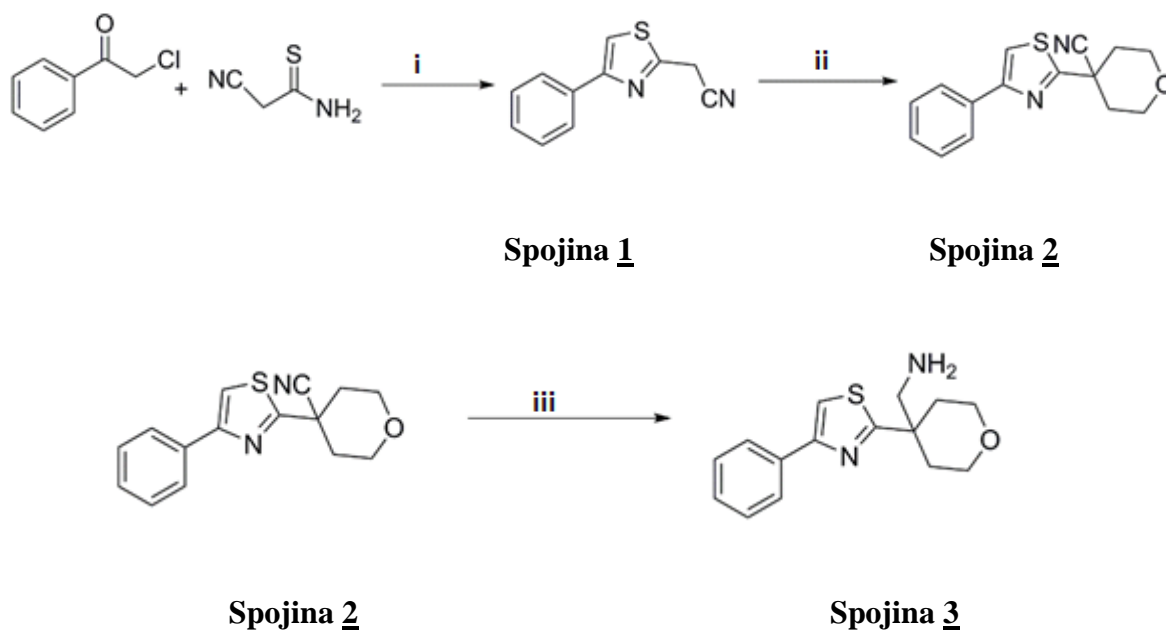
**Masna spektrometrija (MS):** MS spektre so posneli na Fakulteti za farmacijo na masnem spektrometru Expression L CMS proizvajalca Advion z ESI tehniko. HR-MS spektre pa so posneli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani z masnim spektrometrom Thermo Scientific, Q Exactive Plus.

### 3.2.3 Določanje tališča

Produktom oziroma spojinam v trdnem agregatnem stanju smo določili temperaturo tališča oziroma talilni interval. Tališče smo določali na talilnem mikroskopu Cambridge instruments z grelno mizico Reichert.

## 4. Eksperimentalni del

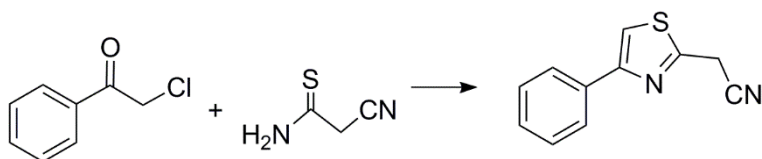
### 4.1 Sinteza dela a: (4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina



**Reakcijska shema 1:** Sinteza (4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina, reagenti in pogoji sinteze: i - Et<sub>3</sub>N, THF, sobna temp., preko noči; ii - 1-kloro-2-(2-kloroetoksi)etan, NaH, DMF, sobna temp., 3 dni; iii – NiCl<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub>, EtOH.

#### 4.1.1 Sinteza 2-(4-feniltiazol-2-il)acetonitrila

Reakcija:



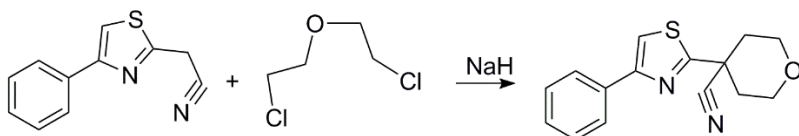
Spojina 1

**Opis postopka:** 2-cianotioacetamid (4,94 g, 0,05 mol, 1 ekvivalent) smo raztopili v brezvodnem THF (50 mL) in dodali fenacilklorid (1 ekvivalent,  $m = 7,7$  g) ter trietilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) 8,3 mL (1,2 ekvivalenta,  $m = 6,07$  g). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili  $\text{EtOAc} : \text{Hex} = 1:1$ . Reakcijski zmesi smo uparili THF in zaostanek raztopili v 50 mL  $\text{EtOAc}$ . Organsko fazo smo sprali z  $2 \times 50$  mL prečiščene vode,  $2 \times 30$  mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in 30 mL nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo  $\text{DCM} : \text{MeOH} = 20:1$ . Izolirali smo oranžen viskozen oljnat produkt (10,782 g).

<b>Molekulska formula:</b> $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$	<b>Molekulska masa:</b> 200,259 g/mol
<b>Izgled:</b> oranžen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,55 ( $\text{EtOAc} : \text{Hex} = 1 : 1$ )
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 108 \%$ (verjetno je prisoten še $\text{EtOAc}$ )	
Istovetnost produkta smo potrdili s TLC kromatografijo s standardom.	

#### 4.1.2 Sinteza 4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



Spojina 1

Spojina 2

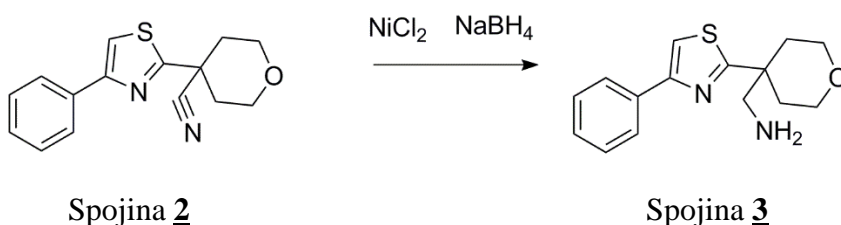
**Opis postopka:** Spojini 1 (10,75 g, 0,053 mol) smo dodali 1-kloro-2(2-kloroetoksi)etan (1 ekvivalent,  $V = 6,3$  mL) in ju raztopili v brezvodnem DMF (70 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli ter jo prepihali z argonom, nato smo postopoma dodajali  $\text{NaH}$  (2,4

ekvivalenta,  $m = 5,2$  g). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 3 dni. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:1. Reakcijski zmesi smo dodali nekaj kapljic očetne kisline za nevtralizacijo prebitnega NaH. Sledila je izolacija produkta. Uparili smo DMF in zaostanek produkta suspendirali v EtOAc (70 mL). Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo ( $3 \times 50$  mL), 50 mL 1 M HCl, 50 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo smo uporabili EtOAc : Hex = 1:5. Zmes smo nanesti na kolono s pomočjo suhega nanosa. Izolirali smo produkt v obliki oranžnih kristalov (2,956 g).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OS	<b>Molekulska masa:</b> 270,083 g/mol
<b>Izgled:</b> Oranžni kristali	<b>Rf:</b> 0,59 (EtOAc : Hex = 1 : 1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 20$ %	
<b>Temperatura tališča:</b> 91,8 – 96 °C	
Istovetnost produkta smo potrdili s TLC kromatografijo s standardom.	

#### 4.1.3 Sinteza (4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



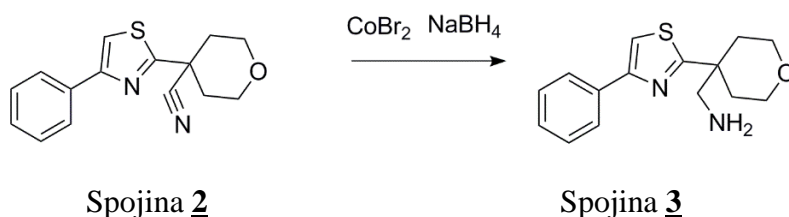
**Opis postopka:** V bučko smo natehtali 1 ekvivalent (0,440 g) nikljevega klorida (NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O) in ga segreli, da je izparela voda (barva pa se je spremenila iz zelene v zlato rumeno). Dodali smo spojino 2 (1 ekvivalent,  $m = 0,5$  g, 1,85 mmol) in ju raztopili v 10 mL brezvodnega etanola. Na ledeni kopeli smo mešali reakcijsko zmes ter postopoma dodajali NaBH<sub>4</sub> (3 ekvivalente, 0,210 g). Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot MF uporabili DCM : MeOH = 19:1 in orositvenim reagentom ninhidrinom. Potek reakcije smo prekinili z vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). Sledila je izolacija produkta, ki smo ga raztopili v EtOAc (10 mL). Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo ( $3 \times 10$  mL) in jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili še

s kolonsko kromatografijo, kjer smo kot MF uporabili DCM : MeOH v razmerju 19:1, nato v razmerju 9:1, ter na koncu v razmerju 1:6 z dodatkom nekaj kapljic NH<sub>3</sub> v vodi. Izolirali smo oljnat produkt, nadaljnja NMR analiza je pokazala, da je v izoliranem produktu prisotna voda, ki smo jo odstranili s koevaporacijo s toluenom (2 × 30 mL). Izolirali smo svetlo rumen oljnat produkt (0,257 g) in ga do uporabe hranili v hladilniku.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> OS	<b>Molekulska masa:</b> 274,382 g/mol
<b>Izgled:</b> svetlo rumen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,11 (DCM : MeOH= 19 :1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 54 %	
Istovetnost produkta smo potrdili s TLC kromatografijo s standardom.	

Z željo po boljšem izkoristku smo spojino **3** pripravili tudi na drug način. Namesto nikljevega klorida smo uporabili kobaltov bromid, katerega ni bilo potrebno segrevati, s čimer smo želeli vplivati na hitrejšo pripravo reakcijske zmesi in morda tudi boljši izkoristek reakcije.

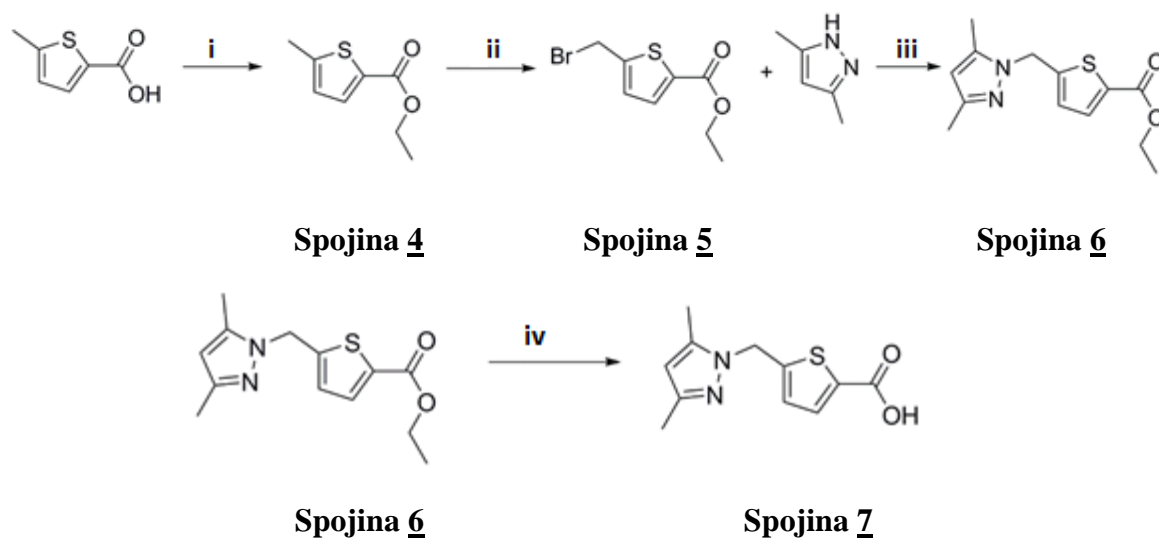
Reakcija:



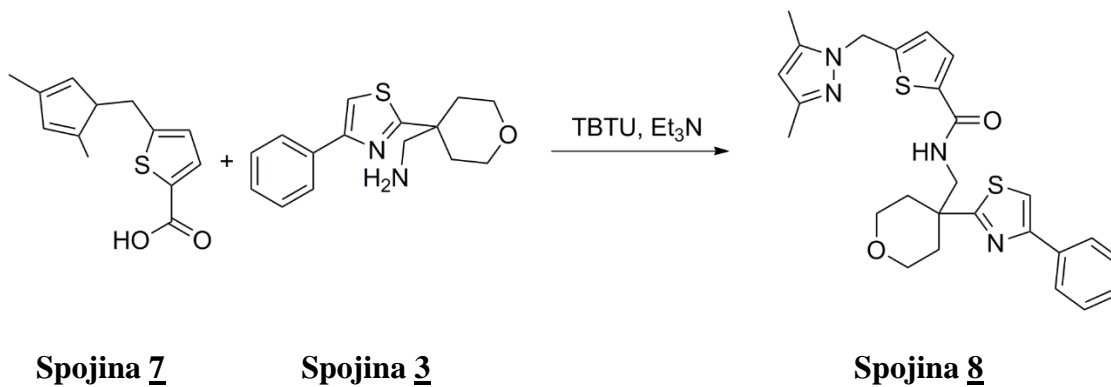
**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali 0,2 g spojine **2** (0,740 mmol), dodali CoBr<sub>2</sub> (1 ekvivalent, 0,162 g) in ju raztopili v 5 mL absolutnega alkohola. Reakcijski zmesi smo ob mešanju na ledeni kopeli postopoma dodajali NaBH<sub>4</sub> (5 ekvivalentov, 0,140 g). Potek reakcije smo periodično spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo uporabili mobilno fazo DCM : MeOH = 19:1). Potek reakcije smo prekinili z dodatkom nekaj kapljic očetne kisline. Reakcijsko zmes smo suspendirali v 20 mL EtOAc. Organsko fazo smo sprali z 2 × 20 mL prečiščene vode, z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (15 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparili pod znižanim tlakom. Potrebna je bila še kolonska kromatografija, kot mobilno fazo smo uporabili DCM : MeOH 19:1, nato 6:1. Izolirali smo zelo svetlo rumen oljnat produkt (m = 0,173 g).

<b>Izgled:</b> svetlo rumen oljnat produkt + črna usedlina	<b>Rf:</b> 0,188 (MF: DCM : MeOH=19:1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 85 %	

## 4.2 Sinteza dela b: s tiofenom



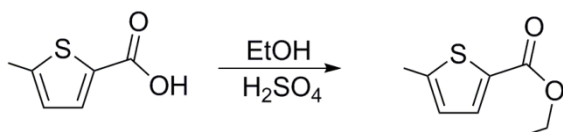
**Reakcijska shema 2:** Sinteza 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiofen-2-karboksilne kisline, reagenti in pogoji sinteze: i - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, EtOH, 92° C, 15 h; ii – NBS, AIBN, CHCl<sub>3</sub>, 65°C, preko noči; iii – NaH, DMF; iv – NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, sobna temp., 4 h.



**Sklopitvena reakcija 1:** Sinteza 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamida, reagenti in reakcijski pogoji: TBTU, Et<sub>3</sub>N, DCM, sobna temp., 1 h.

#### 4.2.1 Sinteza etil 5-metiltiofen-2-karboksilata

Reakcija:



#### Spojina 4

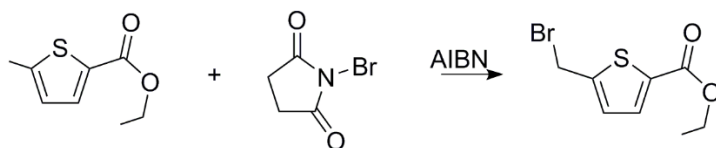
**Opis postopka:** 5-metiltiofen-2-karboksilno kislino (1,5 g, 10,5 mmol) smo suspendirali v 40 mL brezvodnega etanola in dodali 400  $\mu$ L žveplove (VI) kisline. Reakcijsko zmes smo mešali pod pogoji refluxa (92°C) 15 h. Potek reakcije smo periodično spremljali s TLC, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:1. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali natrijev karbonat in reakcijsko zmes mešali 30 min. Sledila je filtracija, po kateri smo filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom in zaostanek raztopili v EtOAc (25 mL). Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo (2  $\times$  25 mL), nasičeno raztopino NaCl (1  $\times$  25 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter uparili EtOAc pod znižanim tlakom. Izolirali smo temnozelen oljnat produkt (m = 1,64 g), ki smo ga uporabili v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 170,226 g/mol
<b>Izgled:</b> temnozelen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,63 ( EtOAc : Hex = 1 : 1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 92 \%$	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 1,36 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 2,52 (d, 3H, <i>J</i> = 1,2 Hz, Ar-CH <sub>3</sub> ); 4,32 (q, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 6,76 (dq, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 3,6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1,2 Hz, Ar-H); 7,61 (d, 1H, <i>J</i> = 3,6 Hz, H-Ar)	



#### 4.2.2 Sinteza etil 5-(bromometil)tiofen-2-karboksilata

Reakcija:



**Spojina 4**

**Spojina 5**

**Opis postopka:** Etil 5-metiltiofen-2-karboksilat smo raztopili v 10 mL kloroforma in dodali 1,2 ekvivalenta *N*-bromosukcinimida (NBS) ( $m = 0,494$  g, 2,91 mmol) ter katalitično količino iniciatorja AIBN. Reakcijsko zmes smo mešali pri 65 °C preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:2. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili  $\text{CHCl}_3$  in zaostanek raztopili v EtOAc. Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo ( $3 \times 20$  mL), 1 M HCl ( $1 \times 10$  mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \times 10$  mL) in z nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 10$  mL). Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in EtOAc uparili pod znižanim tlakom. Izolirali smo oljnat produkt oranžne barve ( $m = 0,720$  g).

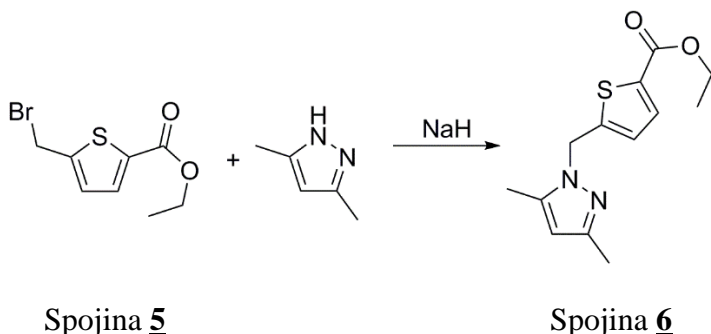
<b>Molekulska formula:</b> $\text{C}_8\text{H}_9\text{BrO}_2\text{S}$	<b>Molekulska masa:</b> 247,951 g/mol
<b>Izgled:</b> oranžen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,524 (EtOAc : Hex = 1 : 2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 99 \%$	
<b>NMR <math>^1\text{H}</math>:</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) 1,369 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 4,345 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 7,089 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, Ar-H); 7,632 (d, 1H, $J = 4$ Hz, H-Ar)	
<b>MS:</b> (ESI) $m/z$ 300,99 ( $\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}$ ) <sup>+</sup>	

Reakcijo smo izvedli še z drugim iniciatorjem, to je *tert*-butil peroksibenzoatom. Reakcijo smo izvedli pod enakimi pogoji kot v primeru iniciatorja AIBN. Izolirali smo oljnat produkt oranžne barve ( $m = 0,926$  g), reakcijo smo začeli z 0,435 g izhodnega estra.

<b>Izgled:</b> rdečeoranžen oljnat produkt
<b>Rf:</b> 0,59 (EtOAc : Hex = 1 : 2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 147 \%$ (EtOAc najverjetneje ni bil do konca uparjen.)

### 4.2.3 Sinteza etil 5-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)tiofen-2- karboksilata

Reakcija:

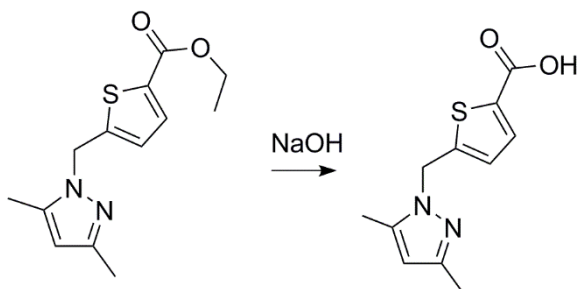


**Opis postopka:** Reakcijo smo izvedli v dveh delih. V prvo bučko smo natehtali etil 5-(bromometil)tiofen-2-karboksilat ( $m = 0,887$  g, 3,56 mmol), 1,1 ekvivalenta 3,5-dimetil-1H-pirazola ( $m = 0,376$  g) ter dodali katalitično količino kronskega etra (15-Crown-5). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom ter dodali brezvodni DMF (15 mL), počakali, da se reaktanti raztopijo ter na ledeni kopeli nato postopoma dodajali 1,3 ekvivalenta NaH ( $m = 0,185$ g). Reakcijsko zmes smo mešali preko noči pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot MF uporabili EtOAc : Hex = 1:2. Reakcijski zmesi smo dodali 5 mL NaHCO<sub>3</sub>, mešali 10 minut in raztopili v 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo (3 × 20 mL), 1 M HCl (1 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 × 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo nato sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOAc uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, za katero smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc: Hex = 1:3, nato 1:2. Izolirali smo kristale svetlo oranžne barve ( $m = 0,123$  g).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 264,343 g/mol
<b>Izgled:</b> kristali svetlo oranžne barve	<b>Rf:</b> 0,24 (EtOAc : Hex = 1 : 2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 13$ %	
<b>Temperatura tališča:</b> 44,2 – 47,9 °C	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 1,34 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 2,23 (s, 6H, 2 × Ar- CH <sub>3</sub> ); 4,31 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 5,33 (d, 2H, $J = 0,8$ Hz, CH <sub>2</sub> ); 5,845 (s, 1H, H-Ar); 6,85 (dt, 1H, $J_{1,2} = 3,6, 0,8$ Hz, Ar-H); 7,63 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-Ar)	
<b>MS:</b> (ESI) 286,82 (M+Na) <sup>+</sup>	

#### 4.2.4 Sinteza 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiofen-2-karboksilne kisline

Reakcija:



Spojina 6

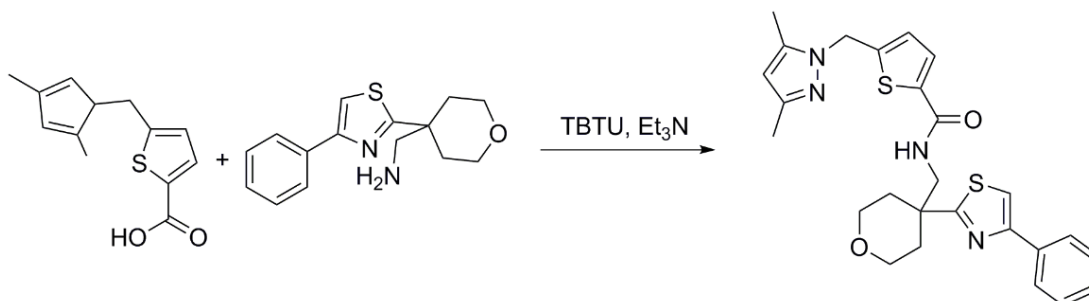
Spojina 7

**Opis postopka:** V bučko smo natehtali 0,046 g etil 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiofen-2-karboksilata (0,174 mmol) in ga raztopili v 3 mL metanola. Med mešanjem smo k reakcijski zmesi dodali štiri ekvivalente NaOH (0,030 g), raztopljenega v vodi. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 4 ure. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo z mobilno fazo DCM : MeOH = 9:1. Reakcijsko zmes smo nevtralizirali z dodatkom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in nato pod znižanim tlakom uparili MeOH. Zaostanek smo raztopili v EtOAc (10 mL) in organsko fazo sprali z 10 mL 1 M HCl, 10 mL NaCl, sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in pod znižanim tlakom uparili EtOAc. Izolirali smo 22 mg produkta v obliki belih kristalov.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 236,062 g/mol
<b>Izgled:</b> majhni beli kristali	<b>Rf:</b> 0,109 (DCM : MeOH = 1 :2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 54 %	
<b>Temperatura tališča:</b> Ni bila izmerjena, ker smo ves produkt uporabili za sklopitveno reakcijo.	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> Ni bil posnet, ker smo ves produkt uporabili za sklopitveno reakcijo.	
<b>MS:</b> (ESI) m/z 234,89 (M-H) <sup>-</sup>	

#### 4.2.5 Sklopitvena reakcija dela a in b: Sinteza 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamida

Reakcija:



Spojina **7**

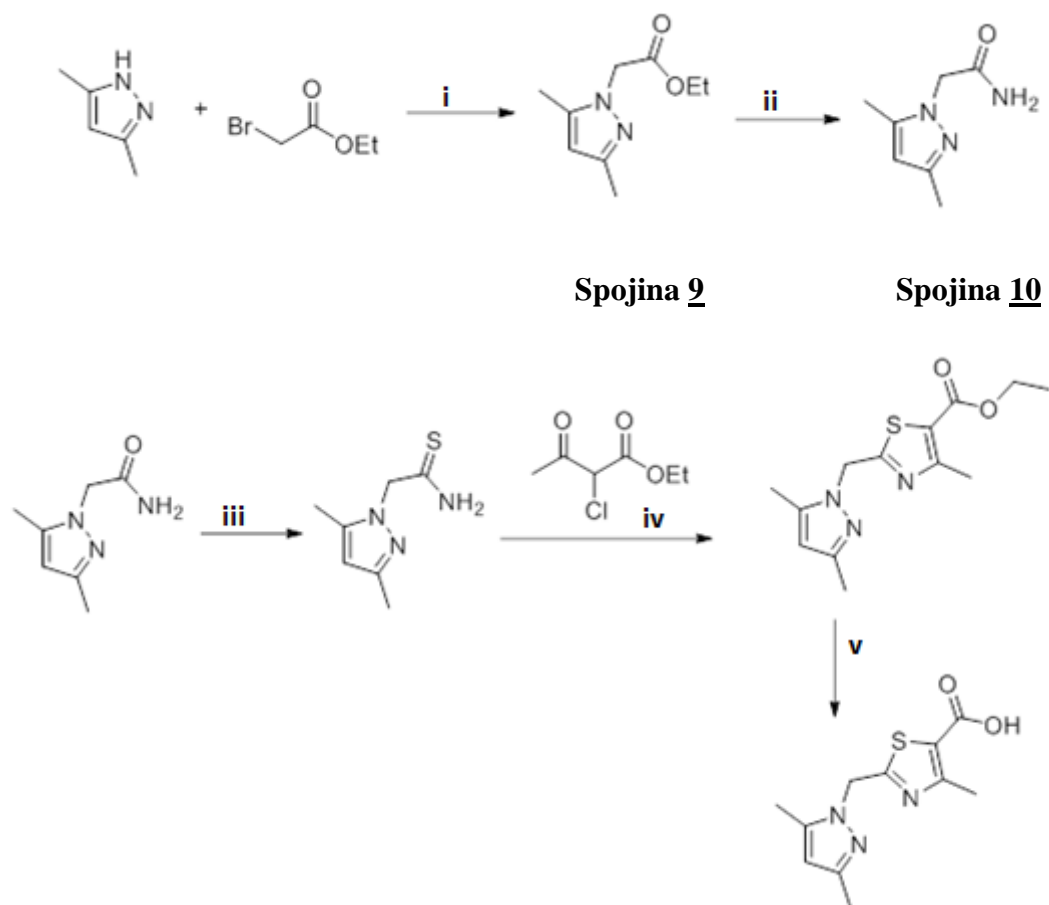
Spojina **3**

Spojina **8**

**Opis postopka:** V manjšo bučko smo natehtali 1 ekvivalent spojine **7** (15 mg, 0,064 mmol) in 1 ekvivalent spojine **3** (17 mg) in ju raztopili v DCM (10 mL), sledil je dodatek baze Et<sub>3</sub>N (2,5 ekvivalenta, 0,022 mL). Ob mešanju smo v reakcijsko zmes dodali še sklopitveni reagent TBTU 1,3 ekvivalenta (27 mg) ter jo pustili mešati eno uro. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili DCM : MeOH = 19:1. Sledila je izolacija produkta, ki smo ga suspendirali v EtOAc (20 mL). Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo (3 × 20 mL), z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2×20 mL), 1 M HCl (2×20 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (2×20 mL). Sušili smo jo z NaSO<sub>4</sub> in uparili odvečno topilo. Surov produkt je bilo potrebno očistiti še s kratko kolonsko kromatografijo, kot MF smo uporabili EtOAc : Hex = 1:1, nadaljevali s 4:1, ter na koncu zamenjali v DCM : MeOH = 20:1. Izolirali smo 13 mg svetlo rumenega oljnatega produkta.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	<b>Molekulska masa:</b> 492,656 g/mol
<b>Izgled:</b> svetlo rumen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,21 (DCM : MeOH= 20 :1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 42 %	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ (ppm) 1,93-2,02 (m, 2H), 2,18-2,29 (m, 8H), 3,67-3,76 (m, 2H), 3,82 (d, 2H, J =6,8 Hz), 3,87-3,95 (m, 2H), 5,28 (d, 2H, J =0,6 Hz), 5.82 (s, 1H), 6,80 (d, 1H, J =6,8 Hz ), 7,16 (t, 1H, J =0,6 Hz), 7,27 (d, 1H, J =6,8 Hz ), 7,29-7,48 (m, 3H), 7.50 (s, 1H), 7,89-7,94 (m, 2H).	
<b>NMR <sup>13</sup>C (100 MHz):</b> δ (ppm) = 11,08; 13,50; 34,77; 42,91; 46,812; 47,64; 63,97; 105,94; 112,51; 125,91; 126,24; 127,84; 128,40; 128,85; 134,07; 138,47; 138,88; 144,80; 148,24; 155,17; 161,62; 176;55	
<b>HR-MS:</b> (ESI) m/z izračunana za C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 493,1726 (M+H) <sup>+</sup> , izmerjena 493,1725	
<b>HPLC:</b> 85,41% čistost spojine pri t <sub>r</sub> 13,617 min (λ=254 nm)	

### 4.3 Poskus sinteze dela b: s tiazolom

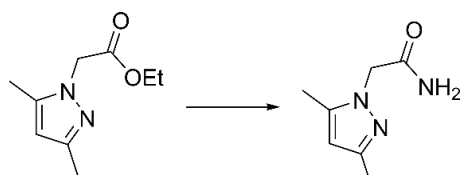


**Reakcijska shema 3:** Poskus sinteze 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)acetamida, reagenti in pogoji sinteze: i – NaH, DMF, sobna temp., preko noči; ii – preprihovanje z NH<sub>3</sub>, MeOH, sobna temp., 3 dni.



### 4.3.2 Poskus sinteze 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)acetamida

Reakcija:



Spojina **9**

spojina **10**

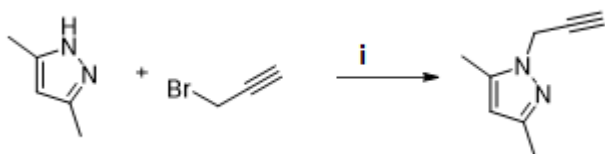
**Opis poskusa:** Produktu prejšnje reakcije smo dodali metanol in prepilovali z NH<sub>3</sub>. Reakcija je potekala 3 dni pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo (mobilna faza: DCM : MeOH = 9:1). Ugotovili smo, da reakcija ni potekla, zato smo jo poskusili izvesti še na drug način.

S KOH in H<sub>2</sub>O smo poskusili najprej produkt etil-2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)acetat pretvoriti do kisline (hidroliza estrov) ter nato nadaljevati. Vendar tudi pretvorba do kisline ni uspela.

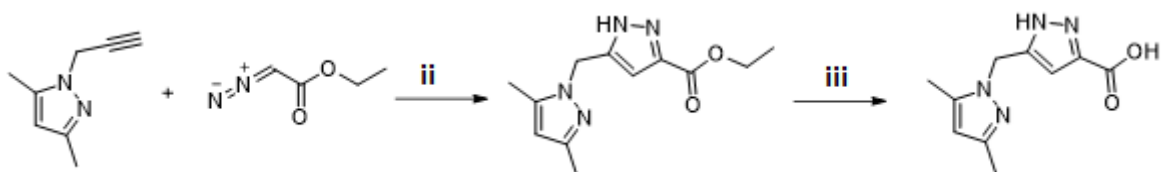
Sintezo smo poskusili izvesti še na tretji način, in sicer smo v bučko natehtali 3,5-dimetil-1*H*-pirazol (1 g, 0,01 mol), dodali 3-kloropropan amid (1,5 ekvivalenta, 1,46 g), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 ekvivalente, 4,31 g) in KI (0,5 ekvivalenta, 0,86 g). Vse skupaj smo raztopili v 20 mL DMF. Reakcijsko zmes smo mešali 48 ur pri temperaturi 65 °C. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo (mobilna faza: DCM : MeOH = 9: 1), vendar smo ugotovili, da sinteza ni uspela.



#### 4.4 Poskus sinteze dela b: s pirazolom



**Spojina 11**



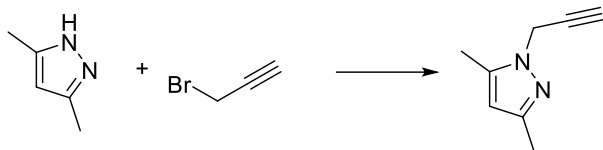
**Spojina 11**

**Spojina 12**

**Reakcijska shema 4:** Poskus sinteze do etil 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kisline, pogoji sinteze: i – DMF, NaH, sobna temp., 2 dni; ii – toluen, refluks 20 min 111 °C; iii - NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O.

#### 4.4.1 Sinteza 3,5-dimetil-1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirazola

Reakcija:



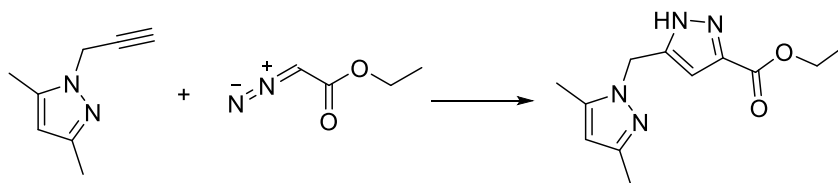
Spojina **11**

**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali izhodno spojino 3,5-dimetil-1H-pirazol (3 g, 0,0312 mol), jo raztopili v brezvodnem DMF (20 mL). Ob mešanju na ledeni kopeli smo postopoma dodajali NaH (1,3 ekvivalenta, 1,62 g), nato še 3-bromo prop-1-in (1 ekvivalent, 3,71 g oz. 3,36 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati dva dni. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:3. Reakcijo smo prekinili z 1 mL očetne kisline. Sledila je izolacija produkta, uparili smo DMF in zaostanek suspendirali v 20 mL EtOAc. Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo (6 × 20 mL), 2 × 20 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili še z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in pod znižanim tlakom uparili EtOAc. Surov produkt smo izolirali s kolonsko kromatografijo, kot MF smo uporabili EtOAc : Hex = 1:3. Izolirali smo 2,58 g tekočega temnega produkta.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	<b>Molekulska masa:</b> 134,18 g/mol
<b>Izgled:</b> temna rdečerjava tekočina	<b>Rf:</b> 0,347 (EtOAc : Hex = 1:3)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 62 %	

#### 4.4.2 Poskusi sinteze etil 5-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil-1H-pirazol-3-karboksilat

Reakcija:



Spojina **11**

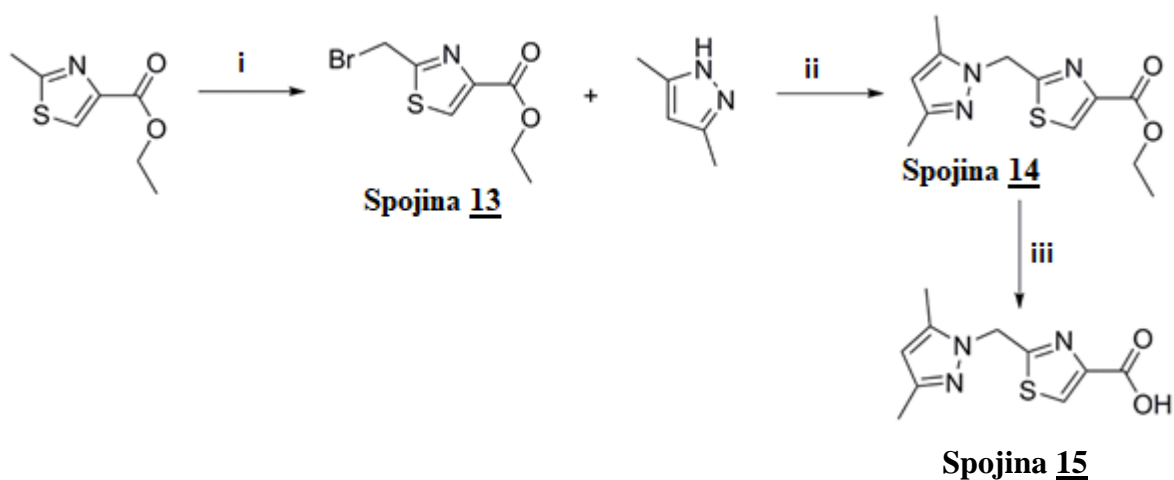
Spojina **12**

**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali 0,51 g spojine **11** (3,8 mmol), dodali 44 mL etildiazoacetata (1,1 ekvivalenta, 0,48 g) ter 5 mL toluena. Reakcijsko zmes smo mešali pod pogoji refluksa (111 °C) 20 min. Po 30 minutah smo dodali še 81 µL etildiazo acetata, in pustili mešati preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex =1:2. TLC je bil nejasen, zato nismo nadaljevali z izolacijo.

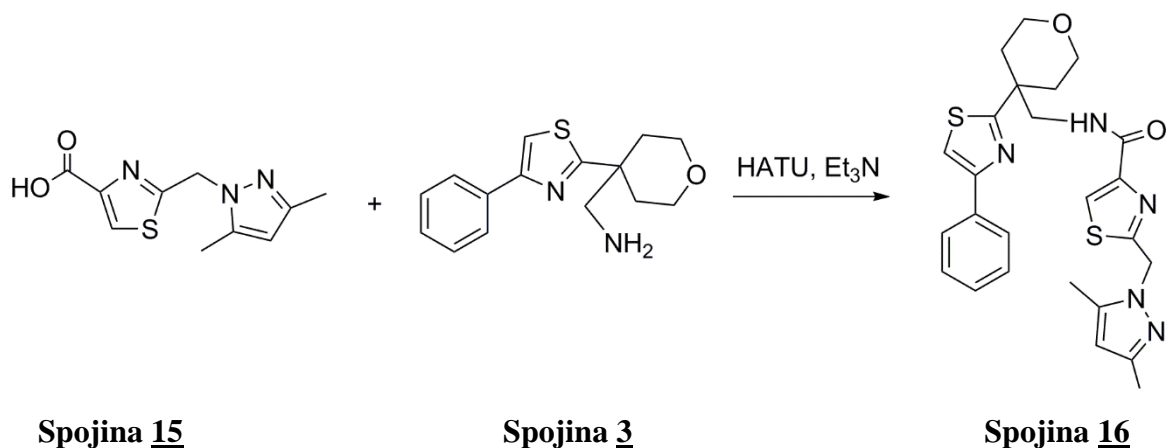
V bučko smo natehtali 0,41 g spojine **11** in 326 µL etildiazoacetata. Reakcijsko zmes smo mešali pod pogoji refluksa (112 °C) 1 uro. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo (mobilna faza: EtOAc : Hex =1:2). Rezultati TLC so bili nejasni, zato smo dodali še katalitično količino 1,4-diazobiciklooktana, zopet segrevali in refluktirali. TLC nam je nato pokazal več kot 5 lis reakcijske zmesi, zato nismo nadaljevali z izolacijo. Poskusili smo reakcijo izvesti še na tretji način.

V bučko smo natehtali 64 mg indijevega klorida (0,2 ekvivalenta) in ga suspendirali v 2,5 mL prečiščene vode, dodali 200 mg spojine **11** (1,5 mmol) in 1,1 ekvivalenta diazo spojine (0,190 mg, 175 µL). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo (mobilna faza: EtOAc : Hex =1:2). Rezultati TLC analize so bili nejasni, zato nismo nadaljevali z izolacijo.

#### 4.5 Sinteza dela b: s tiazolom (4-karboksilatom)



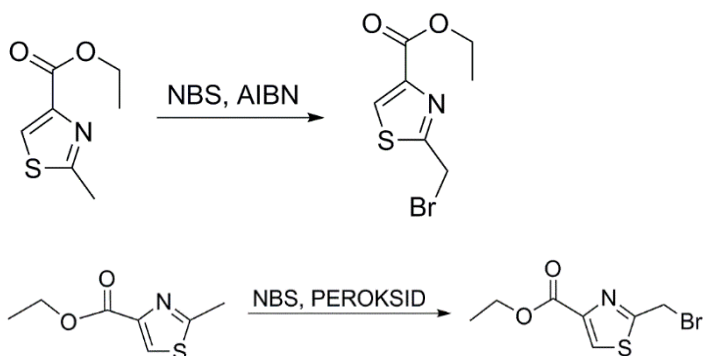
**Reakcijska shema 5:** Sinteza 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)thiazol-4-karboksilna kislina, reagenti in pogoji sinteze: i- NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, refluks 2 h, 80 °C; ii – DMF, NaH, sobna temp., preko noči; iii – NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, sobna temp., preko noči.



**Sklopitvena reakcija 2:** Sinteza 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)thiazol-4-karboksamid, reakcijski pogoji: HATU, Et<sub>3</sub>N, DMF, sobna temp., 2 h.

### 4.5.1 Sinteza etil 2-(bromometil)thiazol-4-karboksilata

Reakcija:



Spojina **13**

**Opis poskusa:** V prvo bučko smo natehtali 0,53 g etil 2-metiltiazol-4-karboksilata (3,1 mmol), dodali smo 1,2 ekvivalenta NBS 0,66 g in 5 mL topila  $\text{CCl}_4$ . Ob mešanju na magnetnem mešalu pri 80 °C smo dodali še katalitično količino AIBN. Reakcijsko zmes smo mešali pod pogoji refluxa (80 °C) 2 h. V drugo bučko smo natehtali 1,0 g etil-2-metiltiazol-4-karboksilata (5,84 mmol), dodali smo 1,2 ekvivalenta NBS (1,24 g) in 15 mL topila  $\text{CCl}_4$ . Ob mešanju na magnetnem mešalu pri 80 °C smo dodali še katalitično količino terc-butyl peroksibenzoata (0,1 ekvivalenta, 250  $\mu\text{L}$ ). Reakcijsko zmes smo mešali pod pogoji refluxa (80 °C) 2 h. Reakcijo, z AIBN kot iniciatorjem, smo ponovili še dvakrat, z večjimi količinami, mase in množine reaktantov so predstavljene v preglednici IV.

*Preglednica IV: Podatki o masah in množinah reaktantov ponovnih sintez spojine 13.*

0,5 g etil 2-metiltiazol-4-karboksilata (2,9 mmol)	1,5 g etil 2-metiltiazol-4-karboksilata (8,76 mmol)
1,2 ekvivalenta NBS 0,62 g	1,2 ekvivalenta NBS 1,87 g
10 mL topila $\text{CCl}_4$	15 mL topila $\text{CCl}_4$
(0,1 ekvivalenta, 51 mg) AIBN	(0,1 ekvivalenta, 144 mg) AIBN

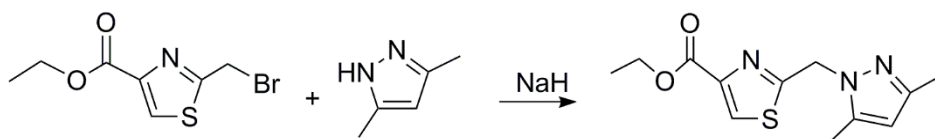
Potek reakcije smo periodično spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili  $\text{EtOAc} : \text{Hex} = 1:2$ . Sledila je izolacija produkta iz reakcijske zmesi. Ekstrakcije smo izvedli za vsako bučko posebej, vendar na enak način. Najprej smo uparili  $\text{CCl}_4$  pod znižanim tlakom, zaostanek smo raztopili v  $\text{EtOAc}$  (25 mL). Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo ( $2 \times 25$  mL), z 1 M  $\text{HCl}$  (25 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL) in

nasičeno raztopino NaCl (25 mL). Nato smo jo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili EtOAc. Surov produkt je bilo potrebno očistiti še s kolonsko kromatografijo, kot MF smo uporabili: EtOAc : Hex = 1:8, nato 1:4. Izolirali smo visoko viskozen oranžen oljnat produkt (2,25 g).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> BrNO <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 250,110 g/mol
<b>Izgled:</b> oranžen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,48-0,56 (MF: EtOAc : Hex = 1 : 2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 44 %	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 1,41 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 4,43 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 4,77 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); 8,23 (s, 1H, H-Ar).	
<b>MS:</b> (ESI) Pri pogojih snemanja MS nismo dobili želenega signala.	

#### 4.5.2 Sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)thiazol-4-karboksilata

Reakcija:



Spojina **13**

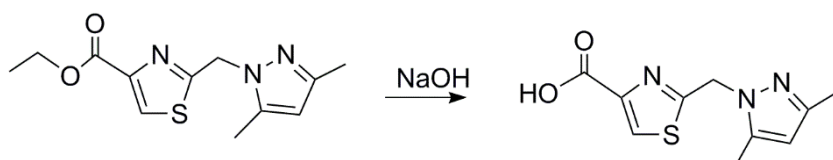
Spojina **14**

**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali spojino **13** (0,789 g, 3,16 mmol) in 1,1 ekvivalenta 3,5-dimeti-1H-pirazola (0,334 g) in ju raztopili v 5 mL brezvodnega DMF. Bučko smo postavili na ledeno kopel in dodali katalitično količino kronskega etra. Ob mešanju na ledeni kopeli smo postopoma dodajali NaH (0,164 g, 1,3 ekvivalenta). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo periodično spremljali s TLC kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo EtOAc : Hex = 1:2. Sledilo je čiščenje reakcijske zmesi, pod znižanim tlakom smo uparili DMF, zaostanek pa raztopili v 50 mL EtOAc. Organsko fazo smo sprali s prečiščeno vodo (4 × 50 mL), 20 mL 1 M HCl, 20 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo smo dodatno sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in nato uparili EtOAc pod znižanim tlakom. Surov produkt smo izolirali še s pomočjo kolonske kromatografije. Kot mobilno fazo smo uporabili EtOAc : Hex = 1 : 3. Izolirali smo produkt v obliki oranžnih kristalov (m = 0,2 g).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 265,331 g/mol
<b>Izgled:</b> oranžni kristali	<b>Rf:</b> 0,178 (MF: EtOAc : Hex=1:3)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 15 %	
<b>Temperatura tališča:</b> 55,7-63,9 °C	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 1,41 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 2,22 (d, 3H, J = 3 Hz, CH <sub>3</sub> ); 2,260 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,43 (q, 2H, J = 6,8 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 5,53 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); 5,88 (s, 1H, H-Ar); 8,11 (s, 1H, H-Ar)	
<b>MS:</b> (ESI) m/z 288,24 (M+Na) <sup>+</sup>	

#### 4.5.3 Sinteza 2-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)thiazol-4-karboksilne kisline

Reakcija:



Spojina **14**

Spojina **15**

**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali 0,2 g spojine **14** (0,754 mmol), dodali smo 3 mL MeOH in 3 mL prečiščene vode in nato med mešanjem postopoma dodali 2 ekvivalenta NaOH (0,070 g). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo (mobilna faza: DCM : MeOH = 9:1). Sledila je nevtralizacija prebitnega NaOH z 1 M HCl. Nevtralizacijo smo spremljali s pH lističi, iz začetnih pH 12 smo prišli do pH 3. Reakcijski zmesi smo uparili metanol in zaostanek suspendirali v 10 mL EtOAc. Organsko fazo smo sprali z 2 × 10 mL prečiščene vode in 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in topilo uparili pod znižanim tlakom. Izolirali smo drobne bele do svetlo rumene kristale (43,2 mg).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 237,277 g/mol
<b>Izgled:</b> beli do svetlo rumeni kristali	<b>Rf:</b> 0,08 (MF: DCM : MeOH = 9:1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 24 \%$	
<b>Temperatura tališča:</b> 59,2-65,3 °C	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 2,25 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2,27 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 5,58 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); 5,90 (s, 1H, H-Ar); 8,20 (s, 1H, H-Ar)	
<b>MS:</b> (ESI) m/z 236,3 (M-H) <sup>-</sup>	

Ker smo predvidevali, da bo 43 mg premalo za sklopitveno reakcijo, smo se odločili, da sintezo ponovimo, kar smo morali storiti od začetne spojine (3 stopnje nazaj). Sinteze smo izvedli pod enakimi pogoji, kot so zgoraj opisani, le z drugimi količinami. V spodnji preglednici V so predstavljene količine in mase reaktantov in produktov ter izkoristki.

*Preglednica V: Podatki o masah in množinah reaktantov ter izgledu, masah in izkoristkih produktov ponovnih sintez spojin 13, 14 in 15.*

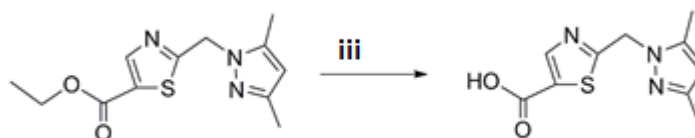
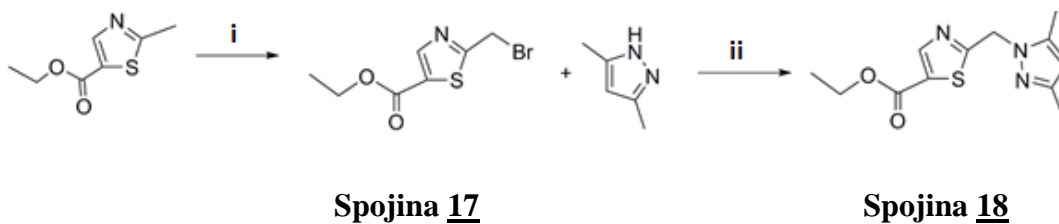
<b>Sinteza spojine 13</b>	m=1,259 g n=7,353 mmol 1,1 ekvivalent m=1,571 g 0,1 ekvivalent m=0,121 g Topilo: CCl <sub>4</sub> 10 mL	Rumeno olje Masa produkta: 0,702 g Izkoristek: 38 %
<b>Sinteza spojine 14</b>	m=0,700 g n=2,807 mmol 1,1 ekvivalent m=0,297 g 1,5 ekvivalenta m =0,168 g Topilo: brezvodni DMF 10 mL	Oranžni kristali Masa produkta: 0,140 g Izkoristek: 19 %
<b>Sinteza spojine 15</b>	m= 0,110 g n=0,415 mmol 3 ekvivalente m=0,052 g Topilo: 3 mL MeOH in 3 mL prečiščene vode	Beli kristali Masa produkta: 0,011 g Izkoristek: 11 %





<b>Molekulska formula:</b> C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	<b>Molekulska masa:</b> 493,644 g/mol
<b>Izgled:</b> prozoren do svetlo rumen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,62 (DCM : MeOH= 9 :1)
<b>Izkoristek reakcije:</b> $\eta = 52 \%$	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 8.19 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 1H), 8.07-8.03 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.40-7.35 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.00-3.93 (m, 2H), 3.88 (d, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H), 3.79-3.70 (m, 2H), 2.36-2.28 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.09 (d, <i>J</i> = 0,4 Hz, 3H), 2.08-1.99 (m, 2H).	
<b>NMR <sup>13</sup>C 100 MHz:</b> $\delta$ (ppm) = 10,83; 13,46; 34,76; 43,13; 47,11; 50,07; 64,07; 106,27; 106,32; 112,56; 124,29; 124,31; 126,39; 128;28;128,72; 134,38; 139,55; 148,99; 149;64; 155,11; 161;03; 166,95; 175,96	
<b>HR-MS:</b> (ESI) <i>m/z</i> izračunana za C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 494,1679 (M+H) <sup>+</sup> , izmerjena 494,1673	
<b>HPLC:</b> 79,6 % čistost spojine pri tr 13,713 min ( $\lambda=254$ nm)	

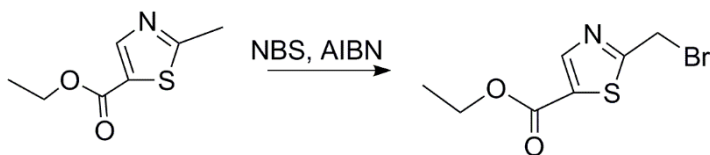
#### 4.6 Poskus sinteze dela b: s tiazolom (5-karboksilatom)



**Reakcijska shema 6:** Poskus sinteze do 2-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)tiazol-5-karboksilne kisline, pogoji sinteze: i- NBS, AIBN, CCl<sub>4</sub>, refluks 2 h, 80 °C; ii – NaH, DMF, sobna temp., preko noči; iii – NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O.

#### 4.6.1 Sinteza etil 2-(bromometil)tiazol-5-karboksilata

Reakcija:



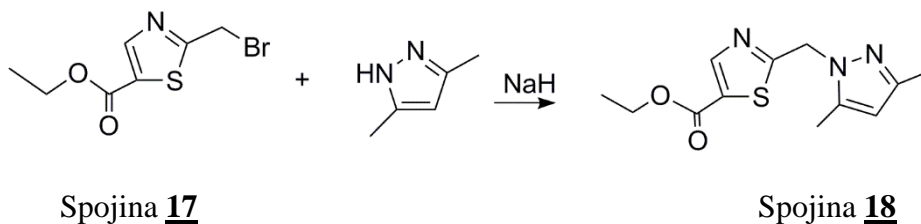
Spojina **17**

**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali etil 2-metil-1,3-tiazol-5-karboksilat (1,0 g, 5,84 mmol), ga raztopili v 10 mL CCl<sub>4</sub> in dodali še NBS (1,2 ekvivalenta, 1,25 g) in AIBN (0,1 ekvivalenta, 96 mg). Pri 80 °C pod pogoji refluxa smo pustili mešati reakcijsko zmes 2 uri. Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:2. Reakcijski zmesi smo pod znižanim tlakom uparili CCl<sub>4</sub> in zaostanek raztopili v EtOAc (50 mL). Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo (2 × 50 mL), 1 M HCl (1 × 30 mL), z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (1 × 30 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOAc uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt je bilo treba očistiti še s kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo smo uporabili EtOAc : Hex = 1:8, nato 1:6. Izolirali smo oranžen oljnat produkt (m = 0,441 g).

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> BrNO <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 250,110 g/mol
<b>Izgled:</b> oranžen oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,563 (MF: EtOAc : Hex = 1:2)
<b>Izkoristek reakcije:</b> η = 30 %	
<b>NMR <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) 1,39 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 4,38 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 4,72 (s, 2H, CH <sub>2</sub> -Ar); 8,32 (s, 1H, H-Ar)	
<b>NMR <sup>13</sup>C:</b> (100 MHz) δ (ppm) = 14,20; 26,13; 61,82; 131,53; 148,15; 160,87; 171,11	
<b>MS:</b> (ESI) Pri pogojih snemanja MS nismo dobili zelenega signala.	

#### 4.6.2 Sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)thiazol-5-karboksilata

Reakcija:



**Opis poskusa:** V bučko smo natehtali spojino **17** (0,364 g, 1,46 mmol), 1,1 ekvivalenta 3,5-dimetil-1H-pirazola (0,154 g) in ju raztopili v brezvodnem DMF (3 mL), bučko smo prej prepihali z argonom. Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali katalitično količino kronskega etra, nato pa postopoma dodajali NaH (3 ekvivalente, 174,6 mg). Potek reakcije smo spremljali s TLC kromatografijo, kjer smo kot mobilno fazo uporabili EtOAc : Hex = 1:2 . Sledilo je čiščenje produkta, uparili smo DMF in zaostanek suspendirali v EtOAc (10 mL). Organsko fazo smo spirali s prečiščeno vodo (4 × 10 mL), 1,0 M HCl (10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) in 10 mL nasičene raztopine NaCl. Sušili smo jo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparili EtOAc in dobili 0,061 g surovega produkta, ki ga nismo čistili naprej, ker smo se odločili, da s sintezo ne bomo nadaljevali zaradi premajhne količine surovega produkta še za dve sintezni stopnji do končne spojine.

<b>Molekulska formula:</b> C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<b>Molekulska masa:</b> 265,331 g/mol
<b>Izgled:</b> rjav oljnat produkt	<b>Rf:</b> 0,283 (MF: EtOAc : Hex = 1:2)

## 5. Rezultati in razprava

### 5.1 Komentar sinteznih postopkov

Pripravili smo **dve končni spojini**, ki sta bili pripravljene na podlagi spojine vodnice z imenom 4-((3,5-dimetil-1*H*-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)benzamid, ki predstavlja tetrahidropiranski derivat. S pomočjo bioizosterne zamenjave smo zamenjali osrednjo fenilno skupino. Pri prvi končni spojini je bila fenilna skupina zamenjana s tiofenom in pri drugi s tiazolom.

Kot izhodne spojine smo uporabili **5-metiltiofen-2-karboksilno kislino** za 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamida in **etil 2-metiltiazol-4-karboksilat** za 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiazol-4-karboksamid, ki sta tudi komercialno dostopni. Do končnih spojin smo prišli s sintezami iz dela **a** in dela **b**, katere smo na koncu spojili s sklopitvenimi reakcijami.

Prvi del spojine (del **a**) smo pričeli z izhodnima spojinama fenacilkloridom in 2-cianotioacetamidom, ki smo ju raztopili v brezvodnem THF ter nato dodali še bazo Et<sub>3</sub>N. Reakcija je potekala preko noči, po čiščenju smo dobili spojino **1**.

Spojini **1** smo dodali 1-kloro-2(2-kloroetoksi)etan in ju raztopili v brezvodnem DMF. Ob mešanju in hlajenju na ledeni kopeli je sledilo postopno dodajanje NaH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po čiščenju smo dobili spojino **2** v obliki oranžnih kristalov z izkoristkom reakcije 20 %. Vzrok, da je tako nizek izkoristek, je lahko v izolaciji produkta, saj smo poleg ekstrakcije izvajali še kolonsko kromatografijo s suhim nanosom in smo lahko med vsemi koraki izgubili več produkta.

Reakcija **redukcije nitrila v amin** je potekala tako, da smo v bučko najprej natehtali NiCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, ki smo ga segreli, da je izparela voda, barva pa se je spremenila iz zelene v zlato rumeno. Nato smo dodali spojino **2** in brezvodni etanol ter na ledeni kopeli mešali reakcijsko zmes ter postopno dodajali NaBH<sub>4</sub>. Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo reakcijo prekinili z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub>. Po čiščenju reakcijske zmesi smo izolirali oljnat produkt. NMR analiza je pokazala, da je v našem produktu prisotna voda, zato smo produkt čistili še s koevaporacijo s toluenom. Toluena namreč z vodo tvori azeotrop (78,9 % toluena in 21,1 % vode), tako smo odstranili vso vodo iz produkta. Reakcija bi lahko bolje potekla, če bi v reakcijsko zmes

uvajali CO<sub>2</sub>, s tem bi zaščitili nastali primarni amin, ki ne bi reagiral naprej do sekundarnega anina (21). Svetel oljnat produkt smo do naslednje uporabe hranili v hladilniku, ker so amini občutljivi na svetlobo in toploto. Izkoristek reakcije je bil 54 %.

Sintezne reakcije drugega dela (dela **b**: s tiofenom) smo pričeli z reakcijo **esterifikacije, ki jo uvrščamo med nukleofilne adicije na heterogene multiple vezi** (22). Kot izhodno spojino smo uporabili 5-metiltiofen-2-karboksilno kislino, katero smo s pomočjo EtOH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretvorili do etil-5-metiltiofen karboksilata. Vlogo nukleofila ima etanol, elektrofilni center je karbonilni ogljik na izhodni spojini. Reakcijo katalizirajo protoni, ki jih zagotavlja H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esterifikacija je ravnotežna reakcija in lahko izkoristek povečamo z uporabo prebitka alkohola, kar smo tudi storili (15). Poleg tega H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tvori močne vodikove vezi z vodo, tako da slednja ni na voljo za hidrolizo. V našem primeru je izkoristek znašal 92 %.

Dobljenemu karboksilatu smo želeli pripeti brom, šlo je za **radikalno verižno reakcijo radikalnega halogeniranja - bromiranja**. Pri reakciji smo naleteli na prve težave, bromiranje v prvem poskusu ni poteklo. Reakcija z NBS je selektivna, vendar je selektivni učinek odvisen od njegove sposobnosti, da daje nizko, a stalno koncentracijo broma (15). Reakcijska zmes se je mešala v DCM pri 55 °C, vendar reakcija ni potekla. Zato smo poskusili še na dva druga načina, ker smo mislili, da na reakcijo vpliva topilo, smo ga zamenjali z kloroformom, kot iniciator pa v prvem primeru uporabili AIBN, v drugem pa terc-butyl peroksibenzoat. Dobili smo enaka produkta glede na TLC, navidezna izkoristka sta znašala 99 % in 146 %, vendar v obeh primerih topila nismo dovolj uparili.

Pri naslednji stopnji smo z adicijo etil 5-(bromometil)tiofenu-2-karboksilatu (spojina **4**) dodali 3,5-dimetil-1*H*-pirazol ter ju raztopili v brezvodnem DMF, kot katalizator je pri reakciji sodeloval kronski eter. Reakcijski zmesi smo na ledeni kopeli ob konstantnem mešanju postopoma in previdno dodajali NaH, da ga slučajno ne bi stresli v vodo, s katero burno reagira. Reakcija je potekla, vendar je bil slab izkoristek reakcije (13 %).

Zadnja reakcija na **b** delu spojine s tiofenom pa je bila pretvorba spojine **5** nazaj v karboksilno kislino – **pri hidrolizi estrov gre za podobno reakcijo kot esterifikacija, le da poteka v nasprotni smeri**. Uporabili smo NaOH v mešanici MeOH in prečiščene vode. Reakcija je potekala pri sobni temperaturi. Izolirali smo malo produkta (spojine **6**) v obliki belih kristalčkov (22 mg), izkoristek reakcije je bil 54 %.

Za prvo končno spojino, 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamid, je ostala še tvorba amida med aminom (del **a**) in karboksilno kislino (del **b**), tako da smo izvedli **sklopitveno reakcijo, pri slednji gre za sintezo amidne vezi med kislino in aminom**. Karboksamidna skupina, ki pri tem nastane, se pojavi v več kot 25 % znanih zdravilnih učinkovin glede na poglobljeno analizo v bazi »Comprehensive Medicinal Chemistry«. Vez nastane ob nukleofinem napadu amino skupine na aktiviran karbonilni C-atom. Potrebna je aktivacija karboksilne kisline. Uporabili smo TBTU, ki je sklopitveni reagent, natančneje *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat. Poleg tega za potek sklopitvene reakcije uporabimo inertno suho topilo, v katerem je prisotna ne-nukleofilna baza Et<sub>3</sub>N (23).

Uporabili smo spojino **7** in spojino **3**, kjer smo kot topilo uporabili DCM, kateremu smo dodali bazo Et<sub>3</sub>N. Vse skupaj smo postavili na magnetno mešalo in ob mešanju dodali še sklopitveni reagent TBTU ter reakcijsko zmes pustili mešati eno uro. Po ekstrakciji smo na TLC plošči zaznali še prisotnost stranskega produkta, zato smo izvedli še kolonsko kromatografijo in izolirali 13 mg končnega svetlo rumenega oljnatega produkta, izkoristek reakcije je bil 42 %. Glede na NMR analizo je bila prisotna tetrametilsečnina (singlet pri 2.8 ppm), ki je stranski produkt reakcije z TBTU in se jo zelo težko odstrani. Alternativno bi lahko kislino aktivirali s pretvorbo slednje v kislinski klorid, vendar se zaradi ostrih pogojev tvorbe kislinskega klorida za to metodo nismo odločili.

V nadaljevanju sinteznega oz. eksperimentalnega dela smo se srečali s kar nekaj težavami, saj nekaj reakcij ni poteklo in nismo prišli do zelenih spojin za nadaljevanje.

Pri poskusu sinteze dela **b** - s tiazolom: etil 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)acetata nismo uspeli izolirati čistega produkta. Surovi produkt smo uporabili v naslednji stopnji t. j. **amidoliza z amonijakom**. Slednja reakcija ni potekla; verjetno je alifatski ester manj aktiviran kot aromatski estri, kjer reakcija poteče zelo hitro. Alternativno smo želeli najprej hidrolizirati ester in nato tvoriti amid, vendar nam estra ni uspelo izolirati. Najverjetneje smo ga izgubili med ekstrakcijo, saj je ester (etil 2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)acetat relativno polarna spojina, kar pa nismo upoštevali. Zaradi časovne stiske smo opustili sintezo tiazola po tej sintezni poti.

Sledil je poskus sinteze (dela **b**: s pirazolom) 3,5-dimetil-1-(prop-2-in-1-il)-1*H*-pirazola (spojina **11**), ki je potekla brez posebnosti. V naslednji stopnji smo želeli alkin z etil



diazoacetatom pretvoriti v pirazol, gre za t. i. **1,3-polarno cikloadicijo** (24). Vendar smo bili neuspešni; reakcija je večkrat opisana za aromatske alkine, v našem primeru pa smo imeli alifatski alkin, ki ni reagiral pod pogoji, ki smo jih uporabili oz. je nastalo zelo veliko produktov. Zaradi časovne stiske smo opustili sintezo pirazolskega derivata in se posvetili reakcijam, ki so boljše potekle.

Prišlo je do sprememb v načrtu eksperimentalnega dela, naročili smo dve spojini, s katerima smo nato nadaljevali s sintezami. Naročili smo 5 g etil 2-(metil)tiazol-4-karboksilata in 1 g etil 2-(metil)tiazol-5-karboksilata.

**Sintezo druge končne spojine** smo pričeli s sintezo etil 2-(bromometil)tiazol-4-karboksilata iz etil 2-(metil)tiazol-4-karboksilata. Enako kot pri prvi končni spojini je potekala **radikalna reakcija – bromiranje**. Najprej smo poskušali z manjšimi množinami ugotoviti najboljše pogoje, pri katerih bi imeli tudi dober izkoristek. Spreminjali smo topilo. Reakcija je najbolje potekla pri uporabljenemu topilu tetraklorometanu pod pogoji refluksa pri temperaturi 80 °C, pri kateri se je reakcijska zmes mešala 2 uri. Naslednja spremenljivka, ki smo jo izbirali, je bil iniciator AIBN oz. peroksidni iniciator - v našem primeru smo uporabili terc-butyl peroksibenzoat. Reakcija s peroksidnim iniciatorjem se ni izkazala za najbolj uspešno, zato smo za reakcije z večjim množinami reaktantov uporabili AIBN in CCl<sub>4</sub>.

Sledila je sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiazol-4-karboksilata iz spojine **13** in 3,5-dimetil-1*H*-pirazola. Uporabili smo preizkušene pogoje; NaH kot baza in DMF kot topilo. Nastali spojini **14** smo cepili ester z NaOH in pridobili 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiazol-4-karboksilno kislino, potekla je reakcija **bazične hidrolize estrov**. Slednja je učinkovitejša kot kislina hidroliza, saj je bazična hidroliza ireverzibilna reakcija.

Drugi del druge končne spojine je enak kot pri prvi končni spojini. Ponovili smo le zadnji del sinteze: **redukcijo nitrila do amina**.

Ko smo ugotovili, da bomo za nadaljnje sinteze potrebovali več amina, smo ga poskusili sintetizirati še na druge načine, namesto NiCl<sub>2</sub> smo uporabili CoBr<sub>2</sub>; ker ga ni bilo treba segrevati, je bila izvedba reakcije hitrejša.

Težave smo imeli tudi z reagentom NaBH<sub>4</sub>, saj je reagent že prišel v stik z vlago in ni reagiral po pričakovanjih. V enem primeru smo reakcijo ustavljali z acetonom, ki je zreagiral z našim produktom. Aceton se uporablja za prekinitev reakcije s hidridi, saj zreagira s hidridi do

izopropanola, vendar je v našem primeru poteklo reduktivno aminiranje in smo z visokim izkoristkom na primarni amin uvedli izopropilno skupino.

Pri sklopitveni reakciji – **sintezi amida** – smo za sintezo druge končne spojine: 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiazol-4-karboksamida uporabili spojino **3** in spojino **15**, kjer smo kot sklopitveni reagent uporabili HATU – (1-[Bis(dimetilamin)metilen]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridin 3-oksidi heksafluorofosfat) ter dodatek baze Et<sub>3</sub>N. Po čiščenju smo izolirali svetel oljnat produkt z izkoristkom reakcije 52 %.

Poskusili smo tudi s **sintezo tretje končne spojine**, izhajali smo iz izhodne spojine **etil 2-metil-1,3-tiazol-5-karboksilata**, katere smo imeli le 1 g. Sintezo smo pričeli z reakcijo **radikalskega bromiranja**. Izhodni spojini smo dodali NBS, AIBN ter CCl<sub>4</sub> kot topilo. Izkoristek reakcije je bil že v prvi stopnji relativno slab, približno 30 %, zato smo slutili, da bo sinteza do končnega produkta težavna.

V drugi stopnji je sledila sinteza etil 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)tiazol-5-karboksilata; izolirali smo le 0,061 g surovega produkta. Na tej točki smo se odločili, da s sintezo ne bomo nadaljevali, saj bi nam do končne spojine (še dve sintezni stopnji) surovega produkta že prej zmanjkalo.

Po končanem sinteznem delu menimo, da naši izkoristki niso bili najboljši, potrebno je bilo več stopenj čiščenja spojin z ekstrakcijo in kolonskimi kromatografijami, veliko je bilo stranskih produktov, ki so bili tudi težje odstranljivi. Z optimizacijo bi lahko izboljšali izkoristke, a nam je za to zmanjkalo časa oziroma reagentov.

## 5.2 Testiranje encimske kinetike IC<sub>50</sub>

Pri obeh končnih spojinah so določili srednjo zaviralno koncentracijo IC<sub>50</sub> na encimu InhA. IC<sub>50</sub> je definirana kot zaviralna koncentracija spojine, ki zmanjša delovanje encima za polovico (50 %) (25). Rezultati testiranja encimske kinetike IC<sub>50</sub> so napisani v preglednici VI.

Preglednica VI: Rezultati testiranja IC<sub>50</sub>.

Spojina	IC <sub>50</sub>
<b><u>8</u></b>	190 nM
<b><u>16</u></b>	8 μM

Pri testiranju smo uporabili znane zaviralce, s katerimi smo zagotovili, da je bil test primerljiv. Kot kontrola je bila uporabljena spojina vodnica, kateri je bil IC<sub>50</sub> določen v podjetju GSK. Pri končnih spojinah **8** in **16** nismo dosegli izboljšanja IC<sub>50</sub>, pri spojini **8** je znašal 190 nM in pri spojini **16** 8 μM. Lahko rečemo, da se je spojini **8** obdržala zaviralna aktivnost, medtem ko se je pri spojini **16** IC<sub>50</sub> za več velikostnih razredov poslabšala.

Glede na to, da spojini s tiofenom kot tiazolom lahko zavzameta praktično identično konformacijo, najverjetneje razlike v zaviranju encima InhA izhajajo iz različne elektronske gostote, ki vpliva na polarnost/lipofilnost in tvorbo vodikovih vezi (tiofen jih ne tvori, tiazol pa lahko).

Končni spojini **8** in **16** odpirata možnosti za nadaljnje raziskovanje in načrtovanje novih zaviralcev, pri čemer ima večji potencial spojina s tiofenom.

### 5.3 Preverjanje čistote spojin s HPLC

Pri nekaterih spojinah smo preverili tudi njihovo čistoto oz. prisotnost nečistot s HPLC metodo. Izvedli smo gradientno ločbo, da smo ugotovili, kje se eluirajo naši vzorci.

Čistoto spojin smo definirali kot odstotek površine pod krivuljo signala za želeno spojino glede na površino pod krivuljo vseh signalov. Čistota končnih spojin je bila: 85 % za spojino **8** in 79 % za spojino **16**. Morali bi izboljšati izolacijo predhodnih spojin in izvesti bolj natančno čiščenje končne spojine, da bi imeli boljšo čistoto spojin.

Analizo smo izvedli tudi na ostalih vmesnih spojinah (tistih, ki smo jih imeli še dovolj za izvedbo analize). Rezultati analiz so prikazani v preglednici VII, iz katere lahko opazimo tudi trend, da več kot ima sinteza pot stopenj, bolj tudi pada čistota končne spojine.

*Preglednica VII: Predstavlja rezultate HPLC analize - čistoto nekaterih vmesnih spojin.*

Spojina	$t_r$ (min)	Čistota spojin (%)
Spojina <b>2</b>	14,210	99,35
Spojina <b>5</b>	14,377	81,67
Spojina <b>6</b>	11,837	98,55
Spojina <b>8</b>	13,617	85,41
Spojina <b>14</b>	8,627	96,43
Spojina <b>15</b>	5,067	89,19
Spojina <b>16</b>	17,713	79,63
Spojina <b>17</b>	11,500	83,25

## 6. Sklep

V sklopu magistrske naloge smo uspeli sintetizirati dve končni spojini:

- Spojino **8**: 5-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiofen-2-karboksamida
- Spojino **16**: 2-((3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)metil)-*N*-((4-(4-feniltiazol-2-il)tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)tiazol-4-karboksamid

Naš namen je bila bioizosterna zamenjava osrednje fenilne skupine na tetrahidrpiranskem derivatu, pri prvi spojini smo uvedli tiofen in pri drugi tiazol (4-karboksamid). Med eksperimentalnim delom smo imeli več težav z reakcijo radikalnega halogeniranja – bromiranja in redukcije nitrila v amin.

Glede na analize se je tiofen izkazal za ustrežnejšo zamenjavo fenila. Izkazal je boljšo (nižjo) IC<sub>50</sub> vrednost od tiazola. Vendar spojina s tiofenom še vedno slabše zavira encim InhA kot spojina vodnica s fenilno skupino.

Spojino **8** smo poslali tudi na določitev kristalne strukture z InhA. Pridobljena kristalna struktura bo uporabna za nadaljne načrtovanje zaviralcev InhA.

## 7. Literatura in viri

- (1) Pajk S., Živec M., Šink R., Sošič I., Neu M., Chung C., Martinez-Hoyos M., et al.: New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, 112, 252–257
- (2) <https://www.britannica.com/science/tuberculosis> (dostopano: 2.5.2018)
- (3) Šink R., Sošič I., Živec M., Frenandez-Mendez R., Turk S., Pajk S., Alvarez-Gomez D., et.al.: Design, Synthesis, and Evaluation of New Thiadiazole-Based Direct Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) for the Treatment of Tuberculosis, *J. Med. Chem.*, 2015, 58, 613-624
- (4) [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/Exec\\_Summary\\_13Nov2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb/publications/global_report/Exec_Summary_13Nov2017.pdf?ua=1) (naslov dokumenta: Global tuberculosis report 2017, Geneva, World Health Organization) (dostopano: 26.6.2018)
- (5) <http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/klinicna-dejavnost/tuberkuloza/> (dostopano: 21.11.2017)
- (6) <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/en/> (dostopano: 24.6.2018)
- (7) Patrick G. L: Medicinal chemistry, 3. izdaja, Oxford University Press, New York, 2005, 16, 381-434
- (8) Rožman K., Sosič R., Fernandez R., et. al.: A new ‘golden age’ for the antitubercular target InhA, *Drug Discov. Today*, 2017; 22(3), 492–502
- (9) Encinas L., O’Keefe H., Neu M., et.al.: Encoded Library Technology as a Source of Hits for Discovery and Lead Optimization of a Potent and Selective Class of Bactericidal Direct Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis InhA, *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 1276-1288
- (10) Lei B, Wei C-J, Tu S-C: Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(4), 2520-2526
- (11) Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA: Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities, *Protein Sci.*, 2010, 19(3), 458–474
- (12) <https://www.internetchemie.info/chemie-lexikon/stoffe/p/pyridomycin.php> (dostopano 25.6.2018)
- (13) Gaikwad L.P., Gandhi S.P., Jagdale M. D., Kadam J. V: The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification, *Am. J. Pharmtech. Res.*, 2012, 2 (4),

- (14) [https://www.ki.si/fileadmin/user\\_upload/datoteke-D01/Laboratorij\\_za\\_racunsko\\_biokemijo\\_in\\_nacrtovanje\\_ucinkovin/Metode.pdf](https://www.ki.si/fileadmin/user_upload/datoteke-D01/Laboratorij_za_racunsko_biokemijo_in_nacrtovanje_ucinkovin/Metode.pdf)  
(dostopano 14.7.2018)
- (15) Tišler M.: Organska kemija, 2.izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013
- (16) Clayden J, Greeves N, Warren S: Organic chemistry, 2. izdaja, Oxford University Press, New York, 2012:37, 970-991
- (17) Chatgililoglu C., Studer A. (editors): Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Material, Volume 1: Basic concepts and Methodologies, Wiley, 2012, Chapter 3, 56-61
- (18) Brindisi M., Maramai S., Grillo A., Brogi S., Butini S., et.al.: Development of a practical and scalable route for the preparation of the deacetyxytubuvaline (dTuv) fragment of pretubulysin and analogs, Tetrahedron Lett. , 2016, 57, 920-923
- (19) Khurana M. J., Kukreja G.: Rapid reduction of nitriles to primary amines with nickel boride at ambient temperature, Synth. Comm., 2002, 32 (8), 1265-1269
- (20) Heinzman W. S., Ganem B.: The Mechanism of Sodium Borohydrate – Cobaltous Chloride Reductions, J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 6801-6802
- (21) Eckert A.C. et.al: CO<sub>2</sub> – Protected Amine Formation from Nitrile and Imine Hydrogenation in Gas-Expanded Liquids; Ind. Eng. Chem, 2004, 7907-7911
- (22) Požgan F., Štefane B.: Uvod v laboratorijsko organsko kemijo, 2.izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2011
- (23) Falque V., Montalbetti C. A. G. N: Amide bond formation and peptide coupling, Tetrahedron, 2005, (61), 100827-10852
- (24) Jiang N, Li C.-J: Novel 1,3-dipolar cycloaddition of diazocarbonyl compounds to alkynes catalyzed by InCl<sub>3</sub> in water, Chem. Commun., 2004, 394-395
- (25) <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/ic50> (dostopano 3.8.2018)