

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANDREJ ŠTERMAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANDREJ ŠTERMAN

RAZISKOVANJE KEMIJSKEGA PROSTORA ZAVIRALCEV INHA

EXPLORATION OF THE CHEMICAL SPACE OF INHA INHIBITORS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Izidorja Sosiča. Računalniške analize, spektroskopske meritve in encimski testi so bili opravljeni na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se asist. Kaji Rožman za opravljena encimska testiranja, doc. dr. Marku Jukiču za računalniško sidranje spojin in doc. dr. Stanetu Pajku za analizo spojin z masno spektrometrijo ter HPLC.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Izidorja Sosiča. Naloga je del projekta InhA pod vodstvom prof. dr. Stanislava Gobca.

Andrej Šterman

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Mojca Kerec-Kos, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1. Uvod.....	1
1.1. Tuberkuloza	1
1.2. Tiadiazolni zaviralci InhA in njihov SAR.....	3
1.3. Tetrahidropiranski zaviralci InhA	6
1.4. Kemijski prostor	7
2. Načrt dela.....	9
2.1. Hibridne spojine	9
2.2. Zamenjava tiadiazolnega obroča C.....	12
2.3. Zamenjava lipofilnega obroča A	12
2.4. Rigidizacija povezave med obročema A in B	13
3. Materiali in metode	14
3.1. Materiali.....	14
3.2. Metode	14
4. Eksperimentalno delo.....	16
4.1. Splošni postopki	16
4.1.1. Delo v argonovi atmosferi.....	16
4.1.2. Splošni postopek za alkiliranje pirazolnega dušika.....	16
4.1.3. Splošni postopek za bazično hidrolizo acetamida.....	16
4.1.4. Splošni postopek za sklapljanje s HATU.....	16
4.1.5. Splošni postopek za ciklizacijo tiadiazolnega obroča s H ₂ SO ₄	17
4.2. Priprava dimetilpirazolnih hibridnih spojin.....	18

Magistrska naloga

4.2.1.	Sinteza N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)acetamida (16a)	18
4.2.2.	Sinteza N-(1H-pirazol-3-il)acetamida (16b)	18
4.2.3.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil-5-metil-1H-pirazol-3-il)acetamida (17a)	19
4.2.4.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil-1H-pirazol-3-il)acetamida (17b)	19
4.2.5.	Sinteza 1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina (18a)	19
4.2.6.	Sinteza 1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-amina (18b)	19
4.2.7.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-4-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)benzamida (6)	20
4.2.8.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-4-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)benzamida (7)	20
4.3.	Priprava metiltiazolnih hibridnih spojin	22
4.3.1.	Sinteza etil 4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzoata (19)	23
4.3.2.	Sinteza etil 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoata (20)	23
4.3.3.	Sinteza 4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzojske kisline (21)	23
4.3.4.	Sinteza 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanojske kisline (22)	24
4.3.5.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzamida (8)	24
4.3.6.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzamida (9)	24
4.3.7.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il) propanamida (10)	25
4.3.8.	Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il) propanamida (11)	25
4.4.	Zamenjava tiadiazola s piridazinom	26
4.4.1.	Sinteza 3-acetil-6-kloropiridazina (23)	26
4.4.2.	Sinteza 1-(6-kloropiridazin-3-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (24)	27
4.4.3.	Sinteza N-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)acetamida (25)	27

Magistrska naloga

4.4.4.	Sinteza 1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-amina (26)	27
4.4.5.	Sinteza 1-(4-metiltiazol-2-il)-1-(6-((1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)piridazin-3-il)etan-1-ola (12).....	28
4.5.	Povečanje lipofilnega obroča.....	29
4.5.1.	Sinteza N-metil-2-nitroanilina (27)	29
4.5.2.	Sinteza N-metil-1,2-fenilendiamina (28)	30
4.5.3.	Sinteza 2-(klorometil)-1-metil-1H-benzimidazola (29)	30
4.5.4.	Sinteza N-(1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)acetamida (30)	30
4.5.5.	Sinteza 1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina (31)	31
4.5.6.	Sinteza 1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-izotiocianata (32)	31
4.5.7.	Sinteza 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanhidrazida (33)	31
4.5.8.	Sinteza 2-(2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoil)-N-(1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)hidrazin-1-karbotioamida (34)	32
4.5.9.	Sinteza 1-(5-((1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (13)	32
4.6.	Rigidizacija povezave med obročema A in B	33
4.6.1.	Sinteza 1-metil-3-jodo-7-aza-1H-indola (35).....	33
4.6.2.	Sinteza (1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-amina (36)	34
4.6.3.	Sinteza (1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-izotiocianata (37).....	34
4.6.4.	Sinteza 2-(2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoil)-N-(1-(1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-il)hidrazin-1-karbotioamida (38)	35
4.6.5.	Sinteza 1-(5-((1-(1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (14)	35
4.7.	Encimska testiranja.....	35
5.	Rezultati in razprava	37

Magistrska naloga

5.1.	Rezultati encimskih testiranj	37
5.2.	Razprava k izbranim sinteznim postopkom.....	38
5.2.1.	Izkoristek bazične hidrolize acetamida (18a, 18b)	38
5.2.2.	Izkoristek reakcije z BuLi (19, 20).....	39
5.2.3.	Izkoristek sklapljanja s HATU (8 – 11)	39
5.2.4.	Uvedba acetilne skupine na piridazinski obroč (23)	39
5.2.5.	Reakcija z BuLi pri piridazinski spojini (24).....	40
5.2.6.	Buchwald-Hartwigovo aminiranje (12)	40
5.3.	Razprava k aktivnosti sintetiziranih spojin.....	42
5.3.1.	Hibridne spojine 6 – 11	42
5.3.2.	Piridazinska spojina 12	44
5.3.3.	Spojina s povečanim lipofilnim delom 13	45
5.3.4.	Rigidizirana spojina 14	46
6.	Sklep	47
7.	Literatura.....	49

POVZETEK

Tuberkuloza je eden izmed najpogostejših vzrokov smrti na svetu. Čedalje večji javnozdravstveni problem predstavlja odpornost povzročitelja *Mycobacterium tuberculosis* na uveljavljena zdravila, kot je izoniazid. Isoniazid zavira bakterijski encim InhA, ki je ključen za sintezo celične stene, vendar je predzdravilo in se mora predhodno aktivirati z encimom katalaza-peroksidaza. Ker je v večini primerov vzrok za odpornost na izoniazid mutacija v tem encimu, je rešitev razvoj neposrednega zaviralca InhA. Dva izmed bolj razvitih kemijskih razredov neposrednih zaviralcev InhA sta tiadiazolni in tetrahidropiranski razred, oba z zaviralnimi koncentracijami v nizkem nanomolarnem območju. V sklopu te magistrske naloge smo sintetizirali nekaj hibridov med obema razredoma, pri čemer je bil naš namen dodatno raziskati kemijski prostor zaviralcev InhA. Nadalje smo z istim ciljem v tiadiazolno spojino vodnico sistematično vnašali določene modifikacije: tiadiazolni obroč smo zamenjali s piridazinskim, sintetizirali smo spojino s povečanim lipofilnim delom in še spojino, pri kateri je lipofilni del rigidno povezan s preostankom molekule.

Hibridne spojine so se izkazale za neaktivne, piridazinski derivat je imel približno 1000-krat nižjo aktivnost od vodnic, rigidizirani 100-krat nižjo, le spojina s povečanim lipofilnim delom je ohranila primerljivo aktivnost glede na vodnice. Ti rezultati so presenetljivi, saj kažejo, da molekula z vsemi farmakofori, ki so v podobnih spojinah že bili validirani in dokazano interagirajo s tarčo, lahko izgubi vso aktivnost, če je medsebojni položaj danih farmakoforov le malo spremenjen. To kaže na izjemno ozek kemijski prostor zaviralcev InhA. Z opisanim raziskovalnim delom smo jasno ponazorili pomen pravilne medsebojne orientacije farmakoforov in tudi napovedali značilnosti spojin, pri katerih pričakujemo dobro zaviralno aktivnost. Nadaljnje raziskovalno delo bi se moralo osredotočiti na iskanje idealnega položaja lipofilnega dela v hidrofobnem žepu aktivnega mesta, za ta namen pa v nalogi predlagamo tudi nekaj struktur spojin, ki temeljijo na naših izsledkih. To magistrsko delo tako predstavlja pomemben korak naprej na poti do razvoja optimalne molekule, ki bi čez leta lahko prišla tudi v klinično uporabo.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the most common causes of death worldwide. An increasing danger to the public health is being posed by the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, a microorganism which causes the disease, especially to the front-line drugs such as isoniazid. Isoniazid inhibits the bacterial enzyme InhA, which is crucial for the cell wall synthesis. Its mechanism of action is not direct as it must first be activated by another mycobacterial enzyme, KatG. Because in most cases of resistance to isoniazid the underlying cause is a mutation in KatG, a solution to the problem is the development of direct InhA inhibitors. Among others, the thiadiazole and tetrahydropyran class have been developed, both exhibiting IC₅₀ values in low nanomolar range. In this work, we synthesized several compounds, which are hybrids of both classes, with the purpose to further explore the chemical space of InhA inhibitors. Furthermore, we systematically introduced various modifications into the thiadiazole lead compound: namely, we substituted the thiadiazole moiety with a pyridazine ring; we synthesized a compound with a larger lipophilic part, and prepared a compound where the lipophilic part is rigidly linked to the remainder of the molecule.

The hybrid compounds proved to be inactive, while the pyridazine derivative and the rigidized compound showed approximately 1000-fold and 100-fold lower activities, respectively, in comparison to the leads. Only the molecule with an enlarged lipophilic part was comparable to the lead compounds. These results are surprising and show that a compound featuring the required pharmacophores, which were validated and were proven to interact with the target, may lose the activity altogether if the spatial orientation of the said pharmacophores is changed ever so slightly. This indicates that the chemical space of InhA inhibitors is extremely narrow. Our work demonstrates the importance of the correct spatial orientation of pharmacophores and also predicts the properties of compounds which are expected to be active, if synthesized in the future. Further work on InhA inhibitors should focus on achieving the optimal position of the lipophilic part in the hydrophobic pocket of InhA. Therefore, this work represents an important step forward in the pursuit of developing an optimal InhA inhibitor, which could, in time, enter clinical use.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	Adenozin trifosfat
BrettPhos	2-(Dicikloheksilfosfino)3,6-dimetoksi-2',4',6'-triizopropil-1,1'-bifenil
BuLi	Butilitij
clogP	Logaritem porazdelitvenega koeficienta, izračunan po metodi prispevka skupin
CoA	Koencim A (ang.: coenzyme A)
d	Dublet
dd	Dublet dubleta
ddd	Dublet dubleta dubleta
dddd	Dublet dubleta dubleta dubleta
DIPEA	Diizopropiletilamin
DMA	N,N-dimetilacetamid
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	Dimetilsulfoksid
ekv	Ekvivalent
ESI	Ionizacija z razprševanjem v električnem polju (ang.: electrospray ionizaton)
FAS-II	Sintetaza maščobnih kislin II (ang.: fatty acid synthetase)
HATU	1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat
HIV	Virus humane imunske pomanjkljivosti (ang.: human immunodeficiency virus)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang.: high-performance liquid chromatography)
IC50	Polovica maksimalne zaviralne koncentracije (ang.: inhibitory concentration)
J	Sklopitvena konstanta
MDR-TB	Na več zdravil odporna tuberkuloza (ang.: multi-drug-resistant tuberculosis)
Met	Metionin
MIC	Minimalna zaviralna koncentracija (ang.: minimal inhibitory concentration)
MS	Masna spektrometrija
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NAD⁺	Oksidirana oblika NAD
NADH	Reducirana oblika NAD
NMP	N-metilpirolidin-2-on
NMR	Nuklearna magnetna resonanca
Pd₂(dba)₃	Tris(dibenzilidenacetone)dipaladij(0)
Pd-C	Paladij na ogljiku
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kislina)
q	Kvartet
r s	Razširjen singlet
RA	Rezidualna aktivnost
Rf	Retencijski faktor
RT	Sobna temperatura (ang.: room temperature)
s	Singlet
SAR	Razmerje med strukturo in delovanjem (ang.: structure-activity relationship)
t	Triplet
TBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
tBuXPhos	2-di-terc-butilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil

Magistrska naloga

THF	Tetrahidrofuran
TLC	Tankoplastna kromatografija (ang.: thin-layer chromatography)
XDR-TB	Izrazito odporna tuberkuloza (ang.: extensively drug-resistant tuberculosis)
Xphos Pd G2	Kloro(2-dicikloheksilfosfino-2',4',6'-triizopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladij(II)

1. Uvod

1.1. Tuberkuloza

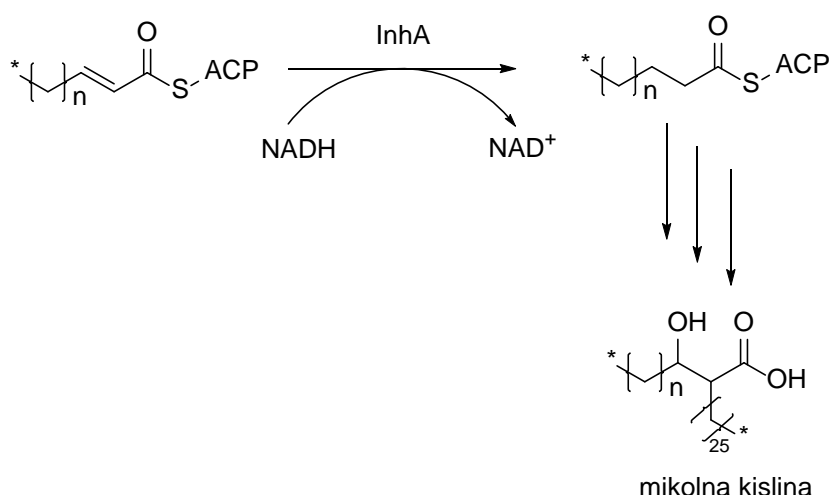
Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča bakterija *Mycobacterium tuberculosis*, v letu 2016 pa je bila eden izmed najpogostejših vzrokov smrti na svetu (1). Zanj je v tem letu zbolelo več kot 10 milijonov ljudi, umrlo pa 1,7 milijona, od tega 400 tisoč okuženih s HIV – v tej populaciji je tuberkuloza vzrok za kar 40% vseh smrti (1). Mikobakterije se bistveno razlikujejo od ostalih za človeka patogenih bakterij, saj imajo med prokarionti edinstveno sestavo celične stene (2). Ta ima še dodatno zunanjo ovojnico, ki jo sestavlja kar 60% lipidov, med katerimi je največ mikolnih kislin. To so za mikobakterije in korinebakterije specifične dolge, razvejane maščobne kisline, zaradi katerih je zunanja ovojnica celične stene izjemno hidrofobna in zato neprepustna za večino snovi iz okolja, kar bakterijo varuje pred imunskim sistemom gostitelja in tudi pred veliko večino antibiotikov (2). Ovojnica iz mikolnih kislin je pomemben dejavnik virulence tudi zato, ker bakteriji omogoča infiltracijo in preživetje v makrofagih, zaradi česar mora biti zdravljenje okužb še posebej dolgotrajno, saj se želimo izogniti temu, da bi fagocitirane latentne bakterije sprožile nov zagon na uporabljena zdravila odporne bolezni (2).

Tudi zaradi tega se za zdravljenje tuberkuloze uporabljajo kombinacije zdravilnih učinkovin, zdravljenje pa tipično traja od 6 do 9 mesecev (2, 3). Zaradi omenjenih posebnosti v sestavi celične stene se uporabljajo specifični antibiotiki in kemoterapevtiki, zdravili prvega izbora sta izoniazid in rifampicin, uporabljata pa se še etambutol in pirazinamid (3). Ker je nabor učinkovin za zdravljenje tuberkuloze zelo omejen, čedalje večji javnozdravstveni problem predstavlja na izoniazid in rifampicin odporna tuberkuloza, imenovana MDR-TB (ang. multi-drug-resistant tuberculosis; na več zdravil odporna tuberkuloza) (2, 3). Še hujša oblika je XDR-TB (ang. extensively drug-resistant tuberculosis; izrazito odporna tuberkuloza), ki se ne odziva niti na zdravila drugega izbora, kot so fluorokinoloni in kanamicin, tako da učinkovita farmakoterapija zanjo pogosto sploh ne obstaja (1). V letu 2016 je po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije za tema oblikama tuberkuloze zbolelo okrog pol milijona ljudi, od tega večina na Kitajskem, v Indiji in Rusiji (1). Za zdravljenje odpornih oblik tuberkuloze je bil leta 2012 registriran bedakvilin, ki zavira mikobakterijsko ATP-sintazo, vendar ima hude stranske učinke (hepatotoksičnost, podaljšanje QT-intervalov), ki omejujejo njegovo uporabo

Magistrska naloga

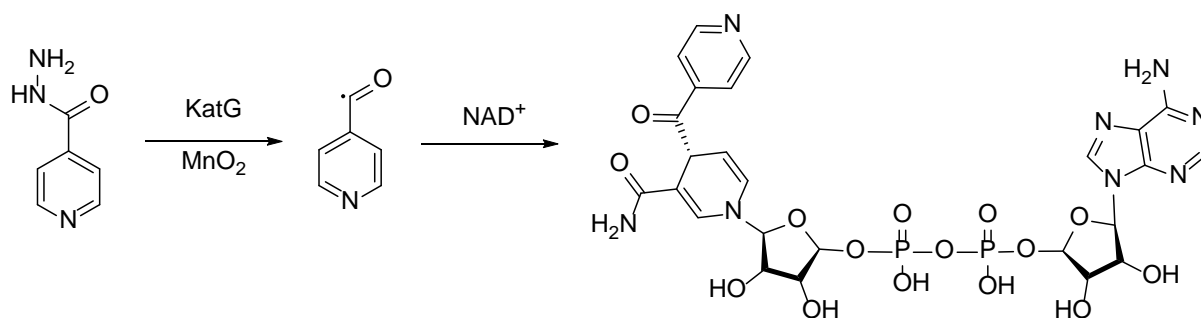
(4). V eni izmed kliničnih študij je skupina bolnikov, ki je prejela bedakvilin, imela celo večjo smrtnost od kontrolne skupine, ki je prejela placebo (4). Ta primer jasno ponazarja nujno potrebo po odkrivanju novih zdravil, saj bedakvilin ni prinesel bistvenega preboja pri terapiji MDR-TB oziroma XDR-TB.

Kot opisano zgoraj so mikolne kisline ključen dejavnik virulence mikobakterij, ob tem pa so zanje tudi specifične, zato je z vidika farmakoterapije smiselno preprečevati njihovo biosintezo. Ta poteka prek sistema FAS-II (ang. fatty acid synthetase; sintetaza maščobnih kislin), v katerem ima ključno vlogo encim reduktaza enoil acil prenašalnega proteina (InhA) (5). S pomočjo InhA se na acil prenašalni protein (ACP) vezani prekursor reducira, čemur v več stopnjah sledi dokončna sinteza mikolne kisline, ki ima značilno zgradbo: tipične so β -hidroksi skupina in dve lipofilni verigi, ena je 26-členska, druga pa variabilna ter navadno še daljša z vključenimi ciklopropilnimi skupinami (2, 5) (slika 1).



Slika 1: Poenostavljen prikaz biosinteze mikolnih kislin, povzeto po Willey in soavtorji (2).

Ker sinteza maščobnih kislin pri človeku poteka po drugačni poti (FAS-I) in tako na tem nivoju ni nevarnosti za toksično delovanje, je InhA privlačna tarča za zdravljenje tuberkuloze, nanjo pa deluje ravno izoniazid, vendar po dokaj kompleksnem mehanizmu. Isoniazid je namreč predzdravilo, ki se po pasivnem vstopu v mikobakterijsko celico z encimom KatG (katalaza-peroksidaza) pretvori v izonikotinoilni radikal, ta pa se nato kovalentno veže na NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid) (6,7) (slika 2).



Slika 2: Mehanizem aktivacije izoniazida, povzeto po Chollet in soavtorji (6).

Komaj ta spojina je dejanski zaviralec InhA in se prilega v aktivno mesto encima. Zaradi zavrtega delovanja InhA je bakteriji onemogočena sinteza mikolnih kislin, posledica česar sta izguba funkcije celične stene in smrt mikobakterije (8).

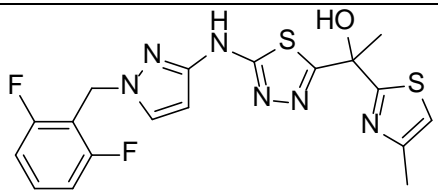
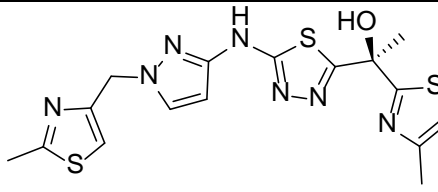
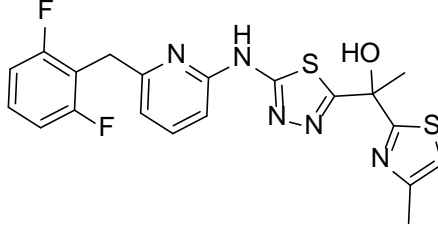
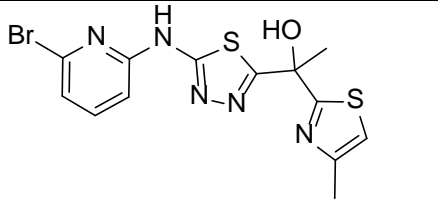
Pri približno dveh tretjinah na izoniazid odpornih mikobakterij je bila odkrita mutacija v genu, ki kodira KatG, pri čemer tako ne pride do aktivacije izoniazida, encim InhA pa je pri teh bakterijah nespremenjen in bi bil še vedno občutljiv na zgoraj opisano spojino (9). To pomeni, da bi lahko večino okužb z na izoniazid odpornimi bakterijami zdravili z učinkovinami, ki učinkujejo neposredno na InhA in ne potrebujejo predhodne aktivacije s KatG. Z uporabo novega zaviralca bi se ob primerljivi učinkovitosti lahko izognili tudi stranskim učinkom izoniazida, med katerimi velja poudariti nevo- in hepatotoksičnost, predvsem zaradi slednje je namreč zdravljenje včasih potrebno prekiniti (10).

1.2. Tiadiazolni zaviralci InhA in njihov SAR

Z metodami visokozmogljivega molekulskega rešetanja so različne raziskovalne skupine odkrile več zadetkov, ki učinkujejo neposredno na InhA, med njimi pa so se kot ene najbolj obetavnih izkazale spojine z 1,3,4-tiadiazolnim obročem, tako da se bomo v tej magistrski nalogi osredotočili prav nanje (11, 12). Optimizirane spojine in njihove aktivnosti so prikazane spodaj, pri čemer je v vseh primerih podana aktivnost racemne zmesi, razen pri spojini **2**, ki je čisti (*S*)-enantiomer (preglednica I).

Magistrska naloga

Preglednica I: Pregled nekaterih obstoječih tiadiazolnih zaviralcev InhA

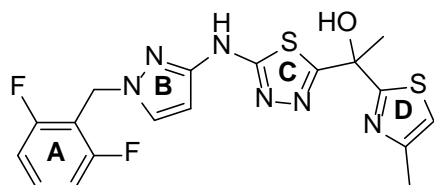
	Strukturna formula	IC ₅₀ ^a	MIC ^b
Spojina <u>1</u>		4 nM	0,2 μM
Spojina <u>2</u>		7 nM	0,2 μM
Spojina <u>3</u>		<0,002 nM	3,13 μM
Spojina <u>4</u> ^c		13 nM	2 μM

^a: polovica maksimalne zaviralne koncentracije, merjeno na InhA, podatek o aktivnosti povzet po Rožman in soavtorji (11).

^b: minimalna zaviralna koncentracija, merjeno na *Mycobacterium tuberculosis*, sev H37Rv, podatek povzet iz preglednega članka Rožman in soavtorji (11).

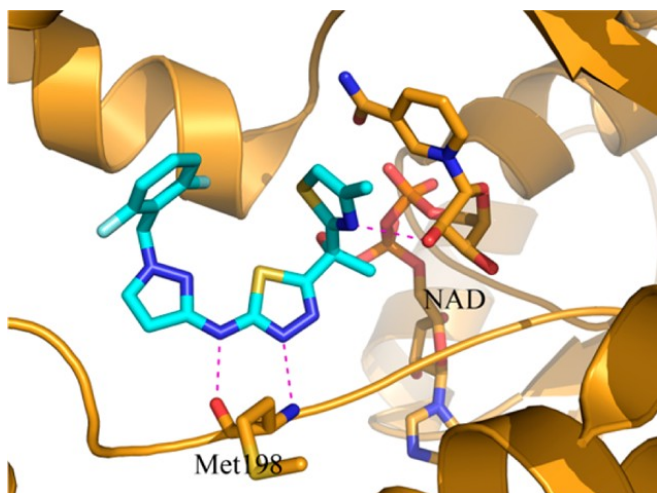
^c: podatek iz Šink in soavtorji (12).

Za lažjo analizo SAR (ang. structure-activity relationship; razmerje med strukturo in aktivnostjo) velja aromatske obročje označiti s črkami A, B, C in D, pri čemer spojina 4 obroč A nima (slika 3).



Slika 3: S črkami označeni obroč pri tiadiazolni spojini 1

Različne raziskovalne skupine so razrešile kristalne strukture več različnih spojin v aktivnem mestu InhA, kar nam omogoča boljše razumevanje vezave molekul in s tem daje tudi možnost optimizacije zaviralcev InhA (12, 13, 14). Za lažjo ponazoritev prilagamo model sokristalne strukture spojine **2** (slika 4, PDB vnos 4bqp).



Slika 4: Spojina **1** v aktivnem mestu InhA, slika povzeta po Šink in soavtorji; z dovoljenjem avtorjev. (12)

Iz računalniških vizualizacij sledi, da so za vezavo ključna tri področja v aktivnem mestu encima: katalitsko (interakcija z NAD^+), hidrofilno (interakcija z Met98, torej metioninskim ostankom) in hidrofobni žep (interakcija z več hidrofobnimi ostanki) (14). Spojina **1** se v aktivnem mestu orientira v obliki podkve, iz kristalne strukture pa je možno razbrati, da se obroč A prilega v hidrofobni žep, kjer tvori hidrofobne in Van der Waalove interakcije, medtem ko je obroč B pomemben predvsem za zagotavljanje pravilne orientacije obroča A. Sledijo še tri pomembne vodikove vezi: dve z Met98 in ena z NAD^+ . Aminska skupina med obročema B in C se poveže s karbonilno skupino, tiadiazol (obroč C) pa z amidno NH-skupino metionina, medtem ko je za interakcijo z NAD^+ odgovoren tiazolni (obroč D) dušik (12, 13).

Na kratko velja pojasniti posledice nekaterih sprememb, ki so jih raziskovalci med procesom optimizacije uvedli v spojine. Krčenje lipofilnega dela, ki ga sestavlja obroč A, oziroma zamenjava z manj lipofilnimi fragmenti, sta vodila v slabšo zaviralno aktivnost na encimu (12). Pri spojini **4** pa je obroč A nadomeščen z bromom, ki je relativno voluminozen substituent, saj so avtorji molekulo želeli skrajšati in hkrati tudi ustvariti nekoliko bolj hidrofilno spojino (12). Težava spojine **1** je namreč prav v previsoki lipofilnosti, kar napoveduje slabe farmakokinetične lastnosti, njen clogP (porazdelitveni koeficient, izračunan

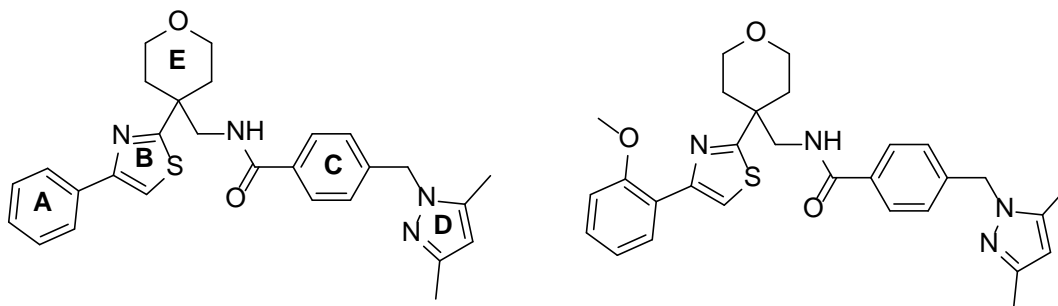
Magistrska naloga

po metodi prispevka skupin) namreč znaša 2,15, medtem ko je ta vrednost za spojino **4** znižana na 1,26, za spojino **2** pa na 0,71. Obroč D in njegova povezava z obročem C sta že dokaj dobro optimizirana; od prvotnega metilpirazolnega obroča, ki je bil z obročem C povezan z metilensko skupino, je razvoj šel v smer večje hidrofilnosti ob ohranjeni aktivnosti (15). Primerjava spojin **1** in **2** nadalje kaže, da ima spojina **2** ob bistveno boljših fizikalno-kemijskih lastnostih, na kar kaže že omenjena vrednost clogP, primerljivo zaviralno aktivnost tako na izoliranem encimu kot na mikobakterijah.

Z vidika optimizacije spojin pa je zanimivo predvsem neujemanje med IC_{50} in MIC vrednostmi: medtem ko spojina **3** izkazuje več kot 1000-krat višjo aktivnost na encimu, je njeno protibakterijsko delovanje približno 10-krat slabše od spojin **1** in **2**. Podobno velja tudi za spojino **4**, sicer tudi ob slabšem IC_{50} . Možna razlaga za ta na prvi pogled paradoksalen pojav je denimo, da piridinski obroč B spojin **3** in **4** predstavlja oviro za vstop molekul v celico, ali pa ju naredi bolj dovzetno za iztočne črpalke, s katerimi ju bakterija lahko odstrani.

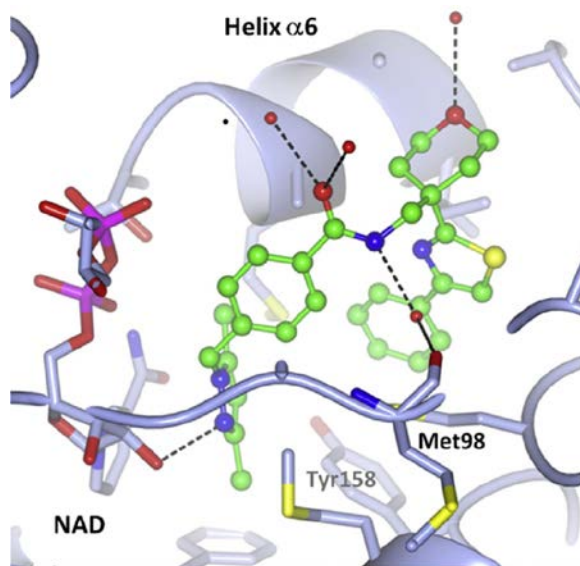
1.3. Tetrahidropiranski zaviralci InhA

Z visokozmogljivim rešetanjem molekul iz zbirke GlaxoSmithKline je bil odkrit še en razred zaviralcev InhA, za katerega je značilen tetrahidropiranski obroč na kvarternem ogljikovem atomu (16). Po vzoru prvotnega zadetka (spojina **5**) so sintetizirali serijo spojin, najboljša od njih je imela IC_{50} pri 36 nM in MIC pri 5 μ M koncentraciji, njena prednost pred zadetkom pa je bila poleg večje hidrofilnosti tudi boljši MIC, medtem ko je bila aktivnost na samem encimu primerljiva (slika 5).



Slika 5: Spojina **5** (levo) z označenimi obroči (analogno tiadiazolom) in njen optimiziran derivat (desno)

Razrešili so tudi kristalno strukturo spojine **5** v aktivnem mestu InhA, kjer enako kot tiadiazolne spojine zavzame podkvasto obliko (slika 6).



Slika 6: Spojina **5** v aktivnem mestu InhA, povzeto po Pajk in soavtorji; z dovoljenjem avtorjev (16).

Za interakcijo z Met98 je tukaj odgovoren amidni dušik, z NAD^+ pa se poveže eden izmed pirazolnih dušikov. Na tiazol vezani benzenov obroč A podobno kot pri tiadiazolih zagotavlja hidrofobne interakcije v lipofilnem žepu. Tukaj je zanimivo predvsem to, da za to serijo značilni tetrahidropiranski obroč E sploh ne tvori interakcij s tarčnim encimom, saj štrli iz aktivnega mesta in zgolj zagotavlja pravilno orientacijo lipofilnega dela (16).

Primerjava aktivnosti opisanih tiadiazolov in tetrahidropiranov torej kaže, da sta skupini učinkovin glede na način vezave v aktivno mesto zelo sorodni, saj v njem zavzameta enako obliko in tvorita zelo podobne interakcije. Z metioninom tvorijo tiadiazoli dve vodikovi vezi (aminska skupina med obročema B in C ter tiadiazolni dušik), tetrahidropirani pa eno (amidna NH-skupina), prav tako pa oba razreda spojin interagirata z NAD^+ , ki je prisoten v aktivnem mestu encima. Za vezavo torej ni potrebno imeti specifične funkcionalne skupine, pač pa le prave farmakofore z optimalno medsebojno lego in orientacijo v prostoru.

1.4. Kemijski prostor

Pojem kemijski prostor se lahko uporablja zelo široko, zato je prav, da ga v tej magistrski nalogi jasno definiramo. V osnovi je to virtualen večdimenzionalen prostor, definiran s parametri kot so molekulska masa, število aromatskih obročev, število kationskih centrov, lipofilnost itd. Po tej široki definiciji tako vsebuje vse molekule, ki jih je v teoriji možno sintetizirati, teh pa je po nekaterih študijah več kot 10^{60} (17). Omenjene parametre lahko poljubno omejimo, da kemijski prostor zožimo na spojine, ki imajo po dostopnih podatkih

Magistrska naloga

določeno biološko aktivnost, v našem primeru zavirajo encim InhA. Ko torej v praksi govorimo o kemijskem prostoru zaviralcev InhA, imamo v mislih skupek kemijskih lastnosti in medsebojnega položaja farmakoforov, ki spojini omogoča zaviralno aktivnost.

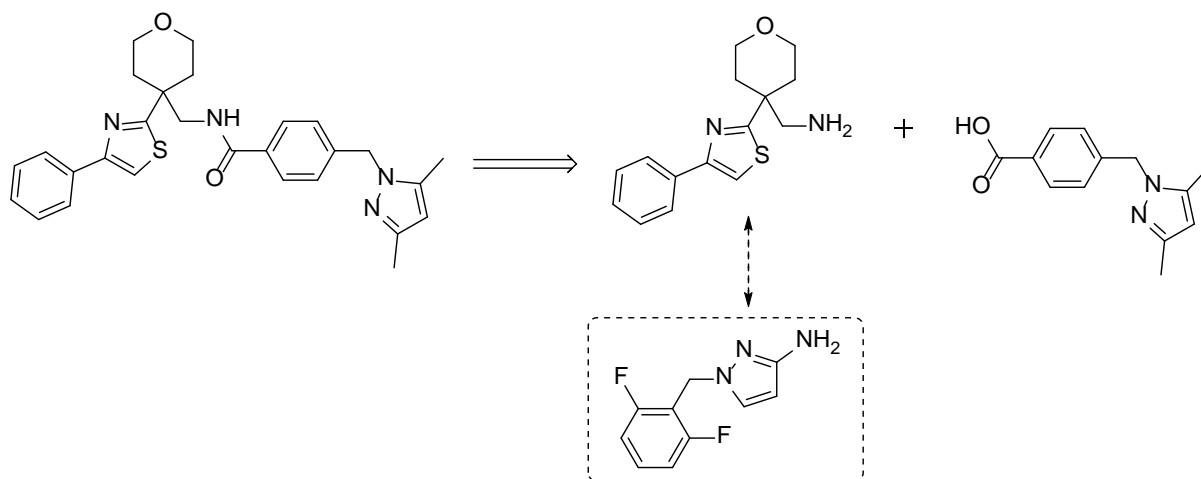
2. Načrt dela

V tej magistrski nalogi bomo raziskali kemijski prostor zaviralcev InhA upoštevajoč že znane podatke o njem, ki so opisani v uvodu. Za ta namen bomo sistematično načrtovali večje število spojin, ki jih bomo sintetizirali in nato testirali na mikobakterijskem encimu InhA. Naš osnovni namen je tako dobiti več podatkov o kemijskem prostoru zaviralcev InhA, saj bomo iz aktivnosti sintetiziranih spojin lahko sklepali, katere lastnosti so ugodne za zaviralno aktivnost in katere ne. Dolgoročno – in izven konteksta samega magistrskega dela – to pomeni, da želimo s pridobljenimi podatki o kemijskem prostoru prispevati k možnosti razvoja optimiziranega zaviralca.

2.1. Hibridne spojine

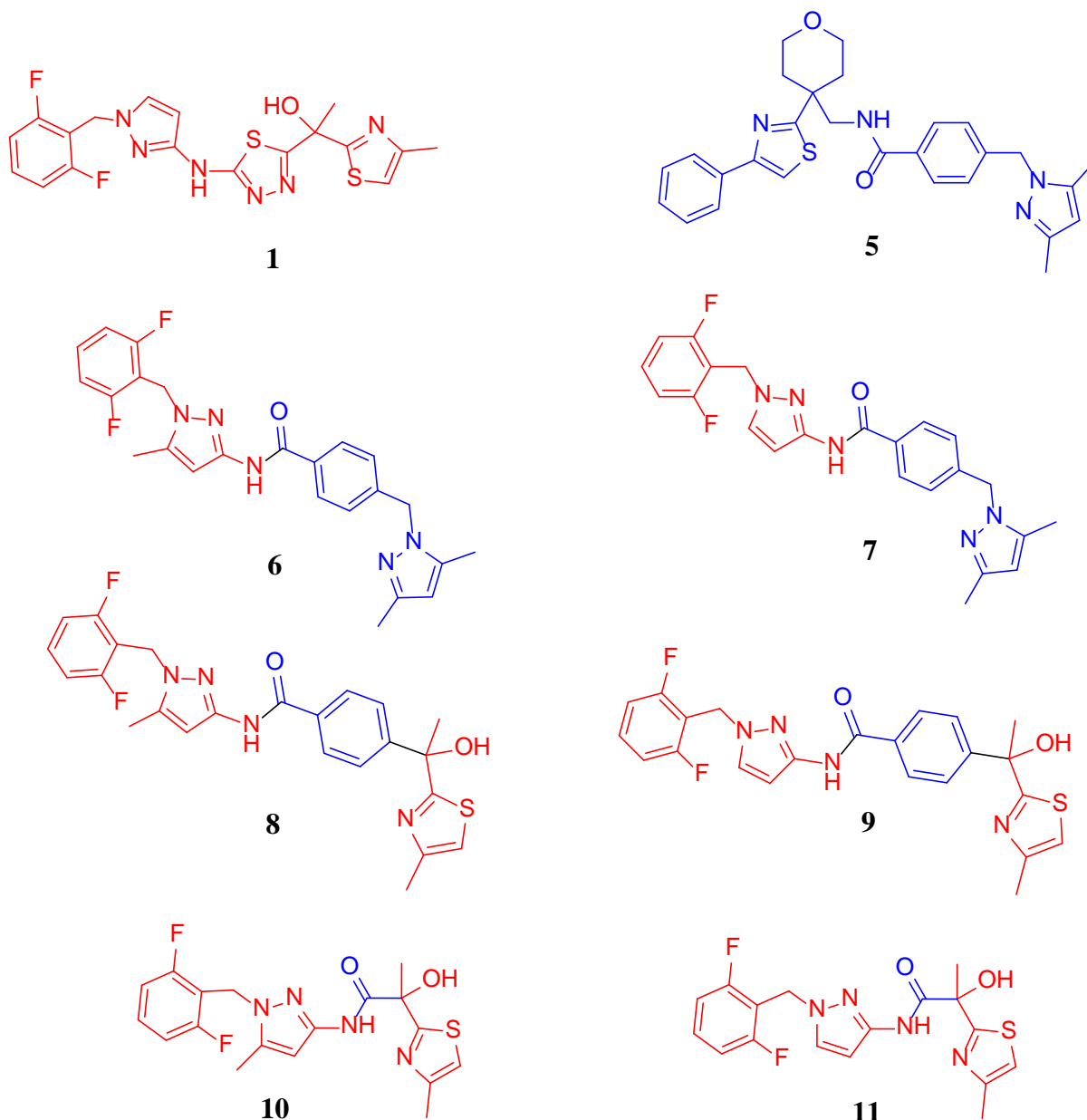
Po številnih preizkušanih serijah spojin je jasno, da lahko pri načrtovanju molekul uporabimo različne funkcionalne skupine, ni pa še razvite teorije, ki bi opisovala, kako različne kombinacije teh skupin vplivajo na zaviralno aktivnost. Izmerjene aktivnosti in razrešene kristalne strukture spojin **1** in **5** jasno kažejo, da so strukturno različni deli obeh spojin analogni, kar se tiče vezave v aktivno mesto InhA. S sistematičnim križanjem farmakoforov dveh zaviralno delujočih razredov spojin, torej tiadiazolov in tetrahidropiranov, želimo dobiti nove (hibridne) aktivne spojine, pri katerih bi lahko dodatno preučili vplive specifičnih delov molekul na njihovo aktivnost. Ker je ta magistrska naloga del skupnega raziskovalnega dela več raziskovalcev na Katedri za farmacevtsko kemijo, bomo sintetizirali le nekaj izmed možnih hibridnih spojin. Za lažjo ponazoritev spojino **5** retrosintezno ločimo na amin in karboksilno kislino: od nje bomo uporabili kislinski del, to sta po prej uvedenem poimenovanju obročev obroča C in D, od spojine **1** pa aaminski del, torej obroča A ter B (slika 7).

Magistrska naloga



Slika 7: Retrosintezna analiza spojine 5 z dodanim amskim delom spojine 1.

Naslednja shema prikazuje spojine, ki jih želimo sintetizirati. Nad njo sta najprej prikazani spojini vodnici, ki sta označeni vsaka s svojo barvo – z isto barvo pa so v hibridnih spojinah označeni deli, ki izvirajo iz njiju (slika 8).



Slika 8: Načrtovane hibridne spojine 6 - 11

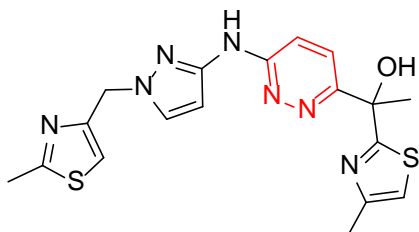
Najprej bomo sintetizirali spojini 6 in 7, ki sta čista hibrida spojin vodnic, razlikujeta se le glede metilne skupine na pirazolnem obroču B. Preučiti namreč želimo, kakšen vpliv ima ta metilna skupina na orientacijo lipofilnega obroča A, zato bomo za primerjavo sintetizirali po eno metilirano in eno nemetilirano različico vsake hibridne spojine. Nadalje bomo sintetizirali spojini 8 in 9, ki vsebujeta obroč A, B in D spojine 1, od spojine 5 pa ohranjata obroč C in amidno vez. Spojini 10 in 11 sta skrajšani, kar je dobro z vidika večje hidrofilitnosti, pri tem pa

Magistrska naloga

se zavedamo možnosti, da bi obroč A (difluorofenilni fragment) lahko bil premalo oddaljen od amidnega dušika za ugodno lego v hidrofobnem žepu.

2.2. Zamenjava tiadiazolnega obroča C

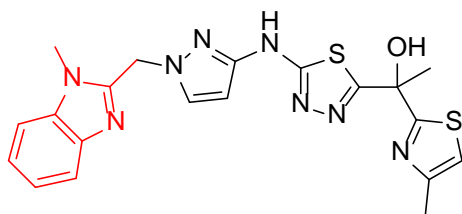
Tiadiazolni obroč tvori pomembno interakcijo z Met98, hkrati pa rigidno povezuje obroč B (in posledično A) z obročem D, s čimer določa obliko molekule. Kot zanimiva bioizosterna zamenjava se ponuja piridazinski obroč, ki bi nudil nekoliko drugačen kot med obema deloma molekule, hkrati pa zadrži vse ostale lastnosti spojine vodnice. Ta sprememba bi lahko bila ključna v iskanju idealne orientacije spojine v aktivnem mestu encima. Tako bomo sintetizirali spojino **12**, ki ima namesto tiadiazolnega piridazinski obroč (slika 9).



Slika 9: Načrtovan piridazinski derivat – spojina **12**

2.3. Zamenjava lipofilnega obroča A

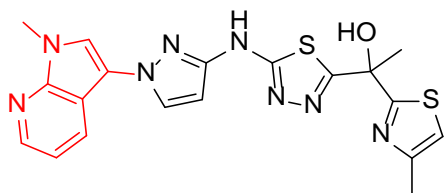
Po kristalnih strukturah aktivnih spojin sodeč je v lipofilnem žepu aktivnega mesta InhA še prostor za večje ali drugače orientirane lipofilne dele spojin. Naša hipoteza je, da bo prostorsko večji obroč A tvoril močnejše hidrofobne interakcije s tem delom vezavnega mesta, posledica česar bo večja afiniteta molekule do encima. Pri načrtovanju take molekule moramo vseeno paziti, da ne bi vključili preveč lipofilnega fragmenta, zaradi katerega bi spojina kot celota imela neidealno visok logP. Iz tega razloga bomo sintetizirali spojino **13**, to je N-metilbenzimidazolni analog spojin **1** in **2**, pri kateri je obroč A bistveno večji in bolj lipofilen, hkrati pa imidazolna dušika nudita akceptorsko mesto za vodikovo vez, zaradi česar predvidevamo ohranitev sprejemljivih farmakokinetičnih lastnosti, denimo topnosti (slika 10).



Slika 10: Načrtovan derivat s povečanim lipofilnim obročem A – spojina **13**

2.4. Rigidizacija povezave med obročema A in B

Kot že omenjeno, je po našem mnenju za čim boljšo zaviralno aktivnost molekul ključna pravilna orientacija lipofilnega obroča A ob prisotnosti ostalih delov molekule, ki lahko tvorijo potrebne interakcije. Metilenski distančnik, ki pri že sintetiziranih spojinah povezuje obroč A in B, resda omogoča orientacijo obroča A v različne smeri in tako tudi v lipofilni žep (inducirano prileganje), toda s tem daje molekuli dodatno stopnjo prostosti, kar je v farmacevtski kemiji načeloma nezaželeno. Idealna bi tako bila spojina, ki ima bolj rigidno povezavo med obročema A in B, pri čemer sta ta dva obroča že v zeleni medsebojni legi. Prav to želimo doseči s spojino **14** (slika 11).



Slika 11: Načrtovan derivat z rigidno povezavo med obročema A in B – spojina **14**

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

Pri magistrski nalogi smo uporabili kemikalije proizvajalcev Sigma-Aldrich, TCI, Fluorochem, Maybridge, Acros Organics, Activate Scientific, Merck in Fluka.

3.2. Metode

Brezvodni THF (tetrahidrofuran) smo pripravili sami z destilacijo iz benzofenon-ketil-natrijevega sistema. Komercialno dostopnemu THF smo v posodi, povezani z destilacijsko napravo, ob segrevanju dodajali benzofenon in na koščke narezan elementarni natrij, dokler ni raztopina postala temno modre barve. Nato smo THF destilirali in destilat zbirali v erlenmajerico z aktiviranimi molekulskimi siti razreda 0,4 nm, kjer smo ga hranili v argonovi atmosferi in ga za potrebe reakcij odvezemali z brizgo. Kjer je posebej poudarjeno, smo sveže predestilirani THF odvezeli z brizgo neposredno iz destilacijske naprave ter ga takoj prenesli v bučko, v kateri smo izvajali reakcijo.

Potek reakcij smo spremljali s tankoplastno kromatografijo, pri čemer smo uporabili TLC plošče proizvajalca Merck (silikagel na aluminijski podlagi, 60 F₂₅₄, 0,25 mm). Spojine smo na TLC detektirali z ultravijolično svetlobo pri valovni dolžini 254 oziroma 365 nm, po potrebi smo jih orosili z ninhidrinom. Ločbo s »flash« kolonsko kromatografijo smo izvajali na silikagelu 60 proizvajalca Merck, velikost delcev od 0,04 do 0,063 nm.

¹H in ¹³C spektre smo snemali na napravi Bruker AVANCE III 400 pri 400 MHz, pri čemer smo kot topilo uporabljali CDCl₃ oziroma devteriran DMSO (dimetilsulfoksid, DMSO-*d*₆). Spektre smo nato procesirali v programu MestRe-C proizvajalca Mestrelab Research.

Za HPLC ločbo smo uporabili HPLC sistem Thermo Scientific DIONEX UltiMate 3000 in kolono Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico acetonitrila in vode, pri čemer smo pričeli elucijo s 5 % acetonitrila in zaključili linearni gradient po 10 min z 80 % acetonitrila. Kolona je bila med ločbo ogreta na 40 °C, elucijo pa smo spremljali z ultravijolično svetlobo pri 254 nm.

Magistrska naloga

Masne spektre smo posneli na masnem spektrometru Thermo Scientific QExactive plus z ESI ionizacijo (ionizacija z razprševanjem v električnem polju, ang.: electrospray ionization).

Strukturne formule spojin in reakcijske sheme smo risali s programom ChemBioDraw Ultra 17.0, isti program smo uporabili tudi za izračun molekulskih mas in napoved masnih ter NMR-spektrov. Za napoved 3D-lastnosti spojin in izračun kotov med različnimi deli molekul smo uporabili program ChemBio3D Ultra 17.0, oba programa sta last proizvajalca PerkinElmer.

4. Eksperimentalno delo

4.1. Splošni postopki

4.1.1. Delo v argonovi atmosferi

Bučko z magnetnim mešalom smo prežarili z žarilno pištolo, jo pokrili s septo in prepihali z argonom. Trdne reagente smo v bučko dodajali tako, da smo septo odstranili in jo po dodatku vnovič namestili ter bučko prepihali z argonom. Tekoče reagente (in trdne, kjer je posebej navedeno, da smo jih predhodno raztopili) smo dodajali s stekleno brizgo z iglo, ki smo jo prav tako predhodno prežarili.

4.1.2. Splošni postopek za alkiliranje pirazolnega dušika

V argonovi atmosferi smo ustrezno spojino s prostim pirazolnim dušikom (1 ekv) raztopili v brezvodnem DMF (N,N-dimetilformamid, 5 mL oziroma minimalna količina, ki je zadoščala, da se je spojina raztopila), ji na ledeni kopeli dodali ustreznemu alkilbromid oziroma alkilklorid (1,05 ekv) in NaH (1,4 ekv). Nato smo reakcijsko zmes segreli na sobno temperaturo in mešali od 48 do 72 h. Potem smo na rotavaporju odparili DMF (60 °C, 16 mbar) in oljnatemu preostanku dodali 100 mL koncentrirane vodne raztopine NH₄Cl, to pa ekstrahirali z 2 × 100 mL CH₂Cl₂. Združeni organski fazi smo sušili nad Na₂SO₄, odparili topilo in odvisno od posameznega primera nadaljevali s čiščenjem surovega produkta.

4.1.3. Splošni postopek za bazično hidrolizo acetamida

Ustreznemu acetamid smo raztopili v 96-odstotnem EtOH (10 mL na 200 mg acetamida) in dodali 25-odstotno vodno raztopino NaOH (10 mL na 200 mg). Na bučko smo namestili vodni hladilnik in raztopino na oljni kopeli refluktirali 16 ur. Nato smo raztopino ohladili na sobno temperaturo, odparili topilo, dolili od 50 do 100 mL vode (odvisno od količine izhodne spojine) in ekstrahirali v EtOAc (3 × od 50 do 100 mL). Združene organske faze smo sušili nad Na₂SO₄, odparili topilo in odvisno od posameznega primera nadaljevali s čiščenjem surovega produkta.

4.1.4. Splošni postopek za sklapljanje s HATU

Ustrezno karboksilno kislino (1 ekv) smo v argonovi atmosferi raztopili v brezvodnem DMF (1 mL na 5 mg karboksilne kisline), dodali HATU (1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat, 1,05 ekv) in na sobni temperaturi mešali

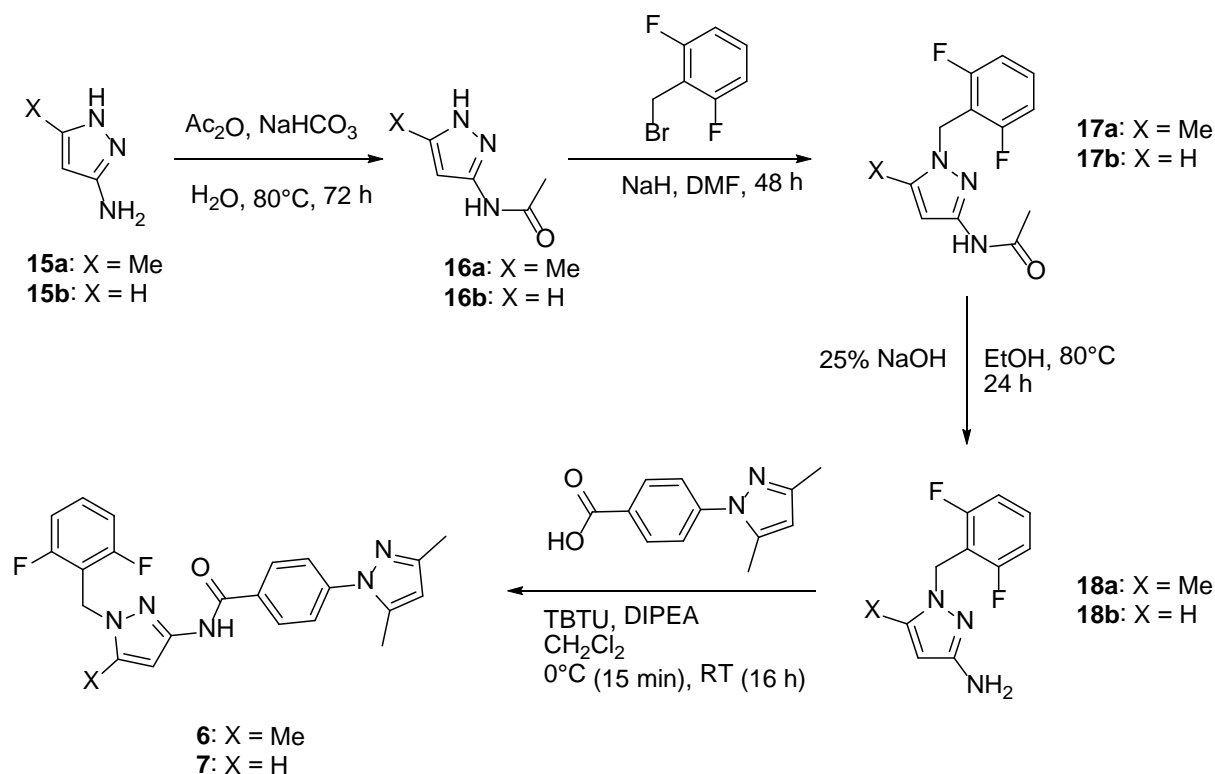
Magistrska naloga

15 minut. Nato smo dodali DIPEA (diizopropiletilamin, 3 ekv) in ustrezni amin (1,0 – 1,1 ekv) ter spremljali potek reakcije s TLC-kromatografijo. Ko smo presodili, da sta se oba reaktanta porabila, smo odparili topilo na 60 °C pri tlaku 30 mbar, dolili 50 mL CH₂Cl₂ ter ga ekstrahirali z 1 × 50 mL 1 M HCl in 1 × 50 mL nasičene vodne raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo, nato pa odvisno od posameznega primera nadaljevali s čiščenjem surovega produkta s »flash« kolonsko kromatografijo.

4.1.5. Splošni postopek za ciklizacijo tiadiazolnega obroča s H₂SO₄

Ustrezno izhodno spojino smo raztopili v 2 mL koncentrirane H₂SO₄ in raztopino mešali na sobni temperaturi 2 uri. Nato smo raztopino na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in jo počasi nevtralizirali s 25-odstotnim amonijakom. Dodajali smo ga po kapljicah, saj je nevtralizacija potekala izjemno burno. Ko je pH raztopine dosegel vrednost 11, smo dolili 10 mL vode in izpadlo oborino odnučali ter odvisno od posameznega primera nadaljevali s čiščenjem produkta.

4.2. Priprava dimetilpirazolnih hibridnih spojin



Slika 12: Reakcijska shema za hibridni spojin **6** in **7**

4.2.1. Sinteza N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)acetamida (**16a**)

Natehtali smo spojino **15a** (5,20 g, 51,5 mmol) in jo raztopili v vodi (30 mL), dodali NaHCO_3 (4,33 g, 51,5 mmol) in 5 minut mešali na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali Ac_2O (9,78 mL, 103 mmol) in po nadaljnjih petih minutah segreli na 80°C ter tako mešali 72 ur. Reakcijsko zmes smo nato na ledeni kopeli ohladili, pri čemer je izpadla bela oborina, ki smo jo odnučali in spirali z ledeno vodo. Matičnico smo nevtralizirali z 2 M NaOH do $\text{pH} \sim 12$ in ekstrahirali z EtOAc (3x100 mL). Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobljeno trdno belo snov smo združili z odnučano oborino, skupna masa je znašala 4,34 g (60-odstotni izkoristek). Po TLC sodeč je bil produkt čist, retencijski faktor (R_f) pa se je ujema s standardom, tako da smo ga brez dodatnega čiščenja in analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.2.2. Sinteza N-(1H-pirazol-3-il)acetamida (**16b**)

Natehtali smo spojino **15b** (5,14 g, 60,17 mmol) in sledili postopku za sintezo spojine **16a**. Masa produkta je bila 6,76 g (90-odstotni izkoristek). Po TLC sodeč je bil produkt čist, R_f pa

Magistrska naloga

se je ujemal s standardom, tako da smo ga brez dodatnega čiščenja in analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.2.3. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil-5-metil-1H-pirazol-3-il)acetamida (**17a**)

Uporabili smo spojino **16a** (1,0 g, 7,2 mmol) in 2,6-difluorobenzilbromid (1,56 g, 7,56 mmol) ter sledili splošnemu postopku za alkiliranje pirazolnega dušika, pri čemer smo uporabili 60-odstotno disperzijo NaH v mineralnem olju. Po ekstrakciji in uparitvi topila smo dobili 1,82 g trdnega belega produkta (95-odstotni izkoristek). TLC je pokazal, da je bil produkt čist, R_f pa se je ujemal s standardom, tako da smo ga brez dodatnega čiščenja in analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.2.4. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil-1H-pirazol-3-il)acetamida (**17b**)

Uporabili smo spojino **16b** (1,0 g, 8,0 mmol) in 2,6-difluorobenzilbromid (1,74 g, 8,4 mmol) ter sledili postopku za sintezo spojine **17a**. Izolirali smo 1,95 g trdnega belega produkta (97-odstotni izkoristek). Po TLC sodeč je bil produkt čist, R_f pa se je ujemal s standardom, tako da smo ga brez dodatnega čiščenja in analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.2.5. Sinteza 1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina (**18a**)

Uporabili smo spojino **17a** (1,80 g, 6,8 mmol) in sledili splošnemu postopku za bazično hidrolizo acetamida. Surovo zmes smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1. Izolirali smo 667 mg produkta kot oranžno trdno snov (44-odstotni izkoristek). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.22 (s, 3H), 4.45 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, *J* = 0,7 Hz), 7.05 – 7.13 (m, 2H), 7.36 – 7.45 (m, 1H) ppm.

4.2.6. Sinteza 1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-amina (**18b**)

Uporabili smo spojino **17b** (1,93 g, 7,7 mmol) in sledili postopku za sintezo spojine **18a**. Dobili smo 983 mg produkta kot oranžno trdno snov (61-odstotni izkoristek). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.59 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.36 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz), 7.06 – 7.14 (m, 2H), 7.36 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz), 7.38 – 7.47 (m, 1H) ppm.

4.2.7. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-4-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)benzamida (**6**)

Spojino **18a** (334 mg, 1,5 mmol) smo v argonovi atmosferi raztopili v 20 mL brezvodnega CH₂Cl₂. Nato smo dodali DIPEA (0,77 mL, 4,5 mmol) in TBTU (O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat, 626 mg, 1,95 mmol), zamašili s septo in mešali na ledeni kopeli 15 minut. 4-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)benzojsko kislino (345 mg, 1,5 mmol, predhodno sintetizirana na katedri s strani raziskovalcev pod vodstvom dr. Pajka) smo v drugi bučki prav tako v argonovi atmosferi raztopili v 5 mL brezvodnega CH₂Cl₂, nato pa smo jo z brizgo po kapljicah dodali v bučko s spojino **18a**. Pustili smo, da se je reakcijska zmes segrela na sobno temperaturo, in mešali 16 ur. Tedaj smo dolili 10 mL CH₂Cl₂ in ekstrahirali s 3 × 40 mL 1 M HCl, 3 × 40 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in 2 × 40 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo odparili pod znižanim tlakom in izvedli ločbo s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : acetone = 10 : 1. Ker je ¹H-NMR nakazoval prisotnost tetrametilsečnine, ki je na TLC-ploščici nismo mogli videti, smo izvedli še eno »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo. Izolirali smo 115 mg trdnega belega produkta (18-odstotni izkoristek). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.09 (s, 3H), 2.14 (d, 3H, *J* = 0.6 Hz), 2.37 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 7.09 – 7.15 (m, 4H), 7.40 – 7.49 (m, 1H), 7.87 – 7.91 (m, 2H), 10.66 (s, 1H) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 10.55, 10.74, 13.28, 40.06, 51.09, 97.64, 105.03, 111.67 (dd, ²*J*_{CF} = 18 Hz, ⁴*J*_{CF} = 6 Hz), 112.73 (t, ²*J*_{CF} = 19 Hz), 126.42, 127.98, 130.63 (t, ²*J*_{CF} = 10 Hz), 132.93, 138.81, 139.05, 141.34, 146.17, 146.55, 160.92 (dd, ¹*J*_{CF} = 249 Hz, ³*J*_{CF} = 8 Hz), 164.055 ppm. HRMS za C₂₄H₂₃F₂N₅O: izračunan 435,1871, izmerjen 436,1940 ([MH]⁺). Čistota (HPLC): 99,5 %.

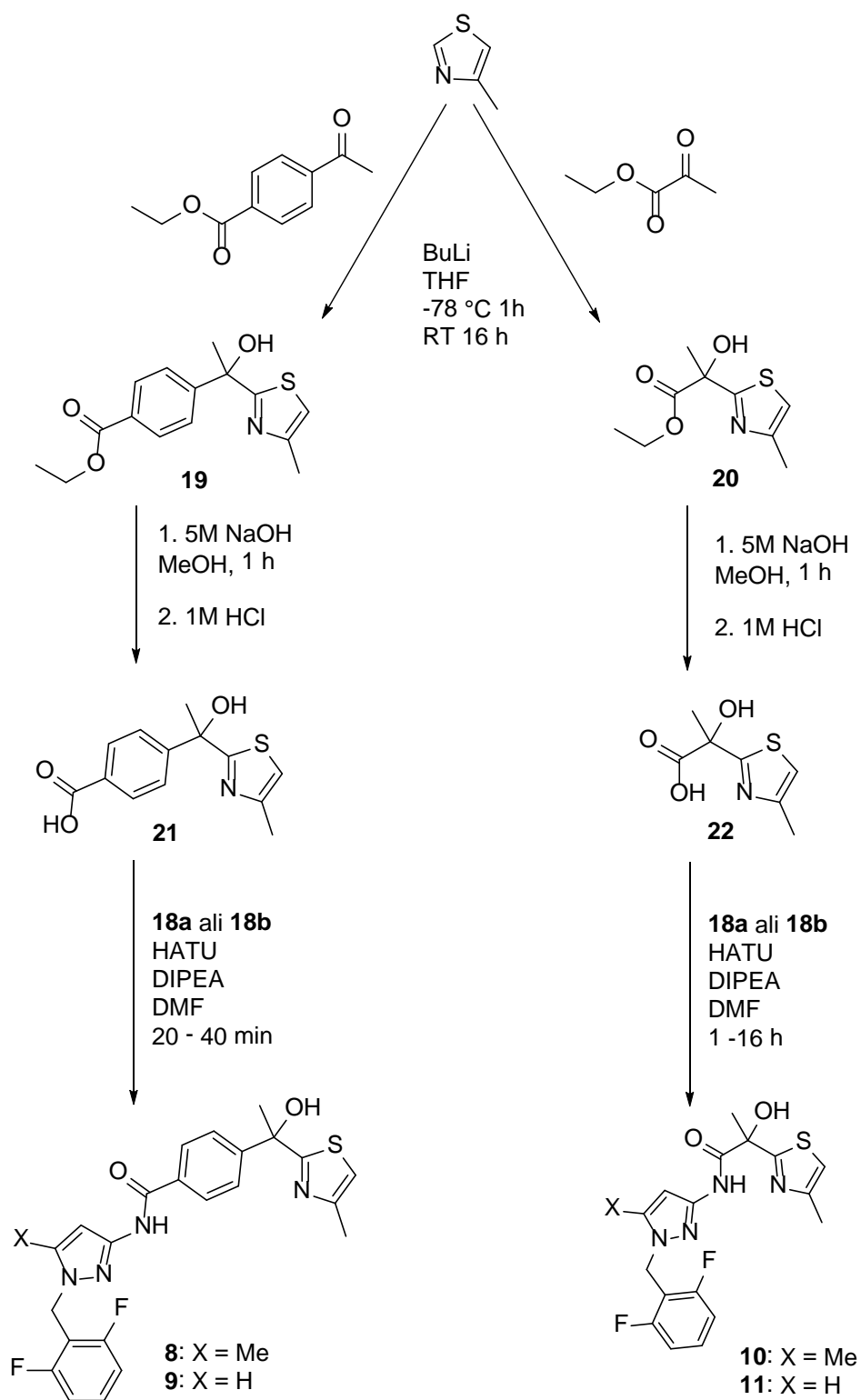
4.2.8. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-4-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)benzamida (**7**)

Izhajali smo iz spojine **18b** (313 mg, 1,5 mmol) in v popolnosti sledili postopku za sintezo spojine **6**. Izolirali smo 45 mg trdnega belega produkta (7-odstotni izkoristek). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.09 (s, 3H), 2.15 (d, 3H, *J* = 0.6 Hz), 5.24 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 6.62 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.09 – 7.17 (m, 4H), 7.41 – 7.50 (m, 1H), 7.76 (d, 1H, *J*

Magistrska naloga

= 2.3 Hz), 7.9 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 10.80 (s, 1H) ppm. HRMS za $C_{23}H_{21}F_2N_5O$: izračunan 421,1714, izmerjen 422,1783 ($[MH]^+$). Čistota (HPLC): 95 %.

4.3. Priprava metiltiazolnih hibridnih spojin



Slika 13: Reakcijska shema za hibridne spojine 8-11

4.3.1. Sinteza etil 4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzoata **(19)**

4-Metiltiazol (793 mg, 8 mmol) smo raztopili v sveže predestiliranem THF (20 mL, odvzet neposredno iz destilacijske naprave) v argonovi atmosferi. Nato smo raztopino ohladili na -78 °C in po 10 minutah po kapljicah dodali BuLi (4,48 mL, 2,5 M raztopina v heksanu, 11,2 mmol). Po 1 uri smo etil 4-acetilbenzoat (1,50 g, 8,4 mmol) v argonovi atmosferi raztopili v 10 mL sveže predestiliranega THF in to raztopino počasi dodali k 4-metiltiazolu ter mešali še pol ure. Nato smo raztopino počasi segreli na sobno temperaturo in tako mešali še 16 ur. Tedaj smo dodali 20 mL nasičene vodne raztopine NH_4Cl , odparili topilo, dolili 30 mL vode in ekstrahirali s 3×50 mL CH_2Cl_2 . Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze heksan : EtOAc : MeOH = 15 : 10 : 2. Izolirali smo 260 mg rumenkastega olja (11-odstotni izkoristek), ki smo ga brez dodatne analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.3.2. Sinteza etil 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoata **(20)**

4-Metiltiazol (1,50 g, 15,13 mmol) smo raztopili v sveže predestiliranem THF (20 mL) v argonovi atmosferi. Nato smo raztopino ohladili na -78 °C in po 10 minutah po kapljicah dodali BuLi (6,65 mL, 2,5 M raztopina v heksanu, 16,64 mmol). Po 1 uri smo dodali še etilpiruvat (1,73 mL, 15,89 mmol) in v nadaljnjem sledili postopku za spojino **19**. Surov produkt smo nato očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze dietil eter : petroleter = 1 : 1, suhi nanos. Izolirali smo 330 mg produkta kot blede rumenega olja (10-odstotni izkoristek). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 1.14 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1.69 (s, 3H), 2.31 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 4.09 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz), 6.73 (s, 1H), 7.20 (q, 1H, $J = 1.0$ Hz) ppm.

4.3.3. Sinteza 4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzojske kisline **(21)**

Spojino **19** (260 mg, 0,89 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 mL 5 M NaOH. Po enournem mešanju smo odparili topilo, dolili 20 mL vode in ekstrahirali z 2×20 mL EtOAc. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M HCl do pH = 1 in jo ekstrahirali z 2×40 mL EtOAc. Združeni organski fazi smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo, da smo dobili produkt kot temnorumeno trdno snov z maso 220 mg (94-odstotni izkoristek). ^1H NMR

Magistrska naloga

(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.90 (s, 3H), 2.31 (d, 3H, $J = 0,9$ Hz), 6.76 (s, 1H), 7.11 – 7.13 (m, 1H), 7.64 – 7.68 (m, 2H), 7.86 – 7.90 (m, 2H), 12.67 (r s, 1H) ppm.

4.3.4. Sinteza 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanojske kisline **(22)**

Spojino **20** (330 mg, 1,65 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 mL 5 M NaOH. Po enournem mešanju smo odparili MeOH in na vakuumski črpalki še vodo. Predhodni poskusi so namreč pokazali, da spojina za razliko od spojine **21** zaradi visoke polarnosti ne prehaja v organsko topilo niti iz nakisane vodne faze. Suh preostanek v bučki smo prelili z MeOH, filtrirali in odparili topilo iz filtrata. Izolirali smo 280 mg trdnega rumenkastega produkta (99-odstotni izkoristek), ki smo ga brez dodatne analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.3.5. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzamida **(8)**

Sledili smo splošnemu postopku za sklapanje s HATU, pri čemer smo uporabili 25 mg (0,095 mmol) spojine **21** in 22 mg (0,1 mmol) spojine **18a**. Reakcijo smo izvajali 30 minut. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1. Ker je ¹H-NMR nakazoval prisotnost tetrametilsečnine, pa smo ga dodano očistili z novo »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo. Izolirali smo 5 mg trdnega belega produkta (11-odstotni izkoristek). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.88 (s, 3H), 2.31 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 2.37 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 6.44 (d, 1H, $J = 0.5$ Hz), 6.70 (s, 1H), 7.10 – 7.15 (m, 3H), 7.40 – 7.49 (m, 1H), 7.56 – 7.60 (m, 2H), 7.86 – 7.90 (m, 2H), 10.64 (s, 1H) ppm. ¹²C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 10.74, 16.95, 30.14, 40.06, 74.88, 97.63, 111.67 (dd, ²J_{CF} = 18 Hz, ⁴J_{CF} = 6 Hz), 112.74 (t, ²J_{CF} = 19 Hz), 114.15, 124.92, 127.43, 130.64 (t, ²J_{CF} = 10 Hz), 132.48, 139.04, 146.58, 149.84, 151.67, 160.89 (dd, ¹J_{CF} = 250 Hz, ³J_{CF} = 8 Hz), 164.11, 178.24 ppm. HRMS za C₂₄H₂₂F₂N₄O₂S: izračunan 468,1432, izmerjen 469,1504 ([MH]⁺). Čistota (HPLC): 95 %.

4.3.6. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-4-(1-hidroksi-1-(4-metiltiazol-2-il)etil)benzamida **(9)**

Sledili smo splošnemu postopku za sklapanje s HATU, pri čemer smo uporabili 25 mg (0,095 mmol) spojine **21** in 21 mg (0,1 mmol) spojine **18b**. Reakcijo smo izvajali 40 minut.

Magistrska naloga

Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1. Ker je ^1H -NMR nakazoval prisotnost tetrametilsečnine, pa smo ga dodano očistili z novo »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo. Izolirali smo 11 mg trdnega belega produkta (26-odstotni izkoristek). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.89 (s, 3H), 2.31 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 5.33 (s, 2H), 6.62 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.71 (s, 1H), 7.11 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 7.14 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.42 – 7.50 (m, 1H), 7.58 – 7.62 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.88 – 7.92 (m, 2H), 10.78 (s, 1H) ppm. ^{12}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 16.95, 30.15, 40.06, 74.88, 97.73, 111.62, 112.50, 114.16, 124.96, 127.42, 130.98, 132.41, 138.92, 147.62, 149.91, 151.68, 162.19, 164.21, 178.23 ppm. Zaradi majhne količine vzorca sklopitve s fluorovimi jedri niso vidne. HRMS za $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: izračunan 454,1275, izmerjen 455,1347 ($[\text{MH}]^+$). Čistota (HPLC): 97 %.

4.3.7. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il) propanamida (**10**)

Sledili smo splošnemu postopku za sklapanje s HATU, pri čemer smo uporabili 58 mg (0,31 mmol) spojine **22** in 72 mg (0,325 mmol) spojine **18a**. Reakcijo smo izvajali 1 uro. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo ter dobili 32 mg produkta kot rumenkasto kristalinično snov (26-odstotni izkoristek). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.71 (s, 3H), 2.32 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 2.33 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 6.26 (d, 1H, $J = 0.5$ Hz), 7.01 (s, 1H), 7.12 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.19 – 7.21 (m, 1H), 7.40 – 7.49 (m, 1H), 9.47 (s, 1H) ppm. ^{12}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 10.67, 16.80, 26.28, 40.06, 76.04, 96.33, 111.68 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 18$ Hz, $^4J_{\text{CF}} = 6$ Hz), 112.53 (t, $^2J_{\text{CF}} = 19$ Hz), 114.90, 130.72 (t, $^2J_{\text{CF}} = 10$ Hz), 139.43, 145.20, 151.61, 160.70 (dd, $^1J_{\text{CF}} = 247$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 8$ Hz), 169.34, 172.98 ppm. HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: izračunan 392,1119, izmerjen 391,1051 ($[\text{M-H}]^-$). Čistota (HPLC): 97,5 %.

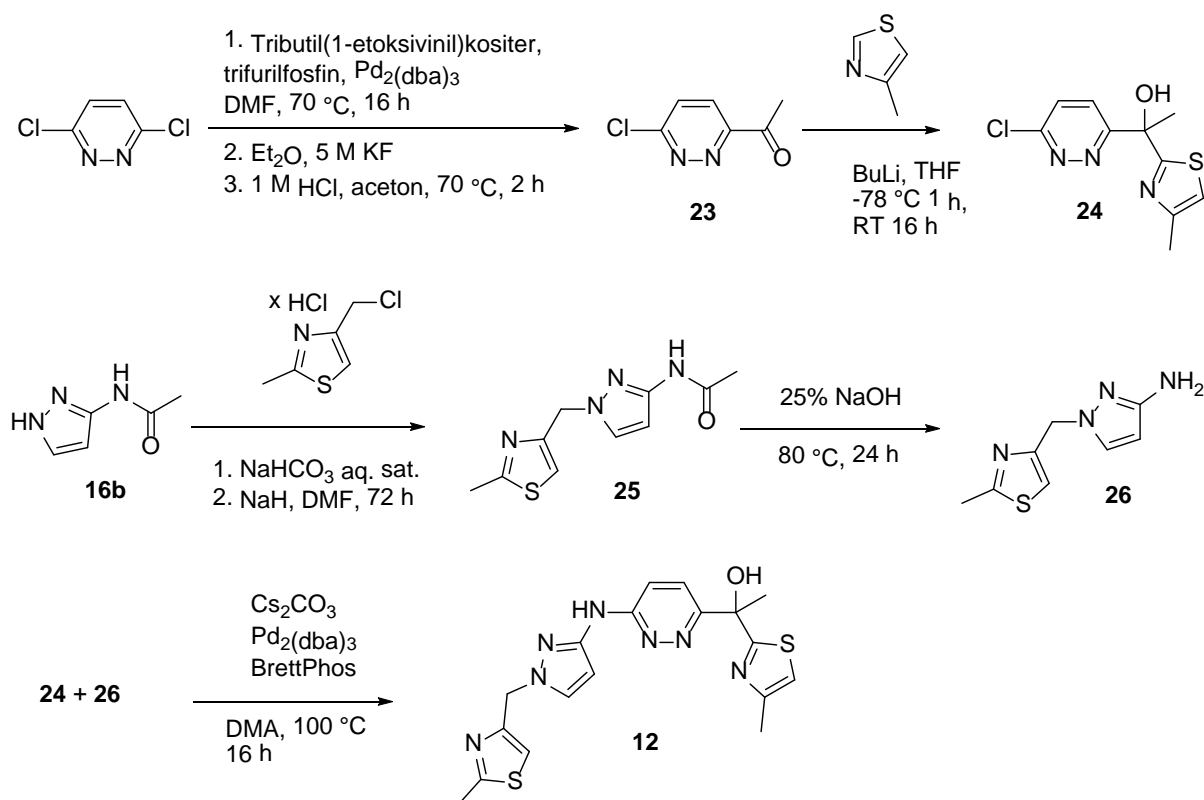
4.3.8. Sinteza N-(1-(2,6-difluorobenzil)-1H-pirazol-3-il)-2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il) propanamida (**11**)

Sledili smo splošnemu postopku za sklapanje s HATU, pri čemer smo uporabili 32 mg (0,171 mmol) spojine **22** in 39 mg (0,188 mmol) spojine **18b**. Reakcijo smo izvajali 16 ur. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo ter dobili 15 mg produkta kot belo kristalinično snov (23-odstotni izkoristek). ^1H NMR (DMSO-

Magistrska naloga

d_6 , 400 MHz): δ 1.73 (s, 3H), 2.32 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 5.28 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.03 (s, 1H), 7.12 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.19 – 7.21 (m, 1H), 7.40 – 7.49 (m, 1H), 9.47 (s, 1H) ppm. ^{12}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 16.81, 26.29, 42.40, 76.06, 96.61, 111.71 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 18$ Hz, $^4J_{\text{CF}} = 6$ Hz), 112.32 (t, $^2J_{\text{CF}} = 19$ Hz), 114.91, 131.01 (t, $^2J_{\text{CF}} = 10$ Hz), 131.26, 146.28, 151.63, 160.82 (dd, $^1J_{\text{CF}} = 249$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 8$ Hz), 169.52, 173.00 ppm. HRMS za $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: izračunan 378,0962, izmerjen 379,1031 ($[\text{MH}]^+$). Čistota (HPLC): 96,5 %.

4.4. Zamenjava tiadiazola s piridazinom

Slika 14: Reakcijska shema za piridazinsko spojino **12**4.4.1. Sinteza 3-acetil-6-kloropiridazina (**23**)

Natehtali smo 3,6-dikloropiridazin (2,0 g, 13,3 mmol) in sledili postopku iz literature (18). Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z mobilno fazo EtOAc : heksan = 1 : 5. Izolirali smo 900 mg produkta kot rjavkasto trdno snov (43-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.87 (s, 3H), 7.67 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 8.10 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz) ppm. HRMS za $\text{C}_6\text{H}_5\text{ON}_2\text{Cl}$: izračunan 156,0090, izmerjen 157,0163 ($[\text{MH}]^+$).

4.4.2. Sinteza 1-(6-kloropiridazin-3-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (**24**)

V argonovi atmosferi smo raztopili 4-metiltiazol (570 μ L, 6,28 mmol) v sveže predestiliranem THF, odvzetim z brizgo neposredno iz destilacijske naprave. Raztopino smo ohladili na -78 $^{\circ}$ C in po 10 minutah dodali BuLi (4,2 mL, 2,5 M raztopina v heksanu, 10,5 mmol). V drugi bučki smo prav tako v argonovi atmosferi v sveže predestiliranem THF raztopili spojino **23** in raztopino po pol ure dodali raztopini tiazola z BuLi. Po 1 uri smo pustili, da se reakcijska zmes segreje na sobno temperaturo, in mešali 16 ur. Tedaj smo na ledeni kopeli dodali 10 mL nasičene vodne raztopine NH_4Cl , odparili topilo, dolili 50 mL vode in ekstrahirali z 2×80 mL CH_2Cl_2 . Združeni organski fazi smo ekstrahirali s 150 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze EtOAc : heksan = 1 : 1. Izolirali smo 440 mg trdnega rumenkastega produkta (30-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.02 (s, 3H), 2.40 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 6.10 (s, 1H), 6.82 (q, 1H, $J = 1.0$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.08, (d, 1H, $J = 9.0$ Hz) ppm. HRMS za $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ON}_3\text{ClS}$: izračunan 255,0233, izmerjen 256,0305 ($[\text{MH}]^+$).

4.4.3. Sinteza N-(1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)acetamida (**25**)

Uporabili smo spojino **16b** (375 mg, 3 mmol) in 4-(klorometil)-2-metiltiazolijev klorid (525 mg, 2,85 mmol). Slednjega smo najprej nevtralizirali s 30 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 , ki smo jo ekstrahirali z 2×30 mL CH_2Cl_2 , združeni organski fazi sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo. Dobljeno svetlooranžno olje smo raztopili v 3 mL DMF ter sledili splošnemu postopku za alkiliranje pirazolnega dušika, pri čemer smo uporabili 95-odstotni NaH. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1. Dobili smo 300 mg trdnega belega produkta (45-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.12 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 5.24 (s, 2H), 6.70 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.85 – 6.88 (m, 1H), 7.40 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.77 (r s, 1H) ppm.

4.4.4. Sinteza 1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-amina (**26**)

Uporabili smo spojino **25** (300 mg, 1,27 mmol) in sledili splošnemu postopku za bazično hidrolizo acetamida. Po ekstrakciji smo dobili 190 mg trdnega oranžnorjavega produkta, ki ga

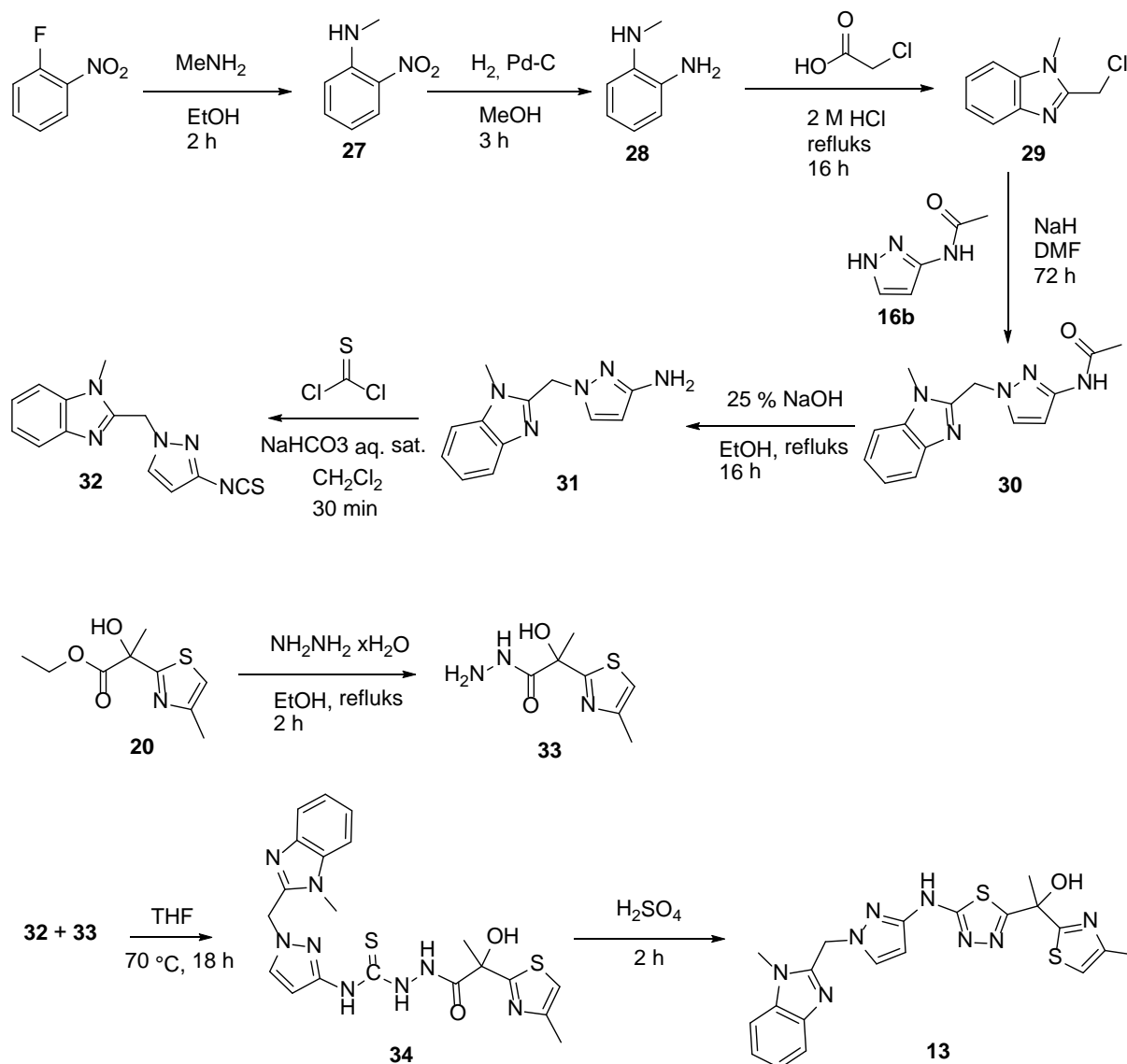
Magistrska naloga

nismo dodatno čistili (77-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.68 (s, 3H), 3.64 (r s, 2H), 5.17 (d, 2H, $J = 0.8$ Hz), 5.62 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.87 (t, 1H, $J = 0.9$ Hz), 7.27 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz) ppm.

4.4.5. Sinteza 1-(4-metiltiazol-2-il)-1-(6-((1-((2-metiltiazol-4-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)piridazin-3-il)etan-1-ola (**12**)

Spojino **26** (76 mg, 0,39 mmol), spojino **24** (100 mg, 0,39 mmol), Cs_2CO_3 (128 mg, 0,39 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (16 mg, 0,015 mmol) in BrettPhos (20 mg, 0,037 mmol) smo kvantitativno prenesli v visokotlačni reaktor z navojnim zamaškom in zmes v argonovi atmosferi raztopili v DMA (N,N-dimetilacetamid). Raztopino smo mešali 16 ur na 100 °C. Po 16 urah smo raztopino ohladili na sobno temperaturo in odparili topilo (oljna črpalka, 1 mbar, 50 °C) Nato smo dolili 50 mL CH_2Cl_2 in ekstrahirali s 50 mL nasičene vodne raztopine NH_4Cl ter 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl . Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo, nakar smo surov produkt očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$. Zaradi še vedno prisotnega DMA (dokazano z ^1H -NMR) smo produkt prelili s 5 mL etra in temu na ledeni kopeli dodali 5 mL n-heksana kot protitopila. Izpadlo oborino smo odnučali in tako izolirali 20 mg trdnega belega produkta (12-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.98 (s, 3H), 2.41 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz), 2.70 (s, 3H), 5.28 (d, 2H, $J = 0.7$ Hz), 6.25 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.47 (s, 1H), 6.76 – 6.78 (m, 1H), 6.92 (t, 1H, $J = 0.8$ Hz), 7.32 (r s, 1H), 7.45 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.64 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 7.86 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 17.30, 19.16, 30.10, 51.93, 75.37, 97.06, 114.12, 116.03, 116.38, 126.79, 130.81, 148.63, 151.24, 152.92, 155.78, 157.15, 166.82, 176.66 ppm. HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{OS}_2$: izračunan 413,1092, izmerjen 414.1163 ($[\text{MH}]^+$). Čistota (HPLC): 100 %.

4.5. Povečanje lipofilnega obroča



Slika 15: Reakcijska shema za spojino s povečanim lipofilnim obročem – **13**

4.5.1. Sinteza N-metil-2-nitroanilina (**27**)

1-Fluoro-2-nitrobenzen (2,00 g, 14,17 mmol) smo v bučki raztopili v 40 mL absolutnega EtOH in dodali metilamin (33-odstotna raztopina v EtOH, 5 mL, 40 mmol). Na bučko smo namestili vodni hladilnik in na vodni kopeli refluktirali na 80 °C 2 uri, pri čemer je raztopina postala oranžne barve. Tedaj smo odparili topilo in dobljeno oranžno tekočino pustili, da je na sobni temperaturi kristalizirala v živooranžne kristale z maso 2,14 g (100-odstotni izkoristek).

Magistrska naloga

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.03 (d, 3H, $J = 5,1$ Hz), 6.66 (ddd, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 1.2$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz), 7.47 (dddd, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, $J_3 = 1.7$ Hz, $J_4 = 0.6$ Hz), 8.18 (dd, 1H, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz) ppm.

4.5.2. Sinteza N-metil-1,2-fenilendiamina (**28**)

Spojino **27** (2,14 g, 14,16 mmol) smo v dvorogi bučki raztopili v 40 mL MeOH, večjo od odprtih zaprli s septo in iz bučke evakuirali zrak z vakuumsko črpalko. Nato smo bučko napolnili z argonom, vanjo dodali paladij na ogljiku (230 mg), zopet evakuirali in napolnili z vodikom. Dobili smo 1,54 g brezbarvne tekočine, ki je ob stiku z zrakom hitro temnela (89-odstotni izkoristek). Spojino smo brez dodatne analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.5.3. Sinteza 2-(klorometil)-1-metil-1H-benzimidazola (**29**)

Spojino **28** (1,54 g, 12,6 mmol) in kloroocetno kislino (1,78 g, 18,9 mmol) smo raztopili v 2 M HCl, bučko opremili z vodnim hladilnikom in refluktirali 16 ur na 100 °C. Tedaj smo raztopino ohladili na sobno temperaturo, jo nevtralizirali s trdnim NaHCO_3 ter dodali še 5 mL 1 M NaOH, da smo pH dvignili na 9. Pri tem je izpadla oborina, ki smo jo odnučali in spirali z ledeno vodo ter heksanom. Ker oborina po TLC-analizi sodeč ni bila čista, smo jo dodatno očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z EtOAc kot mobilno fazo. Izolirali smo 1,18 g produkta kot trdno rumeno snov (52-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.87 (s, 3H), 4.85 (s, 2H), 7.27 – 7.38 (m, 3H), 7.74 – 7.78 (m, 1H) ppm.

4.5.4. Sinteza N-(1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)acetamida (**30**)

Uporabili smo spojino **29** (1,10 g, 6,09 mmol) in spojino **16b** (0,914 g, 7,3 mmol) in sledili splošnemu postopku za alkiliranje pirazolnega dušika, pri čemer smo uporabili 95-odstotni NaH (244 mg, 9,75 mmol). Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH_2Cl_2 : MeOH = 15 : 1. Izolirali smo 900 mg trdnega belega produkta (58-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.13 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 5.48 (s, 2H), 6.70 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 7.27 – 7.35 (m, 3H), 7.39 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.68 (r s, 1H), 7.75 – 7.79 (m, 1H) ppm.

4.5.5. Sinteza 1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-amina (**31**)

Uporabili smo spojino **30** in sledili splošnemu postopku za bazično hidrolizo acetamida. Izolirali smo 720 mg trdnega rdečerjavega produkta (98-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.63 (r s, 2H), 3.80 (s, 3H), 5.41 (s, 2H), 5.62 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.27 – 7.35 (m, 3H), 7.74 – 7.78 (m, 1H) ppm. HRMS za $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5$: izračunan 227,1171, izmerjen 228.1241 ($[\text{MH}]^+$).

4.5.6. Sinteza 1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-izotiocianata (**32**)

Spojino **31** (300 mg, 1,40 mmol) smo na ledeni kopeli raztopili v 10 mL CH_2Cl_2 in dodali 10 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 . Nato smo po kapljicah dodali tiofosgen (151 μL , 1,97 mmol) in nadaljevali z mešanjem na ledeni kopeli še pol ure. Tedaj smo dolili 70 mL vode in jo ekstrahirali s 3×70 mL CH_2Cl_2 . Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1. Izolirali smo 248 mg trdnega rdečerjavega produkta (66-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.84 (s, 3H), 5.53 (s, 2H), 6.19 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.28 – 7.38 (m, 3H), 7.46 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 7.75 – 7.78 (m, 1H) ppm.

4.5.7. Sinteza 2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanhidrazida (**33**)

Spojino **20** (330 mg, 1,54 mmol) smo raztopili v 15 mL absolutnega EtOH in dodali hidrazin hidrat (1,1 mL, 15,4 mmol) ter raztopino refluktirali na 80 °C dve uri. Nato smo odparili topilo, dolili 50 mL EtOAc in ekstrahirali s 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo, nakar smo suhi preostanek raztopili v 10 mL dietiletra in raztopini dodali 3 mL heksana. Po nekaj urah je izpadla bela oborina, ki smo jo odnučali in tako izolirali 130 mg produkta (42-odstotni izkoristek). ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 1.67 (s, 3H), 2.32 (d, 3H, $J = 0.7$ Hz), 4.24 (r s, 2H), 6.60 (s, 1H), 7.17 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz), 9.06 (s, 1H) ppm.

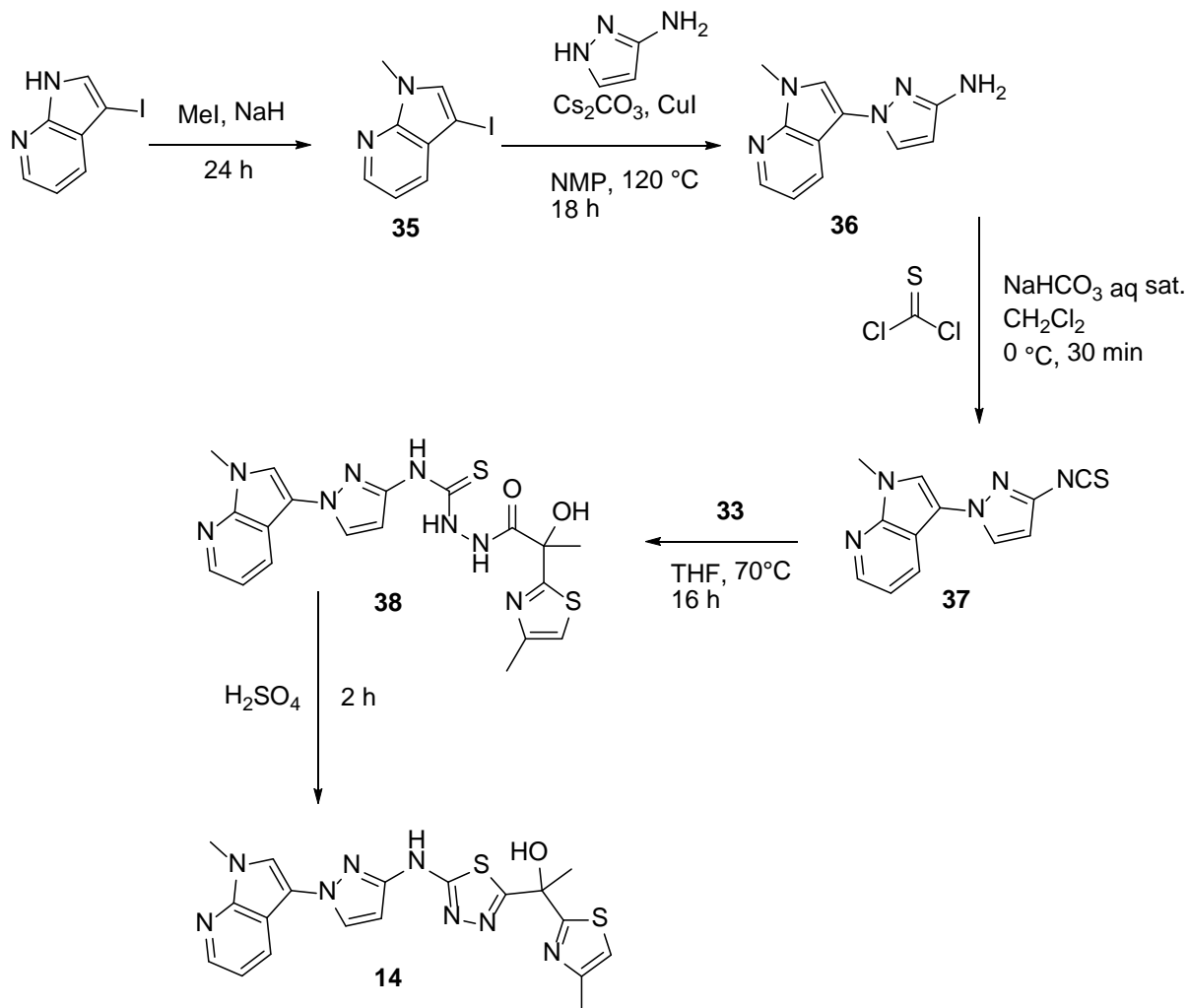
4.5.8. Sinteza 2-(2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoil)-N-(1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)hidrazin-1-karbotioamida (**34**)

Spojini **32** (68 mg, 0,25 mmol) in **33** (46 mg, 0,23 mmol) smo v argonovi atmosferi raztopili v brezvodnem THF, na bučko namestili vodni hladilnik, ki smo ga na vrhu zamašili s septo z argonovim balonom, in raztopino segrevali na 70 °C 18 ur. Tedaj smo odparili topilo in spojino očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH : NH₃ (25% vodna raztopina) = 9 : 1 : 0,1. Izolirali smo 30 mg trdnega belkastega produkta (28-odstotni izkoristek) in ga brez dodatne analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.5.9. Sinteza 1-(5-((1-((1-metil-1H-benzimidazol-2-il)metil)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (**13**)

Uporabili smo spojino **34** (30 mg, 0,064 mmol) in sledili splošnemu postopku za ciklizacijo tiadiazolnega obroča s H₂SO₄. Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1 in izolirali 10 mg produkta kot bele trdne snovi (35-odstotni izkoristek). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.10 (s, 3H), 2.45 (d, 3H, *J* = 0.9 Hz), 3.92 (s, 3H), 5.37 (r s, 1H), 5.53 (s, 2H), 6.04 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 7.27 – 7.37 (m, 3H), 7.42 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 7.74 – 7.77 (m, 1H), 10.10 (r s, 1H) ppm. ¹²C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 17.11, 30.58, 31.09, 48.60, 75.01, 95.08, 109.71, 115.11, 120.03, 122.57, 123.41, 131.32, 132.43, 142.09, 146.72, 148.07, 148.60, 152.05, 166.47 ppm. HRMS za C₂₀H₂₀N₈OS₂: izračunan 452,1201, izmerjen 453,1271 ([MH]⁺). Čistota (HPLC): 95 %.

4.6. Rigidizacija povezave med obročema A in B



Slika 16: Reakcijska shema za spojino 14

4.6.1. Sinteza 1-metil-3-jodo-7-aza-1H-indola (**35**)

Uporabili smo 3-jodo-7-azaindol (516 mg, 2 mmol), jodometan (162 μ L, 2,6 mmol), NaH (120 mg, 60-odstotna disperzija v mineralnem olju, 3 mmol) in DMF (brezvoden, 5 mL). Sledili smo literaturnemu postopku za metiliranje 7-azaindola (19). Surov produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo, pri čemer smo kot mobilno fazo za razliko od avtorjev uporabili CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1. Izolirali smo 455 mg trdnega sivkastega produkta (86-odstotni izkoristek). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.91 (s, 3H), 7.31 (dd, 1H, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz), 7.29 (s, 1H), 7.71 (dd, 1H, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 8.35 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz) ppm.

4.6.2. Sinteza (1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-amina (**36**)

Uporabili smo spojino **35** (377 mg, 1,46 mmol), 3-aminopirazol (133 mg, 1,61 mmol), Cs₂CO₃ (523 mg, 1,61 mmol), CuI (28 mg, 0,146 mmol) in NMP (N-metilpirolidin-2-on, 3 mL) ter sledili sinteznemu postopku iz literature (20). Pomembna razlika je bila v izolaciji: odparili smo NMP na oljni črpalki (75 °C, 2 mbar), suhi preostanek raztopili v 50 mL 1 M HCl, ki smo jo ekstrahirali s 50 mL CH₂Cl₂, tega pa še z dodatnih 50 mL 1 M HCl. Združeni vodni fazi smo naalkalili s kombinacijo 25-odstotnega NaOH in nasičene raztopine NH₄Cl do pH = 10 in ekstrahirali v 100 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo. Nato smo surovi produkt raztopili v 2 mL EtOAc in dolili 20 mL heksana ter pustili kristalizirati na -20 °C 16 ur. Izpadel je produkt v obliki rjavordečih kristalov, ki smo jih odnučali, masa produkta je bila 80 mg (26-odstotni izkoristek). Matičnico smo uparili in manj čist produkt ločeno uporabili v naslednji stopnji. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.92 (s, 3H), 5.84 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 7.13 (dd, 1H, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz), 7.34 (s, 1H), 7.55 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.15 (dd, 1H, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 8.39 (dd, 1H, *J*₁ = 4.8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz) ppm. Resonanca amino skupine v spektru ni vidna, se pa spojina na TLC močno obarva z ninhidrinom. HRMS za C₁₁H₁₁N₅: izračunan 213,1014, izmerjen 214,1086 ([MH]⁺).

4.6.3. Sinteza (1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-izotiocianata (**37**)

Spojino **36** (100 mg, 0,47 mmol) smo raztopili v 10 mL CH₂Cl₂ in dodali 10 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ ter nato na ledeni kopeli dodali še tiofosgen (60 μL, 0,79 mmol). Po 30 minutah smo dolili 40 mL vode in 40 mL CH₂Cl₂ ter močno stresali v liju ločniku z namenom ekstrakcije. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo, surov produkt pa dodatno očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1. Izolirali smo 60 mg blede oranžnega produkta (51-odstotni izkoristek). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.95 (s, 3H), 6.39 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 7.18 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.7 Hz), 7.43 (s, 1H), 7.71 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.18 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz), 8.43 (dd, 1H, *J*₁ = 4.7 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz) ppm.

4.6.4. Sinteza 2-(2-hidroksi-2-(4-metiltiazol-2-il)propanoil)-N-(1-(1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-il)hidrazin-1-karbotioamida (**38**)

Spojini **37** (60 mg, 0,24 mmol) in **33** (43 mg, 0,22 mmol) smo v argonovi atmosferi raztopili v brezvodnem THF ter segrevali na 70 °C 18 ur. Nato smo odparili topilo, prelili s 5 mL EtOAc in z žarilno pištolo segrevali do vrelišča, da se je ves surov produkt raztopil, nakar smo vroči raztopini dodali še 3 mL heksana. Raztopino smo počasi ohladili na sobno temperaturo in jo nato pustili kristalizirati na -20 °C 24 ur, ko smo izpadlo belo oborino odnučali ter tako izolirali 48 mg produkta (48-odstotni izkoristek), vendar je zmes po TLC sodeč vsebovala še manjši delež izhodne spojine **33**. Kljub temu smo produkt brez dodatnega čiščenja in analitike uporabili v naslednji stopnji.

4.6.5. Sinteza 1-(5-((1-(1-metil-7-aza-1H-indol-3-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1-(4-metiltiazol-2-il)etan-1-ola (**14**)

Uporabili smo spojino **38** (46 mg, 0,1 mmol) in sledili postopku za ciklizacijo tiadiazolnega obroča s H₂SO₄. Surov produkt smo dodatno očistili s »flash« kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1. ¹H-NMR je nakazoval prisotnost alifatskih nečistot, zato smo nečist produkt prelili z 10 mL heksana, segreli do vretja in za 4 ure ohladili na -20 °C. Izpadlo belo oborino smo odnučali in dobili bel, sipek praškast produkt z maso 10 mg (23-odstotni izkoristek). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2,41 (d, 2H, *J* = 0.8 Hz), 3.97 (s, 3H), 5.13 (r s, 1H), 5,30 (s, 1H), 6.21 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.88 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz), 7.19 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.6 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.72 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.23 – 8.27 (m, 1H), 8.44 (dd, 1H, *J*₁ = 4.6 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz) ppm. ¹²C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 16.88, 27.96, 30.84, 74.15, 95.03, 112.38, 114.89, 115.96, 116.24, 118.72, 127.79, 130.21, 143.73, 145.39, 148.77, 152.04, 163.72, 163.77, 168.25, 175.41 ppm. HRMS za C₁₉H₁₈N₈OS₂: izračunan 438,1045, izmerjen 439.1116 ([MH]⁺). Čistota (HPLC): 95 %.

4.7. Encimska testiranja

Končne spojine, torej šest hibridnih (**6** – **11**), piridazinsko (**12**), spojino z obsežnejšim lipofilnim delom (**13**) in rigidizirano spojino (**14**), smo testirali na mikobakterijskem encimu InhA ter določali njihove lastnosti zaviranja, in sicer v obliki IC₅₀ vrednosti. Tistim, ki so

Magistrska naloga

izkazovale zaviralno aktivnost, smo nato določali še protibakterijsko aktivnost (MIC) na mikobakterijah.

Testiranja smo izvajali po postopku iz literature, ki ga bomo na kratko povzeli tukaj (21). Pripravili smo 10 mM raztopine spojin v DMSO, pri čemer je končna koncentracija DMSO v raztopini za testiranje znašala 1 vol. %. Meritev smo izvajali pri 25 °C 10 minut. InhA (50 nM) smo dodali raztopini, ki je vsebovala testirano spojino (100 μM), 2-*trans*-dodecenoil-CoA (DD-CoA, 50 μM) in NADH (100 μM) v 30 mM pufru PIPES s pH 6,8. Če se je izkazalo, da spojina ni topna v koncentraciji 100 μM, smo jo osnovno raztopino razredčili na 20 oziroma 10 μM. Pod enakimi pogoji smo izvedli tudi kontrolne reakcije, kjer smo namesto spojine dodali 1 vol. % DMSO.

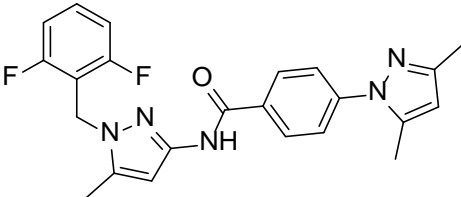
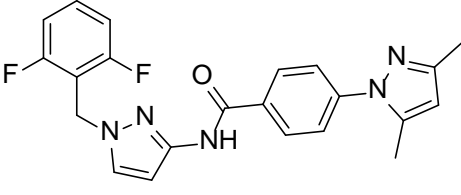
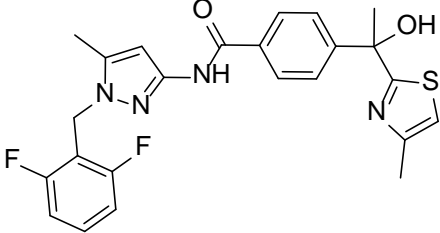
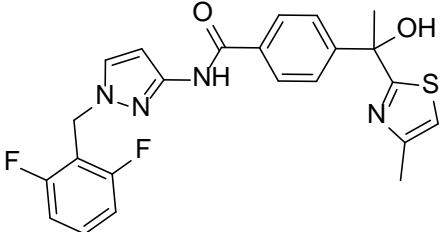
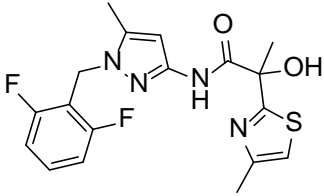
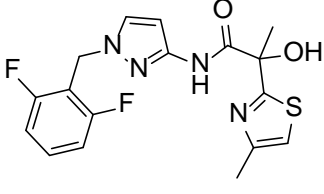
Aktivnost spojin na InhA smo določali posredno preko oksidacije NADH. Če aktivnost InhA ni okrnjena, encim namreč reducira substrat (DD-CoA), pri čemer se NADH oksidira do NAD⁺, kar smo spremljali spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Zaviralno aktivnost vsake spojine smo izrazili kot odstotek zaviranja aktivnosti InhA, pri čemer smo hitrost reakcije primerjali s hitrostjo v kontrolnem poskusu. Vsak preizkus smo izvedli v treh paralelah s standardno deviacijo ± 10%. Vrednosti IC₅₀ smo določili tako, da smo spreminjali koncentracijo testirane spojine in postopali enako, kot je opisano zgoraj.

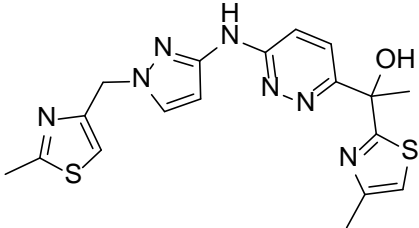
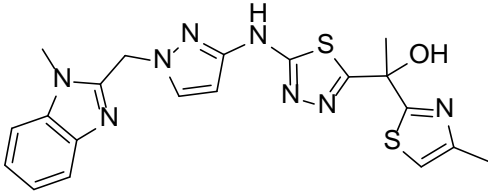
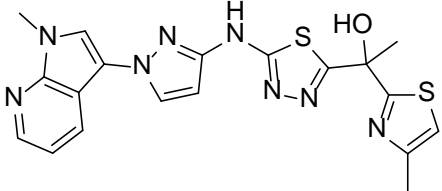
5. Rezultati in razprava

5.1. Rezultati encimskih testiranj

Kot opisano smo ovrednotili aktivnost končnih spojin na InhA, rezultate pa prikazujemo spodaj (preglednica II).

Preglednica II: Rezultati encimskih testiranj

Spojina	Molekulska formula	IC ₅₀ oz. RA
<u>6</u>		RA = 70 % (10 μM)
<u>7</u>		RA = 57 % (10 μM)
<u>8</u>		RA = 94 % (20 μM)
<u>9</u>		RA = 60 % (100 μM)
<u>10</u>		RA = 89 % (100 μM)
<u>11</u>		RA = 90 % (100 μM)

<u>12</u>		$IC_{50} = 12 \mu M$
<u>13</u>		$IC_{50} = 0,062 \mu M$
<u>14</u>		$IC_{50} = 1,12 \mu M$

Spojino smo označili kot neaktivno, če je pri začetni koncentraciji, navedeni v oklepaju, rezidualna aktivnost (RA) InhA, merjena v primerjavi z aktivnostjo v kontrolnem poskusu, znašala več kot 50 %. Vrednosti MIC bodo pri aktivnih spojinah izmerjene naknadno, kar je pri tovrstnih projektih tudi ustaljena praksa, tako da o njih v sklopu tega magistrskega dela še ne moremo poročati. Za mikobakterije je namreč značilna zelo počasna rast, prav to pa opazujemo pri določanju vrednosti MIC (2).

5.2. Razprava k izbranim sinteznim postopkom

5.2.1. Izkoristek bazične hidrolize acetamida (**18a**, **18b**)

Bazična hidroliza acetamida do amina (slika 12) je reakcija, ki načeloma poteče z izkoristki blizu kvantitativnim. Iz tega vidika je izkoristek predvsem pri navedenih dveh spojinah presenetljivo nizek (44 % za **18a** in 61 % za **18b**). Ker je reakcija po TLC analizi sodeč potekla v celoti, gre po našem mnenju vzrok iskati v napačno določeni masi izhodnega acetamida (**17a** in **17b**). V tej sintezni stopnji smo kot topilo namreč uporabili DMF, ki je težko hlapno topilo in ga je (razen s prekristalizacijo produkta) zelo težko popolnoma odstraniti iz izolirane spojine. Dejansko je bil izkoristek sinteze spojin **17a** in **17b** bistveno nižji, navedeni masi obeh produktov sta verjetno vključevali tudi DMF.

5.2.2. Izkoristek reakcije z BuLi (**19**, **20**)

V tej sintezni stopnji BuLi, ki je močna baza, odcepi proton z mesta 2 na 4-metiltiazolu, nastali karboanion pa nukleofilno napade karbonilni C-atom drugega reagenta (slika 13). Za nizek izkoristek te stopnje je po našem mnenju odgovornih več faktorjev: pri spojini **19** smo uporabili BuLi, ki je bil odprt že več mesecev, pri čemer je počasi vezal vodo iz zraka in se razgrajeval. V tej stopnji smo na TLC namreč zaznali veliko količino nezreagirane 4-metiltiazola. Za spojino **20** smo zato uporabili sveže odprt BuLi, izhodna spojina se je tako porabila v celoti, vendar smo na TLC ploščici videli še veliko stranskih produktov. Sklepamo, da je BuLi odcepil tudi proton z etilpiruvata oziroma tudi s produkta samega, ki je po strukturi še vedno ester. Ti dve spojini sta tako lahko vstopali v Claisenovo, lahko pa tudi aldolno reakcijo. To, poleg izgub pri kolonski kromatografiji, pojasni nizek izkoristek te stopnje. Stopnjo bi lahko optimizirali tako, da bi uporabili točno 1 ekvivalent svežega BuLi in reakcijo izvajali izključno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ brez segrevanja na sobno temperaturo. Predvidevamo, da bi pri teh pogojih prevladala nukleofilna adicija na karbonilni ogljik pred Claisenovo in aldolno reakcijo.

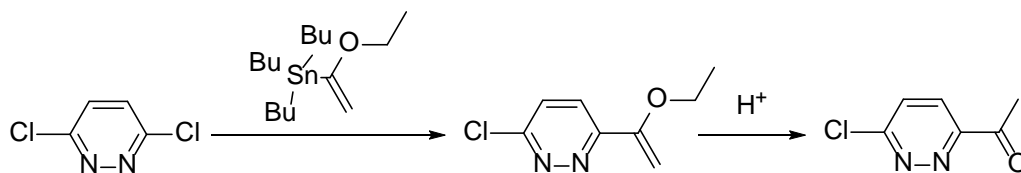
5.2.3. Izkoristek sklapljanja s HATU (**8** – **11**)

Pri spojinah **8** in **9** (slika 13) smo ločbo s kolonsko kromatografijo morali izvesti dvakrat (prvič CH_2Cl_2 : MeOH, drugič EtOAc) saj je produkt po prvi ločbi vseboval znaten delež tetrametilsečnine, ki je stranski produkt pri sklapljanju s HATU. Ker se pri vsaki ločbi s kolonsko kromatografijo določen delež spojine izgubi, je bil izkoristek zelo nizek. Težavo smo omilili pri spojinah **10** in **11**, pri katerih smo že takoj izvedli ločbo z EtOAc kot mobilno fazo, kar je pomenilo tudi boljši izkoristek.

5.2.4. Uvedba acetilne skupine na piridazinski obroč (**23**)

Mehanizem te reakcije je nekoliko kompleksnejši, zato ga bomo na kratko pojasnili. Tributyl(1-etoksivinil)kositer je znan reagent za posredno uvedbo metilketonske (acetilne) skupine s Stillejevim sklapljanjem (22). Po prvotnem sklapljanju s paladijevim katalizatorjem in fosfinskim ligandom dobimo enolni eter, tega pa s kislom hidrolizo pretvorimo v keton (slika 17).

Magistrska naloga



Slika 17: Mehanizem uvedbe ketonske skupine na piridazinski obroč

Stranski produkt reakcije so toksične organokositrove spojine, ki smo jih iz reakcijske zmesi odstranili tako, da smo jo mešali z vodno raztopino KF, nastalo oborino pa filtrirali skozi diatomejsko zemljo (Celite®) (17, 23).

5.2.5. Reakcija z BuLi pri piridazinski spojini (**24**)

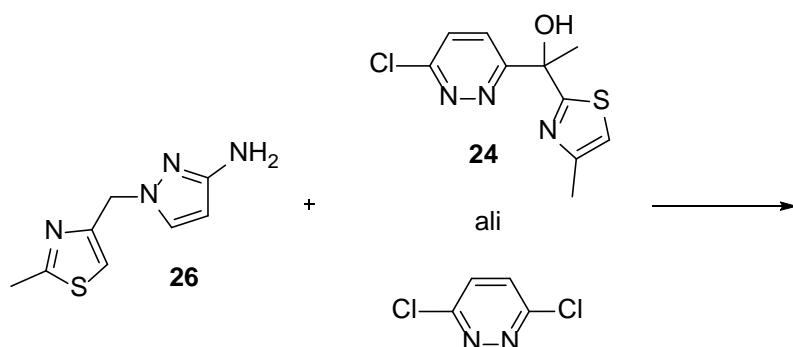
To reakcijo smo izvajali na podoben način kot sintezo spojin **19** in **20** (slika 13), le da je tukaj kot karbonilna spojina nastopal 3-acetil-6-kloropiridazin, ki ne more vstopati v Claisenovo reakcijo (slika 14). Po našem mnenju je prav to razlog za boljši izkoristek te stopnje (30-odstoten, v primerjavi s približno 10-odstotnim pri zgoraj omenjenih spojinah). Na TLC smo poleg produkta zaznali le še eno spojino, katere strukture sicer nismo mogli določiti. Druge nečistote so nastopale zgolj v sledovih, za razliko od sinteze spojin **19** in **20**, pri katerih je bilo različnih nečistot toliko, da nismo uspeli izolirati nobene. Ta reakcija je torej posreden dokaz stranskih reakcij, ki potekajo pri sintezi omenjenih spojin, kajti če pri enakih pogojih v tem primeru reakcija poteče z bistveno boljšim izkoristkom, gre to pripisati manjšemu številu možnih stranskih reakcij.

5.2.6. Buchwald-Hartwigovo aminiranje (**12**)

Sinteza spojine **12** (slika 14) se je izkazala za izjemno zahtevno, saj je 6-kloropiridazin, ki je substituiran na mestu 3, slab substrat tako za nukleofilno aromatsko substitucijo kot za različne metode sklapljanja s paladijevimi katalizatorji. To navsezadnje dokazuje tudi sinteza spojine **23**, pri kateri uvedba acetilne skupine poteče selektivno zgolj na mesto 3, saj se po vezavi enega substituenta piridazinski obroč deaktivira, tako da reakcija na mestu 6 ne poteče. Kljub temu so različni avtorji uspeli uvesti močne nukleofile (alifatske in tudi aromatske amine) na že substituiran piridazinski obroč, vendar tu v našem primeru nastopi še dodatna težava. Na pirazolni obroč vezana aminska skupina je zelo šibek nukleofil, kot denimo vidimo že pri sintezah spojin **16a** in **16b**, pri katerih smo za uspešno acetiliranje 3-aminopirazola z Ac₂O reakcijsko zmes morali segreti na 80 °C in reakcijo izvajati 72 ur. Nereaktivnost te amino skupine lepo ilustrira primer sinteze paracetamola, kjer se prav tako z Ac₂O acetilira

Magistrska naloga

para-aminofenol (**24**). Ta reakcija namreč poteče v celoti v 2 urah na 0 °C, pri čemer je potrebno poudariti, da že aromatski amini niso tako močni nukleofili kot alifatski. (**24**) Za sklapljanje spojin **24** in **26** smo tako morali preizkusiti več različnih metod, preden je sinteza uspela, pri čemer smo zaradi težje dostopnosti spojine **24** nekatere od njih izvedli s 3,6-dikloropiridazinom. Kot opisano zgoraj je ta boljši substrat za nukleofilno aromatsko substitucijo, zato smo v primeru neuspešne reakcije sklepali, da bi bila ta neuspešna tudi pri spojini **24**. Za lažjo predstavo ponovno prikazujemo izhodni spojin (slika 18), reakcijski pogoji pa so povzeti spodaj (preglednica III).

Slika 18: Izhodne spojine za preizkušanje reakcijskih pogojev za spojino **12**Preglednica III: Preizkušeni postopki za sintezo spojine **12**

Razmerje 24:26	Dodatni reagenti (vir)	Reakcijski pogoji	Izkoristek	Komentar
1:2	CuI (0,1 ekv), K ₃ PO ₄ (6 ekv), L-prolin (0,2 ekv), DMSO (25)	Argonova atmosfera 80 °C (24 h)	Izolirali smo le obe nezreagirani izhodni spojin	
1:1	K ₂ CO ₃ (2 ekv), iPrOH (26)	85 °C (24 h)	Nastanek neznanega produkta (ni mogoča identifikacija z NMR)	Namesto spojine 24 smo uporabili 3,6-dikloropiridazin
1:1	NaH (4 ekv), dioksan	Argonova atmosfera	Nastanek neznanega	Namesto spojine 24 smo uporabili 3,6-

Magistrska naloga

		60 °C (48 h)	produkta (ni mogoča identifikacija z NMR)	dikloropiridazin
1:1,2	LHMDS (2,25 ekv), XPhos PdG2 (0,05 ekv), dioksan	Argonova atmosfera, visokotlačni reaktor 100 °C (24 h)	Izolirali smo le obe nezreagirani izhodni spojini	
1:1	Cs ₂ CO ₃ (1 ekv), Pd ₂ (dba) ₃ , BrettPhos, DMA	Argonova atmosfera, visokotlačni reaktor 145 °C)	Produkt zaznan v sledovih, izolirana tudi nezreagirana izhodna spojina <u>24</u>	Sklepali smo, da je izhodni amin <u>26</u> razpadel zaradi previsoke temperature.

V skladu z našimi opažanji in sklepi pri zadnjem opisanem postopku smo tega nato ponovili pri 100 °C, pri čemer je nastala zadostna količina produkta. Če bi se spojina izkazala za boljše aktivno, bi bilo postopek vsekakor vredno optimizirati, denimo preizkusiti še nekatere druge fosfinske ligande, med katerimi študije kot posebej učinkovitega pri šibkih nukleofilnih navajajo *t*BuXPhos (27).

5.3. Razprava k aktivnosti sintetiziranih spojin

5.3.1. Hibridne spojine 6 – 11

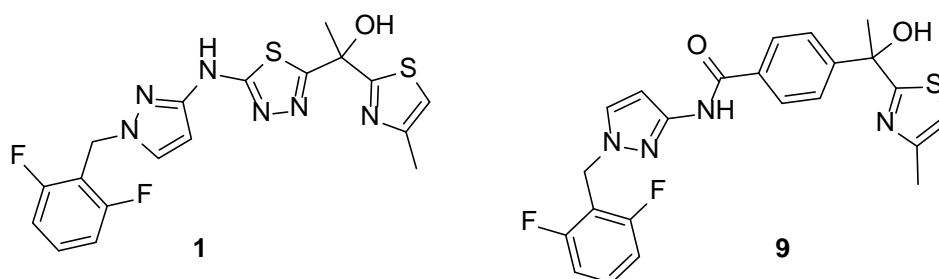
Vseh šest hibridnih spojin je bilo neaktivnih, kar je presenetljivo, saj je bilo po do zdaj znanih podatkih o aktivnosti zaviralcev InhA realno pričakovati določeno zaviralno delovanje. Vse namreč vsebujejo prave farmakofore: akceptor vodikove vezi (heteroaromatski dušik) za interakcijo z NAD⁺, donor vodikove vezi (amidni dušik) za interakcijo z Met98 in lipofilni del za hidrofobne interakcije. Aktivnost teh farmakoforov je bila za povrh že validirana pri spojinah vodnicah, torej lahko utemeljeno sklepamo, da je medsebojna prostorska orientacija teh treh farmakoforov pri hibridnih molekulah neidealna za vezavo v aktivno mesto InhA. Medtem ko bi se kislinski del hibridov lahko povezal z NAD⁺, ima lipofilni obroč glede na

Magistrska naloga

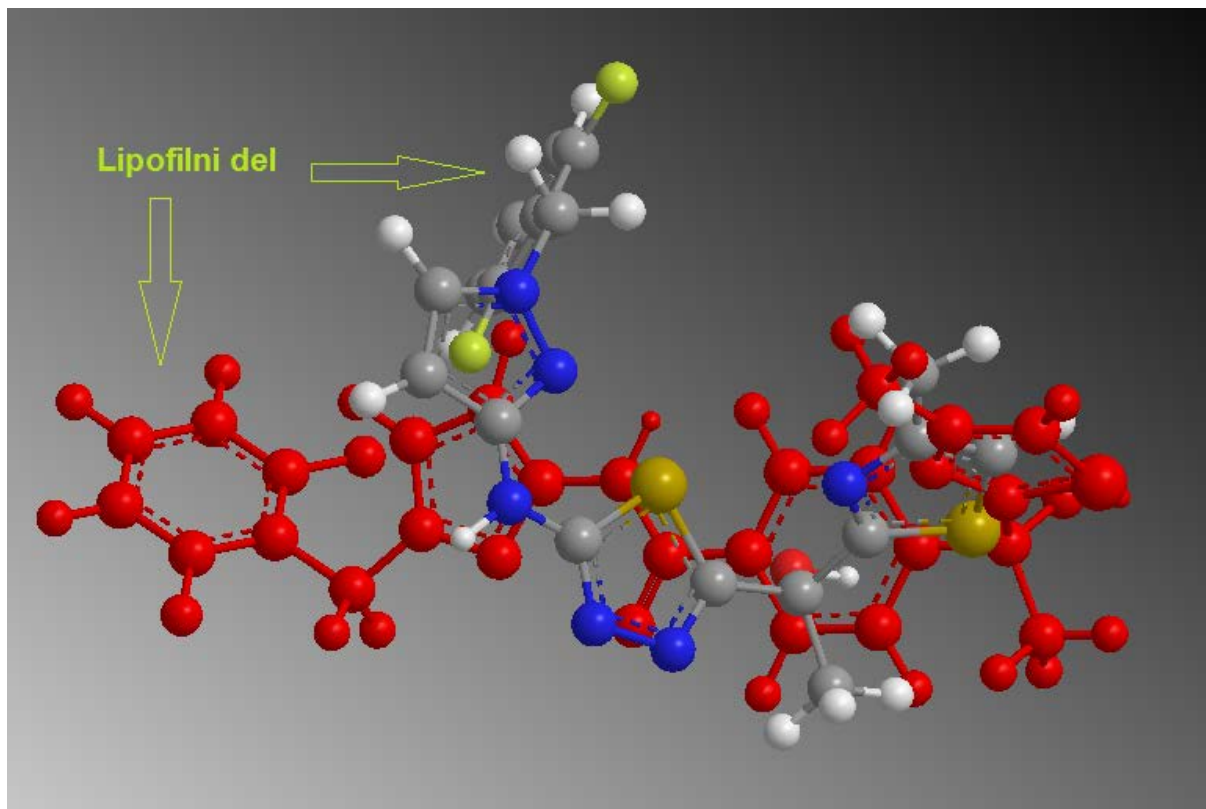
kislinski del očitno drugačno lego kot pri spojini vodnici **5** in se ne more umestiti v hidrofobni žep. Pri zaviralcih InhA, ki niso tiadiazoli in za vezavo z Met98 izkoriščajo amidni dušik, mora torej aaminski del spojine biti orientiran drugače, kar pri spojini vodnici zagotavlja tetrahidropiranski obroč.

Dodatna pomanjkljivost hibridnih spojin (in navsezadnje tudi tetrahidropiranske spojine vodnice) v primerjavi s tiadiazoli je zgolj ena možnost za interakcijo z Met98. Že spojina **5** ima nekoliko slabši vrednosti IC_{50} in MIC od tiadiazolov; benzenov obroč C namreč nima doprinosu k interakcijam z aktivnim mestom encima in služi zgolj kot distančnik: vzpostavlja pravo razdaljo med deli molekule, ki z aktivnim mestom dejansko interagirajo.

Čeprav hibridne spojine niso bile aktivne, nam dajejo dragocene podatke o SAR zaviralcev InhA. Oblika in 3D-orientacija molekule je očitno še pomembnejša, kot smo predpostavljali na začetku, saj že relativno majhna sprememba orientacije lipofilnega dela pomeni popolno izgubo aktivnosti. Trditev o pomembnosti prostorske orientacije lahko ponazorimo s 3D-simulacijo spojine vodnice **1** in spojine **9** v programu ChemBio3D, kjer smo vnesli ukaz, naj se tiazolna obroča D obeh spojin prekrivata. Jasno vidimo, da je aminska skupina spojine **9** še v približno podobnem položaju kot pri spojini **1**, medtem ko sta lipofilna dela obeh molekul (v obeh primerih gre za 2,6-difluorofenilni fragment) obrnjena v popolnoma različni smeri glede na tiazolni obroč D (slika 19, slika 20).



Slika 19: Spojini **1** in **9**



Slika 20: Primerjava prostorskih leg spojin **1** in **2** (slednja je zaradi jasnosti v celoti obarvana rdeče)

Pri tovrstni analizi se sicer moramo zavedati, da molekule v raztopini niso rigidne, kot je prikazano zgoraj, temveč se vrtijo in zasedajo tudi drugačne prostorske položaje; slika namreč prikazuje le tistega, ki je po algoritmu programa najugodnejši. Ta prikaz torej vzemimo le kot ponazoritev, dejstvo pa je, da hibridne spojine niso izkazovale zaviralne aktivnosti na InhA, kar je jasna oporna točka za nadaljnje načrtovanje zaviralcev tega encima in raziskovalno delo na tem področju.

5.3.2. Piridazinska spojina **12**

Zamenjava tiadiazolnega obroča za piridazinski obroč, ki na prvi pogled ne deluje kot velik poseg v strukturo molekule, je pomenila kar 1000-kratno znižanje zaviralne aktivnosti. Razdalja med obročnima dušikoma je le malo večja kot pri tiadiazolu (1,38 Å v primerjavi z 1,36 Å), zaradi česar sklepamo, da to ni vzrok za slabšo aktivnost, pač pa odgovornost vnovič pripisujemo drugačni legi lipofilnega dela molekule glede na del, ki interagira z NAD⁺. Kot med substituentoma 3 in 6 na piridazinskem obroču namreč znaša 179 °, med substituentoma 2 in 5 na tiadiazolnem (spojina vodnica **2**) pa 165 °, kar pomeni že pomembno razliko v prostorski legi lipofilnega dela.

Dejansko gre za podobno situacijo kot pri hibridnih spojinah: farmakofori so prisotni, sprememba v enem samem heteroaromatskem obroču, ki je še manjša kot pri hibridih, pa aktivnost 1000-krat zmanjša. To še dodatno potrjuje našo trditev, da je za aktivnost odločilna pravilna prostorska orientacija spojine.

Kljub slabi aktivnosti te spojine piridazinskih zaviralcev InhA ne velja popolnoma odpisati, pri nadaljnjem načrtovanju in razvoju bi jih še vedno bilo vredno uporabiti, toda z drugačnim lipofilnim delom spojine.

5.3.3. Spojina s povečanim lipofilnim delom **13**

Predpostavljali smo, da bo ta spojina izkazovala boljšo aktivnost na InhA, saj je glede na poznane kristalne strukture zaviralcev v aktivnem mestu InhA v hidrofobnem žepu še veliko prostora. Zato je presenetljiv podatek, da je spojina **13** po aktivnosti ($IC_{50} = 62 \text{ nM}$) celo malo slabša od vodnic. Tudi če upoštevamo, da so rezultati encimskega testiranja do neke mere variabilni (12), je spojina kvečjemu primerljiva z že razvitimi zaviralci InhA, nikakor pa uvedba večjega lipofilnega dela ni prinesla izboljšanja aktivnosti. Ta nepričakovan rezultat lahko pojasnimo na dva načina.

Prvi možen razlog je ta, da zamenjava 2-metiliazolnega obroča za N-metilbenzimidazolnega pomeni večjo spremembo kot le dodan kondenziran benzenov obroč, saj smo bolj lipofilno žveplo v obroču nadomestili z manj lipofilnim metiliranim dušikom. Medtem ko je ta zamenjava z vidika farmakokinetike skorajda nujna (na tej stopnji je nesmiselno razvijati preveč lipofilne molekule), lahko deloma oslabi doprinos hidrofobnih interakcij k skupni vezavni entalpiji. S spremembo obroča A glede na vodnico sicer še vedno ohranjamo bazični heterociklični dušik piridinskega tipa, ki lahko sodeluje v Van der Waalsovih interakcijah, tako da smo vsekakor ohranili vse farmakofore.

Druga teorija, ki pojasnjuje manjšo aktivnost od pričakovane, gre še korak dlje: z benzenovim obročem smo povečali izvorni obroč A, vendar se moramo zavedati, da je hidrofobni žep enako kot drugi deli aktivnega mesta encima tridimenzionalen in tako podaljšanje lipofilnega dela v različne smeri ne more imeti enakih učinkov, saj je orientacija v določeno smer

Magistrska naloga

ugodnejša od druge. Po tej logiki lahko sklepamo, da se je zdaj obroč moral inducirano prilagajati v hidrofobni žep, negativni prispevek tega procesa pa je prevladal nad pozitivnim zaradi močnejših hidrofobnih interakcij. Iz tega vidika bi bilo smiselno sintetizirati še nekaj derivatov s povečanim obročem A, ki pa bi morali biti drugačne oblike; osnovni obroč bi torej podaljšali v neko drugo smer. S tem bi dokončno potrdili oziroma zavrgli našo osnovno hipotezo, ki pravi, da bi večji lipofilni obroč pomenil boljšo zaviralno aktivnost.

5.3.4. Rigidizirana spojina **14**

Z rigidizacijo povezave med obročema A in B smo spojini želeli odvzeti stopnjo prostosti. V nasprotju z našo hipotezo se je aktivnost spojine bistveno zmanjšala – sicer ne toliko kot pri piridazinskem derivatu, toda IC_{50} pri $1,12 \mu\text{M}$ še vedno pomeni slabo afiniteto do encima. Razlog za slabo zaviralno aktivnost je po našem mnenju jasen: piridinski del azaindolnega (pirolo[2,3-b]piridinskega) obroča A sicer dobro posnema tiazolni obroč iz spojine vodnice, očitno pa spet ni pravilno orientiran v hidrofobni žep. Enako kot pri prejšnjih spojinah razlog ne more biti odsotnost pomembnega farmakofora, pač pa zgolj neidealna prostorska orientacija. Rigidizirane spojine so sicer zelo privlačne za nadaljnje raziskave, analogno kot pri spojini **13** bo tako potrebno sintetizirati še več spojin z različno orientiranimi obroči A, ki so z obročem B rigidno povezani.

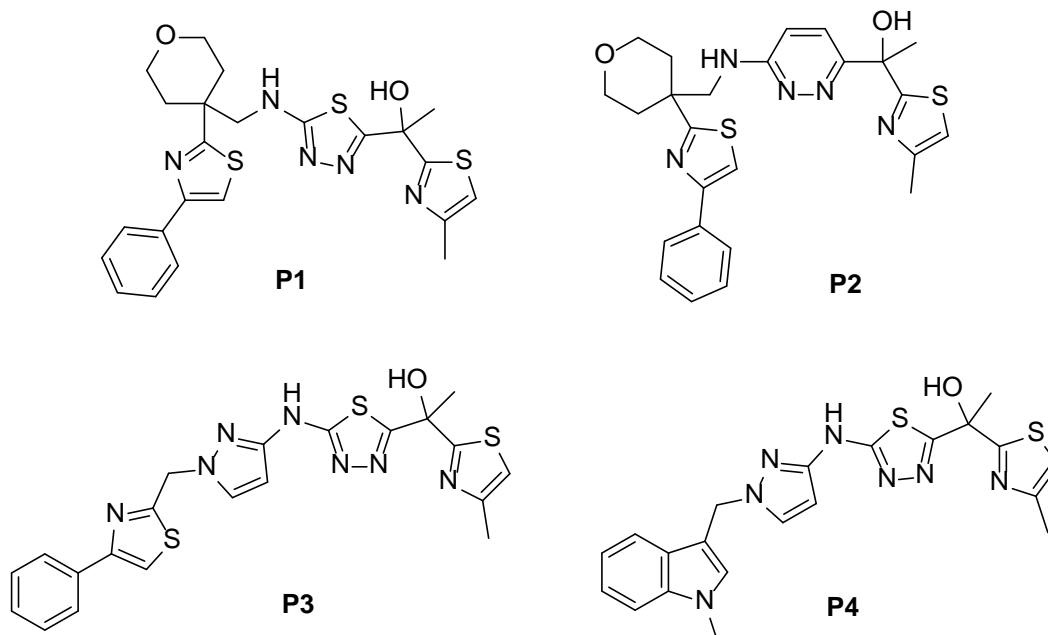
6. Sklep

V sklopu te magistrske naloge smo sintetizirali večje število spojin, ki smo jih ovrednotili na mikobakterijskem encimu InhA in tako določili njihovo zaviralno aktivnost. Če povzamemo: vseh šest hibridnih spojin je bilo neaktivnih, zamenjava tiadiazolnega obroča za piridazinski obroč je pomenila 1000-kratno znižanje aktivnosti, rigidizacija povezave med obročema A in B pa 100-kratno znižanje. Edina spojina, ki je bila po aktivnosti primerljiva z vodnicami, je bila spojina **13**, ki ima v strukturi glede na vodnici **1** in **2** povečan lipofilni obroč A, toda ta sprememba v nasprotju s pričakovanji ni prinesla izboljšanja aktivnosti.

Jasno je, da mora potencialni zaviralec InhA obvezno vsebovati potrebne farmakofore, v tej magistrski nalogi pa smo pokazali, da je še posebej pomembna njihova medsebojna lega v prostoru, saj že minimalna sprememba, kot denimo pri piridazinski spojini **12**, lahko pomeni skorajda popolno izgubo aktivnosti. S tem smo dodatno pojasnili kemijski prostor zaviralcev InhA in prispevali pomemben del k razumevanju SAR pri teh spojinah. Ker je dolgoročni cilj tega magistrskega dela omogočiti razvoj optimalnega zaviralca, v nadaljevanju na kratko predlagamo, v katero smer bi naj, temelječ na opisanih izsledkih, šel nadaljnji razvoj zaviralcev InhA.

Pri načrtovanju nadaljnjih spojin je po našem mnenju potrebno upoštevati dejstvo, da tiadiazolni obroč s pridruženo NH-skupino lahko tvori dve vodikovi vezi z Met98, zato bi moral nadaljnji razvoj temeljiti na tej strukturi in iti v smer iskanja optimalnega položaja lipofilnega dela v hidrofobnem žepu, kar smo sicer poskušali doseči že v tej magistrski nalogi. S tem namenom predlagamo nekaj možnih spojin, ki bi jih glede na tukaj opisane izsledke bilo vredno sintetizirati in preizkusiti njihovo zaviralno aktivnost na InhA. (Slika 20)

Magistrska naloga



Slika 21: Predlogi za nadaljnje delo

Na kratko bomo povzeli bistvene značilnosti vsake od spojin. **P1** je hibrid, ki vključuje obroča C in D iz tiadiazolnega razreda ter obroča A in B iz tetrahidropiranskega razreda zaviralcev InhA. Tukaj bi se odpovedali amidni vezi, saj karbonylna skupina nima doprinosa k interakcijam z vezavnim mestom, in bi tako ostali pri farmakoforu, ki ima dve interakciji z Met98. Ta spojina ima zaradi tetrahidropiranskega obroča rigidnejšo strukturo in že validiran lipofilni del. **P2** je zgolj piridazinski derivat spojine **P1**, ki bi dokončno potrdil oziroma ovrgel hipotezo, da sta piridazinski in tiadiazolni obroč glede možnosti tvorbe interakcij praktično enakovredna. Spojini **P3** in **P4** pa bi nam dali dodatne informacije o pomenu hidrofobnih interakcij, saj imata povečan lipofilni del, toda v drugo smer kot naša spojina **13**. S tem bi, kot opisano v razpravi, preverili hipotezo glede pomembnosti večjega lipofilnega obroča.

Opisani predlogi so torej odlično izhodišče za prihodnje raziskovalce zaviralcev InhA, tako da smo prepričani, da naše delo predstavlja pomemben korak naprej na poti do razvoja optimalne molekule, ki bi čez leta lahko prišla tudi v klinično uporabo.

7. Literatura

1. World Health Organization. Tuberculosis Fact Sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (dostopano 12. 12. 2017).
2. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ: Prescott's Microbiology, Ninth Edition, McGraw-Hill, New York, 2014: 561-562, 892-895.
3. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, Ljubljana; 2011: 434 – 445.
4. Fox GJ, Menzies D. A Review of the Evidence for Using Bedaquiline (TMC207) to Treat Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Infectious Diseases and Therapy* 2013; 2(2): 123–144.
5. Marrakchi H, Lanéelle G, Quémard A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* 2000; 146: 289–296.
6. Rozwarski DA, Grant GA, Barton DHR, Jacobs WR, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1998; 279(5347): 98–102.
7. Chollet A, Mourey L, Lherbet C, Delbot A, Julien S, Baltas M, Bernadou J, Pratviel G, Maveyraud L, Bernardes-Génisson V. Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. *Journal of Structural Biology* 2015; 190(3): 328–337.
8. Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution* 2016; 45: 474–492.

Magistrska naloga

9. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *PLOS ONE* 2015; 10(3): e0119628.
10. Dobravec Verbič M, Mrhar A, Svetlina Šorli, P. Analiza hepatotoksičnosti tuberkulostatikov pri bolnikih z aktivno obliko tuberkuloze, zdravljenih v bolnišnici Golnik. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.
11. Rožman K, Sosič I, Fernandez R, Young RJ, Mendoza A, Gobec S, Encinas L. A new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Discovery Today* 2017; 22(3): 492–502.
12. Šink R, Sosič I, Živec M, Fernandez-Menendez R, Turk S, Pajk S, Alvarez-Gomez D, Lopez-Roman EM, Gonzales-Cortez C, Rullas-Triconado J, Angulo-Barturen I, Barros D, Ballell-Pages L, Young RJ, Encinas L, Gobec S. Design, Synthesis, and Evaluation of New Thiadiazole-Based Direct Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) for the Treatment of Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(2): 613–624.
13. Shirude PS, Madhavapeddi P, Naik M, Murugan K, Shinde V, Nandishaiah R, Bhat J, Kumar A, Hameed S, Holdgate G, Davies G, McMiken H, Hegde N, Ambady A, Venkatraman J, Panda M, Bandodkar B, Sambandamurthy VK, Read JA. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56(21): 8533–8542.
14. Soutter HH, Centrella P, Clark MA, Cuzzo JW, Dumelin CE, Guie M-A, Habeshian S, Keefe AD, Kennedy KM, Sigel EA. Discovery of cofactor-specific, bactericidal *Mycobacterium tuberculosis* InhA inhibitors using DNA-encoded library technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016: 201610978.
15. Martínez-Hoyos M, Perez-Herran E, Gulten G, Encinas L, idr. Antitubercular drugs for an old target: GSK693 as a promising InhA direct inhibitor. *EBioMedicine* 2016; 8: 291–301.
16. Pajk S, Živec M, Šink R, Sosič I, Neu M, Chung C, Martínez-Hoyos M, Pérez-Herrán E, Álvarez-Gómez D, Álvarez-Ruíz E, Mendoza-Losana A, Castro-Pichel J, Barros D, Ballell-

Pages L, Young RJ, Convery MA, Encinas L, Gobec S. New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 112: 252–257.

17. Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature* 2004; 432(7019): 824.

18. Matulenko MA, Lee C-H, Jiang M, Frey RR, Cowart MD, Bayburt EK, DiDomenico S, Gfesser GA, Gomtsyan A, Zheng GZ, McKie JA, Stewart AO, Yu H, Kohlhaas KL, Alexander KM, McGaraughty S, Wismer CT, Mikusa J, Marsh KC, Snyder RD, Diehl MS, Kowaluk EA, et al. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine: structure–activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13(11): 3705–3720.

19. Hong X, Tan Q, Liu B, Xu B. Isocyanide-Induced Activation of Copper Sulfate: Direct Access to Functionalized Heteroarene Sulfonic Esters. *Angewandte Chemie International Edition* 2017; 56(14): 3961–3965.

20. Beyer A, Castanheiro T, Busca P, Prestat G. Copper(I)/Copper(II)-Assisted Tandem Catalysis: The Case Study of Ullmann/Chan-Evans-Lam N 1 ,N 3 -Diarylation of 3-Aminopyrazole. *ChemCatChem* 2015; 7(16): 2433–2436.

21. Štular T, Lešnik S, Rožman K, Schink J, Zdouc M, Ghysels A, Liu F, Aldrich CC, Haupt VJ, Salentin S, Daminelli S, Schroeder M, Langer T, Gobec S, Janežič D, Konc J. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* InhA Inhibitors by Binding Sites Comparison and Ligands Prediction. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 59(24): 11069–11078.

22. Kosugi M, Sumiya T, Obara Y, Suzuki M, Sano H, Migita T. (α -Ethoxyvinyl)tributyltin; An Efficient Reagent for the Nucleophilic Acetylation of Organic Halides via Palladium Catalysis. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1987; 60(2): 767-768.

23. Savall BM, Powell NA, Roush WR. Highly Diastereoselective Synthesis of Propargylic 1,2-anti-Diol Derivatives Using α -Alkoxypropargylstannanes. *Organic Letters* 2001; 3(19): 3057–3060.

24. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S. Farmaceutvska kemija III, Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.
25. Bethel PA, Roberts B, Bailey A. Preparation of differentially substituted 3,6-diaminopyridazines under mild conditions. *Tetrahedron Letters* 2014; 55(37): 5186–5190.
26. AbouziD KAM, Khalil NA, Ahmed EM, Esmat A, Al-Abd AM. Design, synthesis, and evaluation of anti-inflammatory and ulcerogenicity of novel pyridazinone derivatives. *Medicinal Chemistry Research* 2012; 21(11): 3581–3590.
27. Surry DS, Buchwald SL. Dialkylbiaryl phosphines in Pd-catalyzed amination: a user's guide. *Chem. Sci.* 2011; 2(1): 27–50.