

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANE BOŽIČ

SINTEZA USTREZNO SUBSTITUIRANIH  
TIAZOLO[4,5-*c*]KINOLINOV KOT POTENCIALNIH  
PROTITUBERKULOZNIH UČINKOVIN

Diplomska naloga

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANE BOŽIČ

SINTEZA USTREZNO SUBSTITUIRANIH  
TIAZOLO[4,5-*c*]KINOLINOV KOT POTENCIALNIH  
PROTITUBERKULOZNIH UČINKOVIN

SYNTHESIS OF SUITABLY SUBSTITUTED  
THIAZOLO[4,5-*c*]QUINOLINES AS POTENTIAL  
ANTITUBERCULAR DRUGS

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Analize NMR in IR so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter Fakulteti za farmacijo, masne analize pa na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. za strokovno vodenje, vsestransko pomoč in nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela ter pisanju diplomske naloge. Za vso izkazano pomoč se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Dane Božič

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

1	POVZETEK.....	V
2	ABSTRACT.....	VI
3	SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
4	UVOD.....	1
4.1	TUBERKULOZA.....	1
4.2	ZDRAVLJENJE TUBERKULOZE.....	3
4.2.1	DOSEDANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE.....	4
4.2.2	MEHANIZMI IN TARČE .....	5
4.2.3	POTENCIALNE ZDRAVILNE UČINKOVINE.....	8
4.2.3.1	Moksifloksacin in gatifloksacin.....	9
4.2.3.2	Linezolid.....	9
4.2.3.3	LL-3858.....	10
4.2.3.4	Rifabutin, rifapentin in rifalazil .....	11
4.2.3.5	SQ-109 .....	13
4.2.3.6	PA-824 .....	13
4.2.3.7	OPC 67683 .....	15
4.2.3.8	TMC-207 .....	15
5	NAČRT DELA .....	18
5.1	REAKCIJSKE SHEME.....	23
6	MATERIALI IN METODE .....	26
6.1	MATERIALI.....	26
6.2	METODE .....	26
6.2.1	Kromatografske metode.....	26
6.2.2	Spektroskopske metode.....	27
7	EKSPERIMENTALNI DEL.....	29
7.1	RAČUNALNIŠKO PREKRIVANJE KONČNIH SPOJIN S TMC-207 V PROGRAMU Chem3D Pro.....	29
7.2	IZRAČUN logP .....	34
7.3	SINTEZE .....	35
7.3.1	SINTEZA 6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA .....	35
7.3.2	SINTEZA 6-KLORO-2-METIL-3-NITRO-4-KINOLINOLA.....	36
7.3.3	SINTEZA 3-AMINO-6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA.....	37
7.3.4	SINTEZA N-(6-KLORO-4-HIDROKSI-2-METILKINOLIN-3-IL)-2-(4- NITROFENIL)ACETAMIDA.....	40
7.3.5	SINTEZA 8-KLORO-4-METIL-2-(4-NITROBENZIL)TIAZOLO[4,5- c]KINOLINA.....	42
7.3.6	SINTEZA 3-AMINO-2-METILKINOLIN-4-OLA .....	43
7.3.7	SINTEZA 2-(terc-BUTOKSIKARBONILAMINO)-2-FENILOCETNE KISLINE 44	
7.3.8	SINTEZA terc-BUTIL 2-(4-HIDROKSI-2-METILKINOLIN-3- ILAMINO)-2-OKSO-1-FENILETILKARBAMATA .....	45
7.3.9	SINTEZA terc-BUTIL (4-METILTIAZOLO[4,5-c]KINOLIN-2- IL)(FENIL)METILKARBAMATA.....	46
7.3.10	SINTEZA (4-METILTIAZOLO[4,5-c]KINOLIN-2- IL)(FENIL)METANAMINA .....	47
7.3.11	SINTEZA 2-(2-AMINOTIAZOL-4-IL)-N-(4-HIDROKSI-2- METILKINOLIN-3-IL)ACETAMIDA .....	48

7.3.12	POSKUS SINTEZE 4-((4-METILTIAZOLO[4,5- <i>c</i> ]KINOLIN-2-IL)METIL)TIAZOL-2-AMINA .....	50
8	REZULTATI .....	51
9	RAZPRAVA .....	52
9.1	RAZPRAVA K SINTEZI 6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA .....	52
9.2	RAZPRAVA K NITRIRANJU KINOLINSKEGA DERIVATA .....	53
9.3	RAZPRAVA H KATALITIČNEMU HIDROGENIRANJU NITRO SKUPINE ..	54
9.4	RAZPRAVA K TVORBI AMIDA NA AMINO SKUPINI .....	55
9.5	RAZPRAVA K UVEDBI BOC ZAŠČITNE SKUPINE NA AMINO SKUPINI ..	56
9.6	RAZPRAVA K TVORBI TIAZOLO[4,5- <i>c</i> ]KINOLINSKEGA DERIVATA ..	57
9.7	RAZPRAVA K ODSTRANITVI BOC ZAŠČITE Z AMINO SKUPINE ..	58
9.8	RAZPRAVA K REZULTATOM BIOLOŠKIH TESTIRANJ .....	59
10	SKLEP .....	60
11	VIRI IN LITERATURA .....	61

## KAZALO SLIK

Slika 1: Bacili <i>M. tb</i> .....	1
Slika 2: Sestava celične stene mikobakterij .....	2
Slika 3: Zgradba mikobakterijskega encima ATP sintaze (16) .....	16
Slika 4: Nov tip protituberkuloznih učinkovin – tiazolo[4,5- <i>c</i> ]kinolini .....	18
Slika 5: Spojina vodnica .....	19
Slika 6: Prekrivanje spojine TMC-207 (modra) in spojine vodnice (rdeča) .....	19
Slika 7: Interakcije med spojino TMC-207 in vezavnim mestom na mikobakterijski ATP sintazi (5) .....	20
Slika 8: Hipotetične interakcije med spojino vodnico in vezavnim mestom na mikobakterijski ATP sintazi .....	21
Slika 9: 3D struktura prve načrtovane končne spojine .....	30
Slika 10: 3D struktura spojine TMC-207 .....	30
Slika 11: Prekrivanje prve načrtovane končne spojine s TMC-207 .....	31
Slika 12: 3D struktura druge načrtovane končne spojine .....	32
Slika 13: Prekrivanje druge načrtovane končne spojine s TMC-207 .....	32
Slika 14: 3D strukura tretje načrtovane končne spojine .....	33
Slika 15: Prekrivanje tretje načrtovane končne spojine s TMC-207 .....	33
Slika 16: Mehanizem nastanka imina (20) .....	52
Slika 17: Reakcijska shema tvorbe amida s »coupling« reagentom BOP (24) .....	56
Slika 18: Mehanizem substitucije kisika z žveplom (25) .....	58
Slika 19: Mehanizem acidolize (26) .....	59

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Dosedanje zdravilne učinkovine, njihova MIC, mehanizem delovanja in tarče (7) .....	6
Preglednica II: Pomen barve atoma .....	30
Preglednica III: Izračunane vrednosti logP .....	34
Preglednica IV: Primerjava izvedbe reakcije z uporabo treh različnih topil.....	39
Preglednica V: Rezultati eksperimentalnega dela .....	51

## 1 POVZETEK

Tuberkuloza je danes ena najbolj razširjenih bakterijskih bolezni, za katero letno umre približno 2 milijona ljudi po celem svetu. Število novoobolelih se iz leta v leto drastično povečuje in bo po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije kmalu doseglo 10 milijonov. Stanje še poslabšuje pojav rezistentnih sevov *Mycobacterium tuberculosis* na do sedaj odkrite antibiotike, kar narekuje nujo po odkrivanju novih protituberkuloznih učinkovin. Tega se zavedajo tudi v originatorskih farmacevtskih podjetjih, saj je opaziti vedno več publikacij s področja protituberkuloznih učinkovin ravno iz originatorskih laboratorijev.

Katedra za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo sodeluje v skupnem evropskem projektu »Open Collaborative Model for Tuberculosis Lead Optimisation« (akronim »ORCHID«) z madridskim laboratorijem Tres Cantos Medicines Development Campus podjetja GlaxoSmithKline pri razvoju novih protituberkuloznih učinkovin. Razvili so več derivatov tiazolo[4,5-*c*]kinolinov in nekateri med njimi so izkazovali zelo dobro učinkovitost proti sevom *Mycobacterium tuberculosis*. Žal pa vse učinkovine kažejo tendenco k slabi vodotopnosti.

Med diplomskim delom smo v laboratoriju žeeli izdelati nove analoge spojine vodnice z namenom ohraniti ali izboljšati protimikrobakterijski učinek ter izboljšati vodotopnost spojin, s čimer bi posledično povečali obseg absorpcije in biološko uporabnost. Sintetizirali smo dve spojini, ki imata skupen tiazolo[4,5-*c*]kinolinski skelet, razlikujeta pa se v substituentu na mestu 6 na kinolinskem ter mestu 2' na tiazolnem obroču. Pri sintezi prve končne spojine smo kot reagent uporabili *p*-nitrofenilacetno kislino, ki bi po našem mnenju lahko prispevala k boljšemu protimikrobakterijskemu delovanju, k izboljšanju farmakokinetičnih lastnosti pa verjetno ne tako bistveno. Za sintezo druge končne spojine smo uporabili BOC-fenilglicin, ki bi lahko pripomogel k enakemu ali celo izboljšanemu protimikrobakterijskemu učinku, drastično pa bi pripomogel k izboljšanju farmakokinetičnih lastnosti. Druga spojina za razliko od prve na mestu 6 nima klorovega atoma, kar bi lahko vplivalo na jakost in spekter delovanja. Sinteza tretje končne spojine, pri kateri smo kot kislino uporabili 2-amino-4-tiazolacetno kislino, ni uspela zaradi porabe izhodne spojine. Obe končni spojini smo poslali na določanje protimikrobakterijskega učinka.

## 2 ABSTRACT

Nowadays tuberculosis is one of the most widely spread diseases, which annually takes 2 million human lives worldwide. The number of new cases is drastically rising and will soon reach 10 million according to the World Health Organisation. To make it worse the emergence of drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to current regimen makes the researching for novel drugs an urgent priority. More and more publications about antitubercular drugs come from originator pharmaceutical companies that are aware of the severity of the situation.

Department for Pharmaceutical Chemistry from Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana participates in the development of new antitubercular drugs in the European project »Open Collaborative Model of Tuberculosis Lead Optimisation« (acronime »ORCHID«) with Madrid laboratory Tres Cantos Medicines Development Campus of GlaxoSmithKline company. The latter developed derivatives of thiazolo[4,5-*c*]quinolines and some of them were very effective against *Mycobacterium tuberculosis* strains. Unfortunately, all of them showed tendency toward poor solubility in water.

During thesis we have tried to synthesize new analogues of a lead compound aiming to retaining or improving antimicobacterial activity and improve water solubility, which will further lead to greater extent of absorption and bioavailability. We synthesized two compounds, which both had a common thiazolo[4,5-*c*]quinoline scaffold, the only differences were the substituents at place 6 in quinoline and place 2' in thiazolo ring. In the synthesis of the first final compound we used *p*-nitrophenylacetic acid, which in our opinion may improve the antimicobacterial activity but not the pharmacokinetic properties. BOC-phenylglycin was used to synthesize the second final compound. We think it might possess an equal or better antitubercular activity and contribute to superior pharmacokinetic properties. Because of the missing chlorine atom at the place 6 this compound might slightly differ in its potency and antibacterial spectrum. Synthesis of the third final compound with 2-amino-4-thiazoloacetic acid never could not be accomplished because we have run out of the parent compound. Both final compounds will be further evaluated for antimicobacterial activity.

### 3 SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalno
3D	trodimenzionalno
Å	angstrom; $10^{-10}$ m
AIDS	»acquired immune deficiency syndrome«; sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
Arg	arginin
ATP	adenozintrifosfat
AtpE	gen za ATP sintazo
BOC	di-terc-butiloksikarbonat
BOP	benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat
br	širok (NMR)
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EMB	etambutol
ESI	elektrosprej ionizacija (MS)
FDA	»Food and Drug Administration«
GATI	gatifloksacin
Glu	glutaminska kislina
HATU	2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat
HIV	humani imunodeficientni virus
INH	izoniazid
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
KatG	katalaza peroksidaza
m	multiplet (NMR)
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MDR	»multi-drug resistant«; odporen na več zdravilnih učinkovin

MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MeOH	metanol
Mr	relativna molska masa
MS	masna spektrometrija
<i>M. tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MXF	moksifloksacin
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	jedrska magnetna resonanca
PABA	<i>para</i> -aminobutanojska kislina
PAS	<i>para</i> -aminosalicilna kislina
ppm	en del na milijon delov (NMR)
PZA	pirazinamid
Rf	retencijski faktor
RIF	rifampicin
RNK	ribonukleinska kislina
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kislina
s	singlet (NMR)
SM	streptomycin
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TLC	tankoplastna kromatografija
Tt	temperatura tališča
UV	ultra-vijolično
XDR	»extensively drug resistant«
ZU	zdravilna učinkovina
η	izkoristek reakcije
λ	valovna dolžina
ν	valovno število [ $\text{cm}^{-1}$ ]
δ	kemijski premik [ppm]

## 4 UVOD

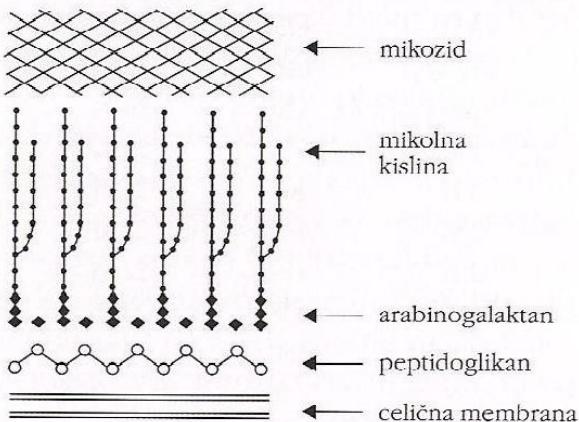
### 4.1 TUBERKULOZA

Rod *Mycobacterium* šteje 70 vrst (1). Mikobakterije so obligatori aerobi, saj se najuspešneje razmnožujejo v tkivih bogatih s kisikom, kot so pljuča (2). So 0,2 do 0,4 µm široki in 2 do 10 µm dolgi negiblivi nesporogeni bacili brez kapsul. Njihova najpomembnejša lastnost je acidorezistentnost, kar pomeni, da so odporni proti kislini. Tuberkuloza ali jetika ali sušica je kronična nalezljiva bolezen, ki prizadene ljudi in nekatere živali. Pri ljudeh v razvitem svetu jo povzroča v glavnem humani bacil tuberkuloze *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*, **slika 1**). Bolezen je stara že tisočletja, saj so našli zanjo značilne spremembe že na okostjih iz neolitika (1).



Slika 1: Bacili *M. tb.*

*M. tb.* je odkril Robert Koch leta 1882, zato se po starem imenuje Kochov bacil. Parazitira v pljučih in drugih organih. Razmnožuje se zelo počasi, ne izdeluje toksinov, ima pa nenavadno zgrajeno celično steno, ki je sestavljena iz štirih plasti: iz peptidoglikana, arabinogalaktana, mikolne kisline in površinskih lipidov mikozidov (**slika 2**). Pri *M. tb.* je med lipidi pomemben trehalozadimikolat ali kordni dejavnik. Lipidi bacilu omogočajo preživetij znotraj makrofagov, so toksični in sprožijo celični imunski odziv, ki povzroči v tkivih nastajanje značilnih granulomov (1).



**Slika 2: Sestava celične stene mikobakterij**

Približno ena tretjina svetovnega prebivalstva je okužena z bakterijo *M. tb.*. Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da letno za tuberkulozo zboli osem do deset milijonov ljudi, umre pa jih približno 2 milijona. To število pa še narašča, kar uvršča tuberkulozo med vodilne tri infekcijske bolezni, za aidsom in pred malarijo, za katere je vzrok en povzročitelj (3).

Najpogostejša oblika je pulmonarna tuberkuloza, ko bacili vstopijo z vdihanim zrakom – kot aerosol pri kašljanju, kihanju, govorjenju, pljuvanju ali petju okuženih ljudi – v alveole, navadno v spodnje dele zgornjih pljučnih režnjev. Za okužbo zadostuje že deset bacilov. Fagocitirajo jih alveolarni makrofagi, v katerih se mikobakterije razmnožujejo, pri čemer nastane t. i. Ghonovo žarišče. Makrofagi s fagocitiranimi mikobakterijami potujejo v hilusne bezgavke in povzročijo vnetje. Ghonovo žarišče skupaj s povečanimi hilusnimi bezgavkami imenujemo primarni kompleks. V desetih dneh po okužbi že nastaja imunski odziv, ki doseže maksimalno intenziteto po 3 do 8 tednih. Makrofagi obkrožijo vnetna žarišča in preprečujejo razmnoževanje mikobakterij. Nastane granulom (tuberkulom), ki ima v središču sirasto nekrozo, sestavljeni iz odmrlega tkiva in mrtvih makrofagov. S takim nastankom organizem običajno zameji primarno infekcijo. Primarna žarišča se popolnoma zacelijo pri 95 % okuženih po 2 do 6 mesecih. Granulome obdajo fibroblasti, ki naredijo brazgotino, ki včasih tudi kalcificira. Bolniki imajo pozitiven tuberkulinski test, ki je znak specifičnega celičnega imunskega odziva. Vsi bacili pri ozdravelih bolnikih niso uničeni. Lahko se reaktivirajo in povzročijo postprimarno bolezen. Kadar eno od žarišč okužbe napreduje, povzroči resne zaplete primarne bolezni, kot so progresivne primarne lezije, meningitis, plevritis, tuberkulozo ledvic, hrbtenice, drugih kosti in sklepov. Bacili se

lahko iz žarišča sprostijo v kri. Širijo se po telesu in povzročajo diseminirano miliarno tuberkulozo. Primarna okužba (najpogosteje na pljučih) je običajno asimptomatična (1). Postprimarna tuberkuloza lahko nastane tudi desetletja po primarni infekciji in je najpogostejša oblika bolezni pri odraslih. Poteka bodisi kot endogena reaktivacija bacilov tuberkuloze ali z eksogeno reinfekcijo. Nastane spontano ali zaradi stanj, ki oslabijo gostiteljevo celično imunost. Gostitelji, pri katerih je nevarnost razvoja tuberkuloze, so starejše osebe, bolniki po presaditvi organov, bolniki, ki jemljejo kortikosteroide ali druge imunosupresive, alkoholiki, diabetiki, ledvični bolniki, bolniki z limfomi, begunci socialno ogrožene osebe in bolniki, okuženi z virusom HIV. Za postprimarno obliko so značilni splošni simptomi: neproduktiven kašelj, hujšanje, subfebrilnost, nočno znojenje in simptomi, ki izhajajo iz drugih bolnih organov. Na rentgenski sliki so vidni infiltrati v apikalnem delu zgornjega režnja pljuč, ki ne reagirajo na običajne antibiotike. Pljučna tuberkuloza je aktivna, če je bolnik bakteriološko pozitiven ali če je dinamika rentgenskih sprememb taka, da sklepamo na aktivno dogajanje. Zunajpljučna tuberkuloza je možna skoraj v vseh organih in tkivih (1,4).

#### **4.2 ZDRAVLJENJE TUBERKULOZE**

Cilji zdravljenja tuberkuloze so skrajšati zdravljenje, zagotoviti ozdravitev, preprečiti smrt bolnikov, preprečiti ponovitev bolezni in razvoj postprimarne tuberkuloze, zaustaviti širjenje infekcije ter preprečiti širjenje rezistence oz. odpornosti na zdravila (3). Ravno pojavnost rezistence je najbolj zaskrbljujoča zaradi vedno večjega razsoja MDR- in XDR-sevov *M. tb.* (5).

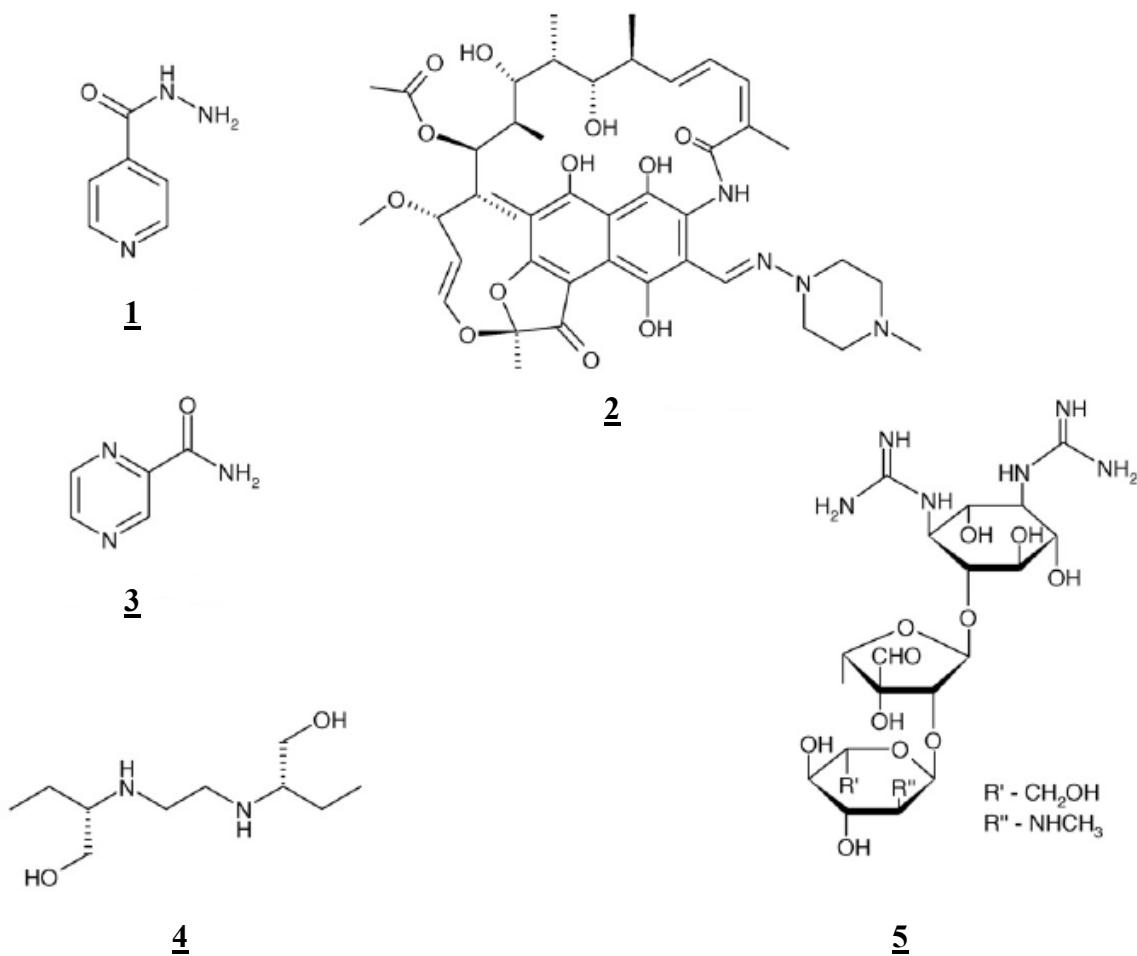
MDR-sevi so odporni na najmanj izoniazid in rifampicin, ki sta najpomembnejši zdravilni učinkovini (ZU) prve vrste. To se lahko dogodi, če se bolnik okuži z že odpornim sevom ali pa bacili razvijejo odpornost zaradi prekratkega zdravljenja ali nepravilne izbire kombinacije zdravil. Odstotki ozdravitve so proti okužbi z nerezistentnimi sevi nižji, običajno od 50 do 70 %. XDR-sevi so odporni na izoniazid in rifampicin ter tudi fluorokinolone in katerokoli injektabilno ZU (amikacin, kanamicin ali kapreomicin) (6).

Razvitje odpornosti bakterij na protimikrobakterijske učinkovine je posledica slabe kompliance bolnikov zaradi cen zdravil, stranskih učinkov, dolgega zdravljenja in števila dnevnih odmerkov (5). V lezijah so lahko bacili v različnih stanjih: metabolično aktivni, znotrajcelični, delnospečni in speči. Za uničenje vseh teh različnih subpopulacij bacilov potrebujemo kombinacijo zdravilnih učinkovin, ki so baktericidne (ubijejo metabolično

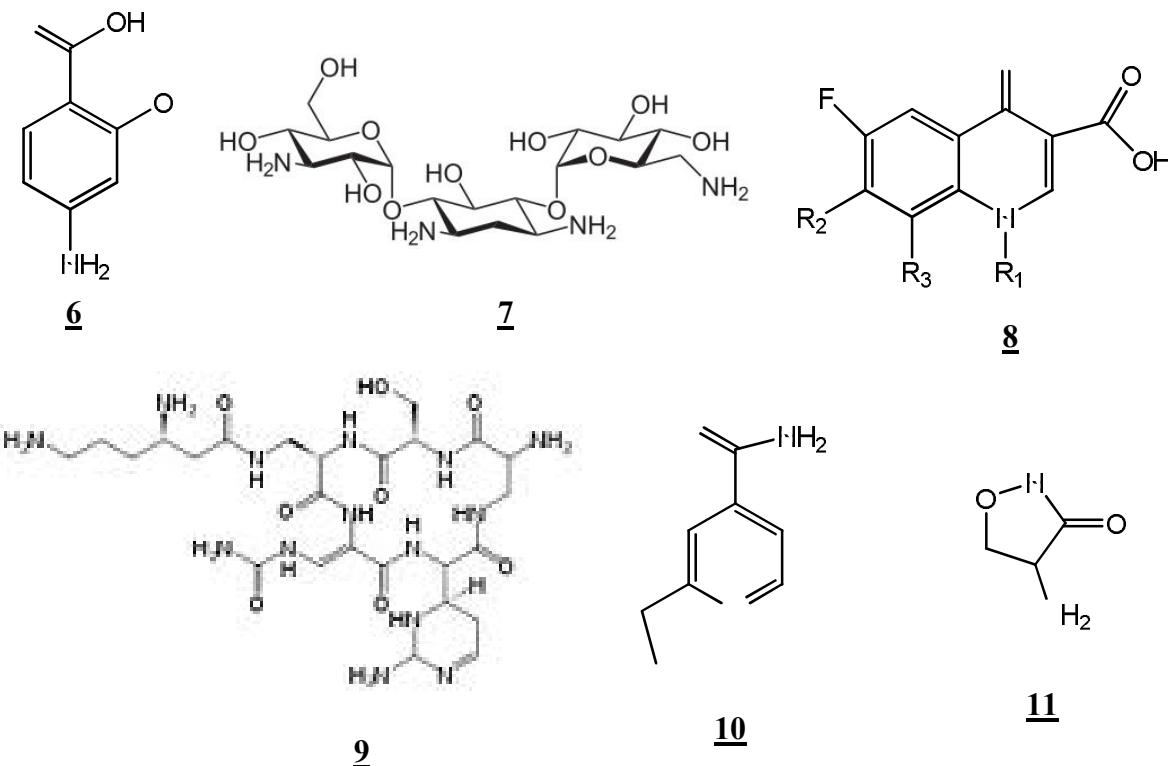
aktivne bacile) in sterilizirajoče (ubijejo delnospeče bacile). Dosedanje zdravilne učinkovine so dobro učinkovite proti metabolično aktivnim, ne pa proti spečim bacilom. Bacili tuberkuloze so razvili unikatno sposobnost, da se zoperstavijo kemoterapeutikom in gostiteljevemu imunskemu sistemu ter preživijo tudi desetletja, dokler se spet ne reaktivirajo (3,6,7).

#### 4.2.1 DOSEDANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Standardna terapija proti tuberkulozi je sestavljena iz štirih zdravilnih učinkovin prve vrste: izoniazid (INH) (**1**), rifampicin (RIF) (**2**), pirazinamid (PZA) (**3**) in etambutol (EMB) (**4**) ali streptomycin (SM) (**5**). Pred odkritjem RIF in PZA je zdravljenje trajalo 12 do 18 mesecev, sedaj pa traja 6 do 8 mesecev. Zdravljenje je sestavljeno iz intenzivne faze z vsemi štiri učinkovinami 2 meseca in nadaljevalne faze z INH in RIF še 4 mesece.



Če le-to ni učinkovito, morebiti zaradi rezistence ali intolerance na zdravila, uporabijo učinkovine iz druge vrste kot so *p*-aminosalicilna kislina (PAS) (**6**), kanamicin (**7**), fluorokinoloni (**8**), kapreomicin (**9**), etionamid (**10**) in cikloserin (**11**), ki pa so običajno manj učinkoviti ali bolj toksični z več neželenimi stranskimi učinki (5,7,8).



INH in RIF sta najbolj potentni učinkovini, medtem ko sta RIF in PZA, ki zelo dobro prodira v makrofage, najpomembnejši učinkovini za sterilizacijo tuberkuloznih lezij in preprečevanje relapsa bolezni. Pacienti po dveh tednih intenzivne faze niso več kužni, zato je cilj nadaljevalne faze eliminirati bacile, ki se delijo, in tako zmanjšati možnost neuspeha zdravljenja in relapsa bolezni (3). Velika slabost RIF je ta, da povzroča interakcije z mnogimi zdravilnimi učinkovinami, med drugim s protivirusnimi zdravilnimi učinkovinami kot so nenukleozidni inhibitorji reverzne transkriptaze in proteazni inhibitorji. Inducira namreč jetrne encime, ki so odgovorni za metabolizem protivirusnih učinkovin, zato je le-ta povečan ter njihova plazemska koncentracija posledično nižja (4).

#### 4.2.2 MEHANIZMI IN TARČE

V preteklem času so na mikobakterijah identificirali številne tarče ter veliko število protituberkuloznih učinkovin in njihovih strukturnih analogov. Tarče so del biosinteznih

poti, katerih produkti so makromolekule (nukleinske kisline, proteini in polimeri celične stene), ključne za preživetje bakterij. Ciljanje teh ključnih bakterijskih mehanizmov privede do pomanjkanja življensko pomembne komponente ali nepopravljive napake v bakterijskem genomu, kar se posledično najverjetnejše konča z njihovo smrtjo. Pri izbiri tarč se moramo izogibati tistim, ki so zelo podobne človeškim. V mikobakterijah so najpogosteje tarče sinteza proteinov, biosinteza nukleinskih kislin, biosinteza makromolekul celične stene in DNK topoizomeraza. Protibakterijske učinkovine lahko zato tudi razdelimo glede na te štiri glavne mehanizme kot: inhibitorje sinteze proteinov (aminoglikozidi: SM), inhibitorje biosinteze nukleinskih kislin (RIF), inhibitorje biosinteze makromolekul celične stene (INH, PZA, EMB) in inhibitorje DNK topoizomeraze (kinoloni) (9).

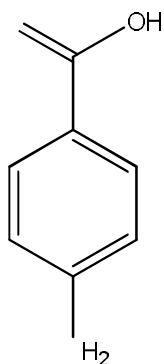
**Preglednica I: Dosedanje zdravilne učinkovine, njihova MIC, mehanizem delovanja in tarče (7)**

ZU	MIC* ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mehanizem delovanja	Tarča
Izoniazid	0,01-0,20	Inhibicija sinteze mikolne kisline	Enoil acil prenašalni protein reduktaza
Rifampicin	0,05-0,50	Inhibicija sinteze RNK	RNK polimeraza, beta-enota
Pirazinamid	20-100	Izčrpanje energije	Metabolizem v membrani
Etambutol	1-5	Inhibicija sinteze arabinogalaktana	Arabinozil transferaza
Streptomycin	2-8	Inhibicija sinteze proteinov	Ribosomalni S12 protein in 16S rRNK
Kanamicin	1-8	Inhibicija sinteze proteinov	16S rRNK
Kapreomicin	4	Inhibicija sinteze proteinov	16S rRNK, 50S ribosom, rRNK metiltransferaza
Fluorokinoloni	0,2-4,0	Inhibicija sinteze DNK	DNK giraza
Etionamid	0,6-2,5	Inhibicija sinteze mikolne kisline	Acil prenašalni protein reduktaza
PAS	1-8	Inhibicija sinteze v folatni poti in mikobaktinov	Timidilat sintaza

\* = minimalna inhibitorna koncentracija je najnižja koncentracija protimikrobnega sredstva, ki še zavira rast preiskovanega mikroorganizma

Aminoglikozidni antibiotik SM z delovanjem na 16S podenoto ribosomalne RNK (rRNK) moti sintezo proteinov. Po istem mehanizmu delujejo tudi ostali aminoglikozidi, ki se uporabljajo v terapiji. Odpornost *M. tb.* na SM je verjetno nastala zaradi mutacij, ki povzročajo spremembe na 16S podenoti rRNK. Ravno zato novejše raziskave pri razvoju novih protituberkuloznih učinkovin, ki ciljajo na sintezo proteinov, potrjujejo, da ribosom ni dobra tarča za boj proti mikobakterijam (10).

Sulfonamidi (strukturni analogi *p*-aminobenzojske kisline (PABA, **12**)) inhibirajo sintezo tetrahidrofolne kisline, ki je pomembna pri tvorbi purinskih in pirimidinskih baz, te pa so pomembne pri sintezi nukleinskih kislin.



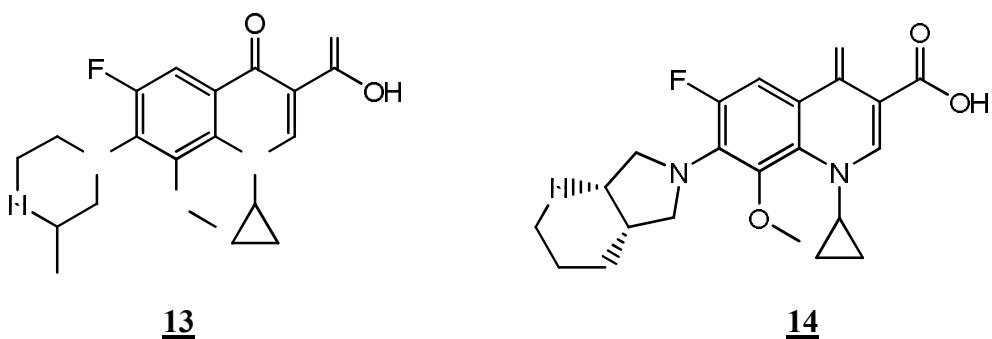
## **12**

Derivati PAS delujejo v metabolični poti tetrahidrofolatov in biosinteznem mehanizmu mikobaktinov, ki sodelujejo pri transportu železa. V zadnjem času raziskave kažejo na povečanje učinka sulfonamidov, še posebej v kombinaciji z drugimi učinkovinami kot je trimetoprim.

Sintetično pripravljen hidrazid izonikotinske kisline (INH) je ena od najširše uporabljenih protituberkuloznih zdravilnih učinkovin, saj je visoko učinkovit proti *M. tb.* ter eden izmed najzaslužnejših za hitro zmanjšanje števila bakterij v začetni fazi terapije. Je predzdravilo, ki ga encim katalaza peroksidaza (KatG) metabolično aktivira v nestabilni intermediat. Ta napade NAD in nastane adukt, ki se veže na prepoznavno NAD(H) mesto 2-trans-enoil-acil transportnega proteina reduktaze ter tvori adukt INH-NADH, ki ima protituberkulozni učinek (11,12). Temu procesu sledi inhibicija biosinteze mikolne kisline, ki je najpomembnejša komponenta celične stene *M. tb.*. Vzrok za rezistenco na INH je mutacija gena za encim KatG (12).

DNK giraza, ki spada v družino encimov DNK topoizomeraz tipa II, je še ena zanimiva tarča *M. tb.*, saj sodeluje v nekaterih ključnih reprodukcijskih procesih teh bakterij. Ti so

od ATP-odvisno uvajanje negativnih zavojev (zvijanje) v krožno dvovijačno molekulo DNK, od ATP-odvisna relaksacija negativno zvite DNK in od nukleotida-odvisna relaksacija negativno zvite DNK. Inhibicija DNK giraze torej blokira procese replikacije in transkripcije v mikobakterijah. 6-fluorokinoloni so verjetno edini poznani inhibitorji DNK giraze. Kinoloni se vežejo v kompleks DNK-giraza in stabilizirajo konformacijsko spremembo kompleksa DNK-giraza, ki je odgovorna za inhibicijo girazne funkcije. Proces uvajanja dodatnih negativnih zavojev se ustavi. Vitalna biološka procesa kot sta replikacija in transkripcija sta onemogočena, zato sta sinteza DNK in celična rast blokirani (9,10). Še vedno učinkoviti 6-fluorokinoloni v terapiji so: ciprofloksacin, ofloksacin, levofloksacin, gatifloksacin (GATI), moksifloksacin (MXF) in sitafloksacin. Sedanje raziskave so namesto na kinoline osredotočene na derivate 2-piridona kot potencialne inhibitorje DNK giraze. Do sedaj najboljšo aktivnost in jakost izkazujeta GATI (**13**) in MXF (**14**) (13,14).



#### 4.2.3 POTENCIALNE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Idealna zdravilna učinkovina bi morala: skrajšati terapijo na dva meseca ali manj, biti vsaj tako varna kot dosedanja zdravila prve vrste, imeti nov mehanizem delovanja, imeti možnost peroralne aplikacije, imeti tak farmakokinetični in farmakodinamski profil, da omogoča enkrat dnevno aplikacijo ali manj, izkazovati minimalne ali nič interakcij z jetrnimi encimi citokromi P450 (s tem so povezane tudi interakcije z drugimi zdravili, še posebno s protivirusnimi) ter nenazadnje imeti nizko ceno.

Po štiridesetih letih je nekaj spojin z obetavnimi lastnostmi vstopilo v predklinična in klinična testiranja. Upamo lahko, da bo vsaj ena prestala vsa potrebna testiranja in odprla novo poglavje v zdravljenju tuberkuloze (15).

#### **4.2.3.1 Moksifloksacin in gatifloksacin**

MXF (**14**) in GATI (**13**) sta kandidata za skrajšanje zdravljenja tuberkuloze zaradi daljše razpolovne dobe, najnižjih MIC vrednosti in najboljše aktivnosti v primerjavi z ostalimi fluorokinoloni. Obe učinkovini imata potencial, da se bosta uporabljali kot učinkovini prve vrste za izboljšanje zdravljenja tuberkuloze (8, 15).

MXF se v največji meri metabolizira preko glukuronizacije in sulfoniranja, manj pa preko citokromov. *In vitro* študije so pokazale, da je MIC od 0,25 do 0,5 µg/ml. *In vitro* študije in študije na miših so pokazale večjo baktericidno aktivnost, kot pri kombinaciji MXF in INH. Kombinacija MXF in rifapentina tri mesece enkrat tedensko se je izkazala za enako učinkovito kot šest mesecev monoterapije INH na mišjem modelu (15). V drugi študiji so dokazali, da je MXF pobil subpopulacije tuberkuloznih bacilov, ki jih RIF ni mogel. Na mišjem modelu so pokazali, da je MXF enako učinkovit kot INH. MXF je v kombinaciji z RIF in PZA uničil več bacilov kot v standardni kombinaciji INH + RIF + PZA in tako bi lahko dosegel stabilno ozdravitev že po 4 mesecih brez relapsov. To daje upanje, da lahko MXF zamenja INH + RIF + PZA in skrajša zdravljenje pri človeku (7). Študija na bolnikih s pulmonalno tuberkulozo je pokazala primerljivo aktivnost MXF (400 mg) proti INH (300 mg). Standardna kombinacija (RIF + PZA) z MXF je povzročila hitrejši upad bakterij oz. CFU kot z INH. Enkratna doza MXF do 800 mg je bila dobro tolerirana, a nič še ni znanega o dolgoročni toleranci. Poročali pa so o redkih, a resnih hepatoloških in dermatoloških stranskih učinkih. MXF je trenutno v tretji fazi razvoja (15).

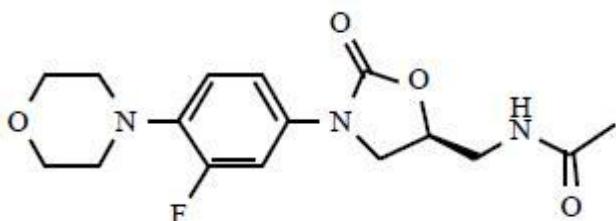
GATI ima MIC od 0,2 do 0,5 µg/ml. *In vitro* študije in študije na miših so pokazale izboljšano aktivnost, ko so RIF in INH dodali GATI, še bolje pa je bilo, ko so tem trem dodali še PZA. Namerajo izvesti tudi študijo, v kateri bodo primerjali učinkovitost in toleranco doziranja kombinacije 2 meseca RIF + INH + PZN + GATI in 2 meseca RIF + INH + GATI proti standardni kombinaciji 2 meseca RIF + INH + PZN + EMB in 4 meseca RIF + INH. Pri starejših pacientih, ki so jemali GATI pri zdravljenju različnih bakterijskih okužb, so opisali povečano tveganje za disglikemijo. GATI je trenutno v tretji fazi razvoja (15).

#### **4.2.3.2 Linezolid**

Oksazolidinoni predstavljajo nov razred kemoterapevtikov, ki izkazujejo široko aktivnost proti gram-pozitivnim bakterijam in mikobakterijam. Z vezavo na 23S rRNK na 50S podenoti ribosoma inhibirajo sintezo proteinov že v zgodnji fazi. Pozitvni lastnosti

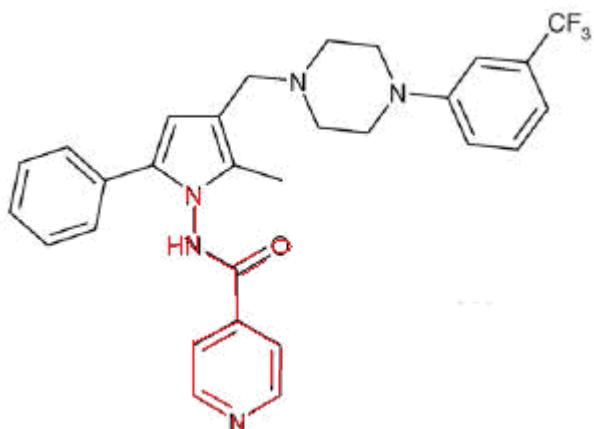
oksazolidinonov sta še možnost peroralne aplikacije in odsotnost navzrižnih interakcij z ostalimi antibiotiki.

Linezolid (**14**) je prvi izmed oksazolidinonov, ki je bil razvit in odobren s strani FDA za zdravljenje rezistentnih infekcij z gram-pozitivnimi bakterijami, ni bil pa odobren za zdravljenje tuberkuloze na pacientih. Njegova MIC za *M. tb.* je  $0,125\text{-}1 \mu\text{g/ml}$ . V zadnjih dveh študijah je bila večina pacientov z MDR-tuberkulozo, ki so bili zdravljeni z linezolidom v kombinaciji z ostalimi učinkovinami, uspešno pozdravljena. A pri daljši uporabi linezolida v terapiji MDR-tuberkuloze je pogosto prišlo do pojava neželenih učinkov kot so anemija, trombocitopenija ter periferna in optična nevropatija. Čeprav so oksazolidinoni zelo obetavni pri zdravljenju rezistentnih sevov tuberkuloze, bo potrebno narediti še več izčrpnih kliničnih študij za ovrednotenje učinkovitosti, toksičnosti in možnosti razvoja rezistence nanje (7,15).

**14**

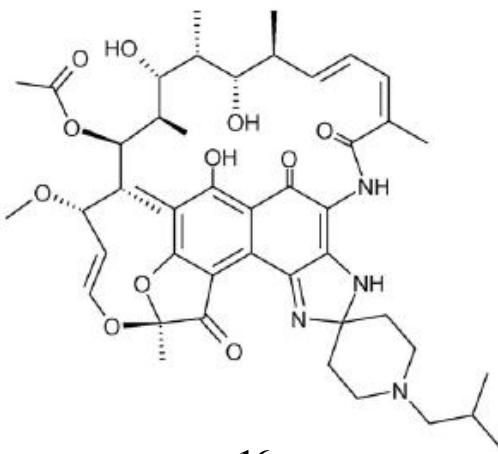
#### 4.2.3.3 LL-3858

Substituiran pirolov derivat LL-3858 (**15**) je pravzaprav strukturni analog INH (na strukturni formuli je okrepljen z rdečo barvo) in je trenutno v prvi fazi testiranj za tuberkulozo. Preliminarni podatki kažejo, da ima močno *in vitro* aktivnost, saj je MIC za *M. tb.*, vključno z MDR-sevi, v območju med  $0,06$  in  $0,5 \mu\text{g/ml}$ . Monoterapija na mišjem modelu za tuberkulozo je pokazala baktericidno aktivnost pri odmerkih precej pod mejo toksičnosti. Dodatek k standardni kombinaciji (INH + RIF + PLZ) je signifikantno prispeval k povečanju protimikrobakterijske učinkovitosti (15).

**15**

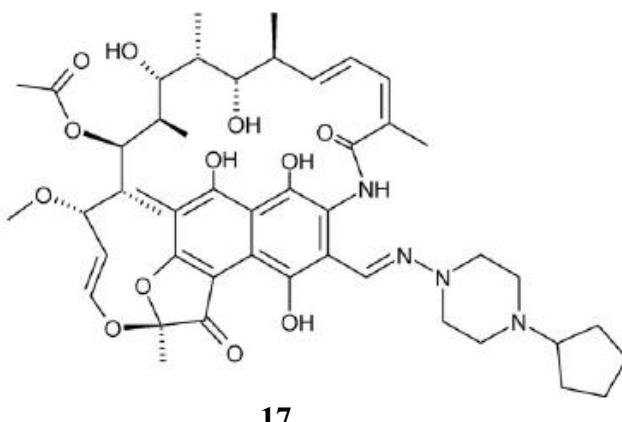
#### **4.2.3.4 Rifabutin, rifapentin in rifulazil**

Vsi trije derivati rifamicina so bili sintetizirani z namenom izboljšati delovanje proti mikobakterijam in podaljšati razpolovno dobo učinkovin. Rifabutin (**16**) je odobren za zdravljenje intraceličnega kompleksa *Mycobacterium avium* (MAC) ter pacientov, ki imajo tuberkulozo in so hkrati okuženi z virusom HIV, z namenom zmanjšanja interakcij s protivirusnimi učinkovinami (8).

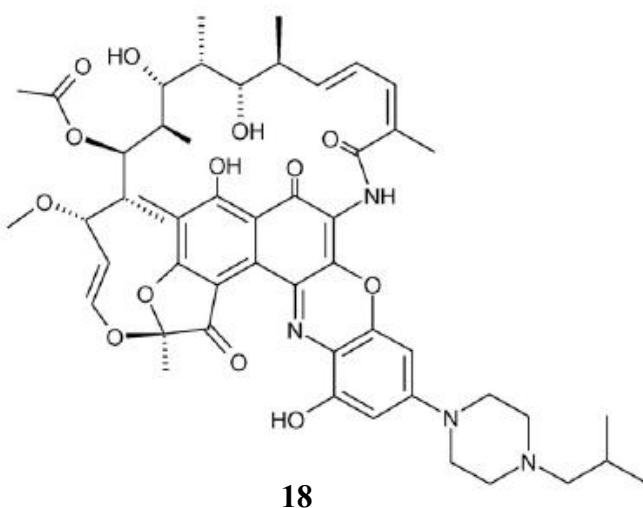
**16**

Leta 1998 je FDA odobrila rifapentin (**17**) kot dolgo delujoči derivat rifamicina za zdravljenje tuberkuloze. Je varen pri enkrat tedenski aplikaciji, trenutno pa je v tretji fazi preizkušanja učinkovitosti z namenom skrajšanja terapije latentne tuberkuloze. V eni izmed študij so naključnim pacientom dajali ali rifapentin skupaj z INH enkrat tedensko tri mesece ali samo INH enkrat dnevno devet mesecev. Študija je končana, a je trenutno v nadaljevalni fazi. Če bi bila ta kombinacija uspešna, bi to bila zelo dobra alternativa za prihodnjih zdravljenja. Na mišjem modelu so demonstrirali tudi, da je kombinacija

rifapentina, MXF in PZN ozdravila miš s tuberkulozo v treh mesecih zahvaljujoč povečani protimikrobakterijski aktivnosti zaradi daljše razpolovne dobe rifapentina. Naredili bodo tudi poskuse, kjer bodo primerjali učinkovitost standardne kombinacije in kombinacije, kjer bodo namesto RIF uporabili rifapentin (7, 8).

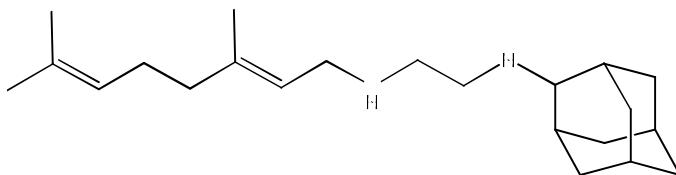
**17**

Rifalazil (**18**) je nova polsintezna učinkovina z dolgo razpolovno dobo, ki je zelo aktivna proti vrsti intracelularnim bakterijam kot so *M. tb.* in *avium*, *Chlamydia trachomatis* in *pneumoniae* ter *Helicobacter pylori*. Na mišjem modelu *in vitro* ter *in vivo* proti *M. tb.* se je izkazalo, da je rifalazil aktivnejši od RIF in rifabutina. Na žalost pa je njegova uporaba omejena, saj se je izkazalo, da so sevi, ki so rezistentni na RIF, rezistentni tudi na rifalazil. Preliminarne toksikološke študije na ljudeh so pokazale, da je rifalazil varen pri 10 mg in 25 mg, pri odmerkih nad 100 mg pa se premosorazumno z odmerkom začnejo pojavljati gripi podobni simptomi ter upad števila trombocitov in belih krvničk. Učinkovitost ni bila boljša kot pri RIF. Zaenkrat pa še ni informacij pravih kliničnih študij o zdravljenju infekcij z *M. tb.* (7).

**18**

#### 4.2.3.5 *SQ-109*

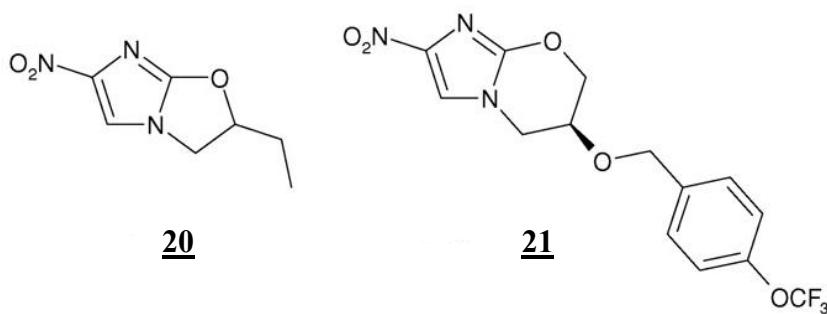
SQ-109 (**19**) je nova učinkovina, ki ohranja 1,2-diaminski del EMB. Kljub podobnosti je opredeljena kot nova učinkovina in ne kot analog EMB, saj najverjetneje deluje na inhibicijo sinteze celične stene po različnem, do sedaj še nepoznanem mehanizmu. Razlog za to je odlična *in vitro* aktivnost proti sevom tuberkuloze, ki so rezistentni na EMB, INH in RIF. Čeprav izkazuje slabo biorazpoložljivost, je njegova dobra lastnost velik volumen distribucije v različna tkiva, še posebej v pljuča in vranico, kjer se bacili nahajajo v največji meri. Njena MIC (0,16-0,64 µg/ml) je približno desetkrat nižja od EMB. Izkazuje tudi sinergistično delovanje v kombinaciji z INH ali RIF proti MDR-sevom tuberkuloze. Zanimivo bi bilo izvedeti, če deluje sinergistično tudi z rifabutinom, ki inducira CYP v manjši meri. Je potencialna učinkovina proti nerezistentnim in MDR-sevom tuberkuloze. Zaradi sinergizma je zelo dobrodošla zamenjava za EMB v standardni kombinaciji začetne faze zdravljenja. Leta 2007 je zaključila preiskave v klinični fazi Ia, v kateri niso opisali nobenih resnih neželenih učinkov. Po peroralni aplikaciji se dobro porazdeljuje po tkivih, ima dolgo razpolovno dobo in menijo, da bi bilo možno doseči enkrat tedensko aplikacijo. SQ-109 je vstopila v fazo I/II kliničnih študij (5, 7, 8, 15).



**19**

#### 4.2.3.6 *PA-824*

Spada v skupino nitroimidazooksazinov, ki se uporablja tudi v kemoterapiji raka. Prva odkrita spojina, ki je izkazovala protituberkulozno *in vitro* ter *in vivo* delovanje, je bila CGI-17341 (**20**), za katero pa so ugotovili, da je mutagena. Z nadaljnim raziskovanjem so se izmed 328-ih spojin osredotočili na PA-824 (**21**), saj je imela najnižjo MIC (0,015-0,025 µg/ml). Spojina je aprila 2005 prestala prvo fazo kliničnih preizkusov, trenutno pa je v drugi. Njen mehanizem delovanja je dvostranski, saj inhibira sintezo celične stene in proteinov. To potrjuje tudi dejstvo, da je učinkovit tudi pri uničenju tako delečih kot nedelečih bacilov in MDR-sevov *M. tb.*, kar pomeni, da ne more delovati samo po mehanizmu inhibicije sinteze celične stene (5, 7, 8).



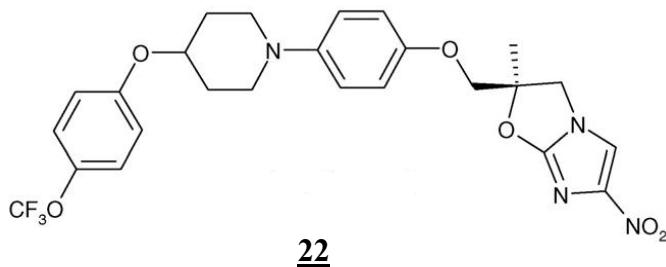
Ugotovili so, da je ta oblika spojine pravzaprav predzdravilo, saj za aktivacijo potrebuje bakterijsko glukoza-6-fosfat dehidrogenazo ali njen kofaktor F420 in nitroreduktazo. V nadaljnjih študijah so odkrili, da se PA-824 metabolizira v tri primarne metabolite, od katerih je največ des-nitroimidazola. Ko so uporabili derivate PA-824, se je z večanjem količine tega metabolita, večala sposobnost ubijanja bacilov tuberkuloze v anaerobnih pogojih. Pri tvorbi des-nitroimidazolnih metabolitov nastanejo reaktivne dušikove spojine, vključno z dušikovim oksidom (NO), ki so potrebni za anaerobno aktivnost. Zaključili so, da PA-824 verjetno deluje kot donor NO in dodatno prispeva k uničenju bacilov na enak način kot to počne človeški imunski sistem (5, 7, 8).

PA-824 je *in vitro* in na miših pokazal večjo aktivnost kot INH in MXF ter podobno aktivnost kot kombinacija INH in RIF. Ko so skušali oceniti njegovo zmožnost skrajšanja terapije na miših, so edino v kombinaciji, kjer so nadomestili INH, dosegli hitrejše zmanjšanje števila bakterij v pljučih. Kombinacija PA-824 (100mg/kg), MXF (100 mg/kg) in PZA (150 mg/kg) se je izkazala za boljšo kot kombinacija RIF (10 mg/kg), INH (25 mg/kg) in PZA (150 mg/kg). Naredili so tudi aerosol za direktno vpihanje v pljuča, s katerim so na živalih dosegli 32-urno lokalno zadrževanje v pljučih, medtem ko se je spojina, ki so jo dali peroralno, zadržala manj časa. To pomeni, da bo mogoče v prihodnje z izboljšavami narediti tudi inhalacijski dostavni sistem, ki bo konkurenčen tabletam oz. kapsulam. Do sedaj pa so glede stranskih učinkov odkrili le to, da inhibira sekrecijo kreatinina v ledvičnih tubulih, kar se kaže v povečanih plazemskih koncentracijah kreatinina (5, 7, 8, 15).

PA-824 ima tri ključne značilnosti: ima unikaten mehanizem delovanja, ozek spekter delovanja in ne izkazuje navzkrižnih interakcij z ostalimi antibiotiki. To izkazuje veliko upanje v skrajšanju zdravljenja latentne tuberkuloze v kombinaciji z učinkovinami druge vrste ali novimi spojinami (5, 7, 8, 15).

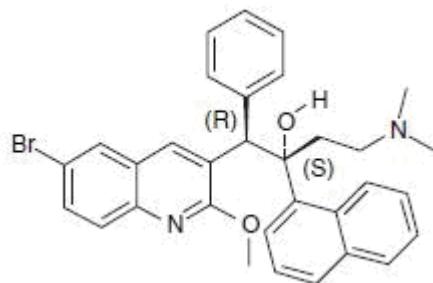
#### 4.2.3.7 OPC 67683

OPC-67683 (**22**) je nov derivat nitro-dihidro-imidazooksazolov, ki je strukturno zelo podoben spojini PA-827 in je bil razvit za zdravljenje tuberkuloze. Je inhibitor biosinteze mikolne kisline in ima izjemno močno delovanje proti nerezistentnim in MDR-sevom tuberkuloze. Njegova MIC *in vitro* je 0,006-0,024 µg/ml in izkazuje zelo dobro delovanje *in vivo*. Je 30-krat močnejši od RIF ter ne izkazuje navzkrižnih interakcij z učinkovinami prve vrste. Kot PA-827 je tudi ta predzdravilo, ki se v *M. tb.* metabolizira do des-nitro-imidazooksazola. Poskus na bacilih iz pljuč je pokazal, da doseže kombinacija OPC-67683, RIF in PZA vsaj za dva meseca hitrejšo eradikacijo bakterij kot standardna kombinacija INH, RIF, PZA in EMB. Tudi poskus na miših, v katerem so prva dva meseca uporabljali kombinacijo OPC-67683, RIF in PZA ter naslednja dva meseca RIF, je bil uspešen, saj so bili bacili po štirih mesecih v celoti eliminirani iz pljuč. OPC-67683 ima dolgo razpolovno dobo, ne inducira in se ne presnavlja z jetrnimi citokromi, kar nakazuje, da bi ta spojina bila zelo perspektivna v terapiji pacientov, ki imajo hkrati tuberkulozo in AIDS. Pred kratkim je spojina uspešno prestala drugo fazo kliničnih poskusov (5, 8, 15).



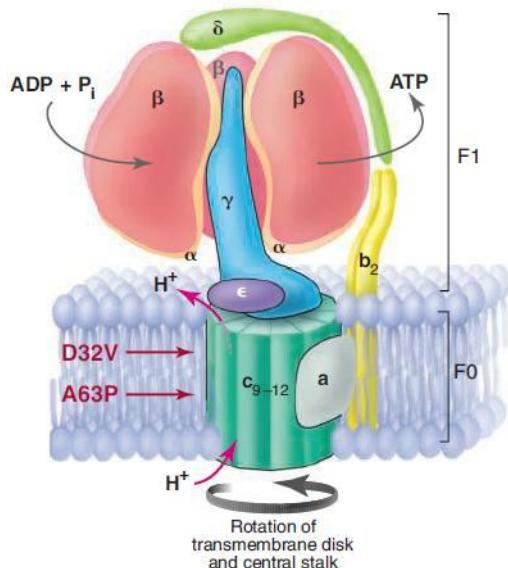
#### 4.2.3.8 TMC-207

TMC-207 (**23**) je nov derivat diarilkinolinov, ki navdušuje z izjemno nizko MIC od 0,03 do 0,12 µg/ml proti *M. tb.*, proti *M. smegatis* pa 0,003 µg/ml. Deluje proti nerezistentnim bacilom, rezistentnim bacilom proti INH, RIF, EMB, PZA, MXF in SM ter MDR-sevom. Na miših ne izkazuje nobenih navzkrižnih interakcij z učinkovinami prve vrste. Aktivnejši je od RIF in INH, zato bi lahko skrajšal čas zdravljenja iz štirih mesecev na dva. Skupaj s PZA deluje sinergistično. Učinkovitost enomesečnega zdravljenja s kombinacijo z INH in PZA ali kombinacijo z RIF in PZA je bilo enako kot dvomesečno z RIF, INH in PZA. TMC-207 je prestal drugo fazo kliničnih študij na ljudeh, kjer so pri monoterapijah z različnimi odmerki opazili le blage do zmerne stranske učinke, od katerih je prevladovala slabost (15, 17).



23

Najbolj presenetljivo je to, da kljub strukturni podobnosti s 6-fluorokinoloni, ne inhibira DNK giraze, kar nakazuje na nov mehanizem delovanja. Ugotovili so, da deluje kot inhibitor mikobakterijske ATP sintaze (slika 3). Transmembranski encim je sestavljen iz dveh delov, F0 in F1. F1 se nahaja v citoplazmi, kjer generira ATP, F0 pa je diskasta enota v membrani, ki je zgrajena iz ene a-podenote, dveh b-podenot in med 9 in 12 c-podenot. Mehanizem delovanja še ni poznan, ampak sklepajo, da se TMC-207 veže na aminokislino Glu-61 na eni izmed c-podenot, kar prepreči prenos protona z Arg-186 na Glu-61. Izolirali so tudi že podenoto encima. S pomočjo sekveniranja so ugotovili, da se AtpE gena pri človeku in bacilu tuberkuloze zelo razlikujeta, kar kaže na dobro selektivnost spojine (16, 17).



Slika 3: Zgradba mikobakterijskega encima ATP sintaze (16)

TMC-207 izkazuje odlično zgodnje in pozno protibakterijsko delovanje, dobre farmakokintetične in farmakodinamične lastnosti, dolg razpolovni čas ter odsotnost neželenih učinkov pri testiranjih na miših in preliminarnih toksikoloških testih na ljudeh.

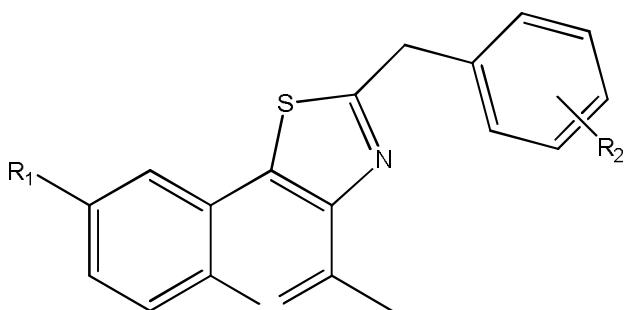
To daje upanje, da je spojina zelo obetavna in v prihodnosti primerna za uporabo v terapiji tuberkuloze (15).

Poleg pozitivnih lastnosti pa se porajajo številna vprašanja oz. dvomi. Prvo: Protituberkulozne učinkovine ponavadi niso enako dobro delajoče proti počasi in hitrorastočim bakterijam. Za primerjavo so INH, RIF in PZA boljše delajoče učinkovine proti počasi rastočim *M. tuberculosis*, a slabše proti hitrorastočim *M. smegatis*, saj imajo zadnje učinkovitejši efluks učinkovin. Diarilkinolini pa so še učinkovitejši proti hitrorastočim *M. smegatis* kot *M. tb.*, kar je nekoliko nenavadno. Drugo: Običajno protituberkulozne učinkovine izkazujejo ali zgodnje ali pozno protibakterijsko delovanje. Ta spojina pa izkazuje oboje. Tretje: Selektivnost spojine na mikobakterijsko ATP sintazo, ki je prisotna v vseh mikobakterijah, ampak tudi v gostiteljevih mitohondrijih, brez toksičnih učinkov je fascinantno. Četrto: Pričakovano je, da imajo mikobakterije za sintezo ATP poleg ATP sintaze še kakšno drugo alternativno pot, kar pomeni, da spojina, ki deluje samo na ATP sintazo, ne bi bila letalna zanje. Razen če TMC-207 deluje še na kakšno drugo tarčo v mikobakterijah (15).

## 5 NAČRT DELA

Katedra za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo sodeluje v skupnem evropskem projektu »ORCHID« z laboratorijem Tres Cantos Medicines Development Campus v Madridu podjetja GlaxoSmithKline pri razvoju novih protituberkuloznih učinkovin.

V laboratoriju Tres Cantos Medicines Development Campus so že razvili protituberkulozne učinkovine na osnovi tiopirazolo[3,4-*d*]pirimidinov in tiazolo[4,5-*c*]kinolinov. Spojine imajo protituberkulozni učinek, a natančen mehanizem delovanja spojin še ni znan. Imajo vrednosti logP nad 5, kar je po pravilu Lipinskega preveč, da bi bile biološke razpoložljivosti spojin ugodne. Praktično o tem priča slaba topnost v vodi, kar posledično vpliva na slab obseg absorpcije, nezadostno koncentracijo na mestu delovanja in manjšo biološko uporabnost. **Slika 4** prikazuje spojine z najmočnejšim delovanjem. Ovrednotili so jih z minimalno inhibitorno koncentracijo 80 ( $\text{MIC}_{80}$ ), ki je definirana kot koncentracija določenega protimikrobnega sredstva, ki zavre 80 % rasti preiskovanega mikroorganizma v primerjavi s kontrolo. Najnižje vrednosti, od 0,022 do 0,035  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , so dosegli, ko so na mesto R<sub>1</sub> postavili Cl ali OCH<sub>3</sub> in na mesto R<sub>2</sub> postavili F, Cl, OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> ali *terc*-butil (18).



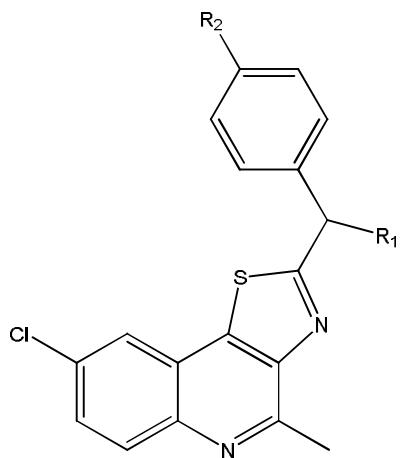
**Slika 4:** Nov tip protituberkuloznih učinkovin – tiazolo[4,5-*c*]kinolini

Na Katedri za farmacevtsko kemijo želimo s sodobnimi prijemi farmacevtske kemije izdelati nove analoge tiazolo[4,5-*c*]kinolinov z izboljšanim protimikrobakterijskim učinkom in vodotopnostjo. Pri tem se bomo opirali na dosedanja raziskovanja laboratorija Tres Cantos Medicines Development Campos in objavljenih člankov o do sedaj odkritih potencialnih učinkovinah.

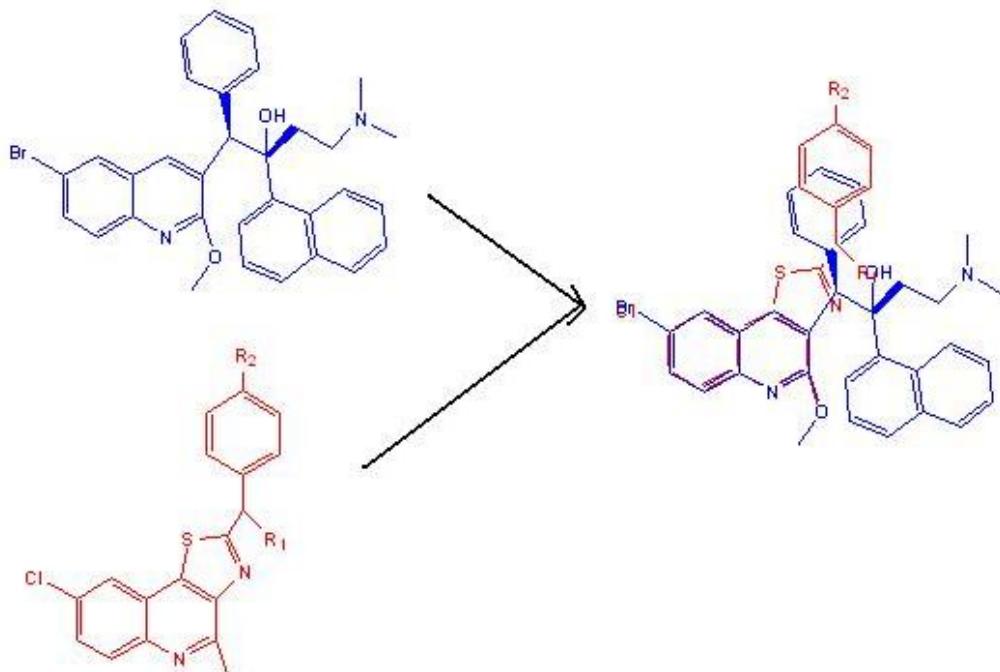
Tarča novih analogov tiazolo[4,5-*c*]kinolinov še ni poznana, a zaradi strukturne podobnosti med njimi in v prejšnjem poglavju opisane spojine TMC-207 (**23**) sklepamo, da je tarča enaka. TMC-207 je ena izmed najučinkovitejših potencialnih učinkovin, ki je trenutno v drugi fazi testiranj. Ima kinolinski skelet, ki ima na mestu 2 metoksi skupino, na mestu 3

dolgo alifatsko verigo, na kateri je na mestu 1' fenilni fragment, na mestu 2' hidroksilno in naftalensko skupino, na mestu 5' pa terciarni amin, in bromov atom na mestu 6.

Spojina vodnica (**slika 5**) ima s spojino TMC-207 skupen kinolinski obroč, kratko alifatsko skupino na mestu 2 in halogenski element na mestu 6. Pri poskusu grafičnega prekrivanja na **sliki 6** obeh spojin opazimo, da se nekateri odseki precej uspešno prekrivajo. Najbolj spodbudno je prekrivanje hidroksilne skupine TMC-207 in R<sub>1</sub> našega tipa spojin, zato bi bilo smiselno na mesto R<sub>1</sub> postaviti hidroksilno skupino ali njen izosterno zamenjavo. Aromatski sistem naše spojine se s fenilnim obročem na mestu 1' spojine TMC-207 le delno prekriva.

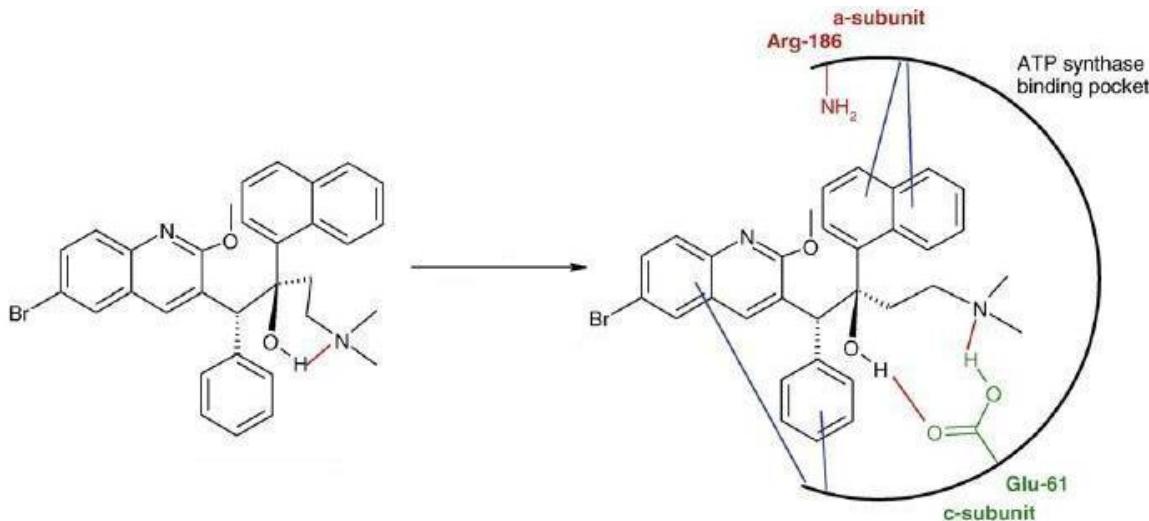


**Slika 5:** Spojina vodnica



**Slika 6:** Prekrivanje spojine TMC-207 (modra) in spojine vodnice (rdeča)

Na **sliki 7** so prikazane interakcije med spojino TMC-207 in vezavnim mestom na mikobakterijski ATP sintazi. Hidroksilna skupina na mestu 2' in terciarni amin na mestu 5' sodelujeta pri tvorbi dveh vodikovih vezi z aminokislino Glu-61 na c-podenoti, kinolinski skelet in fenilni obroč na mestu 1' pa pri tvorbi Van der Waalsovih sil z okolico aminokisline Glu-61 na a-podenoti. Naftalenski obroč tvori Van der Waalsove interakcije z a-podenoto.



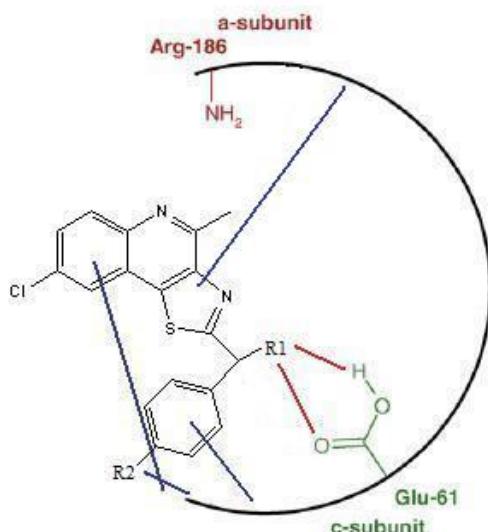
**Slika 7: Interakcije med spojino TMC-207 in vezavnim mestom na mikobakterijski ATP sintazi (5)**

Na **sliki 8** je grafični poskus, kjer smo po zgledu slike 6 spojino vodnico vstavili v vezavno mesto. Zaradi odsotnosti dolge alifatske verige s terminalnim terciarnim aminom kot jo ima TMC-207, lahko spojina vodnica prodre globlje v vezavno mesto. Fenilni obroč, kinolinski skelet in substituent R<sub>2</sub> lahko tvorijo Van der Waalsove interakcije z okolico aminokisline Glu-61. Čeprav spojina vodnica za razliko od TMC-207 nima naftalenskega skeleta, bi tiazolo[4,5-c]kinolinski skelet z globokim prodrtjem v bližino vezavnega mesta lahko vseeno tvoril Van der Waalsove interakcije z okolico aminokisline Arg-186. V strukturo, najverjetneje na kinolinski skelet, bi bilo smiselno vključiti karboksilno skupino, ki bi z amino skupino Arg-186 tvorila močne vodikove vezi. Pravilna izbira substituenta R<sub>2</sub> pripomore k močnejši vezavi, zato bomo pri sintezi prve končne spojine na njegovo mesto postavili nitro skupino.

Na mesto R<sub>1</sub> je smiselno vstaviti tako skupino oz. fragment, ki bi s karboksilno skupino Glu-61 na c-podenoti tvoril čim več vodikovih vezi. Amino skupina je izosterna zamenjava za hidroksilno in po našem mnenju primeren substituent na mestu R<sub>1</sub>, saj lahko z Glu-61

tvori dve donorski in eno akceptorsko vodikovo vez. Hkrati lahko amino skupina prispeva k boljši topnosti spojine, saj se v kislem mediju v želodcu protonira. Posledično se z boljšo vodotopnostjo izboljša tudi absorpcija in biološka uporabnost. Tak fragment (fenilglicin) so uporabili pri prvi in drugi generaciji cefalosporinskih antibiotikov, zato smo se odločili, da ga bomo uporabili tudi pri sintezi druge končne spojine.

Pri sintezi trejte končne spojine bomo uporabili 2-aminotiazolni substituent, saj so take substituente uporabili tudi pri razvoju tretje, četrte in pete generacije cefalosporinov ter s tem razširili spekter delovanja, povečali protibakterijsko učinkovitost in biološko uporabnost. Ta fragment namreč omogoča boljši prehod skozi celično steno gram negativnih bakterij. Cefalosporini pete generacije, ki imajo ta fragment, penetrirajo v mikobakterije in imajo protituberkulozni učinek. Amino skupina se lahko po istem postopku kot v prejšnjem primeru v kislem mediju želodca protonira ter prispeva k boljši vodotopnosti spojine.



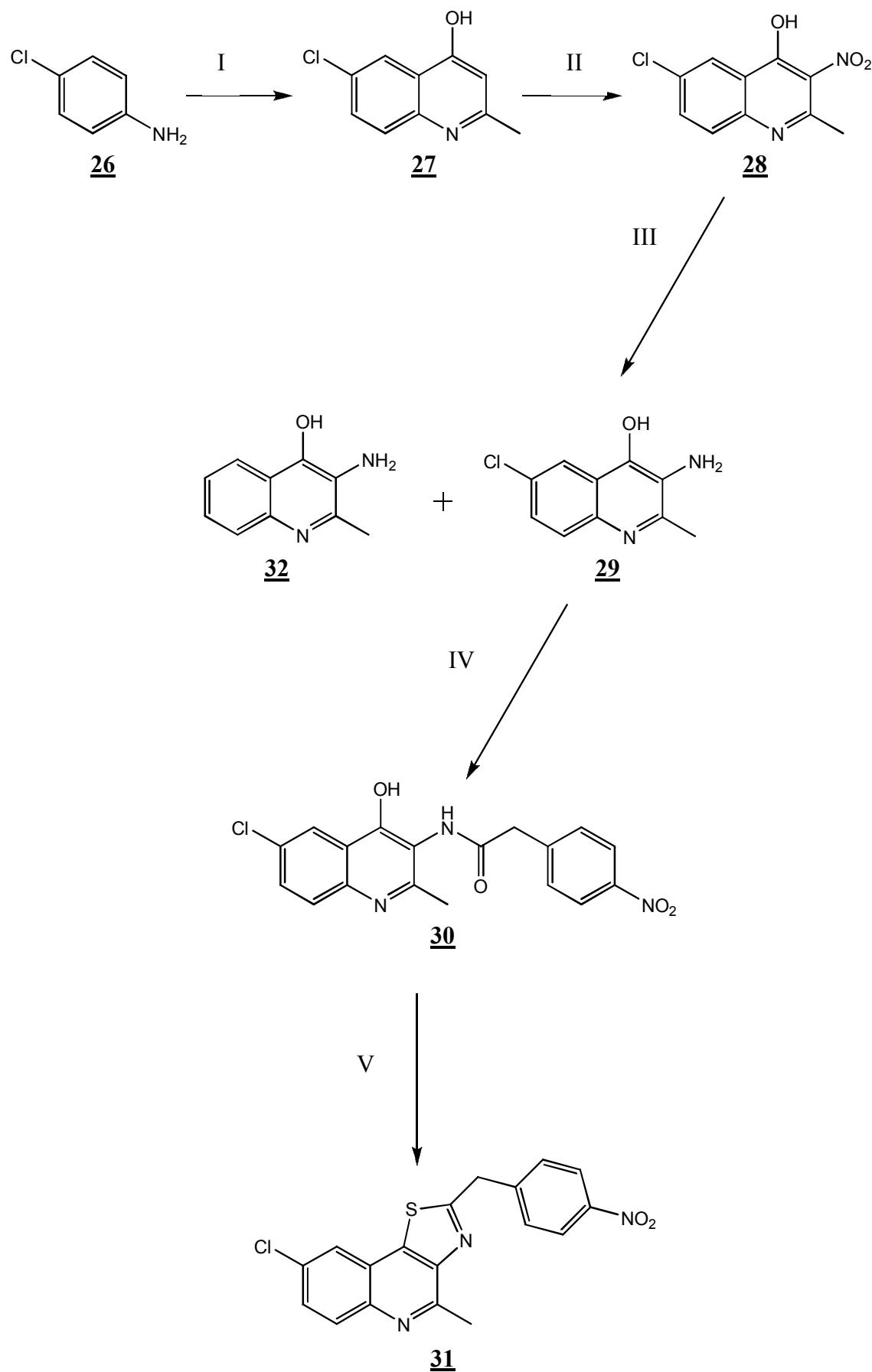
**Slika 8: Hipotetične interakcije med spojino vodnico in vezavnim mestom na mikobakterijski ATP sintazi**

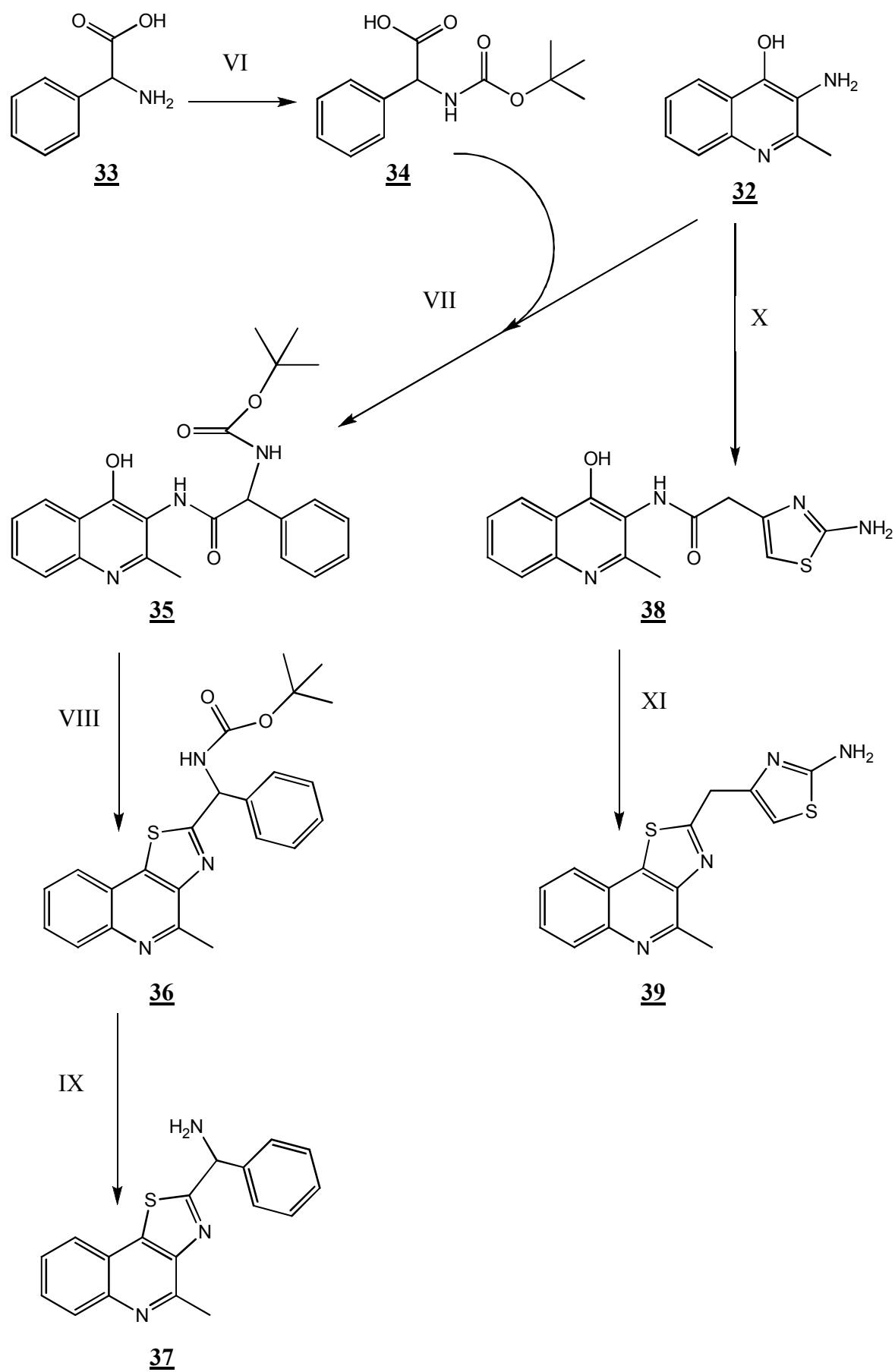
Zavedamo se, da je dvodimensionalno prikazovanje prekrivanja dveh spojin in vmeščanje spojine v vezavno mesto encima lahko zmotno, saj pri tem ne upoštevamo najnižje energije spojine, ki jo zavzema v prostoru v določenem mediju, točnih razdalj med atomi ter možnih konformacij. Zato bomo v eksperimentalnem delu izvedli tudi trodimenzionalno prekrivanje naših končnih spojin s spojino TMC-207. S tem bomo skušali pokazati, kolikšno je ujemanje med spojinama. Posledično bi lahko sklepali, kakšna je možnost, da bodo naše spojine tvorile enake ali vsaj podobne interakcije z vezavnim mestom v encimu

ter sklepali na njihovo učinkovitost. Za teoretično primerjavo bomo izvedli tudi izračun vrednosti logP spojine vodnice, TMC-207 in treh končnih spojin, saj je logP eden ključnih napovednikov vodotopnosti spojin.

Sinteza bo predvidoma potekala v petih stopnjah. V prvi stopnji bomo s 6-kloro-anilinom in etil acetacetatom tvorili kinolinski derivat. Najprej bomo uporabili Dean-Starkovo past, da se znebimo vode, ki pri reakciji nastaja, potem pa nadaljevali s segrevanjem pri močno povišani temperaturi v difeniletru. Nato bomo z dušikovo kislino v propanojski kislini izvedli nitriranje na mestu 3. Sledilo bo katalitsko hidrogeniranje nitro skupine na mestu 3 s Pd/C v metanolu. Z isto reakcijo bomo skušali sintetizirati dekloro derivat ter z njim nadaljevati sintezno pot do končne spojine. V četrtni stopnji bomo izvedli tvorbo amida na aminski skupini na mestu 3 z več različnimi derivati 2-fenilocetne in 2-amino-4-tiazolocetne kisline. Reakcija bo potekala v DMF z uporabo reagenta za tvorbo amidne vezi BOP. V zadnji stopnji bomo kisik na hidroksilni skupini na mestu 4 zamenjali z žveplom s pomočjo reagenta  $P_4S_{10}$  v piridinu, s segrevanjem pa bomo izvedli ciklizacijo oz. tvorbo tiazolnega obroča.

Dobljene končne produkte bomo poslali na določanje protimikrobakterijskega učinka in tako določili njihov biološki učinek.

**5.1 REAKCIJSKE SHEME**



- I: 1) etil acetoacetat, CH<sub>3</sub>COOH, toluen; 2) Ph<sub>2</sub>O
- II: HNO<sub>3</sub> (65 %), CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH
- III: 1) H<sub>2</sub>/Pt/C, a) DMF/CH<sub>3</sub>COOH, b) EtOH, c) MeOH; 2) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH /H<sub>2</sub>O
- IV: *p*-nitrofenilocetna kislina, BOP, DIPEA, DMF
- V: P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>, piridin
- VI: 1) BOC<sub>2</sub>O, NaOH/dioksan/H<sub>2</sub>O; 2) HCl
- VII: BOP, Et<sub>3</sub>N, DMF
- VIII: P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>, piridin
- IX: CF<sub>3</sub>COOH, DKM
- X: 2-amino-4-tiazolocetna kislina, DIPEA, TBTU, DMF
- XI: P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>, piridin

## 6 MATERIALI IN METODE

### 6.1 MATERIALI

#### Kemikalije in metode

Pri sinteznem delu smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Merck, Sigma-Aldrich, Fluka in Acros Organics.

#### Aparature

Standardna laboratorijska oprema: rotavapor, eksikator, laboratorijska tehnica, UV-lučka, magnetni mešalnik, sušilnik za lase, električni grelnik, kalota, Dean-Starkova past.

#### Branje spektrov in risanje struktur

Za določevanje struktur sintetiziranih spojin iz  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  spektrov smo uporabljali program MestReC 4.7.6. Za risanje spojin in pomoč pri razlaganju  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  spektrov smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

### 6.2 METODE

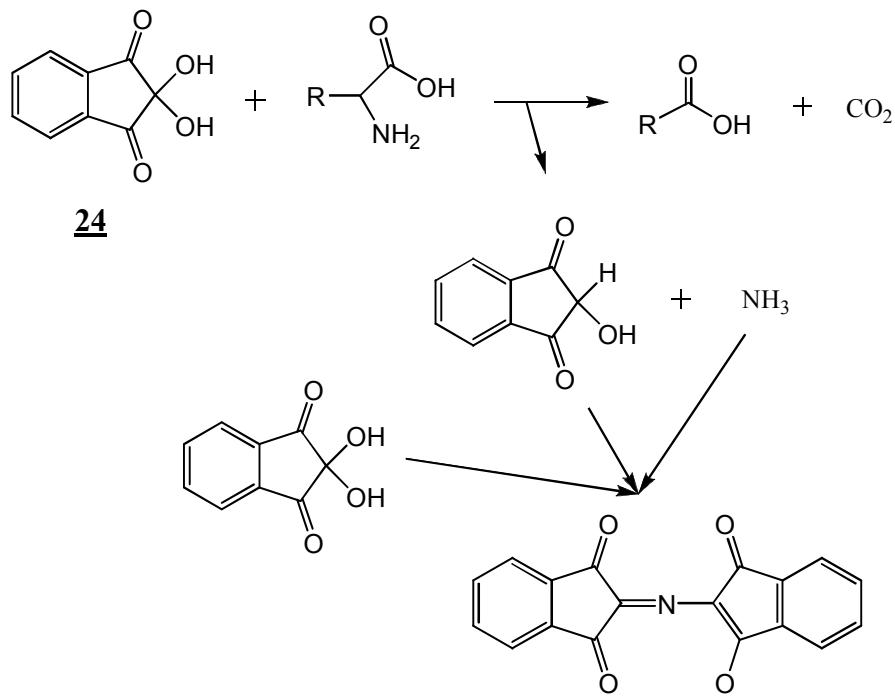
#### 6.2.1 Kromatografske metode

##### Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> z 0,25 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Uporabljali smo tudi različne mobilne faze, ki so navedene pri vsakem sinteznem postopku posebej. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV-svetilko z valovno dolžno  $\lambda = 254$  nm in 366 nm ter orositvene reagente kot so ninhidrin in 2,4-dinitrofenilhidrazin.

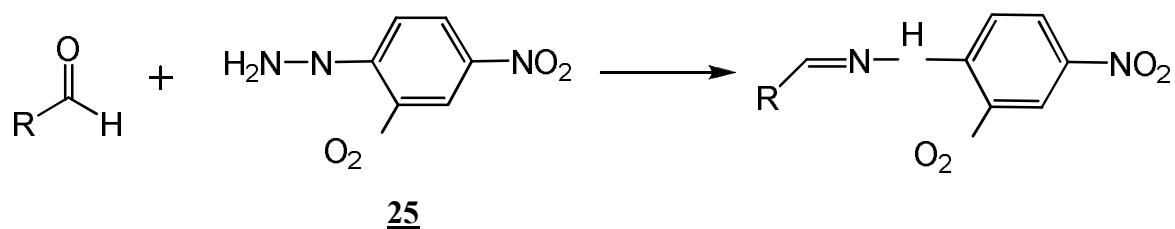
Ninhidrin (**24**) je orositveni reagent za aminokisline, pri čemer reagira z amino skupino. TLC ploščico je potrebno sprva orositi, nato pa še pogreti z grelno pištolo. Amini se obarvajo rjavo. Po dolgotrajnem segrevanju se obarvajo tudi amidi in karbamati (19).

Mehanizem reakcije z ninhidrinom (19):



2,4-dinitrofenilhidrazin (**25**) je orositveni reagent za karbonilne skupine. Reakcija je zelo občutljiva, saj dobimo rumeno obarvanje že v primeru, če so aldehidi in ketoni le v sledovih. Obarvajo se lahko tudi acetali, aminoacetali in oksazolidini, a se obarvanje pojavi šele čez nekaj minut (19).

Mehanizem reakcije z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (19):



### 6.2.2 Spektroskopske metode

#### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre so nam posneli na spektrometu Bruker AVANCE DPX300 in Bruker AVANCE DPX400 na Fakulteti za farmacijo in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Uporabljali smo devterirana topila: DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> in MeOD-d<sub>4</sub>.

**Masna spektrometrija (MS)**

Masne spektre so nam posneli na spektrometru Varian – MAT 311 A z EI, ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

**Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektre so nam posneli na spektrometru Perkin Elmer 1600 FT – IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

**Tališče**

Temperaturo tališč spojin smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico znamke Leica. Temperature tališč niso korigirane.

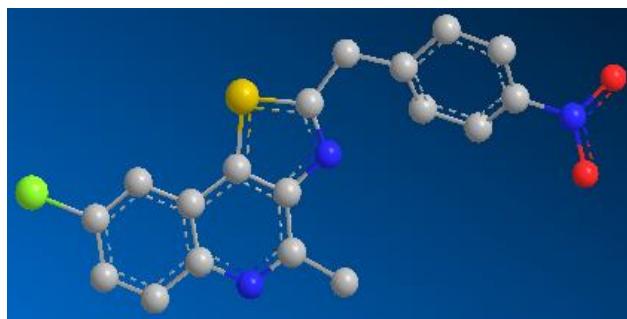
## 7 EKSPERIMENTALNI DEL

### 7.1 RAČUNALNIŠKO PREKRIVANJE KONČNIH SPOJIN S TMC-207

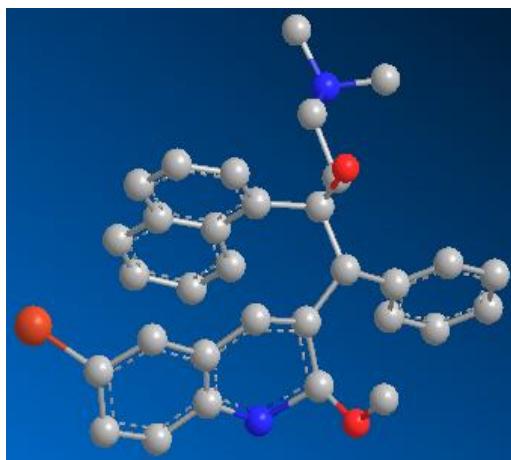
#### *V PROGRAMU Chem3D Pro*

Zaradi strukturne podobnosti končnih spojin s spojino TMC-207 predvidevamo, da delujejo na isto tarčo – ATP sintazo. Prileganje konformacij spojin z minimizirano energijo smo izvajali z uporabo računalniškega programa Chem3D Pro 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Ker iz dvodimenzionalne (2D) strukture ne moremo sklepati, kakšno obliko zavzame spojina v prostoru, smo 2D strukturo prve načrtovane končne spojine (**31**) narisane v programu ChemDraw Ultra prenesli v Chem3D Pro. Tem konformacijam smo minimizirali potencialno energijo z molekulske mehaniko. Celotno potencialno energijo molekule lahko obravnavamo kot funkcijo molekulske geometrije. Molekulska mehanika temelji na enačbi polja sil, ki pri izračunu potencialne energije molekul upošteva energijo kovalentnih medatomskih vezi, energijo zaradi rotacije okoli kotov in torzijskih kotov ter prispevke vseh elektrostatskih interakcij in Van der Waalsovih interakcij. Za vsak različen položaj atomov znotraj molekule oziroma za vsako različno konformacijo lahko izračunamo potencialno energijo in ta predstavlja le eno točko na t. i. površini potencialne energije. Ta površina ima svoje lokalne minimume (»globeli«) ter en globalni minimum. Pri energijski minimizaciji želimo na osnovi molekulske mehanike določiti ravno ta globalni minimum. Upoštevati moramo, da izračun konformacije globalnega minimuma temelji na predpostavki, da se spojina nahaja v vakuumu (**Slika 9**). Ideničen postopek je veljal tudi za spojino TMC-207 (**Slika 10**), ki smo ga izvedli v drugem oknu, da program ne bi računal minimalne energije obeh spojin hrati, saj bi pri tem upošteval tudi interakcije med njima. **Preglednica II** prikazuje pomen barv posameznih atomov. Vsakič program izpiše tudi energijo spojine, podatke o interakcijah, sterični oviranosti, RMS gradientu in RMS premiku.



Slika 9: 3D struktura prve načrtovane končne spojine



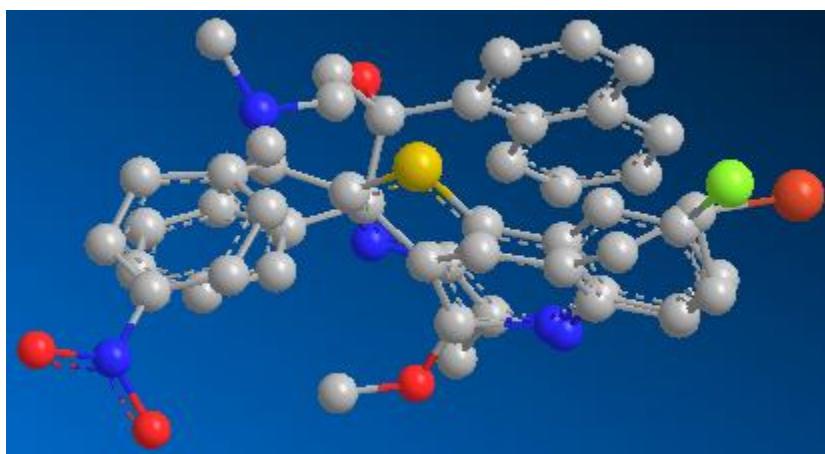
Slika 10: 3D struktura spojine TMC-207

### Preglednica II: Pomen barve atoma

Vrsta atoma	Barva atoma
C	Siva
N	Modra
O	Rdeča
S	Zlata
Cl	Zelena
Br	Temno rdeča

Za izvedbo prekrivanja je bilo potrebno izbrati vsaj štiri pare sorodnih atomov v obeh molekulah: na končni spojni in na spojni TMC-207. Program izračuna »dejansko« razdaljo med njima, ampak le-ta nič ne pove, saj sta strukturi postavljeni daleč drug od druge. Za vsak povezani par je mogoče vpisati »optimalno« razdaljo med njima. Izbrali smo štiri pare atomov na kinolinskih obročih obeh spojin in par sestavljen iz C-atoma med atomoma N in S na tiazolnem obroču spojine 31 in terciarnega C-atoma na mestu 3

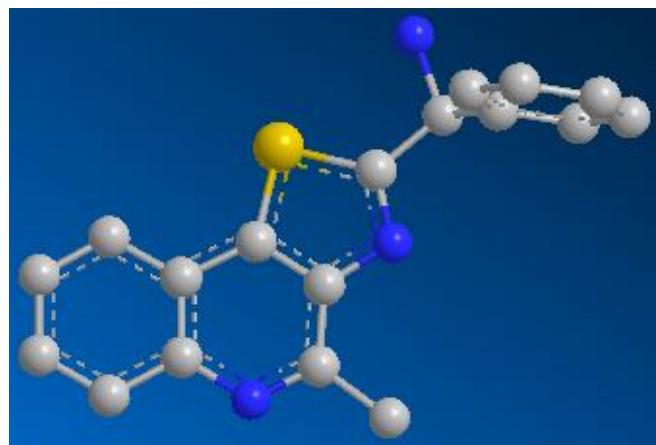
kinolinskega obroča spojine TMC-207. Ker smo želeli, da se prekrivata, smo »optimalno« razdaljo za vsak par atomov ovrednotili z 0 Å in nato izvedli prekrivanje (**Slika 11**). To pomeni, da smo hoteli doseči popolno prekrivanje med vsakim parom posebej, kar pa je praktično nemogoče. Večje kot je število izbranih parov, manj popolno je prekrivanje. Zato program prilagodi strukturi tako, da so razdalje med izbranimi pari čim manjše.



**Slika 11:** Prekrivanje prve načrtovane končne spojine s TMC-207

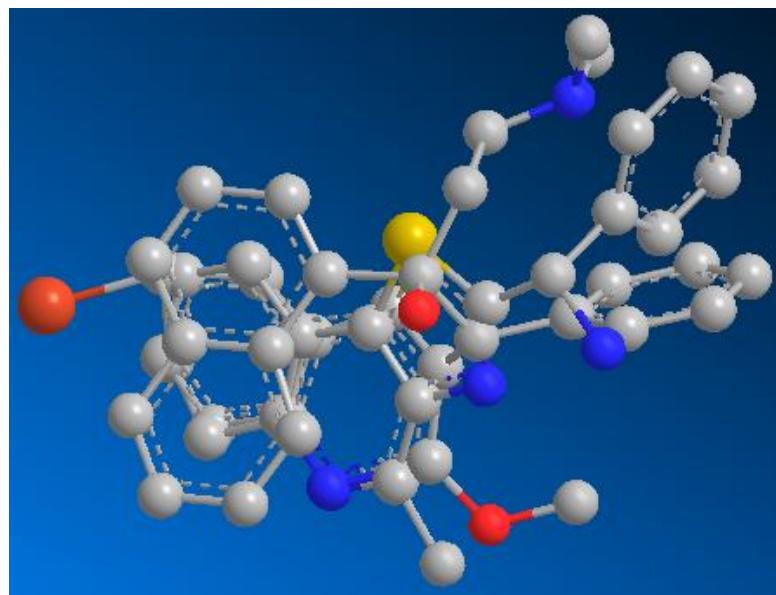
Iz **slike 11** je razvidno, da se izbranih 5 parov zelo dobro prekriva. Sprva se fenilna obroča obeh spojin nista tako dobro prekrivala kot sedaj, saj je program v začetku predvidel drugačno usmeritev fenilnega obroča končne spojine. Sklepali smo, da je enojna vez med C-atomom in metilenskim linkerjem te spojine zelo gibljiva, kar pomeni, da bi bil lahko fenilni fragment tudi drugače usmerjen. Program ima možnost izrisa grafa, ki prikazuje energijo vezi v odvisnosti od kota rotacije vezi. Energije so se med seboj razlikovale le malo, zato smo si dovolili ročno zasukati vez, da se fenilna obroča prilegata. To smo pravilno domnevali tudi v 5. poglavju.

Enako smo postopali tudi pri prekrivanju druge načrtovane končne spojine (**37**) s TMC-207. Najprej smo minimizirali energijo druge načrtovane končne spojine (**slika 12**), nato pa iste atome kot pri načrtovani prvi končni spojini povezali z istimi atomi kot v prejšnjem poskusu prekrivanja spojine TMC-207. Razlika je bil le par med N-atomom na alifatskem aminu spojine **37** in O-atomom hidroksilne skupine TMC-207.



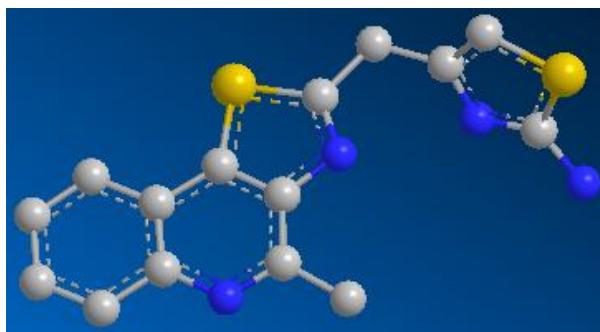
Slika 12: 3D struktura druge načrtovane končne spojine

Na sliki 13 je prikazana uspešnost prekrivanja obeh spojin. Štirje pari točk tiazolokinolinskega skeleta načrtovane druge končne spojine se s kinolinskim skeletom TMC-207 zelo dobro prekrivajo. V primerjavi s spojino **31** je fenilni obroč spojine **37** orientiran pravokotno glede na tiazolokinolinski skelet, saj na to vpliva pozicija aminske skupine na sosednjem C-atomu. Fenilna obroča spojine **37** in TMC-207 se zato ne ujemata najbolje. Tudi aminska skupina se s hidroksilno skupino ne prekriva dobro, saj sta med seboj oddaljeni 3 Å, kar je razmeroma veliko in se ne sklada z našimi 2D predvidevanji iz 5. poglavja.



Slika 13: Prekrivanje druge načrtovane končne spojine s TMC-207

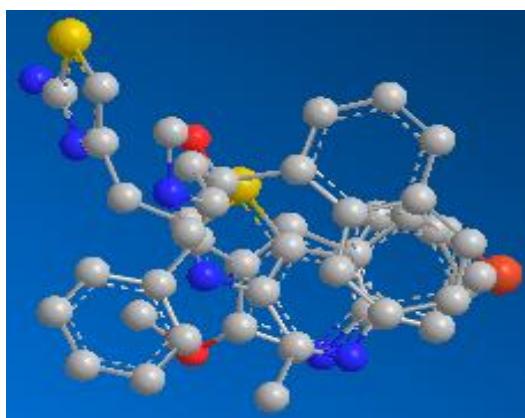
Na **sliki 14** je prikazana tretja načrtovana končna spojina (**39**), ki smo ji s programom minimizirali energijo do najnižje. Podobno kot fenilni obroč pri prejšnji spojini tudi tu tiazolni obroč ni v isti ravnini kot preostali del spojine.



**Slika 14:** 3D struktura tretje načrtovane končne spojine

Pri poskusu prekrivanja s TMC-207 smo kot pare točk vzeli standardnih pet parov kot smo to storili v prvem primeru. Poskusili smo izbrati tudi druge pare točk, a je bilo prekrivanje v vseh primerih slabše. **Slika 15** prikazuje, da se vseh pet parov točk tiazolokinolinskega skeleta spojine **39** odlično ujema s kinolinskim skeletom TMC-207. Tiazolni obroč načrtovane spojine **39** je obrnjem v nasprotno smer kot fenilni obroč TMC-207. Poskus rotacije enojne vezi med C-atomom na tiazolnem delu tiazolokinolina in metilenskim linkerjem je pokazala, da je ta konformacija vezi energijsko daleč najugodnejša, zato je bilo sklepanje o popolnem prekrivanju s fenilnim obročem TMC-207 napačno.

S pomočjo programa Chem3D Pro 12.0 smo potrdili, da 2D strukture niso tako dobre napovedovalke uspešnosti prekrivanja kot 3D strukture, a upoštevati moramo, da program predvidi prostorsko obliko spojine v vakuumu. Spojina pa lahko v telesnih tekočinah pri določenih fizioloških pogojih pravzaprav zavzame drugačno obliko in ima posledično drugačno afiniteto do tarče, aktivnost ali celo deluje na drugo tarčo.



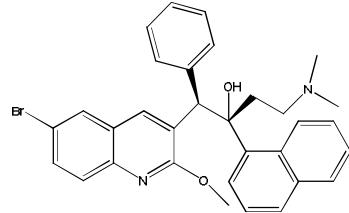
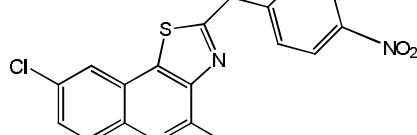
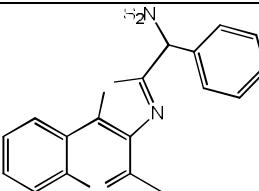
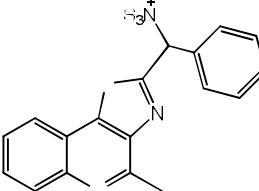
**Slika 15:** Prekrivanje tretje načrtovane končne spojine s TMC-207

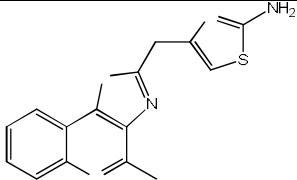
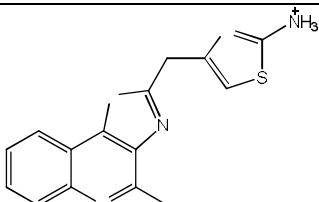
## 7.2 IZRAČUN $\log P$

Vse dosedanje spojine, sintetizirane v laboratoriju Tres Cantos Medicines Development Campos, so v vodi slabo topne, kar se odraža v vrednostih logP višjih od 5. Pravilo Lipinskega pravi, da je biološka razpoložljivost peroralno aktivnih učinkovin ugodna pri vrednosti logP pod 5. Z vpeljavo pravih substituentov na naših končnih spojinah smo želeli znižati vrednosti logP pod 5 in s tem vplivati na boljšo vodotopnost ter posledično na večji obseg absorpcije in višjo biološko uporabnost.

Meritve logP smo izvedli s programom Chem3D Pro 12.0 proizvajalca CambridgeSoft. Najprej smo minimizirali energije vsake spojine posebej, nato pa v programu izbrali ukaz za izračun logP. Rezultate smo zbrali v **preglednici III**.

**Preglednica III: Izračunane vrednosti logP**

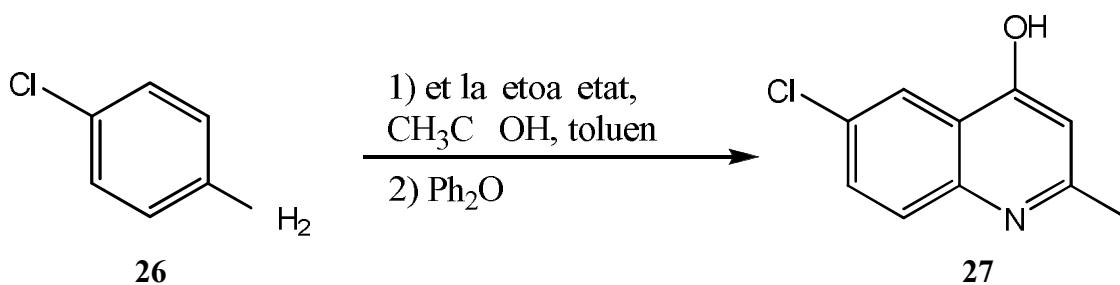
Spojina	Strukturna formula	logP
Spojina vodnica		5,68
TMC-207		7,25
1. končna spojina		5,42
2. končna spojina		3,18
2. končna spojina (ionizirana oblika)		3,23

3. končna spojina		3,04
3. končna spojina (ionizirana oblika)		1,96

Z vpeljavo nitro skupine na *para* mesto fenilnega obroča pri prvi končni spojini se vrednost logP ne zniža veliko in je še vedno nad 5. A nitro skupina je elektron akceptorska skupina in ima močan negativni mezomerni efekt, zato v spojini prispeva k večjemu dipolnemu momentu, zaradi česar lahko prispeva k malo boljši topnosti. Obe obliki (neionizirana in ionizirana) druge in tretje končne spojine imata logP pod 5 kar ustreza pravilu Lipinskega. To nam daje vedeti, da smo spojine pravilno zasnovali, zato bi lahko bili druga in tretja končna spojina z vrednostmi logP pod 5 bistveno bolj vodotopni.

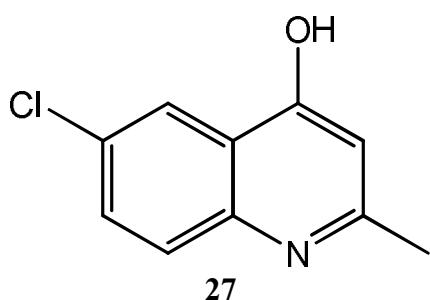
## 7.3 SINTEZE

### 7.3.1 SINTEZA 6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA



#### Postopek:

10,206 g (80 mmol) 6-kloroanilina smo raztopili v 150 ml toluena, nato pa dodali 11,888 ml (94 mmol) etil acetoacetata in 6 ml (105 mmol) koncentrirane ocetne kisline. Segrevali smo pod refluksom 2 uri pri 145 °C z uporabo Dean-Starkove pasti, s katero smo se znebili vode v zmesi. Nato smo toluen odrotavapirali, v zmes dodali 21,5 g Ph<sub>2</sub>O ter segrevali pri 260 °C 1 uro. Pustili smo, da se je zmes ohladila na sobno temperaturo, pri čemer se je začela spojina izobarjati. Zmesi smo dodali 60 ml absolutnega etanola, oborino odnučali ter sprali z 2 x 5 ml absolutnega etanola. Dobljeni produkt smo posušili v sušilniku pri 60 °C do konstantne mase. Dobili smo 3,279 g (17 mmol) temnordečih kristalov.

**6-kloro-2-metil-4-kinolinol** $\eta = 21,2 \%$  $Mr = 193,63$ Elementna sestava:  $C_{10}H_8ClNO$  $Tt = 248,2 - 258,1 \text{ } ^\circ\text{C}$  $Rf = 0,25$  (DKM/MeOH = 9/1)

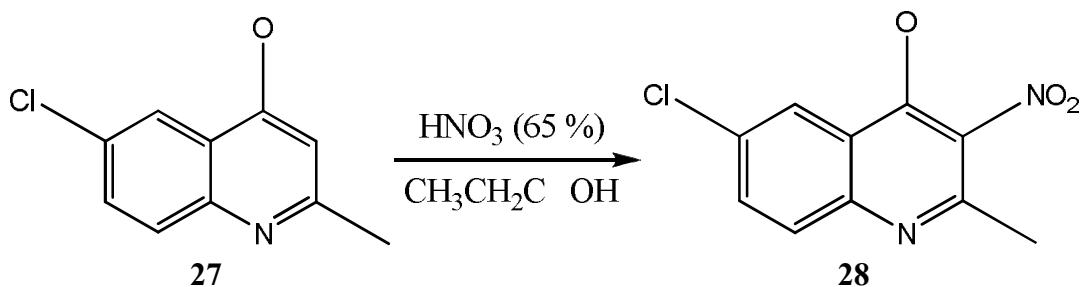
Rdeči kristali

**Analize 6-kloro-2-metil-4-kinolinola:**

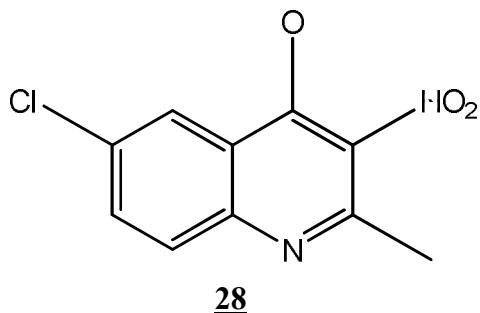
**$^1\text{H - NMR (300 MHz, DMSO-d}_6\text{)}$ :**  $\delta = 2,35$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $5,96$  (s, 1H,  $\text{CH}$ );  $7,52$  (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H, Ar-H);  $7,64$  (dd,  $J = 6,6$  in  $1,9$  Hz, 1H, Ar-H);  $7,96$  (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H, Ar-H),  $11,75$  (s, 1H, Ar-OH) ppm.

**MS ESI:** m/z (%): 194 ( $\text{MH}^+$ , 100).

**IR (KBr):**  $\nu = 3059, 2868, 2362, 1637, 1598, 1553, 1508, 1400, 1349, 1296, 1237, 886, 832, 818, 680, 603, 573, 526 \text{ cm}^{-1}$ .

**7.3.2 SINTEZA 6-KLORO-2-METIL-3-NITRO-4-KINOLINOLA****Postopek:**

Suspenzijo spojine 27 (12,9 mmol) in propionske kisline (50 ml) smo segreli pod refluksom pri  $110 \text{ } ^\circ\text{C}$ , nato pa z injekcijo skozi septuum počasi dodajali  $\text{HNO}_3$  (1,7 ml) ter 2 uri nadaljevali s segrevanjem pri  $110 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Zmes smo ohladili na sobno temperaturo in še dodatno na ledu do  $0 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Nastalo oborino smo odnučali in jo sprali z  $2 \times 5$  ml mrzlega absolutnega etanola. Produkt smo posušili v sušilniku pri  $60 \text{ } ^\circ\text{C}$  do konstantne mase. Dobili smo 1,040 g (4,36 mmol) rumenih kristalov.

**6-kloro-2-metil-3-nitro-4-kinolinol** $\eta = 34,4 \%$  $M_r = 238,63$ Elementna sestava:  $C_{10}H_7ClN_2O_3$ 

Tt &gt; 300 °C (pred taljenjem poteče oksidativni razpad)

Rf = 0,53 (DKM/MeOH = 9/1)

Rumeni kristali

**Analize 6-kloro-2-metil-3-nitro-4-kinolinola:**

**$^1H$  – NMR (300 MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 2,52$  (s, 3H,  $CH_3$ );  $7,66$  (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H, Ar-H);  $7,81$  (dd,  $J = 1,9$  in  $6,6$  Hz, 1H, Ar-H);  $8,09$  (d,  $J = 1,9$ , 1H, Ar-H);  $12,64$  (s, 1H, Ar-OH) ppm.

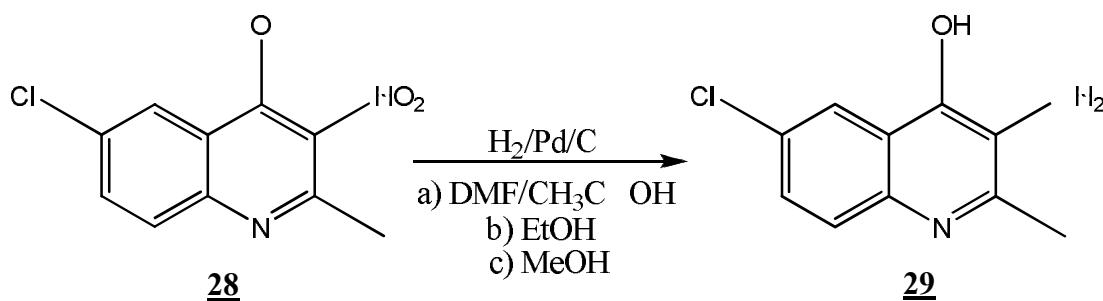
**$^{13}C$  – NMR (75 MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 166,2$ ;  $147,3$ ;  $137,1$ ;  $135,6$ ;  $133,2$ ;  $129,5$ ;  $126,5$ ;  $124,3$ ;  $121,0$ ;  $16,9$  ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 239 ( $MH^+$ , 100).

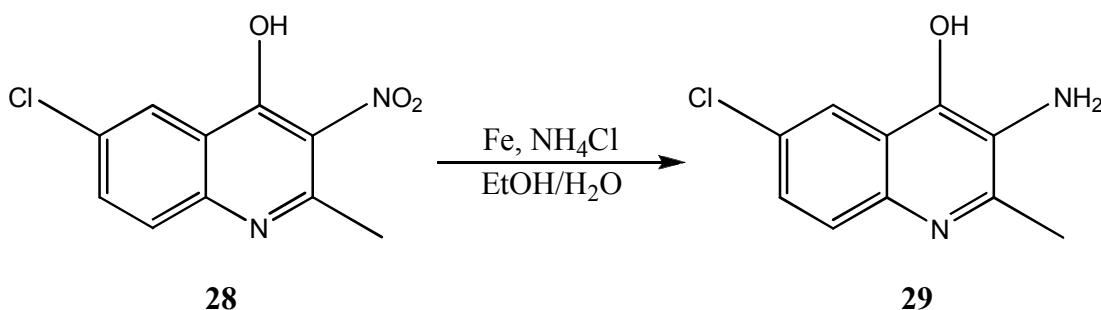
**IR (KBr):**  $\nu = 3448, 3266, 3059, 2911, 2362, 1593, 1568, 1506, 1474, 1399, 1354, 1284, 1236, 1161, 1140, 1035, 938, 881, 826, 792, 742, 702, 682, 654, 608, 591, 578, 546, 524$   $cm^{-1}$ .

**7.3.3 SINTEZA 3-AMINO-6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA**

1)



2)

**Postopek:**

- 1) Poskus smo izvajali v treh paralelah, v katerih smo uporabili tri različna topila.
- a) V 500-ml trogrlni bučki smo suspendirali 1,0 g spojine **28** (4,19 mmol) v 40 ml brezvodnem DMF in 30 ml koncentrirane ocetne kisline. Uporabili smo 150 mg katalizatorja Pd/C ter pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Drugi dan reakcija še ni potekla do konca, zato smo v reakcijsko zmes dodali še 100 mg Pd/C. Po treh urah mešanja pri sobni temperaturi ni prišlo do sprememb, zato smo začeli zmes segrevati pri 70 °C ter pustili mešati čez noč. Tretji dan je reakcija potekla do konca. Katalizator smo odfiltrirali preko guča ter spirali z 5 ml ledocta. Pod znižanim tlakom pri 70 °C smo nato odrotavapirali le približno 10 ml topila, zato smo zmes zlili na 200 ml vode in leda. Ker oborina ni nastala, smo zmes naalkalili z 2,8 M NaOH na pH = 5. Pri rotavapiranju vode so se izoborili beli kristali ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), nato smo v bučko dodali še 20 ml DKM. Kristale smo odnučali, DKM pa odrotavapirali. Ker končna spojina ni bila čista, smo opravili še kolonsko kromatografijo z DKM/MeOH = 9/1. Dobili smo 320 mg končne spojine ( $\eta = 36,6 \%$ ), ki pa glede na analize NMR in MS ni bila dovolj čista.
- b) V dvogrlni 100-ml bučki smo v 50 ml absolutnega etanola suspendirali 500 mg spojine **28**. Uporabili smo 100 mg Pd/C ter mešali 3 ure pri sobni temperaturi. Ker reakcija ni potekla do konca, smo zmes segrevali 2 ure na 50 °C, kar pa ni bistveno spremenilo poteka reakcije. Zato smo temperaturo dvignili na 100 °C ter mešali čez noč. Reakcija ni potekla do konca, zato smo dodali še 100 mg katalizatorja. Kljub nadaljnjemu dodatku 10 ml DMF, 50 mg katalizatorja in direktnemu vpihanju vodika direktno v reakcijsko zmes, reakcija še vedno ni potekla do konca. Topilo smo odrotavapirali ter spojino očistili s pomočjo avtomatske kolonske kromatografije z mobilno fazo DKM/MeOH = 9/1 + 1 %  $\text{Et}_3\text{N}$ . Čiste frakcije smo združili ter pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 643 mg spojine ( $\eta = 73,6 \%$ ).

c) V 100-ml bučki smo v absolutnem metanolu suspendirali 500 mg spojine **28**. Uporabili smo 50 mg Pd/C ter pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Drugi dan smo dodali še 100 mg katalizatorja, ker pa ni bilo bistvenih sprememb smo po 2 urah dodali še 30 mg katalizatorja ter začeli zmes segrevati pri 60 °C. Za izboljšanje topnosti smo dodali še 20 ml MeOH ter reakcijo izvajali čez noč. Tretji dan je reakcija potekla do konca, zato smo Pd/C odfiltrirali skozi teflonski filter s pomočjo vodne črpalke. Z rotavaporjem smo naprej uparili topilo, nato pa dobljeno spojino posušili do konstantne mase. Dobili smo 766 mg (3,67 mmol,  $\eta = 87,6\%$ ). Reakcijo smo ponovili še trikrat in jo vsakič malce optimizirali. Ugotovili smo, da za 1g spojine potrebujemo 200 mg Pd/C in 200 ml absolutnega MeOH, reakcija pri 60 °C pa poteče čez noč (približno 16 ur). Najvišji izkoristek je bil 91,5 %. Pri vseh treh paralelah smo katalizator dodajali po naslednjem postopku: S pomočjo vodne črpalke smo evakuirali zrak iz bučke. Nato smo bučko prepahlali z argonom, dodali Pd/C (100 mg), evakuirali argon in namestili balon z vodikom.

**Preglednica IV: Primerjava izvedbe reakcije z uporabo treh različnih topil**

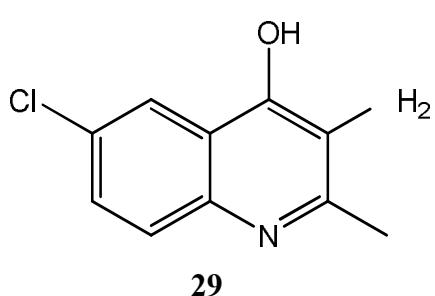
	Topnost izhodne spoijine	Topnost končne spoijine	Količina topila	Količina katalizatorja	Čas	Zahtevnost izolacije	Izkoristek [%]
DMF/AcOH	+	+	70 ml (1 g)	250 mg	~ 3 dni	Težka	36,6
Abs. EtOH	-	+-	50 ml (0,5 g)	250 mg	~ 1,5 dni	Lahka	73,6
Abs. MeOH	+-	+	200 ml (1 g)	200 mg	~ 1 dan	Lahka	91,5

Največji izkoristek in najlažja izolacija končne spojine sta bila v paraleli, kjer smo za topilo uporabili absolutni metanol, zato smo ga uporabili tudi v nadalnjih ponovitvah te reakcije.

**2)** V dvogrlni 100-ml bučki smo v absolutnem etanolu (30 ml) suspendirali 500 mg spojine **28** (2,095 mmol) ter segrevali do 100 °C. Nato smo skozi lij dodali 1170 mg železa (20,953 mmol, 10 ekv.) in 2,5 M vodno raztopino NH<sub>4</sub>Cl, ki smo jo predhodno pripravili iz 1121 mg NH<sub>4</sub>Cl (20,953 mmol, 10 ekv.) in 8,38 ml prečiščene vode. Reakcijo smo izvajali pod refluksom pri 110 °C 3,5 ure. Železa smo se skušali znebiti tako, da smo še vročo zmes

zlili skozi dve plasti mivke in ene vmesne plasti Celite® na Hirschevem liju ter sprali z 20 ml vročega etanola. Matičnico smo zbirali v 250-ml bučko, topilo pa nato odrotavapirali. V bučki ostane temna oborina, ki smo ji dodali 8 ml vode. Velik del oborine se je raztopil ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), neraztopljeni oborino pa smo odnučali. V matičnici je ostalo še nekaj končne spojine, zato smo kislo matičnico s  $\text{pH} = 5$  z 1 M  $\text{NaOH}$  naalkalili do  $\text{pH} = 10$ . Nastalo oborino smo odnučali, jo združili s prejšnjo in jo posušili v sušilniku pri  $60^\circ\text{C}$  do končne mase. Dobili smo 190 mg končne spojine ( $\eta = 43,5\%$ ). Po primerjavi končne spojine z ostalimi, sintetiziranimi po drugih postopkih, smo že po izgledu (temno siva) sklepali, da še vedno vsebuje železo, kar pa bi motilo analize NMR.

### 3-amino-6-kloro-2-metil-4-kinolinol



η = 91,5 %

$$\text{Mr} = 208.64$$

Elementna sestava: C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>O

T<sub>t</sub>: 211.8 – 205.9 °C

Rf 0.24 (DKM/MeOH = 1/9 ± 1 % Et<sub>3</sub>N)

## Svetlorumeni kristali

### Analize 3-amino-6-kloro-2-metil-4-kinolinola:

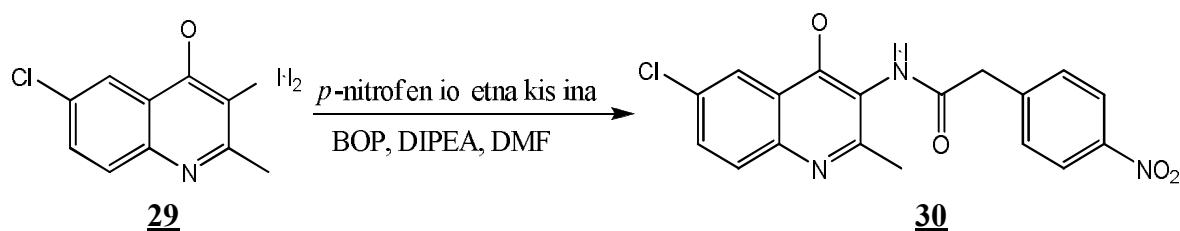
**<sup>1</sup>H – NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 2,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,39 (m, 1H, Ar-H); 7,72 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H, Ar-H); 8,13 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar-H), 12,68 (br s, 1H, Ar-OH) ppm.

**<sup>13</sup>C – NMR (75 MHz, DMSO-d6):** δ = 170,0; 144,6; 138,8; 132,2; 122,8; 122,2; 121,8; 118,3; 112,4; 16,2 ppm.

**MS (ESI):** m/z (%) · 194 (40) 237 (30) 251 (100) 209 ( $\text{MH}^+$ ) 30

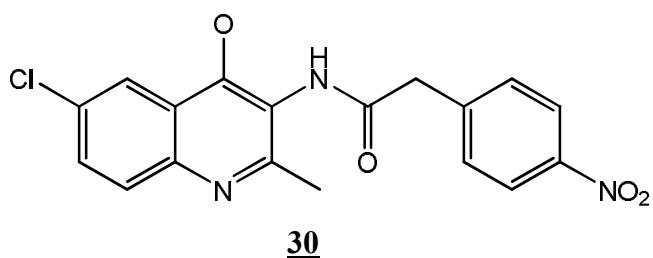
**IR (KBr):**  $\nu = 3460, 3106, 2903, 1624, 1579, 1508, 1358, 1269, 1202, 906, 806, 770, 695, 658, 595, 564 \text{ cm}^{-1}$ .

### 7.3.4 SINTEZA N-(6-KLORO-4-HIDROKSI-2-METILKINOLIN-3-IL)-2-(4-NITROFENIL)ACETAMIDA



**Postopek:**

Spojino **29** (1,44 mmol) in p-nitrofenilocetno kislino (1,44 mmol) smo suspendirali v DMF (6 ml), nato pa dodamo še BOP (2,16 mmol; 1,5 ekv.) in DIPEA (4,31 mmol; 3 ekv.). 25 – ml bučko smo pokrili s septuumom in skozenj nastavili balon z argonom. Mešali smo 2 uri pri sobni temperaturi, potem pa dali bučko za eno uro v hladilnik, pri čemer je izpadla oborina. Oborino smo odnucali ter sprali z 10 ml prečiščene vode in 5 ml heksana. Spojino smo sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili 260 mg (0,7 mmol).

***N-(6-kloro-4-hidroksi-2-metilkinolin-3-il)-2-(4-nitrofenil)acetamid***

$\eta = 48,7 \%$

Mr = 371,77

Elementna sestava: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Tt = > 300 °C (pred taljenjem poteče oksidativni razpad)

Rf = 0,46 (DKM/MeOH = 9/1)

Beli kristali

**Analize *N-(6-kloro-4-hidroksi-2-metilkinolin-3-il)-2-(4-nitrofenil)acetamida*:**

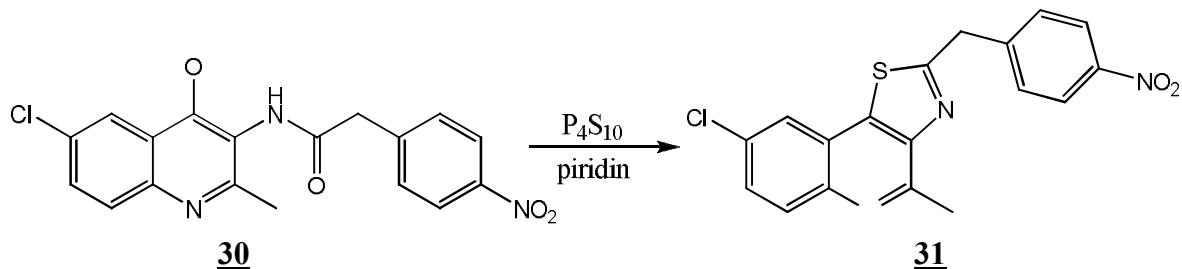
**<sup>1</sup>H – NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 2,18$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,86 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,56 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H, Ar-H); 7,66 (m, 3H, Ar-H); 8,02 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H, Ar-H); 8,21 (d,  $J = 6,7$  Hz, 2H, Ar-H); 9,51 (s, 1H, NH-CO); 11,93 (s, 1H, Ar-OH) ppm.

**<sup>13</sup>C – NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 172,6; 168,4; 146,7; 146,2; 144,7; 138,8; 131,5; 130,4; 124,3; 123,1; 122,8; 121,9; 117,7; 116,9; 39,5; 16,7$  ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 372 (MH<sup>+</sup>, 100).

**IR (KBR):**  $\nu = 3314, 3078, 2940, 1656, 1637, 1610, 1598, 1561, 1522, 1491, 1420, 1408, 1346, 1287, 1230, 1201, 1162, 1109, 958, 919, 858, 817, 786, 763, 740, 717, 698, 662, 644, 615, 568, 530, 499, 472$  cm<sup>-1</sup>.

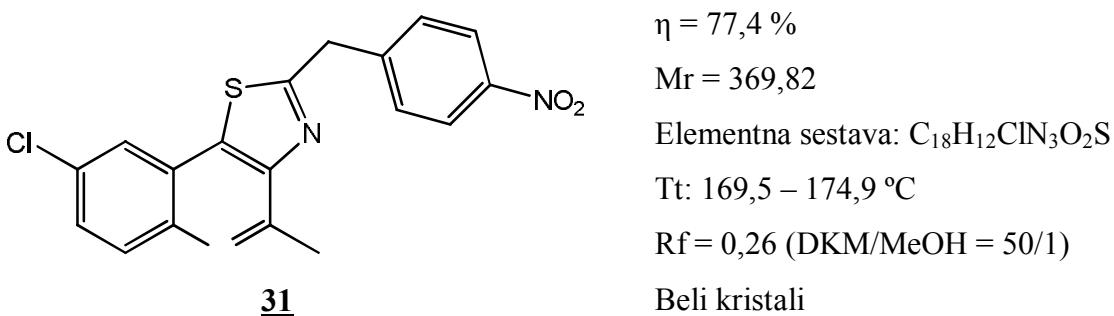
### 7.3.5 SINTEZA 8-KLORO-4-METIL-2-(4-NITROBENZIL)TIAZOLO[4,5-*c*]KINOLINA



#### Postopek:

Spojino **30** (0,96 mmol) smo suspendirali v piridinu (8 ml), dodali  $\text{P}_4\text{S}_{10}$  (0,96 mmol; 1 ekv.), na bučko namestili vodni hladilnik, odprtino zaprli s septuumom in skozenj namestili balon z argonom. Segrevali smo 2 uri pri 80 °C. Ohladili smo na sobno temperaturo in vsebino bučke zlili v čašo z 20 ml prečiščene vode. Tvorila se je oborina, ki smo jo odnučali in sprali s 5 ml vode. Ker spojina še ni bila dovolj čista, smo izvedli še kolonsko kromatografijo. Frakcije s čisto spojino smo združili ter odparili topila pod znižanim tlakom. Dobili smo 250 mg (0,68 mmol) belih kristalov.

#### 8-kloro-4-metil-2-(4-nitrobenzil)tiazolo[4,5-*c*]kinolin



#### Analize 8-kloro-4-metil-2-(4-nitrobenzil)tiazolo[4,5-*c*]kinolina:

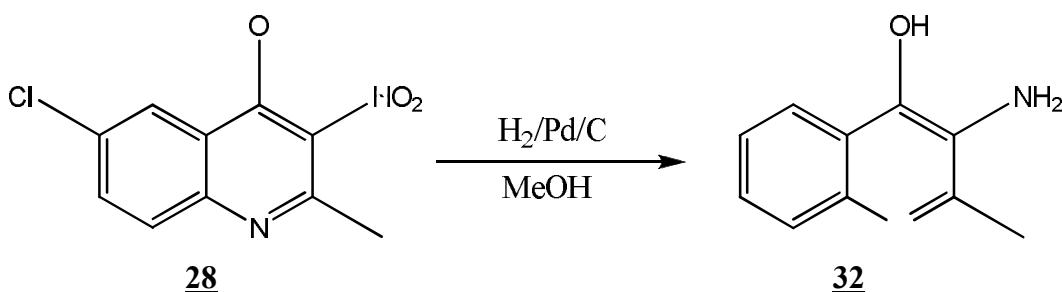
**$^1\text{H - NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 3,07$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $4,64$  (s, 2H,  $\text{CH}_2$ );  $7,57$  (d,  $J = 6,7$  Hz, 2H, 2 x Ar-H);  $7,60$  (dd,  $J = 1,7$  in  $6,7$  Hz, 1H, Ar-H);  $7,80$  (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H, Ar-H);  $8,05$  (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H, Ar-H);  $8,23$  (d,  $J = 6,7$  Hz, 2H, 2 x Ar-H) ppm.

**$^{13}\text{C}$  – NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 168,3; 155,2; 147,8; 143,9; 142,5; 139,6; 132,7; 131,4; 129,7; 129,2; 128,1; 126,3; 124,2$  (2x), 123,6; 123,3; 40,1; 22,4 ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 336 (100), 370 ( $\text{MH}^+$ , 75).

**IR (KBr):**  $\nu = 3453, 1542, 1515, 1340, 1179, 1112, 1086, 857, 825, 772, 710 \text{ cm}^{-1}$ .

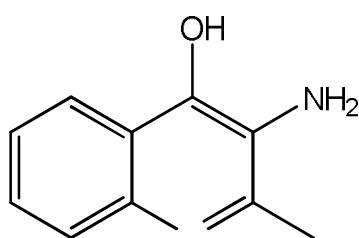
### 7.3.6 SINTEZA 3-AMINO-2-METILKINOLIN-4-OLA



#### Postopek:

V 500-ml trigrlni bučki smo suspendirali 1,0 g spojine **28** (4,191 mmol) v absolutnem metanolu (300 ml). S pomočjo vodne črpalke smo evakuirali zrak iz bučke. Nato smo bučko prepihalo z argonom, dodali Pd/C (200 mg), evakuirali argon in namestili balon z vodikom. Segrevali smo pri  $60^\circ\text{C}$  3,5 ure, potem pa s pomočjo vodne črpalke odfiltrirali Pd/C skozi teflonski filter. Z rotavaporjem smo naprej uparili topilo, nato pa dobljeno spojino posušili do konstantne mase. Dobili smo 656 mg (3,766 mmol).

#### 3-amino-2-metilkinolin-4-ol



$\eta = 89,9 \%$

$\text{Mr} = 174,20$

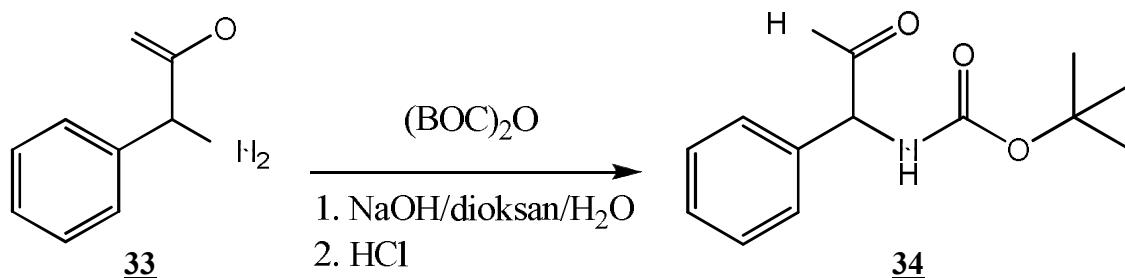
Elementna sestava:  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$

$T_t = 198,3\text{--}201,8^\circ\text{C}$

$R_f = 0,28$  (EtOAc/MeOH = 4/1)

Svetlorumeni kristali

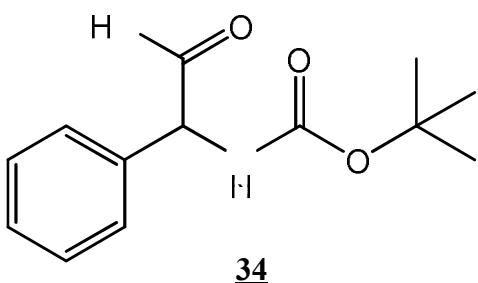
### 7.3.7 SINTEZA 2-(terc-BUTOXIKARBONILAMINO)-2-FENILOCETNE KISLINE



#### Postopek:

Fenilglicin (33, 10 mmol) smo suspendirali v 10 ml destilirane vode in 10 ml dioksana, ki smo mu nato dodali še 10 ml 1M NaOH. Bučko smo postavili na led ter počasi dokapavali  $(\text{BOC})_2\text{O}$  (11 mmol, 1,1 ekv.), ki smo ga predhodno raztopili v 10 ml dioksana. Reakcija je potekala čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odrotavapirali dioksan ter izvedli ekstrakcijo z 2 x 20 ml dietiletra. Vodno fazo smo na ledeni kopeli previdno nakisali z 2,8 M HCl do pH = 2. Belo oborino smo odnučali, sprali z 10 ml destilirane vode ter posušili v sušilniku pri 60°C do končne mase (2300 mg, 9,15 mmol).

#### 2-(terc-butoksikarbonilamino)-2-fenilocetna kislina



$\eta = 91,5 \%$

$\text{Mr} = 251,28$

Elementna sestava:  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

$\text{Rf} = 0,82$  (acetonitril/MeOH/voda = 3/1/1)

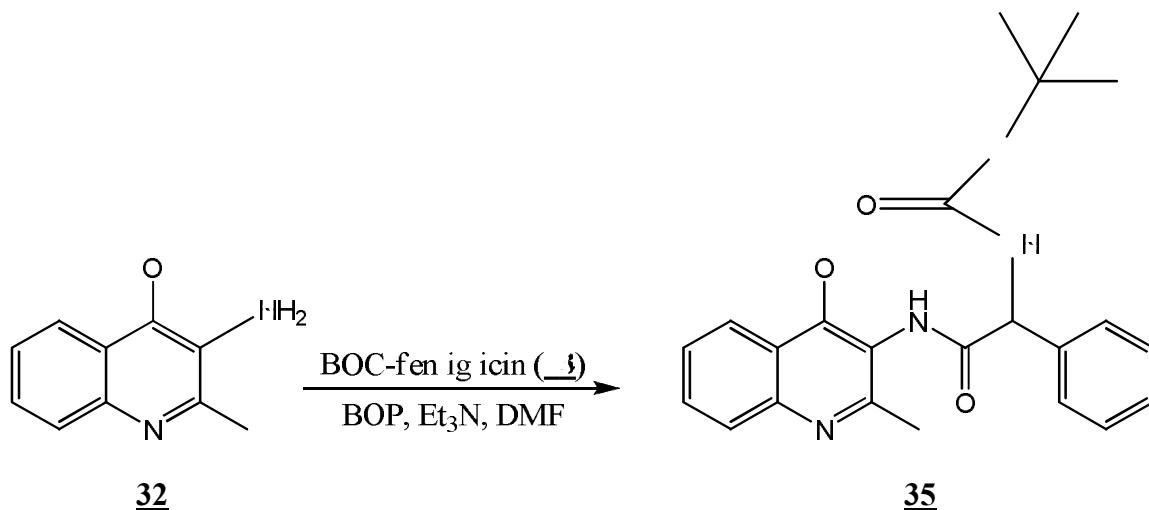
Beli kristali

#### Analize 2-(terc-butoksikarbonilamino)-2-fenilocetne kisline

**$^1\text{H - NMR}$  (300 MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,39$  (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3$ ); 5,10 (d, 1H,  $\text{CH}$ ); 7,30 (m, 5H, 5 x Ar-H); 7,59 (d, 1H, CO-NH); 12,78 (br s, 1H, COOH) ppm.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%): 132 (95), 176 (100), 206 (75), 250 ( $\text{M}-\text{H}^+$ , 70).

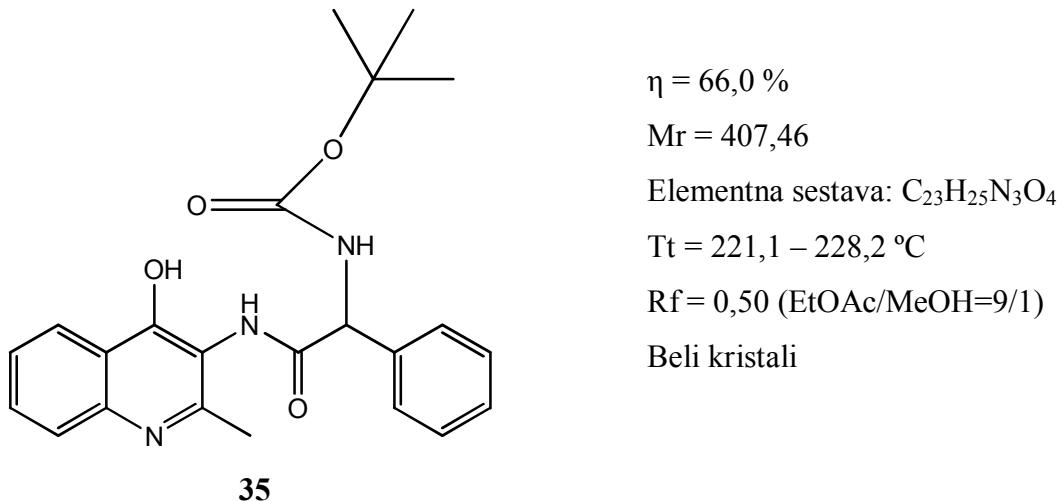
### 7.3.8 SINTEZA terc-BUTIL 2-(4-HIDROKSI-2-METILKINOLIN-3-ILAMINO)-2-OKSO-1-FENILETILKARBAMATA



#### Postopek:

300 mg spojine **32** (1,722 mmol) in 519 mg BOC-fenilglicin (**34**, 2,066 mmol, 1,2 ekv.) smo natehtali v 100 mL dvogrlno bučko, dodali 1142 mg BOP (2,583 mmol, 1,5 ekv.) ter raztopili v 40 mL DMF. Na oba vratova bučke smo namestili septuma ter balon z argonom. Nato smo z brizgo dodali 716 µl Et<sub>3</sub>N (5,166 mmol, 3 ekv.) ter mešali pri sobni temperaturi čez noč. Pod znižanim tlakom smo uparili toliko topila, da ga je v bučki ostalo približno 10 mL. Vsebino bučke smo zlili na 50 g ledu in 10 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>. Tvorila se je oborina, ki smo jo, ko se je led popolnoma stalil, odnučali. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo: EtOAc/MeOH=9/1. Frakcije s čisto spojino smo združili ter odparili topila pod znižanim tlakom. Dobili smo 463 mg čiste spojine (1,136 mmol).

#### *terc*-butil 2-(4-hidroksi-2-metilkinolin-3-ilamino)-2-okso-1-feniletilkarbamat



**Analize** **terc-butil 2-(4-hidroksi-2-metilkinolin-3-ilamino)-2-okso-1-feniletilkarbamata:**

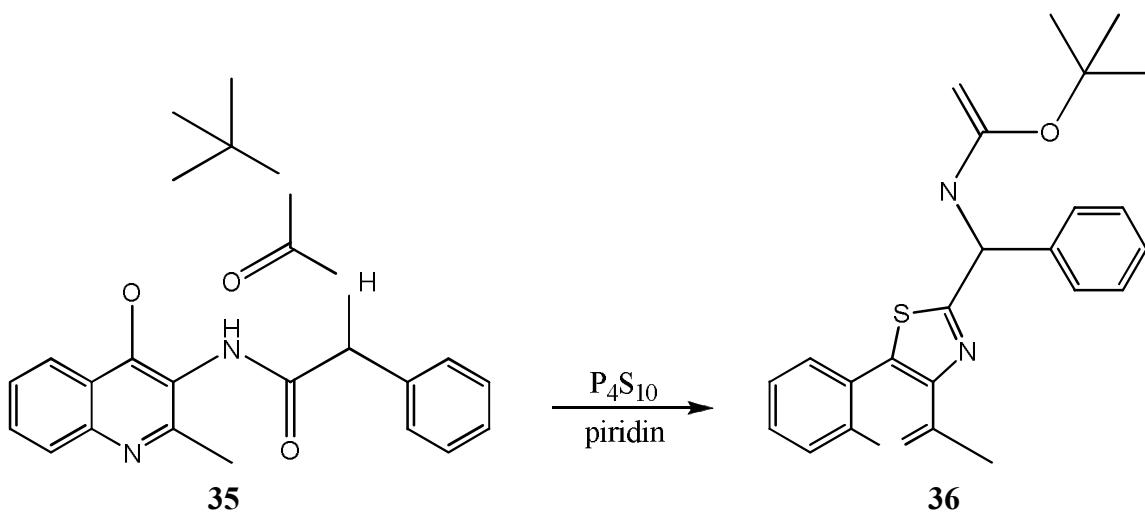
**$^1\text{H}$  – NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 1,41$  (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>); 1,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 5,47 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, CH); 7,27 (m, 5H, 5 x Ar-H); 7,50 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, Ar-H); 7,58 (m, 3H, 3 x Ar-H); 8,07 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, CH-NH-BOC); 9,41 (s, 1H, Ar-NH-CO); 11,67 (s, 1H, Ar-OH) ppm.

**$^{13}\text{C}$  – NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 172,6; 169,5; 154,9; 146,6; 138,9; 138,8; 132,4; 128,3; 127,5; 125,5; 125,0; 122,8; 117,7; 116,5; 78,4; 57,7; 28,1; 16,3$  ppm.

**MS (ESI):** m/z (100 %): 408 (MH<sup>+</sup>, 100), 442 (MH<sup>+</sup> + Cl, 25).

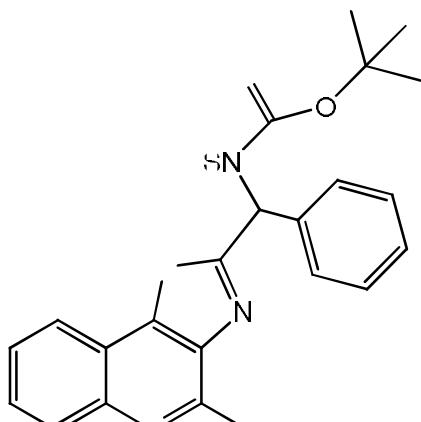
**IR (KBr):**  $\nu = 3419, 3237, 3064, 2981, 1713, 1655, 1563, 1506, 1391, 1364, 1305, 1280, 1253, 1234, 1168, 1052, 1028, 987, 920, 886, 816, 758, 700, 658, 614, 601, 561, 503$  cm<sup>-1</sup>.

### 7.3.9 SINTEZA terc-BUTIL (4-METILTIAZOLO[4,5-c]KINOLIN-2-IL)(FENIL)METILKARBAMATA



#### Postopek:

325 mg spojine **35** (0,798 mmol) smo raztopili v 4 mL piridina ter dodali 355 mg P<sub>4</sub>S<sub>10</sub> (0,798 mmol, 1 ekv.). Namestili smo vodni hladilnik, segrevali pri 80 °C ter pustili mešati 5 ur. Piridin smo uparili pod znižanim tlakom, v bučko dolili 10 mL destilirane vode in jo dali za 30 minut v hladilnik. Izpadla je oborina, ki smo jo odnučali, sprali z vodo in par kapljic heksana. Spojino smo sušili v sušilniku do konstantne mase ter dobili 221 mg (0,546 mmol) rumene oborine.

**Terc-butil (4-metiltiazolo[4,5-c]kinolin-2-il)(fenil)metilkarbamat****36** $\eta = 68,4 \%$  $\text{Mr} = 405,51$ Elementna sestava:  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  $\text{Tt} = 177,3 - 181,2 \text{ }^\circ\text{C}$  $\text{Rf} = 0,72 (\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=9/1)$ 

Rumeni kristali

**Analize terc-butil (4-metiltiazolo[4,5-c]kinolin-2-il)(fenil)metilkarbamata:**

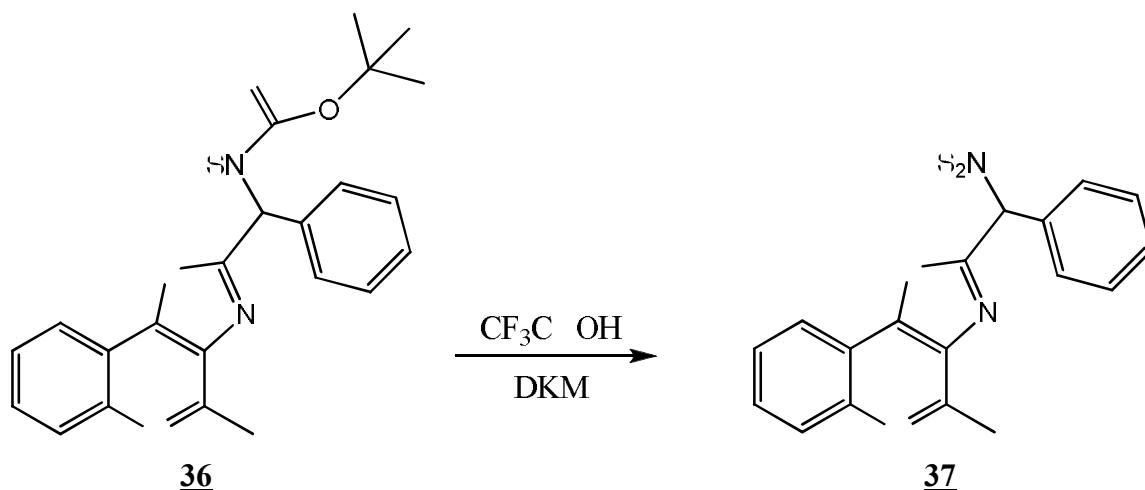
**$^1\text{H - NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 1,48$  (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3$ ); 3,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,00 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ ); 7,36 (m, 5H, 5 x Ar-H); 7,54 (m, 4H, 4 x Ar-H); 8,16 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, CH-NH-CO) ppm.

**$^{13}\text{C - NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 174,9; 155,2$  (2x); 154,0; 147,4; 146,6; 142,8; 139,9; 139,1; 129,3; 128,6; 128,1; 128,0; 127,0; 125,2; 124,8; 122,0; 79,0; 57,2; 28,1; 21,7 ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 406 ( $\text{MH}^+$ , 100), 440 ( $\text{MH}^+ + \text{Cl}$ , 35).

**IR (KBr):**  $\nu = 3448, 3204, 2978, 1706, 1560, 1519, 1453, 1394, 1368, 1306, 1276, 1238, 1197, 1169, 1127, 1050, 1026, 915, 886, 843, 783, 764, 725, 698, 606, 578 \text{ cm}^{-1}$ .

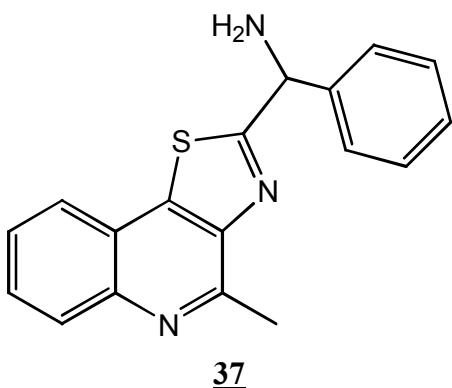
### 7.3.10 SINTEZA (4-METILTIAZOLO[4,5-c]KINOLIN-2-IL)(FENIL)METANAMINA



## **Postopek:**

150 mg spojine **36** (0,370 mmol) smo raztopili v 5 ml diklorometana, dodali 2 ml CF<sub>3</sub>COOH (v prebitku) ter mešali 1 uro pri sobnih pogojih. Ko smo diklorometan in CF<sub>3</sub>COOH odparili pod znižanim tlakom, smo preostanek trituirali s 3 x 3 mL dietiletra. Produkt smo posušili pod znižanim tlakom. Dobili smo 108 mg (0,354 mmol) rumenih kristalov spojine **37**.

### (4-metiltiazolo[4,5-c]kinolin-2-il)(fenil)metanamin



$$\eta = 95,6 \%$$

Mr = 305.40

Elementna sestava: C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S

Tt = 96,5 – 103,8 °C

R<sub>f</sub> = 0,70 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1)

## Rumeni kristali

**Analize (4-metiltiazolo[4,5-c]kinolin-2-il)(fenil)metanamina:**

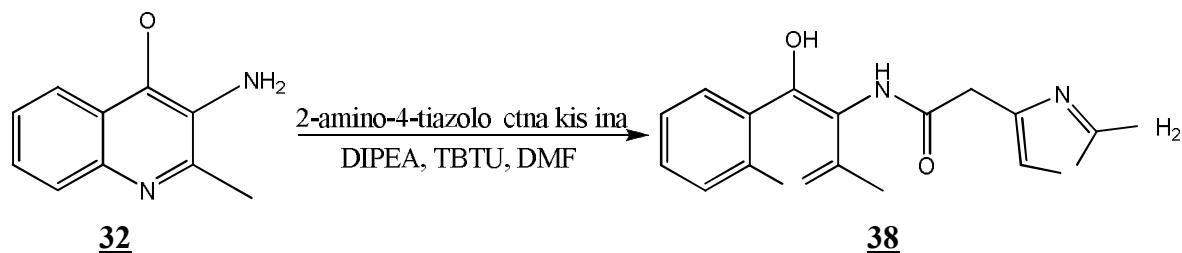
**<sup>1</sup>H – NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 3,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,24 (s, 1H, CH); 7,51 (m, 3H, 3 x Ar-H); 7,67 (m, 3H, 3 x Ar-H); 7,79 (dd, *J* = 1,2 in 7,2 Hz, 1H, Ar-H); 8,11 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, 2 x Ar-H); 9,41 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C – NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 167,9; 158,1; 157,8; 154,2; 145,6; 142,8; 141,2; 135,4; 130,0; 129,9; 129,4; 128,4; 127,4; 121,8; 117,5; 114,6; 54,8; 21,6 ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 306 ( $\text{MH}^+$ , 100).

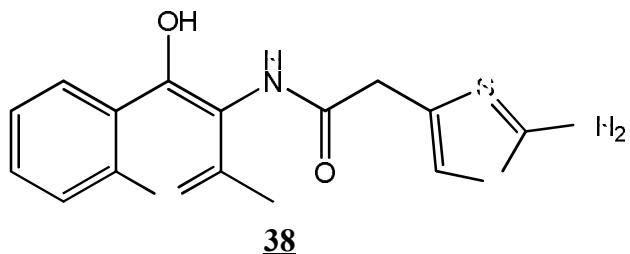
**IR (NaCl):**  $\nu = 2929, 1674, 1426, 1320, 1289, 1202, 1135, 835, 799, 763, 722, 701 \text{ cm}^{-1}$ .

### **7.3.11 SINTEZA 2-(2-AMINOTIAZOL-4-IL)-N-(4-HIDROKSI-2-METILKINOLIN-3-IL)ACETAMIDA**



**Postopek:**

142 mg spojine **32** (0,815 mmol) in 142 mg 2-amino-4-tiazolne kisline (0,896 mmol, 1,1 ekv.) smo natehtali v 25 mL dvogrlno bučko, dodali 392 mg TBTU (1,222 mmol, 1,5 ekv.) ter raztopili v 5 mL DMF. Na oba vratova bučke smo namestili septuumata ter balon z argonom. Nato smo z brizgo dodali 126 µl DIPEA (2,444 mmol, 3 ekv.) ter mešali pri sobni temperaturi čez noč. Pod znižanim tlakom smo uparili toliko topila, da ga je v bučki ostalo čim manj, nato pa končno spojino očistili z avtomatsko kolonsko kromatografijo (ISOLERA) z mobilno fazo: EtOAc/MeOH=4/1. Frakcije s končno spojino smo združili ter odparili topila pod znižanim tlakom. Dobili smo 185 mg spojine (0,588 mmol).

**2-(2-aminotiazol-4-il)-N-(4-hidroksi-2-metilkinolin-3-il)acetamid**

$\eta = 72,3 \%$

Mr = 314,36

Elementna sestava: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

Tt = 158,1-162,8 °C

Rf = 0,24 (EtOAc/MeOH = 4/1)

Beli kristali

**Analize 2-(2-aminotiazol-4-il)-N-(4-hidroksi-2-metilkinolin-3-il)acetamida:**

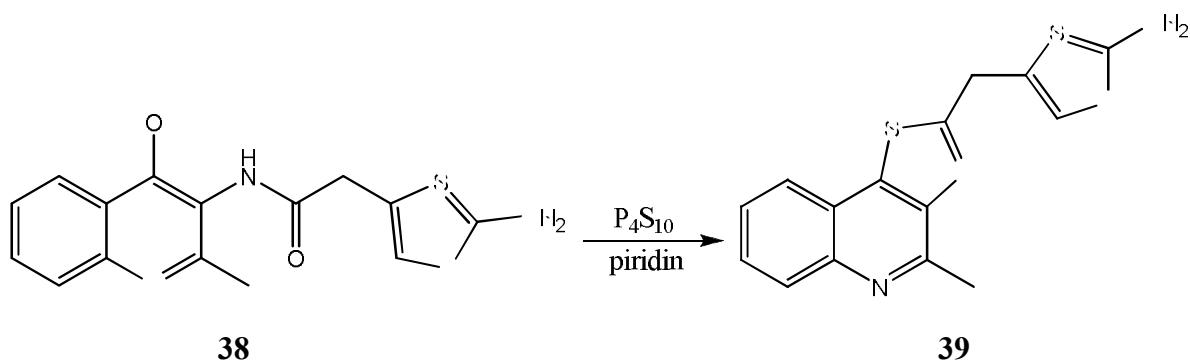
**<sup>1</sup>H – NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 2,25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,50 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,44 (s, 1H, CH); 6,88 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,27 (dd, J = 0,9 in 6,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,52 (m, 2H, 2 x Ar-H); 8,07 (dd, J = 0,9 in 6,9 Hz, 1H, Ar-H); 9,06 (s, 1H, NHCO); 11,68 (br s, 1H, Ar-OH) ppm.

**<sup>13</sup>C – NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = ppm.

**MS (ESI):** m/z (%): 175 (95), 315 (MH<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** ν = 3320, 3215, 1636, 1566, 1506, 1478, 1405, 1359, 1333, 1287, 1235, 1173, 1099, 984, 947, 767, 698, 617, 575, 473 cm<sup>-1</sup>.

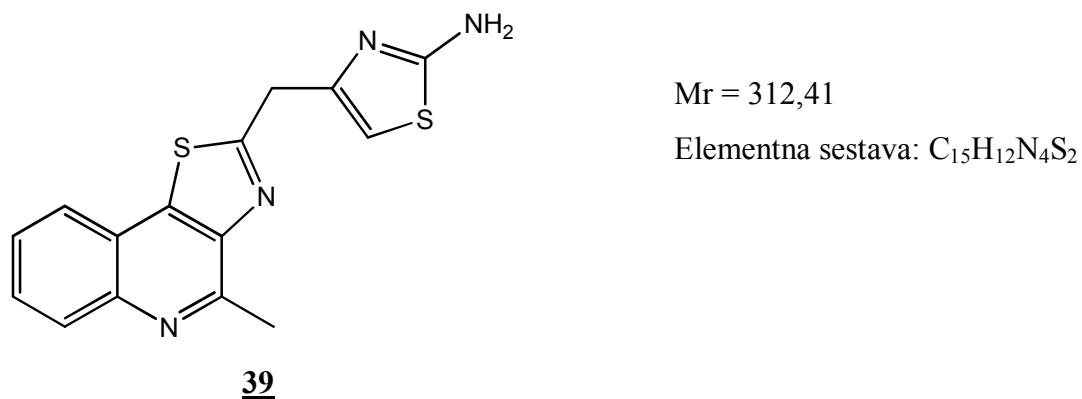
**7.3.12 POSKUS SINTEZE 4-((4-METILTIAZOLO[4,5-*c*]KINOLIN-2-IL)METIL)TIAZOL-2-AMINA**



**Postopek:**

120 mg spojine 38 (0,382 mmol) smo raztopili v 5 mL piridina ter dodali 170 mg  $P_4S_{10}$  (0,382 mmol, 1 ekv.). Namestili smo vodni hladilnik, segrevali pri  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter pustili mešati čez noč. Piridin smo uparili pod znižanim tlakom, v bučko dolili 4 mL destilirane vode. Izpadla je rumena oborina, ki smo jo odnučali, sprali s  $2 \times 2$  ml vode in 2 ml heksana. Že po TLC analizah smo ugotovili, da oborina ni čista in bi bila njena izolacija predolga in prezahtevna. Zaradi pomanjkanja izhodne spojine te reakcije nismo ponovili.

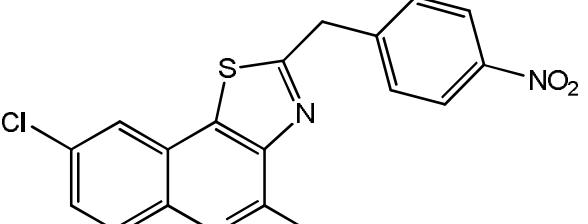
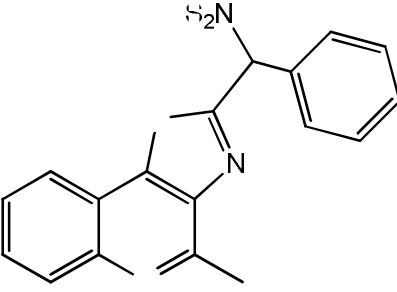
**4-((4-metiltiazolo[4,5-*c*]kinolin-2-il)metil)thiazol-2-amin**



## 8 REZULTATI

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali končni spojini **31** in **37**. Za obe smo domnevali, da bi lahko izkazovali protituberkulozni učinek, za drugo pa pričakovali tudi izboljšano vodotopnost.

**Preglednica V: Rezultati eksperimentalnega dela**

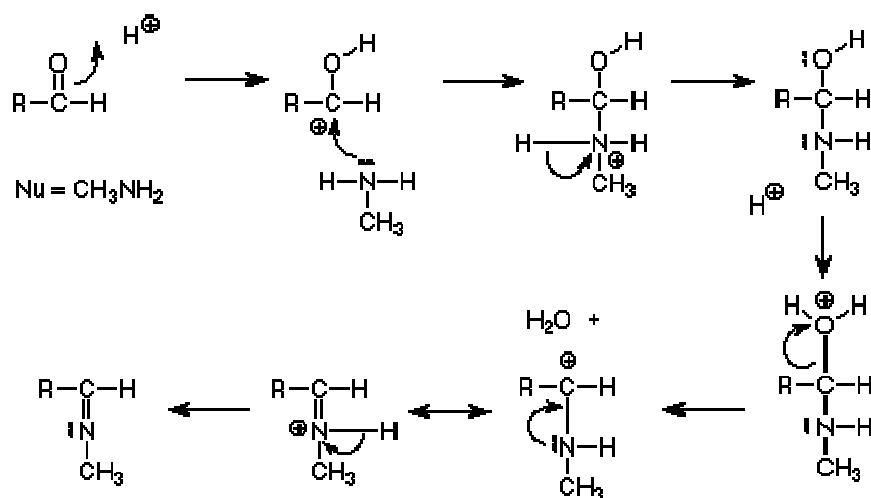
Struktura spojine	Oznaka spojine
	<b>31</b>
	<b>37</b>

Spojine **31**, **36** in **37** smo poslali na določanje protimikrobakterijskega učinka. Testi, izvedeni na H37Rv sevu *M. tb.*, so pokazali, da MIC za spojino **31** znaša 3,750 µg/ml, za spojini **36** in **37** pa nad 5,000 µg/ml.

## 9 RAZPRAVA

### 9.1 RAZPRAVA K SINTEZI 6-KLORO-2-METIL-4-KINOLINOLA

Aminska skupina 4-kloroanilina predstavlja nukleofil, ki napade C-atom karbonilne skupine po principu nukleofilne adicije z eliminacijo. Reakcija je ravnotežna in poteka le ob prisotnosti kisline, v našem primeru koncentrirane ocetne kisline. Z Dean-Starkovo pastjo smo se s segrevanjem pri  $145\text{ }^{\circ}\text{C}$  znebili vode, ki nastaja med reakcijo ter po Le Chatelierjevem načelu pomaknili ravnotežje proti nastanku produktov. Voda s toluenom tvori azeotrop ( $T_v = 82,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ki ima nižjo temperaturo vrelišča kot toluen ( $110,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ali voda ( $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Ob vrenju azeotrop destilira, se ohlaja v vodnem hladilniku in kondenzira v Dean-Starkovo past, kjer se fazi ločita. Ker je voda gostejša od toluena, se zbira na dnu pasti, toluen na vrhu pa se preliva nazaj v reakcijsko zmes. Po prvi stopnji nastane imin (slika 16).



Slika 16: Mehanizem nastanka imina (20)

V drugi stopnji smo na rotavaporju odparili ocetno kislino in toluen, saj bi bila v naslednji stopnji reakcije odvečna. Dodali smo difenil eter, ki v reakciji predstavlja zgolj topilo z visoko temperaturo vrelišča, da smo lahko reakcijo izvajali pri  $265\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Visoka temperatura je potrebna za kondenzacijo estrske karbonilne skupine in protona na mestu 2 na 4-kloroanilinu ter s tem nastanek kinolinskega derivata. Reakcijo izvajamo pod refluksom, kot stranski produkt pa nastaja etanol.

Reakcijo smo izvajali tudi po malce spremenjenem postopku. V bučko smo že na začetku dodali 4-kloroanilin, acetoacetat, ocetno kislino ter obe topili – toluen in difenileter. To

smo storili, ker je toluen topilo, ki služi za odstranitev vode, difenileter pa omogoča izvajanje reakcije oz. segrevanje pri visokih temperaturah. Zato difenilni eter po naši predpostavki ne bi smel motiti poteka reakcije. Po prvi stopnji smo se znebili vode, nato pa smo povišali temperaturo na 190 °C in se kar s pomočjo Dean-Starkove pasti znebili ocetne kisline, toluena in etanola, ki je morebiti že nastajal v drugi stopnji. Temperaturo smo potem zvišali na končnih 260 °C ter se znebili prebitnega etilacetooacetata. Tudi po tem postopku smo dobili primerljive izkoristke s prvim postopkom.

Po koncu druge stopnje smo zmes ohladili na sobno temperaturo ter dodali absolutni etanol. Difenilni eter in ostale nečistoče se v njem dobro raztapljajo, zato nadaljno čiščenje spojine ni bilo potrebno.

## **9.2 RAZPRAVA K NITRIRANJU KINOLINSKEGA DERIVATA**

S 65%  $\text{HNO}_3$  smo želeli uvesti nitro skupino na mestu 3 kinolinskega skeleta. Nitriranje na mestu 3 je najverjetnejše, saj na položaj substitucije vpliva prisotnost in položaj ostalih substituentov na skeletu. Metilna skupina na mestu 1 je aktivirajoča skupina in pri reakciji usmerja substituente na *ortho* ali *para* položaje. Po istem mehanizmu tako usmerja tudi hidroksilna skupina na mestu 4. Kombinacija obeh vplivov po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije favorizira vezavo elektrofilnega nitronijevega iona na mesto 3, saj je to orto položaj obeh dosedanjih substituentov - metilne in hidroksilne skupine.

Suspenzijo kinolinskega derivata v propionski kislini smo segreli na 110 °C, nato pa smo skozi septum začeli počasi dodajati dušikovo kislino. Pri tem smo uporabljali 5 ml injekcijo z možnostjo namestitve različnih igel. Suspenzija se je že po dodatku 0,3 ml začela spremnjati iz rumenkaste v rjavo ter postajala vedno gostejša in viskoznejša. Po celemu dodatku se je zmes razredčila ter ohranila oranžno barvo do konca reakcije. Opazili smo, da reakcija pri uporabi igle s plastičnim nastavkom ne poteče, zato je nujna uporaba kovinske igle. Domnevamo, da plastika sprošča v raztopino snovi, ki lahko reagirajo z dušikovo(V) kislino ali pa dušikova(V) kislina reagira s plastiko, npr. s polistirenom po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije. Matičnico, ki je vsebovala tudi etanol, s katerim smo oborino spirali, smo pustili čez pri sobni temperaturi. Na dnu smo opazili rumenkasto oborino, ki smo jo odnudili. TLC je pokazal, da oborina ni čista ter vsebuje še nekaj našega produkta, vendar v izolacijo le-te nismo šli. Liza produkta je na TLC ploščici malce višje kot lisa prejšnjega produkta. To je pričakovano, saj nitro skupina prispeva k zmanjšanju bazičnosti kinolina, kar opazimo kot zmanjšanje polarnosti ter zvišanje  $R_f$ .

### **9.3 RAZPRAVA H KATALITIČNEMU HIDROGENIRANJU NITRO SKUPINE**

Pri katalitskem hidrogeniranju je pomembno, da je izhodna spojina čim bolje topna v izbranem topilu, ki z njo in oz. ali produktom ne reagira. V primeru slabe topnosti neraztopljena izhodna spojina nasiti površino katalizatorja, kar zaustavi potek reakcije. Potek reakcije je odvisen tudi od temperature, saj je topnost snovi praviloma večja pri višjih temperaturah, in od količine dodanega katalizatorja – v našem primeru Pd/C.

Ker je bila naša izhodna spojina slabo topna v večini topil, smo izvajali reakcijo v treh paralelah s tremi različnimi topili – z a) brezvodnim DMF in ledoctom, b) absolutnim etanolom in c) absolutnim metanolom. Naredili smo tudi reakcijo z železom in amonijevim kloridom.

Izkazalo se je, da reakcija najhitreje poteka v metanolu, hkrati pa je tudi izolacija iz njega najlažja ter izkoristek največji. Vzrok za hiter potek reakcije je dokaj dobra topnost izhodne spojine in dobra topnost produkta v metanolu, izolacija pa je lahka zaradi nizke temperature vrelišča in površinske napetosti topila. Poleg glavnega produkta je nastal tudi majhen delež oksidirane oblike, saj se aromatski amini ob prisotnosti kisika relativno hitro oksidirajo. Ta oblika ima višji  $R_f$  na TLC kot glavni produkt, oba pa modro fluorescirata pri  $\lambda = 366$  nm. Produkt smo zato hranili pod inertno atmosfero argona v s parafilmom zaprti bučki v hladilniku.

Menimo, da reakcija z železom in amonijevim kloridom ni primerna, čeprav TLC analize kažejo na popoln potek reakcije. Vzrok za to so zelo majhni delci železa, ki delujejo kot katalizator, saj le-ti prehajajo skozi dvojno plast mivke in vmesno enojno plast celita, ki delujejo kot filter. Železo je zato prisotno v produktu, kar ovira izvajanje analiz in potek naslednjih reakcij.

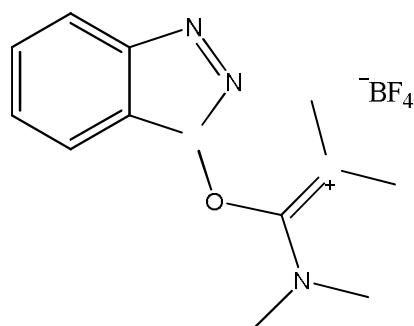
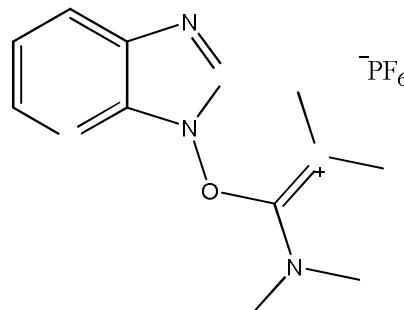
Sintezno reakcijo 6.6 smo izvedli zelo podobno kot prej opisano paralelo z metanolom, le da smo tu za 1,0 g spojine **28** uporabili 200 mg Pd/C in 300 ml MeOH. Uporabili smo torej 100 ml MeOH več, s čimer smo potrdili, da je potek reakcije odvisen od topnosti izhodne spojine in ne od količine dodanega katalizatorja. Sintetizirali smo reducirani dekloro derivat. Znano je, da so halogenirani areni dovetni za reakcije dehalogenacije v z emulgatorjem stabiliziranih vodnih suspenzijah paladija ali rodija nanometrskih velikosti. Reakcije najhitreje potečejo na kloro- in bromoarenih (21). Domnevali smo, da reakcija poteče tudi v metanolu, saj je po polarnosti zelo podoben vodi.

#### 9.4 RAZPRAVA K TVORBI AMIDA NA AMINO SKUPINI

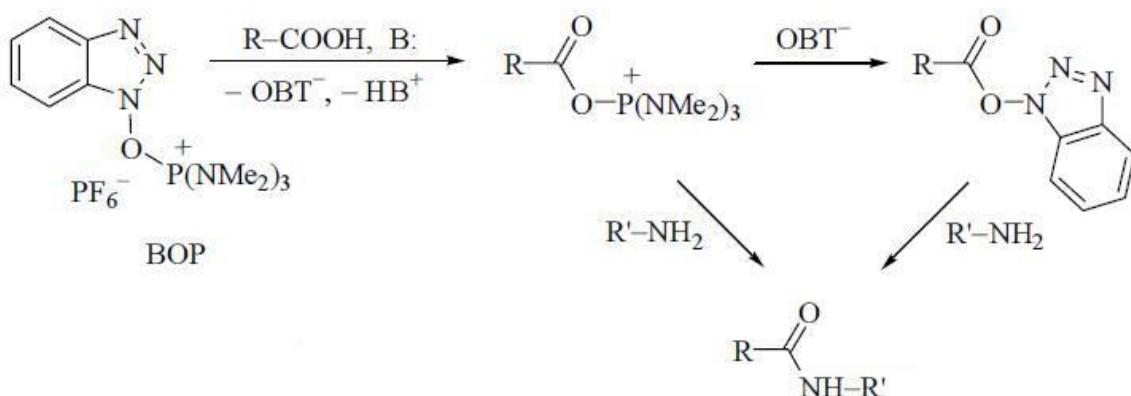
Pri sintezi amida smo uporabili aminski derivat iz prejšnje stopnje, DMF, BOP ali TBTU ali HATU, DIPEA ali Et<sub>3</sub>N ter izbrano kislino. DMF v reakciji služi kot topilo, DIPEA ali Et<sub>3</sub>N kot baza, BOP, TBTU in HATU pa kot »coupling« reagenti.

BOP je standardni reagent, ki olajša in pospeši potek reakcij tvorbe amidov in estrov. Tvorba amida poteče preko aktivacije karboksilne kisline z BOP, ki ji sledi nukleofilni napad amina na aktivirano karboksilno skupino. Predlagani mehanizem reakcije je tvorba reaktivnega aciloksifosfonijevega intermediata, ki se nato pretvori v oksibenzotriazolni aktivirani ester. Obe obliki lahko reagirata z nukleofili, pri čemer je aciloksifosfonijev intermediat reaktivnejši. Prisotnost baze je nujna za potek reakcije. Razpadna produkta BOP sta heksametilfosforamid in hidroksibenzotriazol.

TBTU (**40**) je strukturno zelo podoben BOP. Razlika je le v fosfonijevemu delu BOP, ki je pri TBTU zamenjan s sečninskim, in vrsti soli, saj je BOP v obliki heksafluorofosfata, TBTU pa tetrafluoroborata. Sečninski del tvori reaktivnejši intermediat kot fosfonijev del BOP, posledično nastane oksibenzotriazolni aktivirani ester hitreje, zato je reakcija tvorbe amida hitrejša. HATU (**41**) je v obliki heksafluorofosfatne soli in reaktivneši od ostalih dveh, saj ima namesto benzotriazolnega obroča azabenzotriazol, ki tvori zelo aktiviran oksiazabenzotriazolni ester, zato so reakcije v primerjavi z BOP in TBTU hitrejše. HATU zmanjša obseg racemizacije (22, 23).

**40****41**

Natančnejši potek mehanizma reakcije tvorbe amida prikazuje **slika 17**:



**Slika 17: Reakcijska shema tvorbe amida s »coupling« reagentom BOP (24)**

V reakciji sinteze prve končne spojine smo kot kislino uporabili 4-nitrofenilocetno kislino. Po končani reakciji je po ohlajanju produkt izpadel iz DMF kot bela oborina. Po tem sklepamo, da je produkt precej nepolaren in najverjetneje ne bo imel izboljšanih farmakokinetičnih lastnosti, saj je DMF polarno topilo.

V reakciji sinteze druge končne spojine smo kot kislino uporabili BOC-fenilglicin. Po končani reakciji oborina tudi po enournem ohlajanju v hladilniku ni nastala. Predvidevamo, da je nastal produkt, ki je bolj polaren in se topi v polarnem DMF. Produkt smo izolirali tako, da smo z rotavaporjem odparili skoraj ves DMF, ostalo zmes pa zlili na led, ki smo mu dodali nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub>. DMF in heksametilfosforamid, ki je razpadni produkt BOP, sta topna v vodi. Hidroksilna skupina na hidroksibenzotriazolu je kisla, zato je tudi ta topen v alkalni raztopni. Produkt v alkalni raztopini ni topen, zato izpade. Pri sintezi te končne spojine smo za izhodno spojino uporabili tisto serijo, kjer na mestu 6 ni klorovega atoma, zato tudi končna spojina nima klorovega atoma na mestu 6.

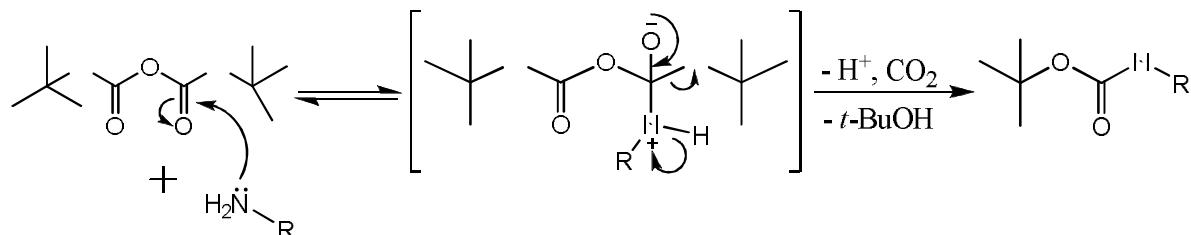
V sintezni reakciji 6.11 smo kot kislino uporabili 2-amino-4-tiazolocetno kislino. Reakcija poteče le ob uporabi reaktivnejših »coupling« reagentov kot sta TBTU in HATU, v primeru uporabe BOP pa reakcija ni potekala. Vzrok za to je aminska skupina v 2-amino-4-tiazolocetni kislini, ki je zelo šibko nukleofilna.

## 9.5 RAZPRAVA K UVEDBI BOC ZAŠČITNE SKUPINE NA AMINO SKUPINI

BOC-fenilglicin smo predhodno pripravili s klasično reakcijo zaščite aminske skupine glicina z (BOC)<sub>2</sub>O po mehanizmu nukleofilne adicije z eliminacijo. Fenilglicin (10 mmol)

smo suspendirali v 10 ml destilirane vode in 10 ml dioksana, ki smo mu nato dodali še 10 ml 1M NaOH. Z NaOH smo omogočili nastanek natrijeve soli na karboksilni skupini fenilglicin ter tako izboljšali njegovo topnost. Dioksan je ciklični eter, ki se meša z vodo v vseh razmerjih ter predstavlja topilo za fenilglicin in  $(BOC)_2O$ . Bučko smo postavili na led, da smo znižali obseg hidrolize  $(BOC)_2O$  ter počasi dokapavali  $(BOC)_2O$  (11 mmol), ki smo ga predhodno raztopili v 10 ml dioksana. Reakcija je potekala čez noč pri sobni temperaturi. Po sintezi je bil produkt raztopljen v vodi (natrijeva sol). Nato smo pod znižanim tlakom odrotavapirali dioksan. Sledila je ekstrakcija z 2 x 20 ml dietiletra, s čimer smo se znebili prebitnega  $(BOC)_2O$ . Vodno fazo smo previdno nakisali z 2,8 M HCl do pH = 2 ter tako povzročili tvorbo soli (NaCl), prehajanje ionizirane oblike produkta v neionizirano in posledično izpadanje produkta v vodi. Nakisanje smo izvajali na ledeni kopeli zaradi eksotermne reakcije nevtralizacije. Morali smo biti previdni, saj bi v primeru nakisanja pod pH = 2 lahko prišlo do hidrolize karbamata. V tem smo se znebili morebitne izhodne spojine, saj se je zaradi nizkega pH-ja prosta aminska skupina ionizirala ter prehajala v vodno fazo. Belo oborino smo odnučali, sprali z 10 ml destilirane vode ter posušili v sušilniku pri 60°C do končne mase.

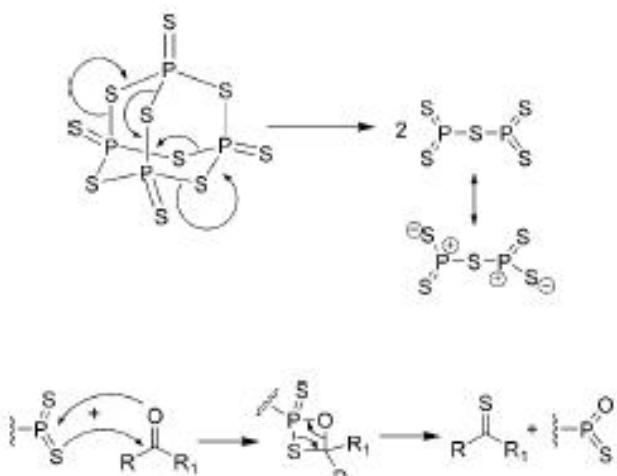
Splošen mehanizem zaščite aminske skupine z  $(BOC)_2O$  (19):



Z BOC zaščiteni amini so karbamati. Obstojni so v pH območju med 4 in 12, neobstojni pa proti organokovinskim spojinam, hidridnim ionom,  $H_2/Pt$  in oksidantom (19).

## 9.6 RAZPRAVA K TVORBI TIAZOLO[4,5-*c*]KINOLINSKEGA DERIVATA

Prva stopnja tvorbe tiazolo[4,5-*c*]kinolinskega derivata je substitucija kisika na amidni karbonilni skupini z atomom žvepla, ki jo dosežemo z reagentom  $P_4S_{10}$ . Ta v reakciji razпадa na  $P_2S_5$ , ki reagira s karbonilno skupino, v našem primeru amidno (slika 18).



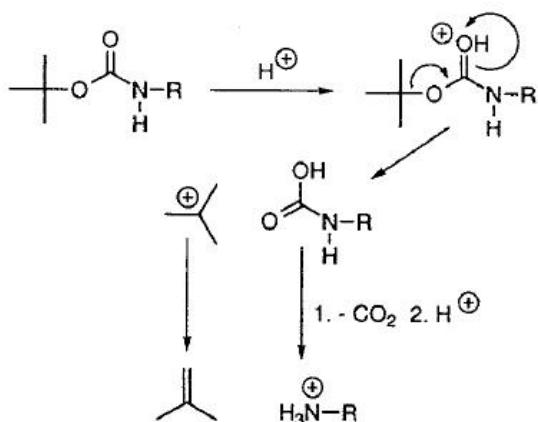
**Slika 18: Mehanizem substitucije kisika z žveplom (25)**

Druga stopnja je ciklizacija, ki poteče po mehanizmu nukleofilne adicije s sledečo eliminacijo. Znano je, da 1,4-diketoni s  $P_4S_{10}$  tvorijo tiofen (21). Hidroksilna skupina na mestu 4 na kinolinskem obroču je lahko kratek, a zadosten čas, zaradi keto-enol tautomerije v keto obliki. Ker pa imamo na mestu 3 amid, je končni produkt reakcije tiazolni obroč.

Postopek izolacije je bil pri obeh končnih spojinah isti. Zaradi vodotopnosti vseh komponent razen produkta. V mrzlem okolju se snovem običajno topnost zmanjša, zato smo bučke postavili v hladilnik, da se je produkt hitreje izboril. Pri reakciji 6.12 je nastal produkt, ki bolj vodotopen kot prejšnja dva, zato bi ga bilo potrebno izolirati s kolonsko kromatografijo. Za rumeno oborino, ki je nastala, nismo prepričani, če je pravi končni produkt, zato bi bila smiselna ponovitev reakcije z večjo količino izhodne spojine.

## 9.7 RAZPRAVA K ODSTRANITVI BOC ZAŠČITE Z AMINO SKUPINE

Reakcija je potekala v brezvodnem diklorometanu v prisotnosti trifluoroacetne kisline po mehanizmu acidolize. **Slika 19** prikazuje, kako proton kisline napade kisik na karbonilni skupini, nato pa sledi odcep *tert*-butilnega karbokationa. Nestabilni derivat karbaminske kisline razпадa na sol aminskega derivata in ogljikov dioksid, ki izhaja iz zmesi. V našem primeru je v bučki po odparitvi diklorometana pod znižanim tlakom ostala rumena zelo viskozna zmes. Po dekantiranju z dietiletrom so nato nastali kristali soli trifluoroacetne kisline. Soli trifluoroacetne kisline so nestabilne, zato je produkt kmalu po končani reakciji prešel v neionizirano obliko.

**Slika 19: Mehanizem acidolize (26)**

Druge možnosti odstranitve BOC zaščite so z HCl/CH<sub>3</sub>COOH in HBr/CH<sub>3</sub>COOH.

### **9.8 RAZPRAVA K REZULTATOM BIOLOŠKIH TESTIRANJ**

Vrednosti MIC dokazujejo, da so spojine šibko protimikrobakterijsko učinkovite v primerjavi z najučinkovitejšima spojinama (MIC = 0,035 µg/ml), ki imata na spojini vodnici na *para* mestu fenilnega obroča pripeti *terc*-butilni in trifluorometilni fragment. Pričakovali smo nižje MIC vrednosti, še posebej za spojino **37** (MIC = 5,000 µg/ml), ki pa je v primerjavi s spojino **31** (MIC = 3,750 µg/ml) manj učinkovita. Najverjetneje na tako nizko učinkovitost vpliva tudi odsotnost klorovega atoma na mestu 6, ki verjetno bistveno pripomore k boljši vezavi spojine na mesto delovanja. Spojina **37** ima kakor nekateri cefalosporini prve in druge generacije v svoji strukturi polarno aminske skupino, ki poveča vodotopnost spojine. Po izračunu s programom Chem3D Pro 12.0 se logP v primerjavi s spojino vodnico (logP = 5,68) zniža na 3,18, kar je po pravilu Lipinskega dobra predikcija za izboljšano vodotopnost spojine.

## 10 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali dva nova protituberkulozna tiazolo[4,5-*c*]kinolinska derivata. Za dosego cilja smo se opirali na dosedanje raziskave in zakonitosti, ki so nujne za izboljšavo vodotopnosti. Le-ta je ključna lastnost za večji obseg absorpcije ter posledično večjo biološko uporabnost. Na tiazolo[4,5-*c*]kinolinski skelet smo pripenjali različne deriveate fenilocetne kisline, za katere smo domnevali, da lahko ohranijo ali izboljšajo protituberkulozni učinek ter izboljšajo vodotopnost.

Sintetizirali smo miligramske količine spojin **31** in **37**. Obe spojini smo poslali na določanje protimikrobakterijskega učinka. Testi so pokazali, da imata obe šibek protimikrobakterijski učinek v primerjavi z najučinkovitejšima spojinama ( $MIC = 0,035 \mu\text{g/ml}$ ), ki imata na spojini vodnici na *para* mestu fenilnega obroča pripeti *tert*-butilni in trifluorometilni fragment. Nasprotno z našimi pričakovanji je spojina **31** ( $MIC = 3,750 \mu\text{g/ml}$ ) učinkovitejša od spojine **37** ( $MIC > 5,000 \mu\text{g/ml}$ ). Možen vzrok za to je odsotnost klorovega atoma na mestu 6 na spojini **37**, ki je morda bistven za vezavo na mesto delovanja. Spojina **37** ima kakor nekateri cefalosporini prve in druge generacije v svoji strukturi polarno aminsko skupino. Po izračunu vrednosti logP s pomočjo programa Chem3D Pro 12.0 ima ta spojina  $\log P = 3,18$ , kar sovпадa s pravilom Lipinskega. V primerjavi s spojino vodnico z  $\log P = 5,68$ , ki pa ima na mestu 6 klorov atom, je ta vrednost precej nižja, zato lahko s teoretičnega vidika sklepamo na izboljšanje vodotopnosti ter posledično na večji obseg absorpcije in večjo biološko uporabnost.

## 11 VIRI IN LITERATURA

1. Gubina M., Ihan A.: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 265-275.
2. <http://gdrake.blogspot.com/2011/04/tuberculosis-tb-mtb.html>, 13.7.2011.
3. Tomioka H.: Current status of some antituberculosis drugs and the development of new antituberculous agents with special reference to their in vitro and in vivo antimicrobial activities. Current pharmaceutical design 2006; 12: 4047-4070.
4. Harries A. D., Dye C.: Tuberculosis. Annals of tropical medicine & parasitology 2005; 100 (5, 6): 415-431.
5. Rivers E. C., Mancera R. L.: New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. Drug Discovery Today 2008; 13 (23, 24): 1090-1098.
6. Koul A., Arnoult E., Guillemont J., Andries K.: The challenge of new drug discovery for tuberculosis. Nature 2011; 469: 483-490.
7. Zhang Y., Post-Martens K., Denkin S.: New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. DDT 2006; 11 (1/2): 21-27.
8. Guy E. S., Mallampalli A.: Managing TB in the 21st century: existing and novel drug therapies. Therapeutic advances in respiratory disease 2008; 2: 401-408.
9. Aboul-Fadl T., Bin-Jubair F. A. S.: Anti-tubercular activity of isatin derivatives. Int. J. Res. Pharm. Sci. 2010; 1 (2): 113-126.
10. Tripathy R. P. *et al.*: Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. Medicinal Research Reviews 2005; 25 (1): 93-131.
11. Benfang L., Chih-Jen W., Shiao-Chun T.: Action mechanism of antitubercular isoniazid: activation by M. tb. KatG, isolation and characterisation of InhA inhibitor. J. Biol. Chem. 2000; 275 (4, 28): 2520-2526.
12. Marrakchi H., Laneelle G., Quemard A.: InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. Mycrobiology 2000; 146: 289-296
13. Hooper D. C.: From fluoroquinolones to 2-pyridones. Lancet Infectious Disease 1995; 345: 1192-1193.
14. Chu D. T. W.: Recent progress in novel macrolides, quinolones and 2-pyrirdones to overcome bacterial resistance. Medicinal Research Reviews 1999; 19 (6): 497-520.
15. Shi R., Sugawara I.: Development od new anti-tuberculosis drug candidates. Tohoku J. Exp. Med. 2010; 221: 97-106.

16. Cole S. T., Alzari P. M.: TB-A new target, a new drug. *Science* 2005; 307: 214-215.
17. Andries K., et al.: A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2005; 307: 223-227.
18. Ballell L., et al.: 4-substituted thioquinolines and thiazoloquinolines: Potent, selective, and Tween-80 in vitro dependent families of antitubercular agents with moderate in vivo activity. *ChemMedChem* 2011; 6: 1-14
19. Sollner Dolenc M., Pečar S.: Vaje iz farmacevtske kemije III, 2. dopolnjena izdaja – ponatis, Ljubljana – Fakulteta za farmacijo, 2007; str. 8-9.
20. <http://chemistry2.csudh.edu/rpendarvis/imineformf99.html>, 7.8.2011.
21. Leger B., et al.: Competitive hydrogenation/dehalogenation of halogenoarenes with surfactant-stabilized aqueous suspensions of rhodium and palladium colloids: A major effect of the metal nature. *Journal of molecular catalysis A* 2007; *Chemical* 266: 221-225.
22. Carpino L. A.: 1-hydroksy-7-azabenzotriazol. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; 115: 4397-4398.
23. Li P., Xu J. C.: HOBt and HOAt-derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis. 2000; 721-724.
24. Dubey L. V., Dubey I. Y.: Side reactions of onium coupling reagents BOP and HBTU in the synthesis of silica polymer supports. *Ukrainica bioorganica acta* 2005; 13-19.
25. Ozturk T., Ertas E., Mert O.: A Berzelius reagent, phosphorus dekasulfide ( $P_4S_{10}$ ), in organic syntheses. *Chem. Rev.* 2010; 110: 3419-3478.
26. [http://ocw201-1.usc.edu/519/hw1\\_key.pdf](http://ocw201-1.usc.edu/519/hw1_key.pdf), 12.8.2011.