

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA FERFOLJA

**SINTEZA POTENCIALNIH ZAVIRALCEV ENCIMA InhA S
TETRAHIDROPIRANSKIM SKELETOM**

**SYNTHESIS OF POTENTIAL InhA INHIBITORS WITH TETRAHYDROPIRANE
SCAFFOLD**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Mateja Živca, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo ter Inštitutu Jožef Štefan.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. ter vsem, ki so mi pomagali in me spodbujali pri pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala gre somentorju asist. dr. Mateju Živcu, mag. farm. ter asist. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. za vse strokovne nasvete pri delu in pomoč pri pisanju. Prav tako gre posebna zahvala Valentini, Maji in staršem za podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag farm. ter somentorstvom asist. dr. Mateja Živca, mag farm.

Mateja Ferfolja

Kazalo vsebine:

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
KLJUČNE BESEDE	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 TUBERKULOZA	1
1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	2
1.2.1 MIKOBakterijska celična stena	2
1.2.1.1 BIOSINTEZA MIKOLNIH KISLIN	4
1.2.1.2 InhA	7
2 NAČRT DELA	11
3 MATERIALI IN METODE	12
4 EKSPERIMENTALNI DEL	13
4.1 REAKCIJSKE SCHEME	13
4.2 SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-(4-(2-METOKSIFENIL)TIAZOL-2-IL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA	15
4.2.1 Sinteza metil 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoata.....	15
4.2.2 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzojske kisline	16
4.2.3 Sinteza 2-(4-(2-metoksifenil)tiazol-2-il)acetonitrila	17
4.2.4 Sinteza 4-(4-(2-metoksifenil)tiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila.....	18
4.2.5 Sinteza (4-(4-(2-metoksifenil)tiazol-2-il)tetrahidro-H-piran-4-il)metanamina	19
4.2.6 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)-N-((4-(4-(2-metoksifenil)tiazol-2-il)tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)benzamida	20
4.3 SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-(4-METOKSIFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA	22
4.3.1 Sinteza 4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila	22
4.3.2 Sinteza (4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina.....	23
4.3.3 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)-N-((4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)benzamida	24
4.4 SINTEZA N-((4-(2-KLORO-6-FLUOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA	26
4.4.1 Sinteza 4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila	26
4.4.2 Sinteza (4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina	27
4.4.3 Sinteza N-((4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)-4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzamida	28
4.5 SINTEZA N-((4-(2-KLOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA	29
4.6 SINTEZA N-((4-(4-TRIFLUOROMETIL)FENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA.....	30
4.6.1 Sinteza 4-(4-(trifluorometil)fenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila	30
4.7 SINTEZA N-((4-(4-BROMOFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA	31
4.7.1 Sinteza 4-(4-bromofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila.....	31
4.7.2 Sinteza (4-(4-bromofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina.....	32

4.8	SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-FENILTETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA	33
4.9	N-((-4-(2,6-DIKLOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4IL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA	34
4.9.1	<i>Sinteza 4-(2,6-diklorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila.....</i>	<i>34</i>
4.9.2	<i>Sinteza (4-(2,6-diklorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina</i>	<i>35</i>
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
5.1	SINTEZNI POSTOPKI.....	36
5.1.1	<i>SINTEZA TIAZOLA</i>	<i>36</i>
5.1.2	<i>SINTEZA TETRAHIDROPIRANSKEGA OBROČA</i>	<i>37</i>
5.1.3	<i>REDUKCIJA NITRILA</i>	<i>37</i>
5.1.4	<i>SINTEZA AMIDNE VEZI</i>	<i>38</i>
5.2	REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA	39
6	SKLEP	41
7	LITERATURA.....	42

Kazalo slik:

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe celične stene pri <i>M. tuberculosis</i> [povzeto po (7)].....	3
Slika 2: Struktura mikolnih kislin pri <i>M. tuberculosis</i> [povzeto po (12)]	4
Slika 3: Osnovni podaljševalni modul FAS II [povzeto po (15)].....	5
Slika 4: Uvedba metilne in hidroksilne skupine ter trans nenasičenja v prekurzorje metoksi- in keto- mikolnih kislin. [povzeto po (13)]	6
Slika 5: Modifikacija hidroksilne skupine ter uvedba ciklopropanskega obroča v mero verige metoksi- in keto-mikolnih kislin [povzeto po (13)].....	6
Slika 6: Kondenzacija in redukcija s Pks13 [povzeto po (13)]	7
Slika 7: Mehanizem redukcije ter pomembne interakcije v aktivnem mestu InhA [povzeto po (20)]	8
Slika 8: Isoniazid ter adukt z NADH [povzeto po (23)].....	9
Slika 9: Etionamid (levo) ter protionamid (desno).....	10
Slika 10: Zadetek	11
Slika 11: Mehanizem Hantzscheve sinteze tiazolov [povzeto po (30)].....	36
Slika 12: Prikaz alternativnih reakcij za sintezo 2-(4-(2-metoksifenil)tiazol-2-il)acetonitrila	37
Slika 13: Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU [povzeto po (35)]	38

POVZETEK

Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, zaradi katere vsako leto umre približno 1,5 milijona ljudi. Povzročajo jo mikobakterije sklopa *Mycobacterium tuberculosis*, katerih posebnost so mokolne kisline v celični steni. InhA, 2-trans-enoil-ACP reduktaza, je encim, ki sodeluje pri njihovi sintezi. Isoniazid, najpomembnejša aktivna učinkovina pri zdravljenju tuberkuloze, je inhibitor InhA. Kljub učinkovitemu delovanju je vse večji zdravstveni problem rezistenca sevov na izoniazid. Odpornost sevov je navadno posledica mutacij v encimu KatG, ki pretvori izoniazid v aktivno obliko. Zaradi naraščajoče odpornosti in ker je InhA validirana tarča, je vse večje zanimanje za razvoj novih in učinkovitih inhibitorjev, ki bi neposredno inhibirali encim InhA. V GlaxoSmithKline so s pomočjo reševanja visoke zmogljivosti prišli do zadetka z IC_{50} v nanomolarnem območju. Na Katedri za farmacevtsko kemijo smo želeli določiti odnos med strukturo in delovanjem, vendar ker kristalna struktura encima z vezanim zadetkom ni znana, smo se odločili postopoma spreminjati strukturo zadetka. V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali pet derivatov, vendar sta bila le dva dovolj čista za testiranje. 2-metoksi derivat se je izkazal kot dober inhibitor InhA, vendar proti pričakovanju ni izkazoval antituberkulotičnega delovanja. Derivat brez vmesnega tiazolovega obroča in ostali derivati sintetizirani na katedri niso izkazovali ne inhibitorne aktivnosti, kot tudi ne antituberkulotičnega delovanja. Na podlagi dobljenih rezultatov smo zaključili, da nadaljevanje razvoja inhibitorjev s tetrahidropiranskim skeletom ni smiselno.

ABSTRACT

Tuberculosis is a serious infectious disease which has been substantially growing on the worldwide basis but still no new specific active medicines have been discovered for decades. *Mycobacterium tuberculosis*, a pathogenic bacterial species from the family Mycobacteriaceae, which cause tuberculosis, are special for their mycolic acids in the cell wall. InhA, 2-trans-enoyl-ACP reductase, responsible for mycolic acids synthesis, is target of the most important medicine for fighting tuberculosis - isoniazid. However due to its effective mode of action resistance has emerged what seems to be an increasing public health problem. Isoniazid resistance is mostly a consequence of mutations in enzyme KatG, which transforms isoniazid into its active form. Due to increasing resistance and being InhA a validated target, there has been major interest in developing new and effective inhibitors for InhA. High-throughput screening at GlaxoSmithKline has contributed to a hit, with IC₅₀ in a nano-molar area. The aim of this study was to determine the relationship between structure and activity. However as the crystal structure of the enzyme in complex with hit has not been determined, we decided to gradually change the hit's structure. We synthesized five derivatives, unfortunately only two of them were pure enough for testing – 2-methoxy derivative and derivative without thiazole moiety. The former demonstrated good enzyme inhibitory activity, but any antitubercular action. A derivative without a thiazole moiety, in addition with other derivatives synthesized at Chair of Pharmaceutical Chemistry, did not possess any inhibitory activities nor antitubercular activities. Based on the results we concluded that further development of tetrahydropirane inhibitors for treating tuberculosis is irrelevant.

KLJUČNE BESEDE

Tuberkuloza, *Mycobacterium tuberculosis*, mikobakterijska celična stena, biosinteza mikolnih kislin, InhA, inhibitorji.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACP: acyl carrier protein

CoA: koencimA

CDCl₃: devteriran kloroform

d: dublet

DKM: diklorometan

DMF: dimetilformamid

DMSO-d₆: devteriran dimetilsulfoksid

ESI: ionizacija z elektrosprejem

FabI: enoil reduktaza

FAS: sintaza maščobnih kislin

IC₅₀: srednja inhibitorna koncentracija

INH: izoniazid

IR: infrardeča spektroskopija

J: sklopitvena konstanta

m: multiplet

mAGP: mikolilarabinogalaktan kompleks

MIC: minimalna inhibitorna koncentracija

NADH: reduciran nikotinamid adenin dinukleotid

NMR: jedrska magnetna resonanca

R_f: retencijski faktor

s: singlet

SAR: odnos med strukturo in delovanjem

t: triplet

T_t: temperatura tališča

TB: tuberkuloza

TBTU: *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat

TEA: trietilamin

THF: tetrahidrofuran

1 UVOD

1.1 TUBERKULOZA

Tuberkuloza (jetika, sušica) je infekcijska bolezen, ki jo v razvitem svetu povzroča predvsem *Mycobacterium tuberculosis*, lahko pa tudi *M. africanum*, *M. canetti* in *M. microti*. Okužbo z *M. bovis*, katere naravni gostitelj je govedo, so izkoreninili s pasterizacijo mleka in veterinarskim nadzorom. Prizadene lahko katerikoli organ, najpogosteje pljuča. Značilni simptomi pljučne tuberkuloze so kronični kašelj, izmeček, izguba apetita, hujšanje, nočno znojenje, vročina in utrujenost. Pri močno napredovali bolezni je izmeček lahko krvav. Bolezen je stara že tisočletja, epidemija se je prvič pojavila v 16. stoletju v Angliji, konec 19. stoletja je bila najpogostejši vzrok smrti v Evropi. Z izboljšanjem življenjskih razmer in pojavom antituberkulotikov sta se pojavnost bolezni in umrljivost močno zmanjšali(1, 2). Zaradi pojava rezistence in ko-infekcije z virusom HIV jo je leta 1993 Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) razglasila za svetovni zdravstveni problem najvišje stopnje ogroženosti. Dandanes je drugi najpogostejši vzrok smrti izmed vseh infekcijskih bolezni, takoj za virusom HIV. Okužba se prenaša kapljično, pri čemer zbolijo približno 10 % okuženih ljudi. Največji dejavnik tveganja za razvoj bolezni je okužba z virusom HIV, pri slednjih je namreč možnost razvoja tuberkuloze kar 20-krat večja. Ostali dejavniki tveganja so še kajenje (2-krat večje tveganje), pitje velikih količin alkohola, diabetes (3-krat večje tveganje) in genetska predispozicija. Pri ostalih 90 % lahko pride bodisi do popolne izločitve mikroba bodisi do latentne oblike tuberkuloze (TB). To pomeni, da ima gostiteljev imunski sistem dovolj veliko kontrolo nad razmnoževanjem bakterije, tako da ne pride do poškodb tkiva oziroma znakov bolezni. Ocenjujejo, da ima približno 2 milijardi ljudi to obliko TB(3, 4). V letu 2013 je po podatkih WHO za TB zbolelo 9 milijonov, umrlo pa 1,5 milijona ljudi. Istega leta je bilo 480.000 novih primerov MDR-TB (multidrug resistant tuberculosis), od tega 9 % primerov XDR-TB (extensively drug resistant tuberculosis). Pri MDR-TB so sevi odporni na rifampicin in izoniazid, pri XDR-TB dodatno še na vse fluorokinolone in na enega od treh intravenskih antibiotikov (kapreomicin, kanamicin in amikacin). Antituberkulotike delimo na zdravila prvega (izoniazid, rifampicin, pirazinamid, etambutol in streptomycin) in drugega reda (etionamid, cikloserin, kanamicin, kapreomicin, amikacin, ofloksacin in ciprofloksacin). Zdravila drugega reda so bolj toksična in/ali manj učinkovita(5). Zdravljenje začnemo z več zdravili hkrati, da se izognemo rezistenci. Zaradi počasne rasti in razmnoževanja bakterij traja zdravljenje več mesecev. Pri standardnem režimu s štirimi zdravili, ki se uporablja pri novoodkriti bolezni občutljivi na antituberkulotike prvega reda je učinkovitost zdravljenja 90-

95%. V začetnem obdobju (2 meseca) zdravimo s kombinacijo rifampicina, izoniazida, pirazinamida in etambutola, sledi stabilizacijsko obdobje (4 mesece), kjer primarno zdravimo z rifampicinom in izoniazidom. Terapijo lahko zaradi možnosti relapsa podaljšamo na 9 mesecev. MDR-TB zdravimo s kombinacijo štirih zdravil drugega reda (fluorokinolon, intravenski antibiotik, etionamid ali protionamid in cikloserin ali para-aminosalicilna kislina) ter pirazinamida. Zdravljenje traja 20-30 mesecev, pri tem traja začetna faza najmanj 8 mesecev(1, 6). Ker je zdravljenje MDR-TB in predvsem XDR-TB dolgotrajno, z veliko stranskimi učinki in nizko stopnjo ozdravljivosti, je vse večja potreba po razvoju novih učinkovitih zdravil. Kot edino cepivo se uporablja BCG (Bacille Clemette-Guerin), ki je oslavljen sev *M. bovis*.

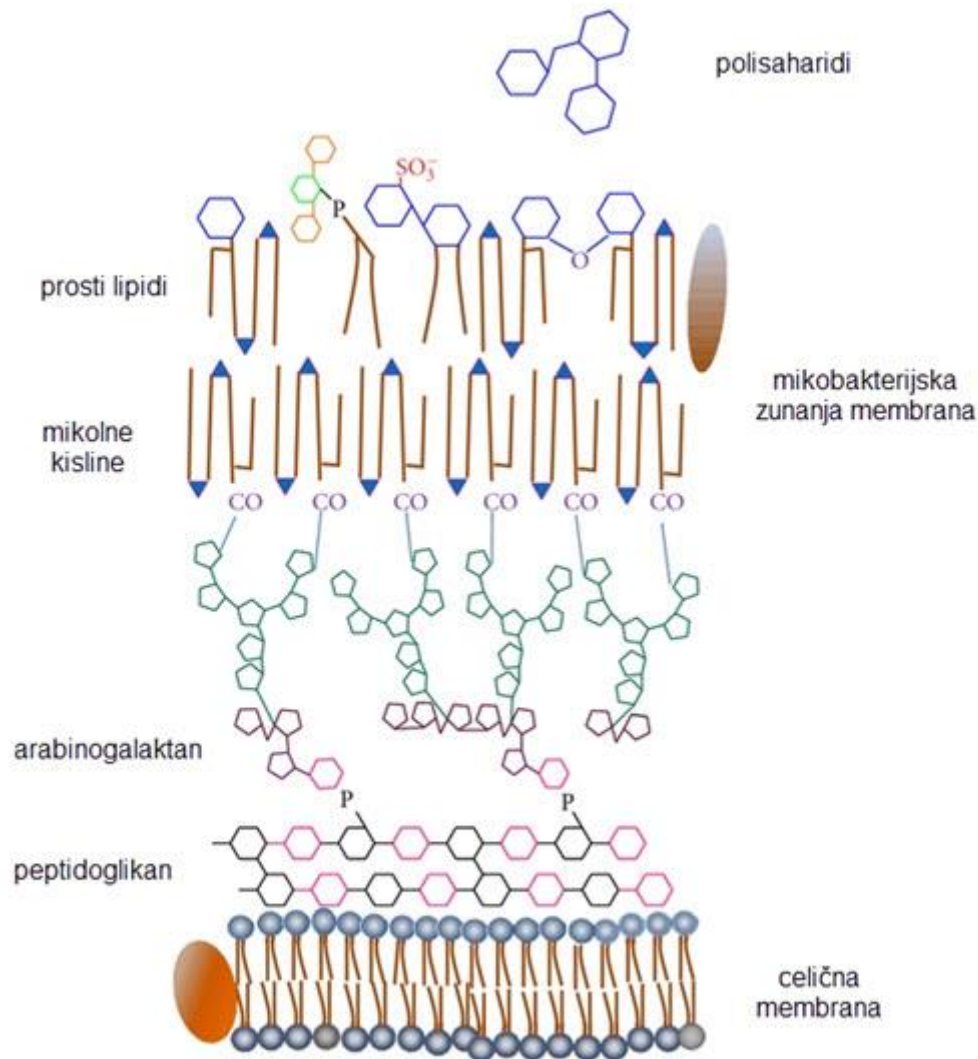
1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Je aeroben, nesporogen, negibljiv, paličast bacil, ki ga je leta 1882 odkril Robert Koch. Je znotrajcelični patogen in je v primerjavi z ostalimi bakterijami počasi rastoč, saj se deli na približno vsakih 18-24 ur. Bolje uspeva v tkivih bogatih s kisikom. Dalj časa lahko preživijo v posušenem izmečku, saj so odporni na sušenje. Na trdnem gojišču so kolonije suhe, rumene barve, podobne krušnim drobtinam, medtem ko v tekočih gojiščih *M. tuberculosis* raste na vrhu kot kožica. Zaradi posebne sestave celične stene, jih ni mogoče barvati po Gramu, zato jih dokazujemo z barvanjem po Ziehl-Neelsenu ali s fluorescentnim barvilom(2, 4).

1.2.1 MIKOBakterijska celična stena

Bacil *M. tuberculosis* je odporen na številne antibiotike in kemoterapevtike ravno zaradi nenavadne zgradbe celične stene, skozi katero antibiotiki slabo prehajajo. Celična stena je sestavljena iz dveh delov. Osnovo predstavlja spodnji del iz treh kovalentno povezanih makromolekul (peptidoglikana, arabinogalaktana in mikolnih kislin), ki mu pravimo mikolilarabinogalaktan-peptidoglikan kompleks (mAGP). Peptidoglikan je sestavljen iz izmenjujočih se enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-glikolilmuraminske kisline (MurNGly). Na mestu 5 nekaterih MurNGly ostankov je pripet tetrapeptid L-Alanil-D-izoglutaminil-mezo-diaminopimelil-D-Alanin. Določen del prečnih povezav je preko dveh mezo-diaminopimeličnih ostankov del pa med mezo-diaminopimeličnim in D-Ala ostankom. Proste karboksilne skupine glutamata in diaminopimelične kislina so lahko še dodatno amidirane. Le določen odstotek glutamata je substituiran z glicinom. MurNGly je z mestom 6 preko fosfodieterske vezi (α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow P)) povezan z galaktanom (10-12 %). Slednji je sestavljen iz približno trideset izmenjujočih 5- ali 6- povezanih β -D-galaktofuranoznih enot. Na mesto 5 galaktofurana je vezan razvejan arabinan. Sestavljajo ga

D-arabinofuranoze z $\alpha(1\rightarrow5)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ in $\beta(1\rightarrow2)$ povezavami. Nereducirajoče konce arabinana sestavljajo heksaarabinofuranozni motivi, pri čemer je dve tretjini slednjih zaestrenih z mikolnimi kislinam. Zgornji del sestavljajo prosti lipidi, glikolipidi, sulfolipidi, fosfatidilinozitol manozidi in fitocerol vsebujoči lipidi, ki z mikolnimi kislinami mAGP kompleksa tvorijo celični membrani podobno strukturo (mikobakterijska zunanja membrana). Zgornjo in spodnjo plast prebadata lipoarabinoman in lipomanan. Na površju je še kapsuli podobna substanca bogata s polisaharidi α -1,4 glikogenom, arabinomanom in mananom.

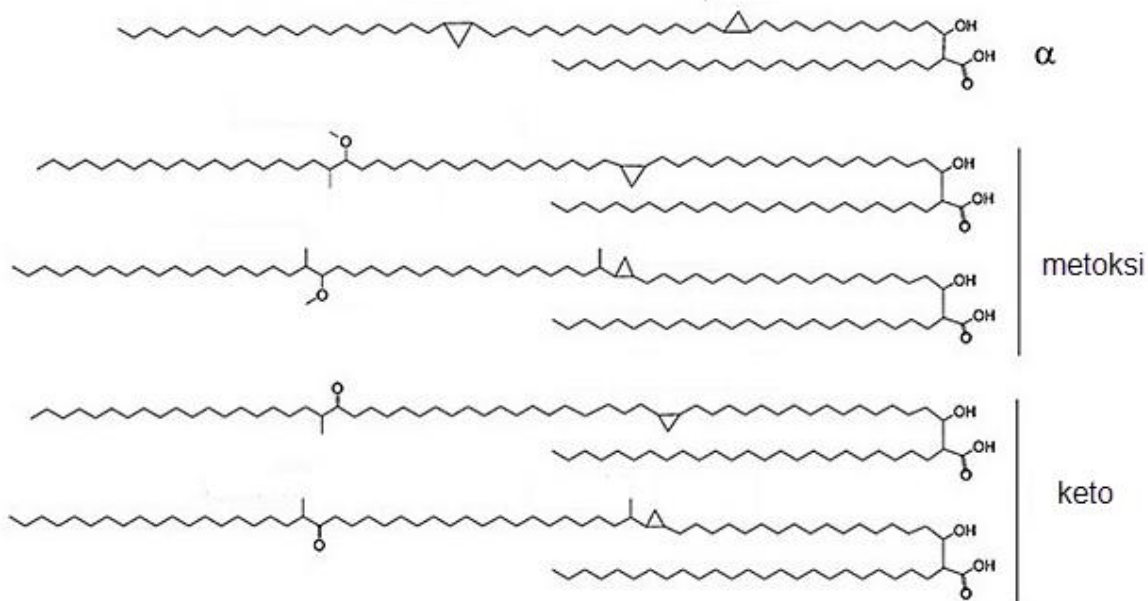


Slika 1: Shematski prikaz zgradbe celične stene pri *M. tuberculosis* [povzeto po(6)].

Prosti lipidi imajo pomembno vlogo pri imunskem odzivu in patogenezi, medtem ko je mAGP pomemben za preživetje bacila. Ravno zato predstavljajo encimi udeleženi v njegovi sintezi pomembne tarče za razvoj novih učinkovin(7-10).

1.2.1.1 BIOSINTEZA MIKOLNIH KISLIN

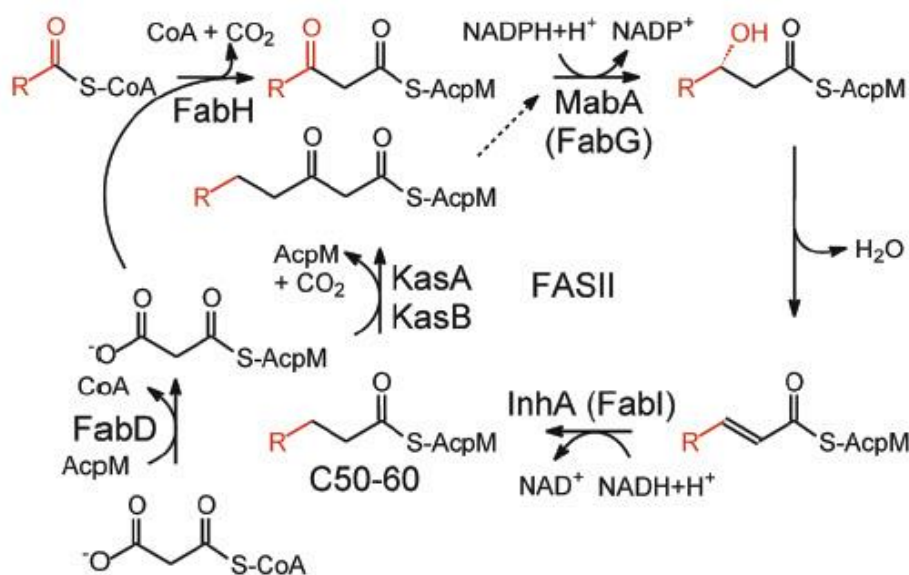
Mikolne kisline so dolgoveržne α -alkil- β -hidroksi maščobne kisline, pri čemer pri *M. tuberculosis* najdemo α -, metoksi- in keto-mikolne kisline (MIK) dolge do 90 C atomov.



Slika 2: Struktura mikolnih kislin pri *M. tuberculosis* [povzeto po(11)].

Skupaj predstavljajo kar 30-40 % mase celične stene, najbolj pogoste so α -mikolne kisline(12). Njihovo sintezo omogočata FAS I in FAS II sistema sinteze maščobnih kislin. Kemija reakcij je pri obeh enaka. Mikobakterijski FAS I je multiencimski kompleks in je odgovoren za *de-novo* sintezo do 26 C atomov dolgih maščobnih kislin iz acetata. Za nastanek mikolnih kislin sta pomembna produkta z 20 C (eikozanoil) in 26 C (heksakozanoil) atomi, ki sta sproščena kot derivata CoA. Iz heksakozanoil-S-CoA nastane krajša veriga ter metil karboksilna skupina. Eikozanoil-S-CoA vstopi v FAS II sistem. Pri mikobakterijah ta sistem sestavlja več posameznih encimov, ki niso sposobni *de-novo* sinteze maščobnih kislin iz acetil-CoA(13). Po predvidevanju (14) obstajajo trije moduli sistema FAS II. Osnovni modul je odgovoren za podaljševanje verige, modul FAS IIA uvede dvojno vez v distalnem delu, FAS IIB pa v proksimalnem delu daljše verige mikolnih kislin (mero verige).

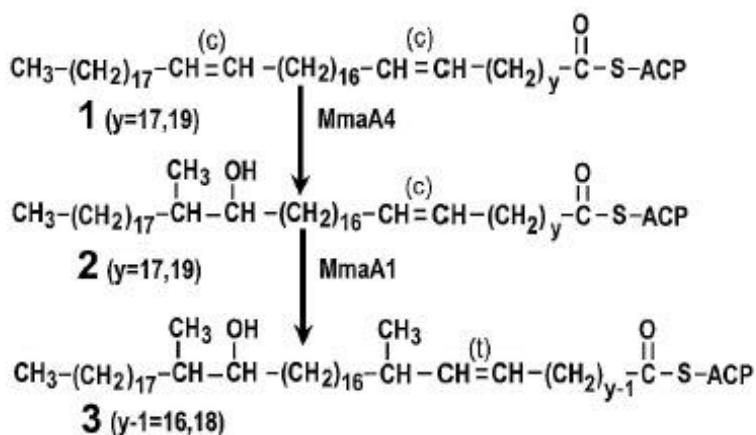
Začne se s pretvorbo malonil-S-CoA v malonil-S-ACP, ki jo katalizira FabD (malonilCoA:ACP transacilaza). V naslednji stopnji (prva stopnja FAS IIA modula), katalizira jo β -ketoacil-ACP sintaza III, poteče kondenzacija med malonil-S-ACP in eikozanoil-S-CoA. Nastali produkt se najprej reducira z β -ketoacil-ACP reduktazo, sledi uvedba dvojne vezi z β -hidroksiacil-ACP dehidrazo in 2-trans-enoil-ACP izomerazo. Produkt, ki nastane, vstopa v osnovni podaljševalni modul FAS II. Reakcije prikazuje slika 3.



Slika 3: Osnovni podaljševalni modul FAS II [povzeto po(13)].

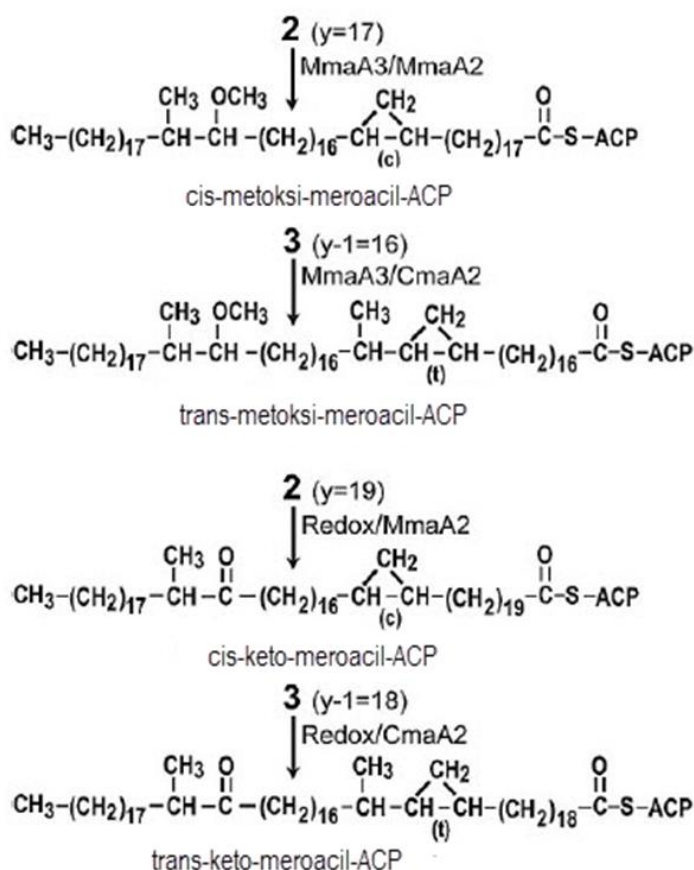
Prve tri reakcije osnovnega podaljševalnega modula FAS II so enake kot pri FAS IIA modulu. Zadnjo, četrto stopnjo katalizira 2-trans-enoil-ACP reduktaza (InhA), tarča, na katero delujeta izoniazid in etionamid. Dobimo produkt, ki je podaljšan za 2 C atoma. Nato se krog večkrat ponovi. Za sintezo α -mikolnih kislin petkrat za sintezo metoksi- in keto-mikolnih kislin pa osemkrat. Sledijo reakcije FAS IIB (uvedejo 2 C atoma in dvojno vez) ter osnovnega podaljševalnega modula. Za α - in metoksi-mikolne kisline se cikel ponovi osemkrat, za keto-mikolne kisline pa devetkrat.

Na prekursor α -mikolnih kislin uvedejo ciklopropanski obroč ciklopropan sintaze (MmaA2 in PcaA). Metiltransferaza MmaA4 uvede v distalnem delu prekursorjev metoksi- in keto-mikolnih kislin metilno in hidroksilno skupino. V primeru trans izomerov naslednjo reakcijo katalizira metiltransferaza MmaA1. Ta uvede alil-metilno skupino in trans nenasičenje v proksimalnem delu (slika 4).



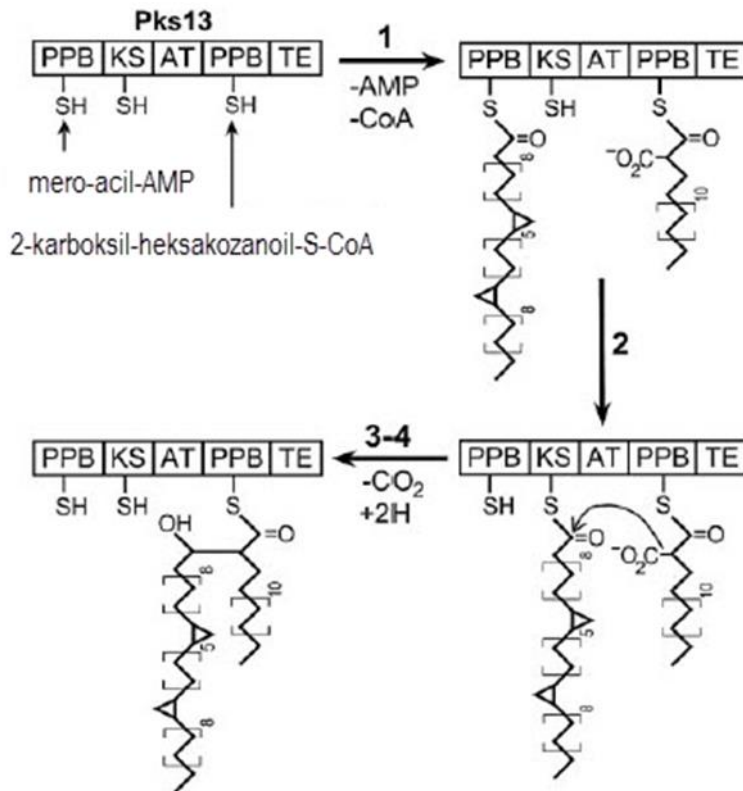
Slika 4: Uvedba metilne in hidroksilne skupine ter trans nenasičenja v prekurzorje metoksi- in keto- mikolnih kislin. [povzeto po(15)].

Sledi modifikacija hidroksilne skupine (etrenje oz. oksidacija) ter ciklopropanacija. MmaA2 uvede ciklopropani obroč v cis izomera, CmaA pa v trans izomera keto- in metoksi- mikolnih kislin (slika 5).



Slika 5: Modifikacija hidroksilne skupine ter uvedba ciklopropankega obroča v mero verige metoksi- in keto- mikolnih kislin [povzeto po(13)].

Vse nastale prekursorje pretvori FadD32 v AMP derivate (meroacil-S-ACP→meroacil-AMP). Acil-CoA karboksilaza uvede karboksilno skupino na heksakozanoil-CoA (produkt FAS I sistema), nastali 2-karboksil-heksakozanoil-CoA in meroacil-AMP pa vstopata v zadnjo stopnjo sinteze mikolnih kislin, katero katalizira multiencimski kompleks poliketidna sintaza 13 (Pks13). Poteče Claisenov tip kondenzacije ter redukcija 3 okso skupine do sekundarnega alkohola (slika 6)(13).



Slika 6: Kondenzacija in redukcija s Pks13 [povzeto po(14)].

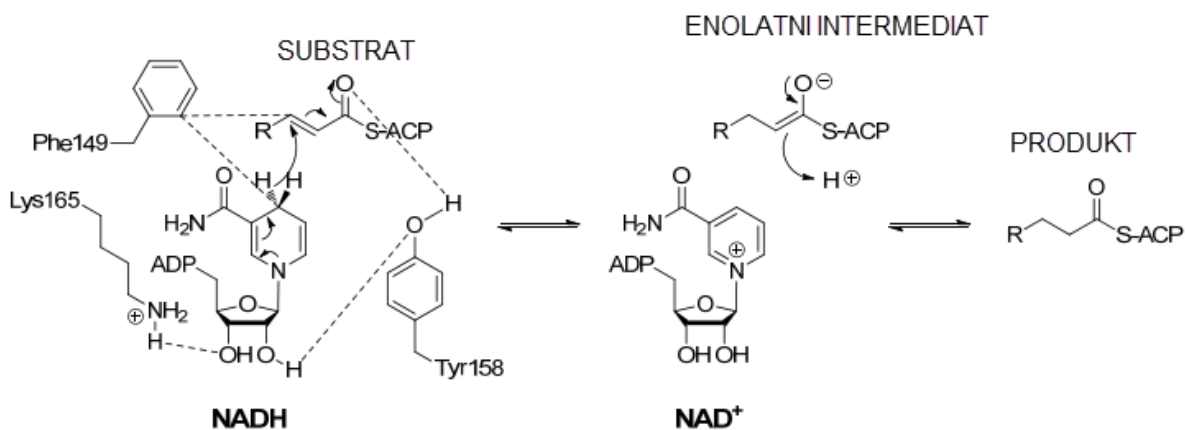
Encimi FAS II sistema so še posebej dobre tarče za načrtovanje novih učinkovin, saj je ta sistem nujen za preživetje mikobakterij, pri ljudeh pa ni prisoten. Na ta način dosežemo selektivno toksičnost.

1.2.1.2 *InhA*

InhA je homolog *FabI* encimov v drugih bakterijah. Ti katalizirajo zadnjo reakcijo osnovnega cikla FAS II sistema. Gre za redukcijo 2-trans-enoil-ACP v acil-ACP s pomočjo reducirane oblike NADH kot kofaktorja. Nekatere bakterije vsebujejo še flavoprotein *FabK*, ki katalizira to isto reakcijo, zato *FabI* ni primerna tarča za razvoj širokospektralnih kemoterapevtikov(13). Razlike med posameznimi homologi so v zanki, ki pokriva aktivno mesto, to je namreč substrat-vezavna zanka, ki igra pomembno vlogo pri *in vivo* aktivnosti inhibitorjev. Velja, da

imajo inhibitorji, ki po vezavi povzročijo premik zanke, tako da ta prekrije aktivno mesto, zelo visoko afiniteto. Pravimo jim »slow-onset« inhibitorji. Zanje je značilen dvostopenjski mehanizem inhibicije, saj se po vezavi inhibitorja začetni kompleks med inhibitorjem in encimom (EI) počasi pretvori v končni kompleks EI*. Posledica tega je daljši čas zadrževanja na encimu, kar pomeni, da bo inhibitor vezan tudi, ko bo njegova koncentracija padla(16, 17).

Kljub temu, da FabI encimi niso primerne tarče za širokospektralne kemoterapevtike, je InhA validiran kot učinkovita tarča za terapijo tuberkuloze. Protein sestavlja 269 aminokislinskih ostankov, ki tvorijo osem α vijačnic in sedem β ploskev. Biološko aktivna struktura je homotetramer, oblika monomera spominja na stol. Vsak monomer ima dve vezavni mesti, eno za substrat in eno za kofaktor. Vezavno mesto za substrat, ki leži nad vezavnim mestom za NADH, je hidrofobno in fleksibilno. Sestavljajo ga substrat vezavna zanka ter zanki A in B(18). Katalitično triado v aktivnem mestu tvorijo Phe 149, Tyr 158 in Lys 165. Mehanizem reakcije je podrobneje prikazan na sliki spodaj.

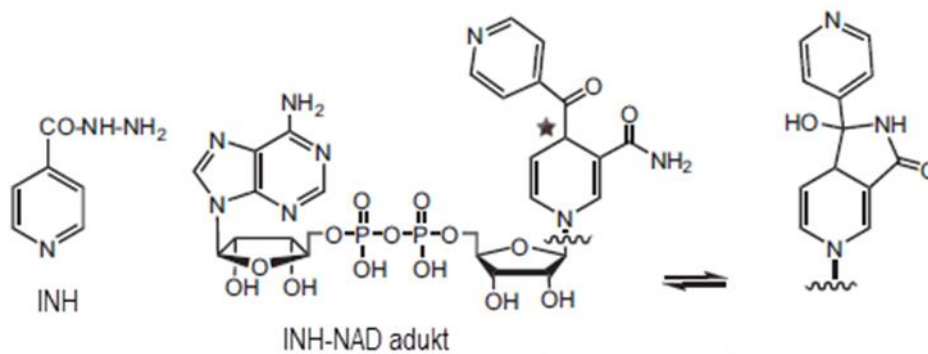


Slika 7: Mehanizem redukcije ter pomembne interakcije v aktivnem mestu InhA [povzeto po(19)].

Tirozin je elektrofilni katalizator, ki stabilizira prehodno stanje tako, da tvori vodikovo vez s karbonilno skupino substrata, lizin je pomemben za vezavo kofaktorja. Vodik na mestu 4 v piridinskem obroču NADH se prenese na β ogljikov atom v substratu, pri tem nastane oksidirana oblika kofaktorja in enoladni intermediat. Slednji nato protonira in tautomerizira do produkta(20, 21). Encim preferenčno reducira verige dolge šestnajst ali več C atomov. V terapevtske namene se trenutno uporabljajo inhibitorji izoniazid, etionamid ter protionamid.

IZONIAZID

Izoniazid (hidrazid izonikotinske kisline, INH) je že od leta 1952 najpomembnejše zdravilo v boju proti tuberkulozi. Njegov kompleksen mehanizem delovanja so odkrili šele pred kratkim. INH je predzdravilo, ki se s pomočjo mikobakterijskega encima KatG metabolično oksidira do izonikotinoilnega radikala. Ta reaktivna zvrst se nato kovalentno veže na mesto 4 kofaktorjev NAD in NADP (slika 8). Aciklični (4S) izomer adukta z NAD, ki je »slow-onset« inhibitor InhA, ima inhibitorno konstanto $K_i = 0,75 \text{ nM}$.

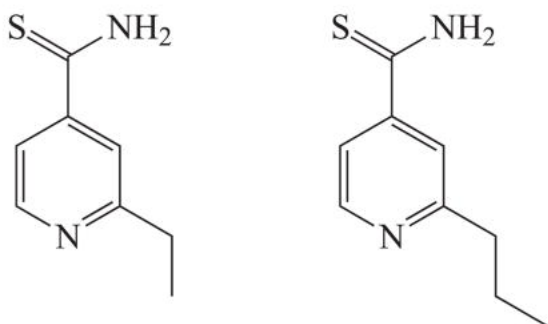


Slika 8: Izoniazid ter adukt z NADH [povzeto po(22)].

Adukta z NADP sta inhibitorja dihidrofolatreduktaze ((4R) izomer) in MabA encima ((4S) izomer)(18, 23, 24). INH je visoko specifičen, saj je učinkovit le za nekatere organizme iz rodu mikobakterij, za ostale mikroorganizme je neučinkovit. Povzroči spremembe v strukturi celične stene, izgubo acidorezistentnosti in sproščanje večjih količin proteinov v okolico. Na hitro se deleče mikobakterije deluje baktericidno, saj povzroči lizo celic. Naravna selekcija in nepravilna uporaba kemoterapevtikov je pripeljala do tega, da je danes vse več sevov odpornih na INH. Odpornost je posledica prekomerne ekspresije ali specifičnih mutacij tarčnega gena (*InhA*). Kar 50 % kliničnih primerov odpornosti povzročajo sevi z mutacijami v genu za KatG encim(25, 26).

ETIONAMID IN PROTIONAMID

Sta analoga izoniazida in njuna adukta z NAD prav tako inhibirata InhA. Ker se metabolično oksidirata s flavin monooksigenazo EtaA, delujeta tudi v primeru mutacije KatG. Sta baktericidna in aktivna tudi proti *M. leprae*. Žal se pojavlja vse več odpornih sevov, večinoma z mutacijami EtaA. Metaboliti, ki nastanejo po oksidaciji s človeško flavin monooksigenazo prispevajo k toksičnosti(27, 28).

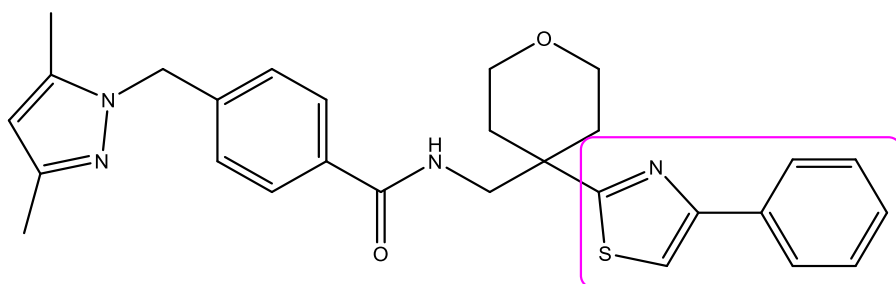


Slika 9: Etionamid (levo) ter protionamid (desno).

Ker je InhA validirana tarča in je večina odpornosti posledica mutacij aktivacijskih encimov, obstaja veliko zanimanje za razvoj novih inhibitorjev, ki bi direktno inhibirali encim. V literaturi lahko zasledimo številne nove skupine spojin, ki so bile sintetizirane v ta namen. Če navedem le nekatere: alkil difenil etri, arilamidi, azaizoindolinoni ter analogi INH-NAD adukta. V sodelovanju s podjetjem GlaxoSmithKline poteka na Katedri za farmacevtsko kemijo projekt, v sklopu katerega je nastala tudi ta magistrska naloga in katerega cilj je odkritje novih inhibitorjev InhA.

2 NAČRT DELA

V GlaxoSmithKline so s pomočjo rešetanja visoke zmogljivosti prišli do zadetka z IC_{50} 20 nM in MIC vrednostjo 15 μ M (Slika 10).



Slika 10: Zadetek.

Cilj projekta, ki ga izvajajo na Katedri za farmacevtsko kemijo je določitev odnosa med strukturo in aktivnostjo (SAR). Ker kristalna struktura InhA z vezanim zadetkom še ni znana, se bomo tega lotili s postopnim spreminjanjem strukture in tako raziskovali kemijski prostor. Namen eksperimentalnega dela magistrske naloge je sinteza derivatov s strukturnimi modifikacijami v desnem delu molekule (označeno na sliki 10). Poskusili bomo pripraviti 2-metoksi-fenilni derivat ter derivate brez vmesnega tiazolnega obroča. Spojine, ki bodo več kot 95% čiste, bomo poslali v GlaxoSmithKline, kjer jim bodo določili vrednosti IC_{50} ter MIC.

3 MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila:

Pri delu smo uporabljali kemikalije naslednjih proizvajalcev: Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Panreac, Gram-mol, Carlo Erba in Janssen.

Kromatografske metode:

Pri tankoplastni kromatografiji (TLC) smo uporabljali Merckove plošče Silica gel 60 F₂₄₅ z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminjastem nosilcu. Kot mobilne faze smo uporabljali mešanice različnih topil. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV svetilko ($\lambda=254$ nm ali $\lambda=366$ nm) ter orositvena reagenta ninhidrin (za amine) in bromkrezol zeleno (za kisline). Za kolonsko kromatografijo smo uporabljali Silikagel 60 (premer delcev 0,04-0,063 mm) proizvajalca Mercka.

Spektroskopske metode:

Jedrska magnetna resonanca: NMR spektri so bili posneti s spektrometrom Bruker AVANCE III na Fakulteti za farmacijo. Spektre ¹H smo posneli pri 400 MHz, spektre ¹³C pa pri 100 MHz. Temperatura je bila v obeh primerih 295 K. Pri tem sta bil uporabljeni devterirani topili DMSO-*d*₆ in CDCl₃ z internim standardom TMS (tetrametil silan). Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRec 8.4.6. (Mestrelab Research).

Masna spektrometrija: Masni in HR-MS spektri so bili posneti s spektrometrom Q-TOF Premier (Waters-Micromass) z ESI tehniko ionizacije na Institutu Jožef Stefan.

Infrardeča spektroskopija: IR spektri so bili posneti na spektrometru Nexus FT-IR (Fakulteta za farmacijo v Ljubljani) ter računalniško obdelani s programom Omnic E.S.P 5.2.

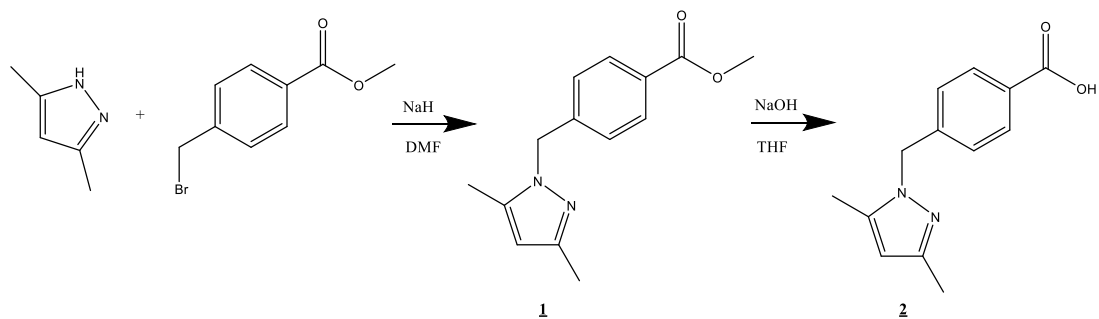
Poimenovanje in risanje spojin: Uporabili smo računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft).

Določevanje tališča: Tališča smo določali s termometrom 52 II Thermometer (Fluka) ter talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A in so nekoregirana.

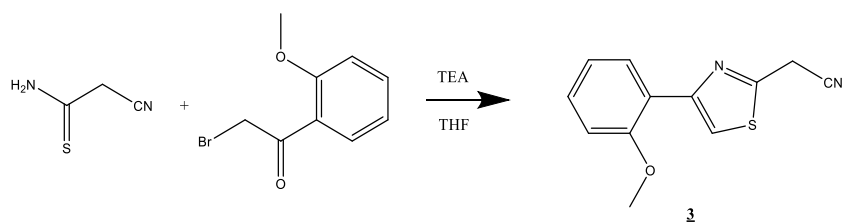
4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 REAKCIJSKE SCHEME

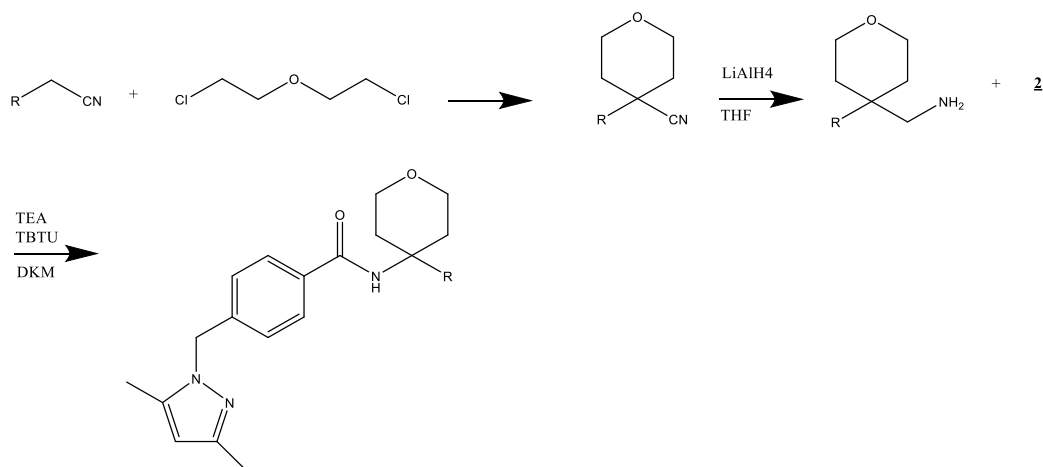
Schema 1



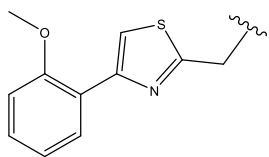
Schema 2



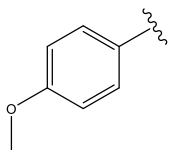
Schema 3



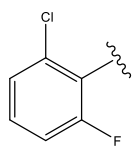
R:



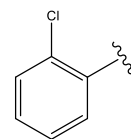
4, 5, 6



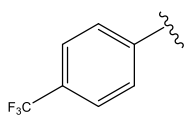
7, 8, 9



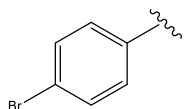
10, 11, 12



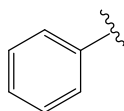
13, 14



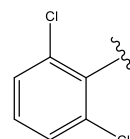
15



16, 17



18, 19

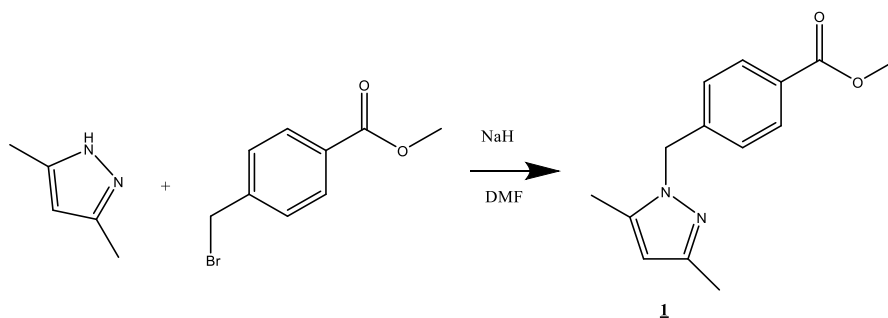


20, 21

4.2 SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-(4-(2-METOKSIFENIL)TIAZOL-2-IL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA

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

Reakcija:



3,5 dimetilpirazol (0,534 g; 5,5 mmol; 1,1 equiv) in metil-4-(bromometil)benzoat (5 mmol, 1,145 g; 1 equiv) natehtamo v bučko ter prelijemo z 10 ml brezvodnega DMF. Zmes prepihamo z argonom ter namestimo na ledeno kopel. Nato počasi dodajamo NaH (0,210 g 60% mešanice s parafinom; 5,25 mmol; 1,05 equiv). Po 30 minutah mešanja reakcijsko zmes odstavimo s kopeli in jo na sobni temperaturi pustimo čez noč. Naslednji dan reakcijski zmesi dodamo 100 ml 5% citronske kisline ter ekstrahiramo z DKM (3 x 30 ml). Organsko fazo uparimo.

Opis: beli kristali

Rf: 0,14 (etil acetat:heksan, 1:3)

Izkoristek reakcije: 99,8 %

T_f: 53-60 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.10 (s, 3H, pirazol-CH₃), 2.14 (d, *J* = 0.6 Hz, 3H, pirazol-CH₃), 3.83 (s, 3H, COOCH₃), 5.28 (s, 2H, CH₂), 5.87 (s, 1H, pirazol-H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-H)

IR (cm⁻¹): 2923, 1723, 1436, 1279, 1103, 1017, 759

Elementna sestava: C₁₄H₁₆N₂O₂

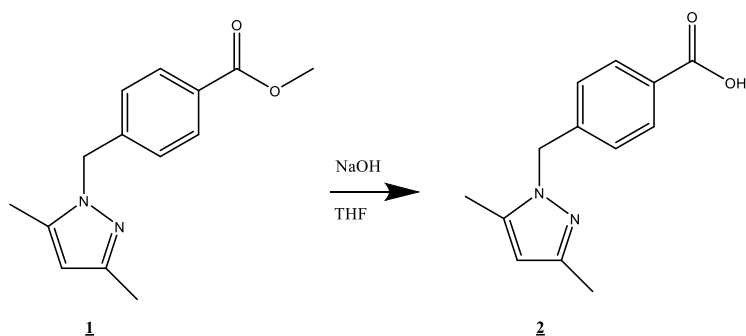
Mr: 244,29

MS (ESI): 245,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₄H₁₇N₂O₂ (m/z): 254,1290 (izračunana vrednost) / 245,1289 (izmerjeno)

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

Reakcija:



Metil 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzoat (1,141 g; 4,7 mmol) raztopimo v brezvodnem THF (30 ml), dodamo 1M NaOH (25 ml; 25 mmol; 5,3 equiv) ter mešamo na sobni temperaturi 24 ur. Nato najprej odparimo THF, vodno fazo nakisamo z 1M HCl do pH = 4 in ekstrahiramo z DKM (3 x 60 ml). Organsko fazo speremo z nasičeno NaCl (1 x 40 ml), posušimo z Na₂SO₄ ter uparimo.

Opis: beli kristalčki

Rf: 0,53 (DKM:MeOH, 9:1 + 0,5% TEA)

Izkoristek: 86,4%

T_f: 184-185 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.10 (s, 3H, pirazol-CH₃), 2.14 (s, 3H, pirazol-CH₃), 5.27 (s, 2H, CH₂), 5.87 (s, 1H, pirazol-H), 7.16 (d, *J* = 8.15 Hz, 2H, Ar-H), 7.89 (d, *J* = 8.15 Hz, 2H, Ar-H), 12.93 (s, 1H, COOH)

IR (cm⁻¹): 3447, 2923, 1699, 1693, 1625, 1268, 1120, 934, 752

Elementna sestava: C₁₃H₁₄N₂O₂

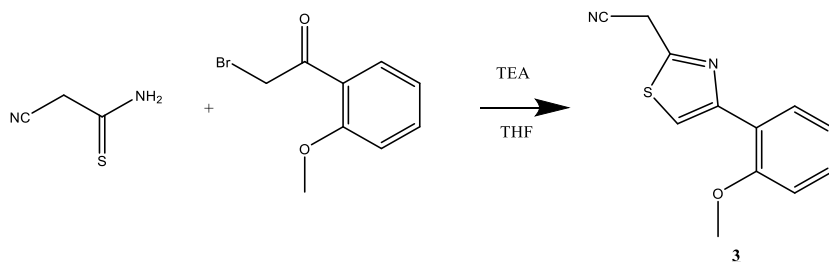
Mr: 230,26

MS (ESI): 231,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₃H₁₃N₂O₂ (m/z): 229,0977 (izračunana vrednost) / 229,0982 (izmerjeno)

4.2.3 Sinteza 2-(4-(2-metoksifenil)thiazol-2-il)acetonitrila

Reakcija:



2-cianoetanoamid (0,934 g; 9,3 mmol) in 2-bromo-1-(2-metiloksifenol)-etanon (2,190 g 98% zmesi; 9,3 mmol) raztopimo v 40 ml brezvodnega THF ter dodamo TEA (1,6 ml; 11,2 mmol; 1,2 equiv). Reakcijsko zmes pustimo na sobni temperaturi 6 ur. Pojavi se oborina, ki jo nato filtriramo. Filtrat najprej uparimo, nato raztopimo v 70 ml etilacetata. Organsko fazo spiramo z vodo (3 x 30 ml), nasičeno raztopino NaHCO₃, (3 x 30 ml), nasičeno NaCl (2 x 40 ml) in jo posušimo z Na₂SO₄. Topilo uparimo, preostanek pa očistimo na koloni. Kot mobilno fazo uporabimo etilacetat:heksan (1:3).

Opis: rumeni kristalčki

Rf: 0,27 (etil acetat:heksan, 1:3)

Izkoristek: 85%

T_i: 76 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3.93 (s, 3H, CH₃), 4.62 (s, 2H, CH₂), 7.06 (ddd, *J* = 7.7, 7.3, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.16 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (ddd, *J* = 8.4, 7.3, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.09 (s, 1H, thiazol-H), 8.13 (dd, *J* = 7.7, 1,8 Hz, 1H, Ar-H)

IR (cm⁻¹): 3010, 2940, 2840, 2262, 1576, 1474, 1240, 1020, 753

Elementna sestava: C₁₂H₁₁N₂OS

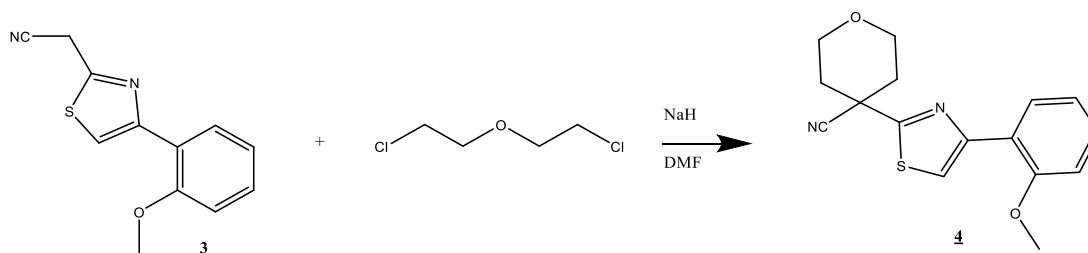
Mr: 230, 29

MS (ESI): 231,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₂H₁₁N₂OS (m/z): 231,0592 (izračunana vrednost) / 231,0588 (izmerjeno)

4.2.4 Sinteza 4-(4-(2-metoksifenil)thiazol-2-ij)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



V bučko preprihano z argonom natehtamo spojino **3** (1,760 g; 7,6 mmol), dodamo 2-kloroetileter (0,9 ml; 7,6 mmol) ter brezvodni THF (10 ml). Bučko postavimo na ledeno kopel in med mešanjem dodamo NaH (0,612 g 60% mešanice s parafinom; 15,3 mmol; 2 equiv). Za izboljšanje topnosti dodamo še 2 ml dietiletra. Po 45 minutah umaknemo ledeno kopel in pustimo, da se reakcijska zmes meša na sobni temperaturi še 24 ur. Nato dodamo reakcijski zmesi 100 ml vode ter ekstrahiramo z DKM (3 x 50 ml). Organsko fazo spiramo z amonijevim kloridom (2 x 40 ml), posušimo (Na₂SO₄) in uparimo. Produkt očistimo na koloni, za mobilno fazo uporabimo etilacetat:heksan (1:3).

Opis: rumena kristalinična snov

Rf: 0,29 (etil acetat:heksan, 1:3)

Izkoristek: 66,7%

T_i: 88 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.08-2.46 (m, 4H, CH₂CH₂O), 3.90 (ddd, *J* = 12.4, 11.2, 2.6 Hz, 2H, CH₂CH₂O), 3.97 (s, 3H, CH₃), 4.09 (ddd, *J* = 6.9, 3.8, 2.6 Hz, 2H, CH₂CH₂O), 7.01 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (ddd, *J* = 7.8, 7.3, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (s, 1H, tiazol-H), 8.28 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, Ar-H).

IR (cm⁻¹): 2968, 2851, 2244, 1582, 1498, 1246, 1020, 751

Elementna sestava: C₁₆H₁₆N₂O₂S

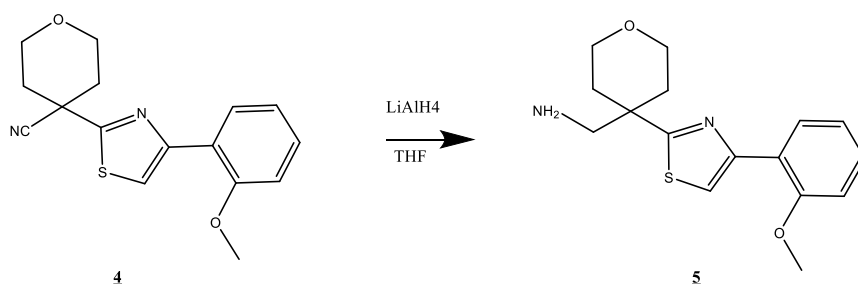
Mr: 300,38

MS (ESI): 301,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₆H₁₇N₂O₂S (m/z): 301,1011 (izračunana vrednost) / 301,1006 (izmerjeno)

4.2.5 Sinteza (4-(4-(2-metoksifenil)thiazol-2-il)tetrahydro-H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



LiAlH₄ (0,475 g; 12,5 mmol; 5 equiv) na ledeni kopeli raztopimo v 10 ml brezvodnega THF ter prepriamo z argonom. Dodamo spojino **4** (0,750 g; 2,5 mmol) ter po 30 minutah umaknemo ledeno kopel in pustimo, da se reakcijska zmes meša na sobni temperaturi še 2 uri. Nato dodamo 1M NaOH (5 ml), dodamo še vodo (20 ml) in ekstrahiramo z DKM. Organsko zmes posušimo z Na₂SO₄ in uparimo. Produkt čistimo na koloni, za mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1 + 0,5% TEA).

Opis: oranžno olje

Rf: 0,20 (DKM:MeOH, 15:1 + 0,5% TEA)

Izkoristek: 13%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.80-1.95 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.05-2.15 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.78 (s, 2H, NH₂), 3.40-3.50 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.60-3.80 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃), 7.04 (ddd, *J* = 8.0, 7.2, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.32 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (s, 1H, thiazol-H), 8.15 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, Ar-H).

Elementna sestava: C₁₆H₂₀N₂O₂S

Mr: 304,41

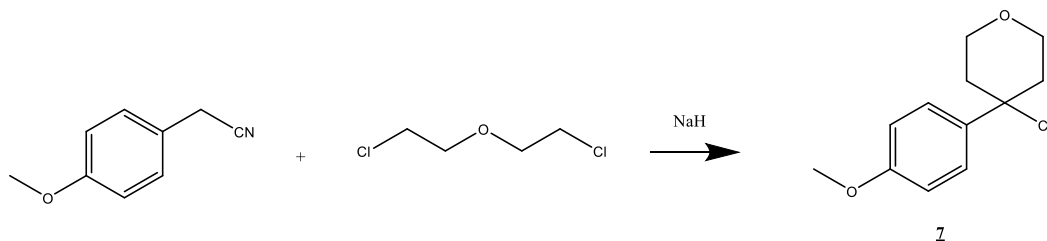
MS (ESI): 517,2 [M+H]⁺

HR-MS za C₂₉H₃₃N₄O₃S (m/z): 517,2273 (izračunana vrednost) / 517,2266 (izmerjeno)

4.3 SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-(4-METOKSIFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA

4.3.1 Sinteza 4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



4-metoksi-benzilcianid (0,7 ml; 5 mmol) in 2-kloroetileter (0,6 ml; 5 mmol) raztopimo v 5 ml brezvodnega DMF ter damo na ledeno kopel. Prepihamo z argonom, nato dodamo NaH (0,4 g; 10 mmol; 2 equiv). Po 90 minutah reakcijsko zmes segrejemo na 55°C in pustimo čez noč. Reakcijski zmesi dodamo 100 ml 5% citronske kisline in ekstrahiramo z DKM ter uparimo. Čistimo na koloni z mobilno fazo etilacetat:heksan (1:3).

Opis: rumeno viskozno olje

Izkoristek: 64%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.00-2.20 (m, 4H, CH₂CH₂O), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.85-3.95 (m, 2H, CH₂CH₂O), 4.00-4.15 (m, 2H, CH₂CH₂O), 6.93 (dd, 2H, *J* = 6.8, 2.4 Hz, Ar-H), 7.39 (dd, 2H, *J* = 6.8, 2.4 Hz, Ar-H).

Elementna sestava: C₁₃H₁₅NO₂

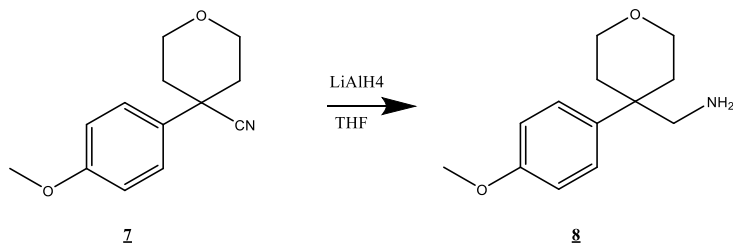
Mr: 217,27

MS (ESI): 217,1 [M+H]⁺

HR-MS za C₁₃H₁₅NO₂ (m/z): 217,1103 (izračunana vrednost) / 217,1101 (izmerjeno)

4.3.2 Sinteza (4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



Na ledeni kopeli zmešamo LiAlH_4 (0,481 g; 12,7 mmol; 5 equiv) z desetimi mililitri brezvodnega THF. Bučko prepriamo z argonom in dodamo spojino **7** (0,545 g; 2,53 mmol). Po 30 minutah damo reakcijsko zmes na sobno temperaturo za dve uri. Prebitni LiAlH_4 nevtraliziramo z 1M NaOH (5 ml). Nastane oborina, ki jo odfiltriramo in spiramo s THF. Filtrat uparimo, ostanek raztopimo v etilacetatu, posušimo s sušilnim sredstvom in spet uparimo. Ostanek čistimo na koloni z mobilno fazo DKM:MeOH (15:1) z 0,5% TEA.

Opis: rumen prašek

Rf: 0,3 (DKM:MeOH, 9:1)

Izkoristek: 79%

T_f: 52-55 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.68-1.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.90-2.00 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.58 (s, 2H, CH_2NH_2), 3.24-3.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.60-3.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 6.86-6.94 (m, 2H, Ar-H), 7.20-7.26 (m, 2H, Ar-H).

IR (cm⁻¹): 3375, 3035, 2849, 1608, 1517, 1258, 1032, 822

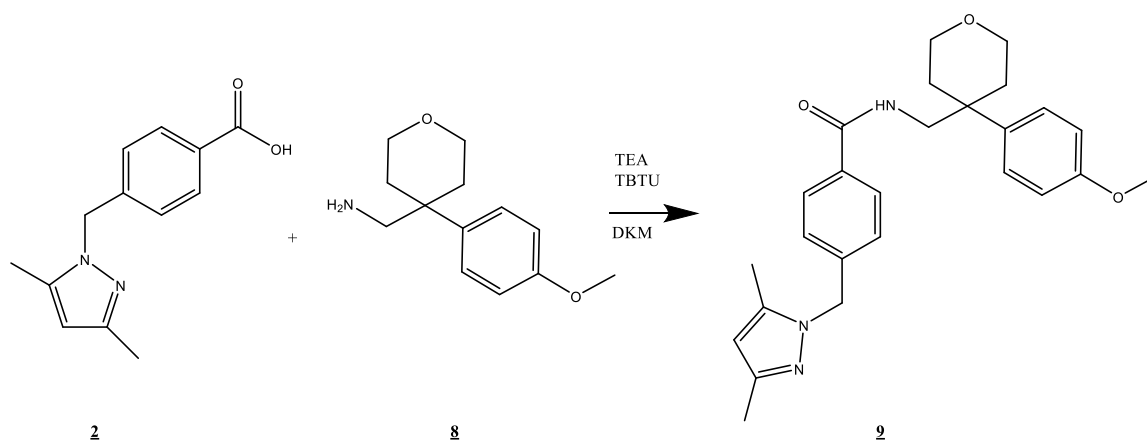
Elementna sestava: C₁₃H₁₉NO₂

Mr: 221,3

HR-MS za C₁₃H₂₀NO₂ (m/z): 222,1494 (izračunana vrednost) / 222,1498 (izmerjeno)

4.3.3 Sinteza 4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)-N-((4-(4-metoksifenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)benzamida

Reakcija:



Kislino **2** (0,208 g; 0,9 mmol) raztopimo v 10 ml DKM, damo na ledeno kopel ter dodamo TEA (0,38 ml; 2,7 mmol; 3 equiv) in TBTU (0,388 g; 1,17 mmol; 1,3 equiv). Po 15 minutah po kapljicah dodamo spojino **8** (0,200 g; 0,9 mmol), ki smo jo predhodno raztopili v DKM (3 ml). Pustimo 10 minut, nato damo reakcijsko zmes na sobno temperaturo še za dve uri. Reakcijsko zmes damo v lij ločnik, dodamo 60 ml DKM in spiramo z 1M HCl (3 x 20 ml), NaHCO₃ (3 x 20 ml), NaCl (2 x 20 ml) ter amonijevim kloridom (6 x 20 ml). Prekristaliziramo iz zmesi topil etilacetat/heksan.

Opis: olje

Rf: 0,45 (DKM:MeOH, 9:1)

Izkoristek: 34%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.88-1.98 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.04-2.12 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.12 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H, pirazol-CH₃), 2.25 (s, 3H, pirazol-CH₃), 3.58-3.66 (m, 4H, CH₂CH₂O), 3.81-3.90 (m, 5H, OCH₃, CONHCH₂), 5.23 (s, 2H, pirazol-CH₂), 5.63 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 5.67 (s, 1H, pirazol-H), 6.93-6.98 (m, 2H, Ar-H), 7.04-7.09 (m, 2H, Ar-H), 7.23-7.28 (m, 2H, Ar-H), 7.47-7.53 (m, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.63, 13.36, 33.18, 40.63, 49.49, 51.20, 54.90, 63.42, 105.09, 113.70, 126.56, 127.54, 128.04, 133.84, 135.47, 138.83, 140.90, 146.20, 157.32, 166.47.

Elementna sestava: C₂₆H₃₁N₃O₃

Mr: 433,55

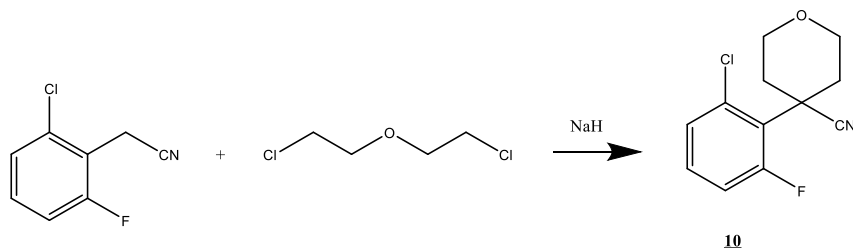
MS (ESI): 434,2 [M+H]⁺

HR-MS C₂₆H₃₂N₃O₃ (m/z): 434,2444 (izračunana vrednost) / 434,2433 (izmerjeno)

4.4 SINTEZA N-((-4-(2-KLORO-6-FLUOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA

4.4.1 Sinteza 4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



Bučko najprej preprihomo z argonom, dodamo 2-kloro-6-fluorofenilacetonitril (0,865 g; 5 mmol) ter 2-kloroetilen (0,6 ml; 5 mmol), 10 ml DMF ter mešamo na ledu. Nato dodamo NaH (0,400 g; 10 mmol; 2 equiv). Reakcijsko zmes pustimo na ledu pod argonom. Po 45 minutah reakcijsko zmes segrejemo na 55 °C in pustimo čez noč. Reakcijsko zmes zmešamo s 100 ml 5% citronske kisline in ekstrahiramo z DKM (3 x 50 ml). Organsko fazo uparimo in surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo uporabimo etilacetat:heksan (1:3).

Opis: rumen prašek

Izkoristek: 52%

T_i: 90-94 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.32-2.40 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.46-2.47 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.69-3.76 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.98-4.02 (m, 2H, CH₂CH₂O), 7.28-7.34 (ddd, *J* = 2.29, 7.48, 13.76, 1H, Ar-H), 7.47-7.51 (m, 2H, Ar-H).

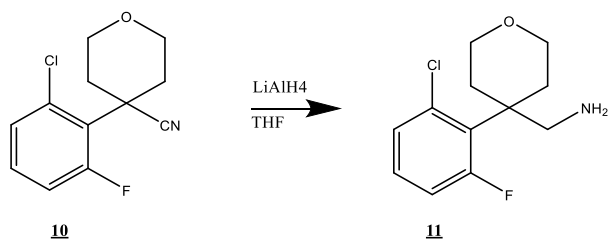
Elementna sestava: C₁₂H₁₁ClFNO

Mr: 239,67

HR-MS za C₁₂H₁₂NOCIF (m/z): 240,0591 (izračunana vrednost) / 240,0597 (izmerjeno)

4.4.2 Sinteza (4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



LiAlH₄ (0,399 g; 10,5 mmol; 5 equiv) suspendiramo v brezvodnem THF (20 ml) na ledu ter preprihamo z argonom. Dodamo spojino **10** (0,500 g; 2,1 mmol). Po 30 minutah damo reakcijsko zmes na sobno temperaturo za dve uri. Nato reakcijo ustavimo in presežni LiAlH₄ nevtraliziramo z 1M NaOH (9 ml). Oborino odfiltriramo in spiramo s THF. THF uparimo, preostanek raztopimo v etilacetatu, posušimo s sušilnim sredstvom in ponovno uparimo. Ostanek čistimo na koloni. Kot mobilno fazo najprej uporabimo etilacetat:heksan v razmerju (1:1) z dodatkom TEA (spojina **13**). Nato uporabimo še DKM:MeOH (15:1) prav tako z dodatkom TEA (spojina **11**). Obe spojini se na TLC obarvata z ninhidrinom.

Opis: olje (produkt brez fluora je bel kristaliničen prašek)

Rf (produkt brez fluora, **13):** 0,22 (etil acetat: heksan, 1:1 + 0,5% TEA)

Rf (11**):** 0,21 (DKM:MeOH, 15:1 + 0,5% TEA)

Izkoristek: 39%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.20-1.21 (s, 2H, NH₂), 1.83-1.90 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.28-2.33 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.99 (s, 2H, CH₂NH₂), 3.55-3.61 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.80-3.86 (m, 2H, CH₂CH₂O), 7.02-7.08 (m, 1H, Ar-H), 7.12-7.17 (m, 1H, Ar-H), 7.22-7.24 (m, 1H, Ar-H).

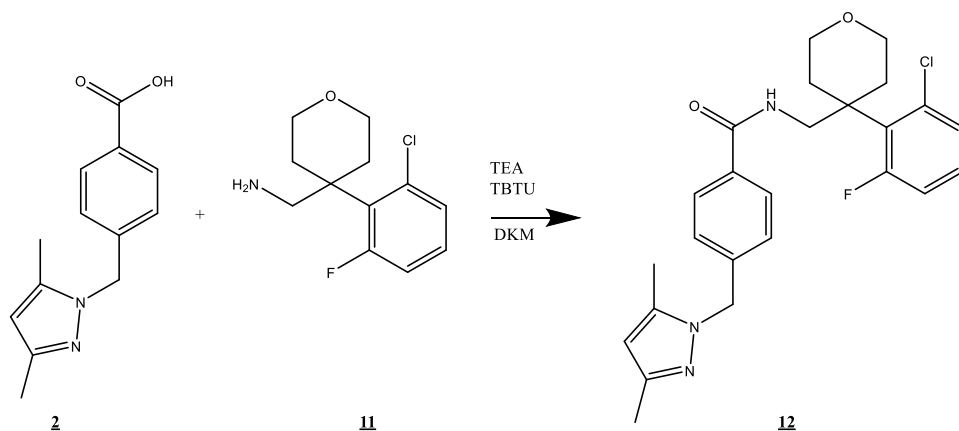
Elementna sestava: C₁₂H₁₅ClFNO

Mr: 243,71

HR-MS za C₁₂H₁₆NOCIF (m/z): 244,0904 (izračunana vrednost) / 244,0911 (izmerjeno)

4.4.3 Sinteza N-((-4-(2-kloro-6-fluorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)-4-((3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)metil)benzamida

Reakcija:



Kislino **2** (0,111 g; 0,48 mmol) raztopimo v 10 ml DKM ter dodamo TEA (0,2 ml; 1,44 mmol, 3 equiv), ohladimo na ledeni kopeli, nato dodamo TBTU (0,207 g; 0,62 mmol; 1,3 equiv). Po 15 minutah dodamo spojino **11** (0,117 g; 0,48 mmol), ki jo predhodno raztopimo v 5 ml DKM. Po 10 minutah dodamo zmes na sobno temperaturo za 150 minut. Organsko fazo spiramo z 1M HCl (3 x 20 ml), NaHCO₃ (3 x 20 ml), NaCl (2 x 30 ml) ter amonijevim kloridom (5 x 20 ml). Nato posušimo s sušilnim sredstvom in uparimo topilo. Čistimo na koloni. Kot mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1). Sledi prekrizalizacija iz etil acetata in heksana.

Opis: olje

Rf: 0,31 (DKM:MeOH, 15:1)

Izkoristek: 63%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.87-1.92 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.08-2.16 (m, 8H, CH₂CH₂O, pirazol-CH₃), 3.32-3.43 (m, 2H, CONHCH₂), 3.60-3.61 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.74-3.79 (m, 2H, CH₂CH₂O), 5.20 (s, 2H, pirazol-CH₂), 5.89 (s, 1H, pirazol-H), 7.10-7.14 (m, 3H, Ar-H), 7.26-7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.58-7.60 (d, *J* = 7.57, 2H, Ar-H), 8.16 (s, 1H, CONH).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 105.08, 116.65, 124.09, 126.51, 127.48, 128.56, 130.06, 133.79, 138.82, 140.90, 146.20, 160.55, 163.00, 166.46

Elementna sestava: C₂₅H₂₇ClFN₃O₂

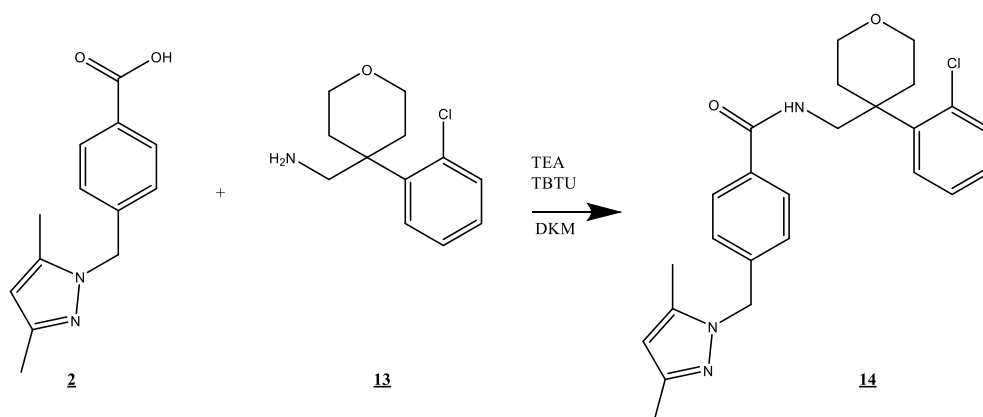
Mr: 455,9

MS (ESI): 456,2 [M+H]⁺

HR-MS za C₂₅H₂₈N₃O₂ClF (m/z): 456,1854 (izračunana vrednost) / 456,1865 (izmerjeno)

4.5 SINTEZA N-((4-(2-KLOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA

Reakcija:

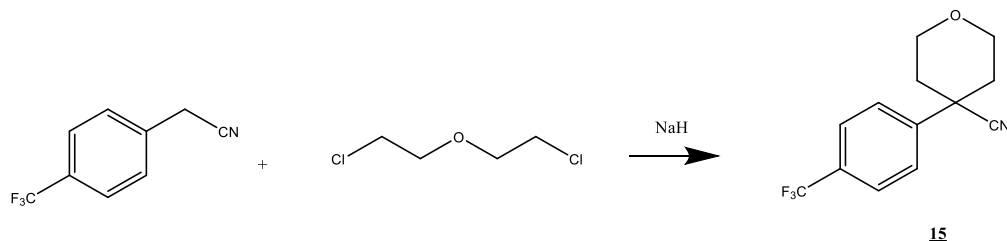


Kislino (0,101 g; 0,44 mmol) raztopimo v 10 ml DKM ter dodamo TEA (0,19 ml; 1,32 mmol; 3 equiv), ohladimo na ledeni kopeli ter nato dodamo TBTU (0,189 g; 0,572 mmol; 1,3 equiv). Po 15 minutah dodamo amin **13** (0,100 g; 0,44 mmol), ki ga predhodno raztopimo v 5 ml DKM. Po 10 minutah dodamo zmes na sobno temperaturo za 150 minut. Organsko fazo spiramo z 1M HCl (3 x 20 ml), NaHCO₃ (3 x 20 ml), NaCl (2 x 30 ml) ter amonijevim kloridom (5 x 20 ml). Nato posušimo s sušilnim sredstvom in uparimo topilo. Čistimo na koloni, kot mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1). Sledi prekristalizacija iz etilacetata in heksana.

Kljub čiščenju na koloni in prekristalizaciji produkt ni bil dovolj čist.

4.6 SINTEZA N-((4-(4-TRIFLUOROMETIL)FENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA

4.6.1 Sinteza 4-(4-(trifluorometil)fenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila Reakcija:



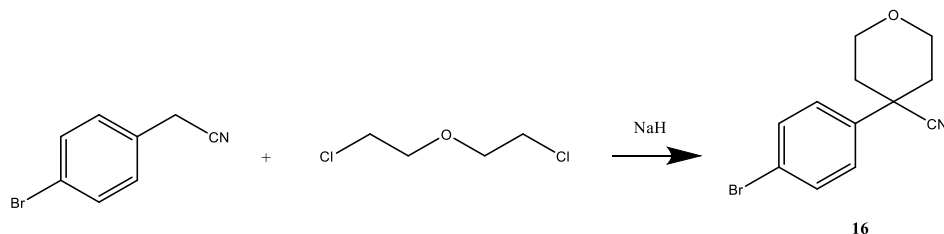
V bučko natehtamo 4-trifluorometilbenzilcianid (0,944 g; 5 mmol), 2-kloroetilen (0,7 ml; 6 mmol; 1,2 equiv), dolijemo brezvodni DMF (5 ml), prepriamo z argonom in damo na ledeno kopel. Po 30 minutah dodamo NaH (0,400 g; 12 mmol; 2,4 equiv) in pustimo reakcijsko zmes še 90 minut na ledu. Nato jo segrejemo na 55 °C in pustimo čez noč. Dodamo 100 ml amonijevega klorida in vodno fazo ekstrahiramo z DKM (3 x 50ml), nato organske faze še enkrat spiramo z amonijevim kloridom, posušimo z Na₂SO₄ ter uparimo. Naredimo še kolono z mobilno fazo etilacetat:heksan (1:3).

Reakcija je bila neuspešna, spojine nismo izolirali s kolone.

4.7 SINTEZA N-((4-(4-BROMOFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA

4.7.1 Sinteza 4-(4-bromofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



4-bromo-benzilcianid (1 g; 5 mmol) in 2-kloroetileter (0,6 ml; 5 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (5 ml) ter ohladimo na ledeni kopeli. Prepihamo z argonom, nato dodamo NaH (0,400 g; 10 mmol; 2 equiv). Po 90 minutah reakcijsko zmes segrejemo na 55 °C in pustimo čez noč. Reakcijski zmesi dodamo 100 ml vode ter NaCl in ekstrahiramo z DKM (3 x 50 ml). Organske faze spiramo z amonijevim kloridom (6 x 20 ml), posušimo in uparimo. Dobimo oljnato zmes. Prekristaliziramo iz zmesi topil etilacetat:heksan (1:3).

Opis: oranžni kristalčki

Rf: 0,3 (etil acetat:heksan, 1:3)

Izkoristek: 52,4%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.03-2.08 (m, 4H, CH₂CH₂O), 3.61-3.68 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.99-4.03 (m, 2H, CH₂CH₂O), 7.51-7.53 (m, 2H, Ar-H), 7.64-7.67 (m, 2H, Ar-H)

IR (cm⁻¹): 2963, 2848, 2235, 1652, 1490, 1242, 1008,809

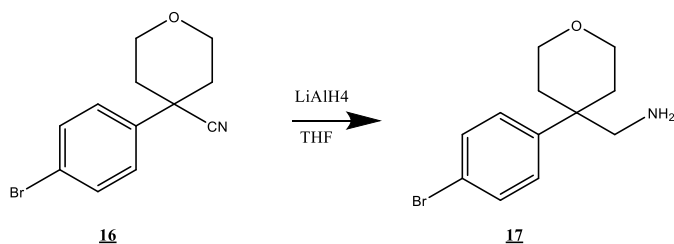
ESI: 280,0 [M+H]⁺

Elementna sestava: C₁₂H₁₂BrNO

Mr: 266,13

4.7.2 Sinteza (4-(4-bromofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



LiAlH₄ (0,357 g; 9,4 mmol; 5 equiv) na ledeni kopeli raztopimo v 10 ml brezvodnega THF ter prepihamo z argonom. Dodamo spojino **16** (0,500 g; 1,88 mmol) ter po 30 minutah damo reakcijsko zmes na sobno temperaturo in mešamo še dve uri. Nato reakcijo ustavimo z dodatkom 1M NaOH, dodamo še vodo in ekstrahiramo z DKM. Organsko zmes speremo z nasičeno raztopino NaCl, posušimo z Na₂SO₄, uparimo in naredimo kolono. Kot mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1 + 0,5% TEA).

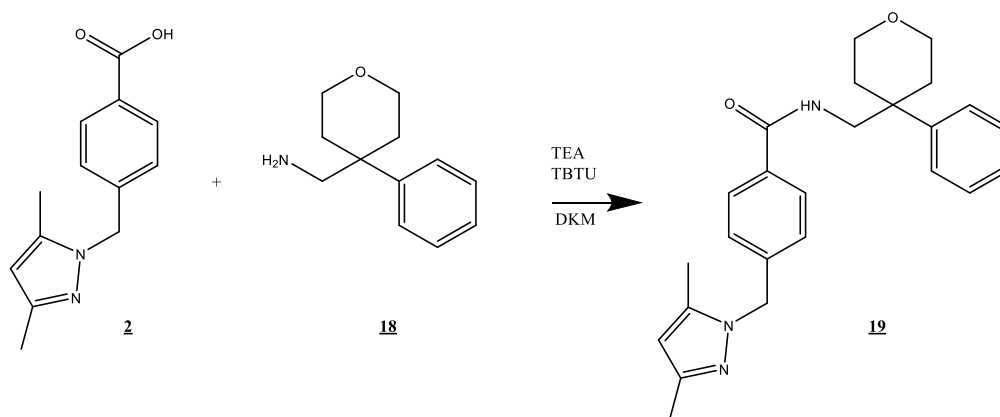
Opis: olje - zmes želenega produkta (le 0,2 ekvivalenta) ter produkta z odstranjenim bromom **18**

Rf: 2,8 (DKM:MeOH, 15:1 + 0,5% TEA)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) za **18:** 1.12 (s, 2H, NH₂), 1.80-1.87 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.14-2.20 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.80 (s, 2H, CH₂NH₂), 3.52-3.58 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.76-3.83 (m, 2H, CH₂CH₂O), 7.23-7.27 (m, 1H, Ar-H), 7.29-7.31 (dd, *J* = 1.34, 8.55 Hz, 2H, Ar-H), 7.36-7.40 (m, 2H, Ar-H)

4.8 SINTEZA 4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)-N-((4-FENILTETRAHIDRO-2H-PIRAN-4-IL)METIL)BENZAMIDA

Reakcija:



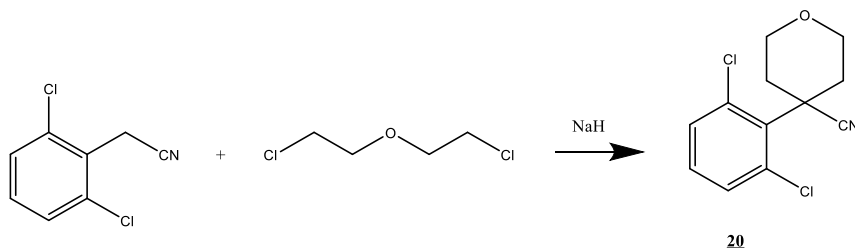
Kislino **2** (0,226 g; 0,92 mmol) raztopimo v 10 ml DKM ter dodamo TEA (0,38 ml; 2,76 mmol; 3 equiv), ohladimo na ledeni kopeli in nato dodamo TBTU (0,396 g; 1,2 mmol; 1,3 equiv). Po 15 minutah dodamo amin **18** (0,226 g; 0,92 mmol), ki ga predhodno raztopimo v 5 ml DKM. Po 10 minutah dodamo zmes na sobno temperaturo za 150 minut. Organsko fazo spiramo z 1M HCl (3 x 20 ml), NaHCO₃ (3 x 20 ml), NaCl (2 x 30 ml) ter amonijevim kloridom (5 x 20 ml). Nato posušimo s sušilnim sredstvom in uparimo. Čistimo na koloni. Kot mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1). Produkt ni dovolj čist.

Rf: 0,26 (DKM:MeOH, 15:1)

4.9 N-((-4-(2,6-DIKLOROFENIL)TETRAHIDRO-2H-PIRAN-4IL)-4-((3,5-DIMETIL-1H-PIRAZOL-1-IL)METIL)BENZAMIDA

4.9.1 Sinteza 4-(2,6-diklorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-karbonitrila

Reakcija:



2,5-dikloro-benzilcianid (0,959 g; 5 mmol) in 2-kloroetileter (0,6 ml; 5 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (5 ml) ter damo na ledeno kopel. Prepriamo z argonom ter dodamo NaH (0,400 g; 10 mmol; 2 equiv). Po 90 minutah reakcijsko zmes segrejemo na 55 °C in pustimo čez noč. Reakcijski zmesi dodamo 100 ml 5% citronske kisline in ekstrahiramo z DKM ter uparimo. Prekristaliziramo iz etilacetat:heksan (1:3). Nastane bela oborina (se ne obori v celoti).

Opis: bel prašek

Rf: 0,3 (etilacetat:heksan, 1:3)

Izkoristek: 52%

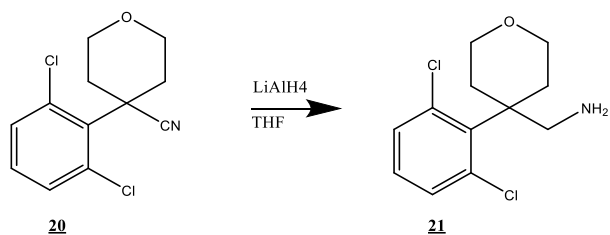
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 2.56-2.61 (m, 2H, CH₂CH₂O), 2.68-2.76 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.98-4.10 (m, 4H, CH₂CH₂O), 7.17-7.21 (dd, *J* = 7.64, 8.40 Hz, 1H, Ar-H), 7.38-7.40 (d, *J* = 8.10, 2H, Ar-H)

Elementna sestava: C₁₂H₁₁Cl₂NO

Mr: 256,13

4.9.2 Sinteza (4-(2,6-diklorofenil)tetrahidro-2H-piran-4-il)metanamina

Reakcija:



LiAlH_4 (0,437 g; 11,5 mmol; 5 equiv) na ledeni kopeli raztopimo v brezvodnem THF (10 ml) ter prepriamo z argonom. Dodamo spojino **20** (0,589 g; 2,3 mmol) ter po 30 minutah damo reakcijsko zmes na sobno temperaturo in mešamo še dve uri. Reakcijo ustavimo z dodatkom 1M NaOH, dodamo še malo vode in ekstrahiramo z DKM. Organsko zmes posušimo z Na_2SO_4 , uparimo in spojino čistimo na koloni, za mobilno fazo uporabimo DKM:MeOH (15:1 + 0,5% TEA). Dobimo dve frakciji **21** in **13** (brez enega klora). Količinsko prevladuje frakcija **13**.

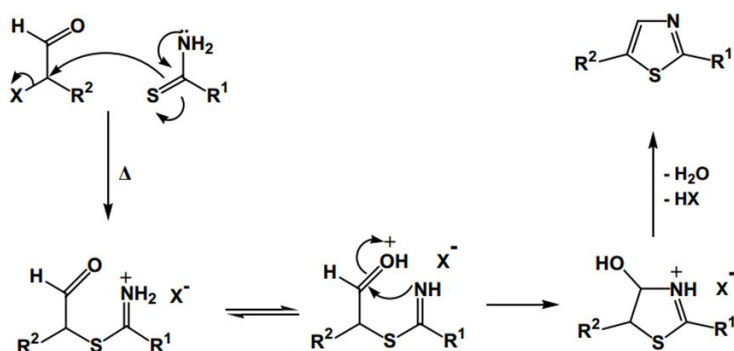
Rf: 0,2 in 0,6 (DKM:MeOH, 15:1 + 0,5% TEA)

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZNI POSTOPKI

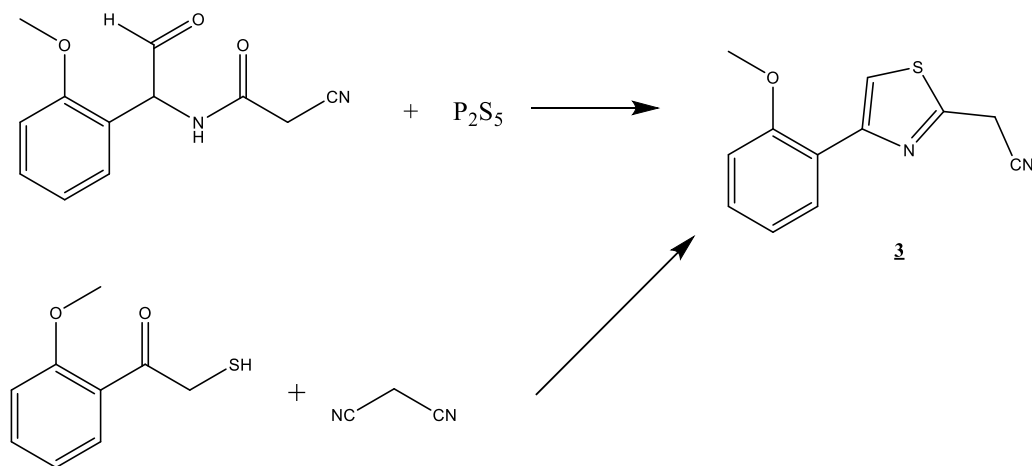
5.1.1 SINTEZA TIAZOLA

Tiazoli so pet-členski aromatski obroči ter pomembni gradniki zdravilnih učinkovin, biocidov, fungicidov in barvil. V naravi najdemo tiazolni obroč v molekuli tiamina (vitamin B1). Za farmacevtsko kemijo je tiazolov obroč zanimiv pri načrtovanju učinkovin kot bioizosterna zamenjava za pirazol, imidazol in piridin ter izosterna zamenjava za amid. Najpogosteje uporabljena metoda za sintezo tiazolov je Hantzscheva metoda, katero smo uporabili tudi mi. Gre za reakcijo med α -halo ketoni ali α -halogenoaldehidi ter tioamidi (lahko uporabimo tudi tiosečnine, tiokarbamate in ditiokarbamate). Tako pridemo do različno substituiranih tiazolov na mestih 2, 4 in 5. Slika 11 prikazuje mehanizem reakcije.



Slika 11: Mehanizem Hantzscheve sinteze tiazolov [povzeto po(29)].

TEA v reakcijski zmesi služi nevtralizaciji HBr, ki nastane med reakcijo. Pri tej reakciji nismo imeli večjih težav, razen tega, da je bil reagent 2-cianoetantioamid star. Naročili smo nov reagent, lahko bi ga pripravili in situ iz ustreznega amida ter P_2S_5 ali Lewassonovega reagenta. Za sintezo tiazolov imamo na voljo še druge metode, vendar ne dajejo tako dobrih izkoristkov. Na sliki 12 sta prikazani alternativni sintezni poti(30).



Slika 12: Prikaz alternativnih reakcij za sintezo 2-(4-(2-metoksifenil)thiazol-2-il)acetonitrila.

5.1.2 SINTEZA TETRAHIDROPIRANSKEGA OBROČA

Tetrahidropiranski obroč smo v molekulo uvedli tako, da smo z NaH (močna baza) deprotonirali kislino metilensko skupino. Nastali karboanion kot nukleofil reagira z elektrofilnim C atomom 2-kloroetiletra. Reakcija poteče dvakrat in obroč je sklenjen. Izkoristki pri reakcijah so bili med 52 in 88 %. Po rezultatih masne analize spojine **16** bi lahko sklepali, da je prišlo do hidrolize nitrila do amida. Ker smo na IR spektru zasledili signal za ciano skupino in na NMR spektru ni bilo opaziti signala za amidna vodika, lahko sklepamo, da je do hidrolize prišlo kasneje oziroma med pripravo vzorca in procesom ionizacije.

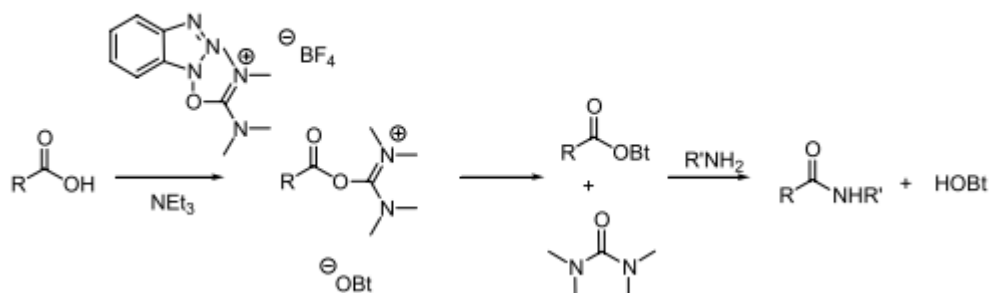
5.1.3 REDUKCIJA NITRILA

Za redukcijo nitrila smo uporabili metodo z močnim donorjem hidrida, ki je poleg katalitskega hidrogeniranja običajna metoda za pripravo aminov. Kot vir nukleofilnih hidridov smo uporabili $LiAlH_4$. Slabosti metode so eksplozivnost reagenta ob stiku z vodo, posledični nujna uporaba brezvodnih topil, majhna selektivnost, temperaturna občutljivost ter tvorba soli kot stranskih produktov. Pri sintezi spojine **5** je bil izkoristek le 13%, kar je občutno premalo glede na podatke iz strokovne literature. Najverjetneje so za tako slab izkoristek krivi kompleksi med našim produktom in aluminijem, ki nastanejo po koncu

reakcije in jih je potrebno razbiti. Slednje smo naredili z dodatkom NaOH, kar pa glede na izkoristek ni najbolj optimalno. Zato smo pri sintezi spojine **8** spremenili postopek izolacije. Reakcijske zmesi nismo ekstrahirali z DKM, ampak smo najprej uparili THF, ostanek raztopili v etilacetatu, posušili s sušilnim sredstvom ter še enkrat uparili. Izkoristek je bil 79%. Kasneje so se težave pojavile pri spojinah s halogeni na aromatskem obroču **11**, **17** in **21** saj je LiAlH₄ tako močan reducent, da je prišlo do delnega ali popolnega dehalogeniranja aromатов. Lahko bi uporabili alternativne metode z blažjimi hidridnimi reducenti; NaBH₄ ob dodatku katalitičnih količin soli nekaterih prehodnih kovin npr Ni(II) in Co(II) (in situ nastanejo nikljevi oziroma kobaltovi hidridi), DIBAL-a ali LiBH₄(31). V literaturi je opisana metoda z uporabo tetrametildisiloksana (TMDS) aktiviranega z titanovim(V)izopropoksidom Ti(OiPr)₄. Prednosti metode so visoki izkoristki, uporabnost pri halogeniranih aromatskih nitrilih, nizka cena reagenta ter nereaktivnost stranskih produktov(32). Kot hitra metoda se je glede na literaturo izkazala uporaba hidrazinijevega monoformiata (N₂H₄ HCOOH) v prisotnosti Raney Ni(33). Uporabo katalitskega hidrogeniranja v našem primeru omejuje uporaba visokih tlakov in nastajanje sekundarnih ter terciarnih aminov.

5.1.4 SINTEZA AMIDNE VEZI

Zadnja stopnja pri sintezi naših spojin je bila tvorba amidne vezi. Vez nastane ob nukleofilnem napadu amino skupine na aktiviran karbonilni ogljikov atom, s sledečim izstopom izstopajoče skupine. Da poteče kondenzacija je potrebno aktivirati karboksilno kislino. Uporabili smo sklopitveni reagent TBTU (*N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat), ki generira reaktivne intermediate benzotriazol-1-il estre.



Slika 13: Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU [povzeto po(34)].

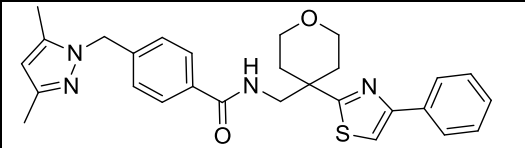
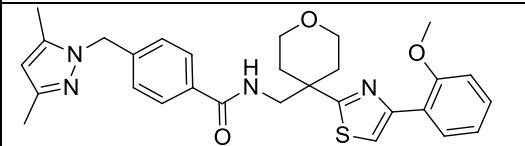
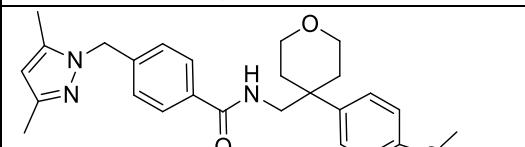
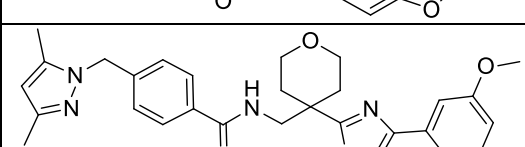
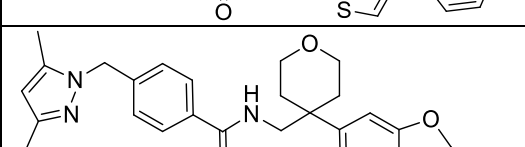
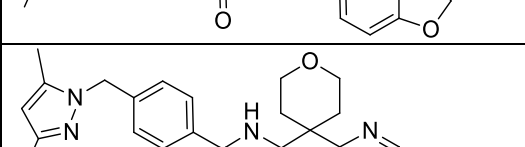
Težave smo imeli z izolacijo oziroma čiščenjem spojin, saj je nastal stranski produkt tetrametil urea (na NMR spektru signal 2,8 ppm), katerega nismo uspeli odstraniti. Kljub spiranju organskih faz z amonijevim kloridom, čiščenju na koloni ter prekrystalizaciji spojina

12 ni bila dovolj čista (89,4 %), da bi jo lahko poslali na testiranje. Pri spojinah **14** in **19** je bila izolacija še težja, saj sta že izhodni spojini **13** in **18** imeli številne stranske produkte, ki so nastali ob redukciji nitrila do amina. Morda bi bilo smiselno uporabiti EDC kot sklopitveni reagent, čeprav je malenkost dražji. Sečninski derivat, ki nastane pri uporabi omenjenega sklopitvenega reagenta vsebuje amino skupino tako, da se ga je mogoče znebiti z enostavnim spiranjem z vodno raztopino kisline.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA

Na testiranje smo poslali le spojini **6** in **9**, ki sta bili več kot 95% čisti, kar smo preverili s HPLC. V spodnji tabeli so še tri spojine, ki so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo in imajo spremenjen desni del molekule glede na izhodno spojino.

Tabela I: Rezultati testiranih spojin

Spojina	Struktura	IC ₅₀ [μM]	MIC [μM]
zadetek		0,02	15,2
6		0,04	>125,0
9		6,38	>125,0
22		>10,0	>125,0
23		7,97	>125,0
24		>10,0	>125,0

Za napovedovanje odnosa med strukturo in delovanjem bi potrebovali veliko večji nabor spojin. Vseeno pa lahko sklepamo, da je tiazol pomemben za delovanje. Spojine brez tiazolovega obroča imajo kar za dva velikostna razreda višje vrednosti IC₅₀ kot spojina **6**. Ta

ima najboljšo inhibitorno aktivnost izmed vseh testiranih spojin. To bi z gotovostjo potrdili, če bi nam uspelo izolirati spojino **19**. Zanimivo, da je uvedba metoksi substituenta na meta mestu pri spojini **22** povzročila tako drastičen upad aktivnosti v primerjavi s spojino **6**. Čeprav je pri slednji vrednost IC_{50} le malenkost višja kot pri zadetku rešetanja, proti pričakovanju ni zavirala rasti bakterij. Odsotnost antituberkulotičnega delovanja si težko razložimo, saj sta si spojini zelo podobni, tako male spremembe v strukturi pa tudi ne bi smele toliko spremeniti sposobnosti prehajanja membran.

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo uspeli sintetizirati le dva, za testiranje dovolj čista derivata zadetka HTS rešetanja. Pri ostalih končnih spojinah smo imeli težavo s čistoto oz. izolacijo. Produkt je bil onesnažen s tetrametil sečnino, stranskim produktom pri sintezi amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU. Največjo težavo je predstavljala redukcija nitrila. LiAlH_4 se ni izkazal kot najbolj primeren reducent za redukcijo spojin s halogeni na aromatskem obroču. V razpravi smo podali nekaj alternativnih metod, ki bi jih vredno preizkusiti. Spojina **6** se je izkazala kot dober inhibitor encima InhA, z vrednost IC_{50} 40 nM, kar je za malenkost slabše od zadetka. Proti pričakovanju pa spojina ni izkazovala antituberkulotičnega delovanja. Možno, da je prišlo do napake pri testiranju spojine, zato bi predlagala ponovno sočasno testiranje derivatov zadetka HTS rešetanja. Spojina brez tiazolovega obroča **9** je praktično neaktivna. Tudi ostale spojine sintetizirane na katedri ne inhibirajo InhA. Za napovedovanje odnosa med strukturo in delovanjem imamo tako premajhen nabor spojin, vendar lahko glede na dosedanje rezultate sklepamo, da nadaljnji razvoj inhibitorjev ne bo dal zelenih rezultatov.

7 LITERATURA

1. **Košnik, Mitja, Andoljšek, Dušan in Lož, Gregor.** *Interna medicina*. 4. Ljubljana: Slovensko medicinsko društvo, 2011. str. 434-444.
2. **Gubina, Marija in Ihan, Alojz.** *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana : Medicinski razgledi, 2002.
3. **Lawn, Stephen D. in Alimuddin, Zumla I.** Tuberculosis. *The Lancet*. Julij 2011, str. 57-68.
4. **Alimuddin, Zumla, Raviglione, Mario in Hafner, Richard.** Tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*. Februar 2013, str. 745-753.
5. **World Health Organisation.** *Global Tuberculosis Report 2014*.
6. **Brooks, George F., in drugi.** *Jawetz, Melnick & Adelberg's microbiology*. 25th ed. New York : McGraw Hill Medical, 2010. str. 289-297.
7. **Lopez-Marin, Luz M.** Nanoprotein structures from Mycobacteria: Emerging Actors for Tuberculosis Control. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.
8. **Favrot, Lorenza in Ronning, Donald R.** Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. *Expert Reviews*. September 2012, str. 1023-1036.
9. **Brennan, Patrick J.** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 2003; 83, str. 91-97.
10. **Chatterjee, Delphi.** The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1997, 1, str. 579-588.
11. **Crick, Dean J., Mahapatra, Sebarata in Brennan, Patrick J.** Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology*. 2001, 11, str. 107-118.
12. **Barkan, Daniel, in drugi.** Redundant function of cmaA2 and mmaA2 in Mycobacterium tuberculosis cys cyclopropanation of oxygenated mycolates. *Journal of Bacteriology*. Julij 2010, str. 3661-3668.
13. **Takayama, Kuni, Wang, Cindy in Besra, Gurdyal S.** Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. Januar 2005, str. 81-101.
14. **Barry, Clifton E., in drugi.** Mycolic Acids: Structure, Biosynthesis and Physiological Functions. *Progress in Lipid Research*. 1998, 37, str. 143-179.
15. **Sullivan, Todd J., in drugi.** High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis. *ACS Chemical Biology*. Februar 2006.

16. **Lu, Hao in Tonge, Peter J.** Inhibitors of FabI, an Enzyme drug Target in the Bacterial Fatty Acids Biosynthesis Pathway. *Accounts of chemical research*. Januar 2008, str. 11-20.
17. **Luckner, Sylvia R, in drugi.** A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from Mycobacterium Tuberculosis. *The Journal of Biological Chemistry*. Maj 2010, str. 14330-14337.
18. **Rawat, Richa, Whitty, Adrian in Tonge, Peter J.** The isoniazid-NAD adduct is a slow, thight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *PANAS*. November 2003, str. 13881-13886.
19. **Pauli, Ivani, in drugi.** Discovery of New Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis InhA Enzyme Using Virtual Screening and a 3D-Pharmacophore-Based Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013.
20. **Pan , Pan.** [Elektronski] [Navedeno: 15. Februar 2015.]
https://dspace.sunyconnect.suny.edu/bitstream/handle/1951/59815/Pan_grad.sunysb_0771E_11060.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
21. **Rozwarki, Denise A, in drugi.** Crystal Structure of The Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD and C16 Fatty Acyl Substrate. *The Journal of Biological Chemistry*. Maj 1999, str. 15582-15589.
22. **Qumard, Annaik, in drugi.** Enzymatic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*. Julij 1995, str. 8235-8241.
23. **Delaine, Tamara, in drugi.** Preliminary Investigations of the Effect of Lipophilic Analogues of the Active Metabolite of Isoniazid Toward Bacterial and Plasmodial Strains. *Chemical Biology & Drug Design*. 2012; 79, str. 1001-1006.
24. **Bonnac, Laurent, in drugi.** Synthesis of 4-phenoxybenzamide adenine dinucleotide as NAD analogue with inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007, 17, str. 4588-4591.
25. **Argyrou, Argyrides, Vetting, Matthew W in Blanchard, John S.** New Insight into the Mechanism of Action of and Resistance to Isoniazid. *Journal of American Chemical Society*. Avgust 2007, str. 9582-9583.
26. **Marrakchi, Heida, Laneelle, Gilbert in Quemard, Annaik.** InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. 2000, 146, str. 289-296.
27. **TB Alliance.** Isoniazid. *Tuberculosis*. 2008, 88(2), str. 112-116.
28. **TB Alliance.** Ethionamide. *Tuberculosis*. 2008, 88(2), str. 106-108.

29. **He, Xin, Alian, Akram in Ortiz de Montellano, Paul R.** Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl acyl carrierprotein reductase InhA by arylamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, str. 6649-6658.
30. **Sharshira, E. M. in Hamada, N. M. M.** Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activities of some Thiazole Derivatives. *American Journal of Organic Chemistry*. 2012, 2, str. 69-73.
31. **Wipf, Peter in Venkatraman, Srikanth.** A New Thiazole Synthesis by Cyclocondensation of Thioamides and Alkynyl(Aryl)Iodonium Reagents. *Journal of Organic Chemistry*. 1996, 61, str. 8004-8005.
32. **Haddenham, Dustin, in drugi.** Reductions of Aliphatic and Aromatic Nitriles to Primary Amines with Diisopropylaminoborane. *Journal of Organic Chemistry*. 2009, (74), str. 1964-1970.
33. **Laval, Stephane, in drugi.** A mild and efficient method for the reduction of nitriles. *Journal of Organic Chemistry*. 2009, 50, str. 7005-7007.
34. **Gowda, Shankare in Gowda, Channe D.** Application of hydrazinium monoformate as new hydrogen donor with Raney nickel: a facile reduction of nitro and nitrile moieties. *Tetrahedron*. 2002, 58, str. 2211-2213.
35. **Montalbetti, Christian A. G. N. in Falque, Virginie.** Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005, 61, str. 10827-10852.