



RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

Vitalii Solomin

BAKTERIĀLO DIVKOMPONENTU SISTĒMU INHIBITORU SINTĒZE

Promocijas darba kopsavilkums

SYNTHESIS OF BACTERIAL TWO-COMPONENT SYSTEM INHIBITORS

Summary of the Doctoral Thesis

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte
Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts
Bioloģiski aktīvo savienojumu ķīmijas tehnoloģijas katedra

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY
Faculty of Materials Science and Applied Chemistry
Institute of Technology of Organic Chemistry
Department of Chemical Technology of Biologically Active Compounds

Vitalii Solomin

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorants
Doctoral Student of the Study Program “Chemistry”

**BAKTERIĀLO DIVKOMPONENTU SISTĒMU INHIBITORU
SINTĒZE**
**SYNTHESIS OF BACTERIAL TWO-COMPONENT SYSTEM
INHIBITORS**

Promocijas darba kopsavilkums
Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskais vadītājs
Scientific supervisor

professors *Dr. chem.* AIGARS JIRGENSONS
Professor *Dr. chem.* AIGARS JIRGENSONS

RTU Izdevniecība
RTU Press
Rīga 2023

Solomin V. Bakteriālo divkomponentu sistēmu inhibitoru sintēze.
Promocijas darba kopsavilkums.
Rīga: RTU Izdevniecība, 2023. 87 lpp.

Solomin, V. Synthesis of Bacterial Two-component System Inhibitors.
Summary of the Doctoral Thesis.
Riga: RTU Press, 2023. 87 p.

Iespiests saskaņā ar RTU promocijas
padomes “RTU P-01” 2023. gada
3. maija lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/45.

Published in accordance with the decision
of the Promotion Council “RTU P-01” of
3 May 2023, Minutes No. 04030-9.1/45.

<https://doi.org/10.7250/9789934229435>

ISBN 978-9934-22-943-5 (pdf)

PATEICĪBAS

Īpašs paldies:

- *Dr. chem.* Aigaram Jirgensonam par promocijas darba vadīšanu un padomiem;
- *Dr. chem.* Annai Ņikitjukai par manuskripta pārlasīšanu!

Pētījums veikts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā, izmantojot Eiropas Savienības programmas *Horizon 2020* projekta *Combating Antimicrobial Resistance Training Network (CARTNET)*, finansējumu. Marijas Sklodovskas-Kirī grantu līgums Nr. 765147.

AKNOWLEDGMENTS

My special thanks to:

- *Dr. chem.* A. Jirgensons for the work supervision and advice;
- *Dr. chem.* Anna Nikitjuka for proofreading of the manuscript.

This research was conducted in the Latvian Institute of Organic Synthesis and funded by the European Union Horizon 2020 program, project Combating Antimicrobial Resistance Training Network (CARTNET), Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 765147.

**PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ**

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2023. gada 13. jūlijā Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Asociētā profesore *Dr. chem.* Nelli Batenko, Rīgas Tehniskā universitāte
Profesors *Ph. D. Antimo Gioiello*, Perudžas Universitāte (*University of Perugia*), Itālija
Vadošais pētnieks *Dr. chem.* Kārlis Pajuste, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Vitalii Solomin(paraksts)

Datums

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā. Tajā ir 17 attēlu, 76 shēmas, 20 tabulu, 101 atsauce. Promocijas darba rezultāti atspoguļoti trīs publikācijās. Publikācijas kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejamo informāciju, ir 134 lpp.

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	6
Ievads	6
Pētījuma mērķis un uzdevumi	8
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	9
Darba struktūra un apjoms	9
Publikācijas un darba aprobācija	9
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	11
1. Pirazola amīdi un indazola atvasinājumi kā iespējamie HK inhibitori	11
2. 2-Aminohinazolīna atvasinājumi kā iespējamie HK inhibitori.....	17
3. Jauna metode 2-aminohinazolīnu sintēzei no 2-formilfenilborskābēm un guanidīniem	26
4. Jauna metode indazolu sintēzei no 2-formilfenilborskābēm un azodikarboksilātiem vai hidrazīna dikarboksilātiem	30
5. Difenilazoli kā antibakteriāli līdzekļi pret <i>S. Aureus Newman</i>	37
SECINĀJUMI.....	43
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	86

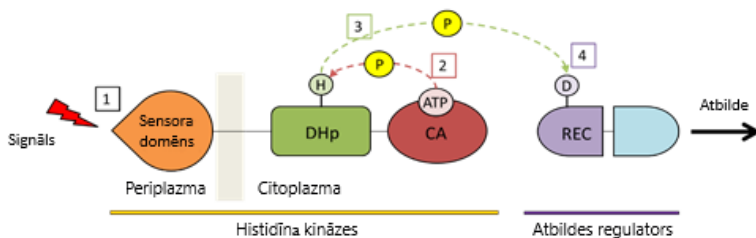
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Ievads

Bakteriālām infekcijām ir liela ietekme uz sabiedrības veselību.¹ Kopš 20. gadsimta vidus, ieviešot antibiotikas, novērsti daudzi nāves gadījumi, un vidējais paredzamais dzīves ilgums ir pieaudzis līdz gandrīz 79 gadiem.² Vairākas antibiotiku klases izveidotas laikā posmā no 1930. līdz 1960. gadam, savukārt pēdējās desmitgadēs atklātas tikai dažas.³ Vienu un to pašu dzīvību glābjošo antibakteriālo līdzekļu ilgstoša lietošana ir kļuvusi par nozīmīgu faktoru baktēriju sugu evolūcijai – baktēriju izstrādātie mehānismi palīdz tām neitralizēt antibiotikas,⁴ piemēram, baktērijas attīsta rezistenci pret vairāku veidu antibakteriālām zālēm un kļūst par multirezistentām baktērijām. Šādi mehānismi var rasties, uzkrājoties dažādiem gēniem, kas ir atbildīgi par rezistenci pret konkrētu medikamentu, kā arī pārmērīgi ekspresējot gēnus, kas kodē baktēriju izplūdes sūkņus.⁵ Rezistentu baktēriju izraisītu infekciju klīniskai terapijai parasti ir nepieciešamas lielākas zāļu devas vai efektīvākas, taču vienlaikus arī toksiskākas, zāles.^{2, 6}

Iepriekš minētie iemesli ir veicinājuši pētījumus, lai atklātu jaunus un perspektīvus antibakteriālos līdzekļus, kas ir aktīvi pret antibiotikām rezistentiem celmiem. Šādu pētījumu galvenais uzdevums ir potenciālā mērķa noteikšana jaunai zāļu vielai. Lielākā daļa tradicionālo antibiotiku ir vērstas uz šūnu sienīņu sintēzes (penicilīni, cefalosporīni, polipeptīdi) vai baktēriju proteīnu sintēzes (tetraciklīni, amfenikoli, makrolīdi) kavēšanu.⁷ Visas šīs zāles izraisa baktēriju nāvi, kas ir būtisks veicinošs faktors baktērijām pielāgoties šādai terapijai.⁸ Perspektīvā savienojumi, kas tiktu vērsti pret baktēriju sistēmām, kas iesaistītas adaptācijā pret antibiotikām, varētu būt risinājums multirezistentu baktēriju problēmai. Viena šāda iespējamā mērķa sistēmu grupa ir histidīna kināzes divkomponentu sistēmas (HK TCs).⁹

Baktēriju TCs ir atbildīgas par signālu pārnesei ceļiem, tostarp virulences, sekrēcijas sistēmu un antibiotiku rezistences regulēšanu. Turklāt TCs ir plaši izplatītas baktērijās un nav sastopamas zīdītāju šūnās.¹⁰



1. att. Histidīna kināzes divkomponentu sistēmu signalizācijas ceļš: DHp – dimerizācijas un histidīna fosfopārneses domēns; CA – katalītiskais domēns; REC – uztvērēja domēns; H – histidīna atlikums; D – aspartāta atlikums; ATP – adenozīna trifosfāts; P – fosfāts. Skaitļi atbilst signāla pārneses ceļa secībai: 1 – ārpusšūnu signāla uztveršana; 2 – ATP saistīšanās un fosfāta pārvešana uz histidīnu; 3 – fosfāta pārvešana uz aspartāta atlikumu uztvērēja domēnā; 4 – uztvērēja domēna struktūras maiņa.

Signālu kaskāde TCs sākas no sensora domēna (1), kas atrodas perioplazmatiskajā vai ārpusšūnu vidē (1. att.).¹¹ Pēc tam ATP saistās ar katalītisko domēnu (CA), kam seko fosfāta grupas pārvešana uz fiksētu histidīna atlikumu histidīna fosfopārneses domēnā (DHp). Pēc tam augstas enerģijas fosforilgrupa tiek pārnesta uz fiksētu aspartāta atlikumu atbildes regulatora uztvērēja domēnā (REC). Savukārt atbildes regulatorā notiek konformācijas izmaiņas, kas izraisa specifisku atbildi.¹²

Vispievilcīgākais mērķis TCs signalizācijas ceļā ir katalītiskais domēns (CA), jo šis domēns jau ir gatavs, lai saistītu mazu ATP molekulu. Izmantojot pareizi izstrādātus inhibitorus, kas īpaši paredzēti CA, transdukcijas ceļu var pārtraukt, samazinot baktēriju pielāgošanās spēju vai izraisot baktericīdu efektu.¹³

Promocijas darbs ir vērsts uz jaunu HK TCs inhibitoru izstrādi un sintēzi, sākot no trāpījuma molekulām, kas identificētas ar atbilstošu proteīna–ligandu struktūru rentģena kristalogrāfiju. Savienojumi ar potenciālu turpmākām modifikācijām pakļauti datorizētā zāļu dizaina (CADD) pētījumiem, lai noskaidrotu struktūras funkcionalizēšanas iespējas, kas var uzlabot savienojumu iedarbību. Pēc CADD modelēšanas sintēzei atlasīti interesantākie savienojumi. Lai noteiktu savienojumu bioloģisko aktivitāti, veikti gan baktēriju proteīnu enzīmatiskie testi, gan baktēriju kultūru *in vitro* testi.

Testiem atlasīti vairāki HK TCs saimei piederošie proteīni. Viens no proteīniem, kas tika izmantots enzīmatiskajos testos, ir ķīmotakses proteīns (CheA), kas ir baktēriju ķīmotakses centrālais regulators. Tas pieder proteīnu grupai, kas kontrolē gēnu ekspresiju, reaģējot uz vides apstākļu izmaiņām. CheA saistās ar ATP un katalizē fosforilēšanu vienā no saviem histidīna atlikumiem.¹⁴ Vēl viens promocijas darba pētījumos izmantotais proteīns ir fosfāta regulona sensora proteīns (PhoR), kas ir daļa no divu komponentu signālu transdukcijas ceļa. Dzīvā šūnā PhoR netieši sajūt un reaģē uz ārpusšūnu neorganiskā fosfāta līmeni, fosforilējot un defosforilējot sev radniecīgo atbildes regulatoru PhoB.¹⁵ Testiem izmantots arī HK853 proteīns. HK853 ir C-gala katalītiskais un ATP saistošais domēns,¹⁶ kam *in vitro* ir pierādīta no ATP atkarīga

autokināzes aktivitāte un kas nodrošina fosfora pārvešanu uz PhoP atbildes regulatoru.¹⁷ No šīs proteīnu saimes testos izmantots arī proteīns EnvZ, kam ir liela nozīme aktivatora proteīna OmpR fosforilēšanā. Fosfora pārvešana starp EnvZ un OmpR *E. Coli* regulē baktērijas pielāgošanos spēju vides osmotiskā spiediena izmaiņām.¹⁸

In vitro baktēriju augšanas inhibēšanas testiem izmantoti grampozitīvo baktēriju celmi *S. Aureus Newman*¹⁹ un *E. Faecalis*.²⁰ Gramnegatīvos celmus pārstāvēja *E. Coli*.²¹ Bez tam izmantoti antibiotiku rezistenti celmi – pret meticilīnu rezistents celms (MRSA) *S. Aureus*²¹ un pret vankomicīnu rezistentais *E. Faecalis*.²²

Pētījums veikts sadarbībā ar profesora A. Marina grupu no *El Instituto de Biomedicina de Valencia es un centro propio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV CSIC)* Valensijā (rentgenstaru kristalogrāfijas un proteīnu pētījumi), profesora J. Wells grupu (dzīvo šūnu pētījumi *in vitro*) un profesora P. Finn grupu (datorizētais zāļu dizains) no *Oxford Drug Design* Oksfordā.

Pētījuma galvenais ieguldījums TCs inhibitoru pētījumos bija bibliotēku skrīninga rezultātā noskaidroto trāpījuma savienojumu sintētiskā ceļa izstrāde. Tas ietvēra konkrētu savienojumu bibliotēku veidošanu, pamatojoties uz atrastā hita savienojuma karkasu, kā arī fragmentu apvienošanu un modificēšanu. Lai iegūtu noteiktas savienojumu klases, piemēram, hinazolīnus un indazolus ar paplašinātu funkcionālo grupu klāstu, tika izstrādātas jaunas sintētiskās metodes šo heterociklu sintēzei.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt jaunus HK TCs inhibitorus, pamatojoties uz fragmentos-balstītu līdera savienojumu atklāšanas pieeju un virtuālajā skrīningā iegūtajiem hita savienojumiem. Bez tam tiks izstrādātas jaunas aktīvāko heterociklu sintēzes metodes. Darba mērķa īstenošanai definēti vairāki uzdevumi:

- 1) sintezēt projekta partneru izstrādātos iespējamus HK TCs inhibitorus – pirazola, hinazolīna un indazola atvasinājumus un analizēt to SAR, izmantojot sadarbības institūciju sniegtos datus;
- 2) izpētīt jaunas, maigākas perspektīvāko 2-aminohinazolīna un indazola atvasinājumu sintēzes metodes, sākot no viegli pieejamām 2-formilfenilborskābēm;
- 3) sintezēt 3,4-difenilpirazola atvasinājumus ar pierādītu antibakteriālo aktivitāti, kas, iespējams, ir saistīta ar HK TCs inhibēšanu un analizēt to SAR *S. Aureus Newman* augšanas inhibēšanā.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Promocijas darba rezultātā piedāvāti jauni HK TCs inhibitoru kemotipi:

- 1) indazola atvasinājumi, kas modificēti ar arilaizvietotāju heterocikla 4. pozīcijā;
- 2) 2-aminohinazolīna atvasinājumi, kas modificēti ar arilaizvietotāju heterocikla 7. pozīcijā.

Bez tam aprakstīta arilazolu antibakteriālā efektivitāte pret *S. Aureus Newman* un to struktūras–aktivitātes likumsakarības. Izstrādātas jaunas mērķa heterociklu sintēzes metodes:

- 1) ērta un maiga vara katalizēta 2-aminohinazolīnu sintēze no 2-formilfenilborskābēm un guanidīniem;
- 2) indazolu sintēze no 2-formilfenilborskābēm un azodikarboksilātiem vai hidrazīndikarboksilātiem vara klātbūtnē.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ietver literatūras apskatu, kas veltīts 2-aminohinazolīnu sintēzes metodēm un lietojumam medicīniskajā ķīmijā, iespējamo HK TCs inhibitoru sintēzes aprakstu un to bioloģiskās aktivitātes pētījumu rezultātus. Papildus aprakstīta jauno fenilpirazolu un fenilzoksazolu antibakteriālā iedarbība pret *S. Aureus Newman* un jaunu 2-aminohinazolīnu un indazolu sintēzes metodes.

Publikācijas un darba aprobācija

Promocijas darba galvenie rezultāti apkopoti trīs zinātniskajās publikācijās. Pētījuma rezultāti prezentēti četrās konferencēs.

Zinātniskās publikācijas

1. **V. V. Solomin**, A. Seins, and A. Jirgensons. 2-Aminoquinazolines by Chan–Evans–Lam Coupling of Guanidines with (2-Formylphenyl)boronic Acids. *Synlett*, **2020**, 31, 1507–1510 (IF(2020): 2.454).
2. **V. V. Solomin**, A. Seins, and A. Jirgensons. Synthesis of indazoles from 2-formylphenylboronic acids. *RSC Advances*, **2021**, 11, 22710–22714 (IF(2021): 4.036).
3. **V. V. Solomin**, B. Fernandez Ciruelos, N. Velikova, J. Wells, M. Albanese, A. Adhav and A. Jirgensons. Synthesis and SAR of phenylazoles, active against *Staphylococcus Aureus Newman*. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2022**, 58 (12), 737–748 (IF(2021): 1.490).

Dalība konferencēs

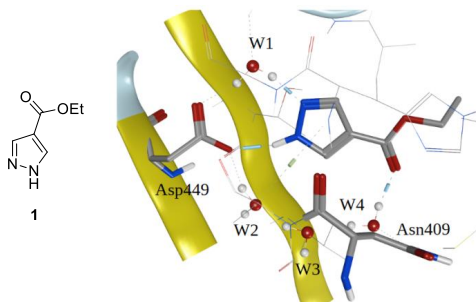
1. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Synthesis of 2-Aminoquinazolines and Indazoles from 2-Formylphenylboronic Acids. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia, February 11, **2022**, Riga, Latvia.

2. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Synthesis of 2-Aminoquinazolines and Indazoles from 2-Formylphenylboronic Acids. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2022)*, July 3–6, **2022**, Vilnius, Lithuania.
3. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Chan-Evans-Lam reaction inspired synthesis of 2-aminoquinazolines and N-protected indazoles. *SPRINGBOARD project Summer School: Major milestones in design and development of novel antimicrobials*, August 23–25, **2022**, Apšuciems, Latvia.
4. **V. V. Solomin**, D. Zaharova. Synthesis of Quinazolines and Indazoles from 2-formylphenylboronic acids. *81th International Scientific Conference of the University of Latvia*, March 17, **2023**, Riga, Latvia.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

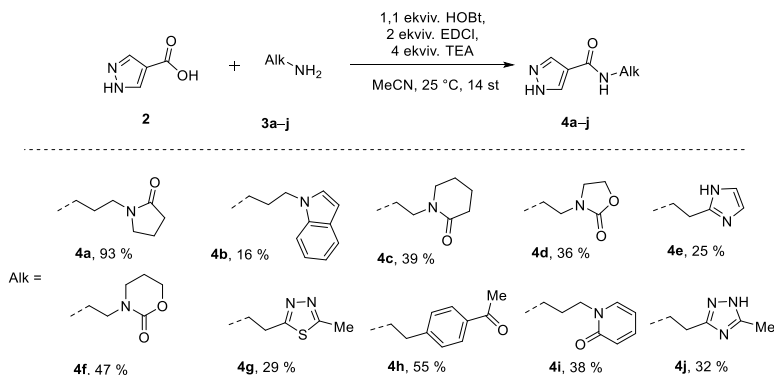
1. Pirazola amīdi un indazola atvasinājumi kā iespējamie HK inhibitori

Vispirms tika veikts mazo savienojumu bibliotēkas skrīnings. Bibliotēka ietvēra tādus savienojumus, kas potenciāli varētu mijiedarboties ar pētījumā interesējošajiem proteīniem. Rentgena kristalogrāfijas skrīningu veica profesora *A. Marina* grupa (*IBV CSIC*). Etil-1*H*-pirazol-4-karbonsilāts **1** bija viens no pirmajiem savienojumiem, kas līdzkristalizēts kopā ar CheA CA domēnu (2. att.).



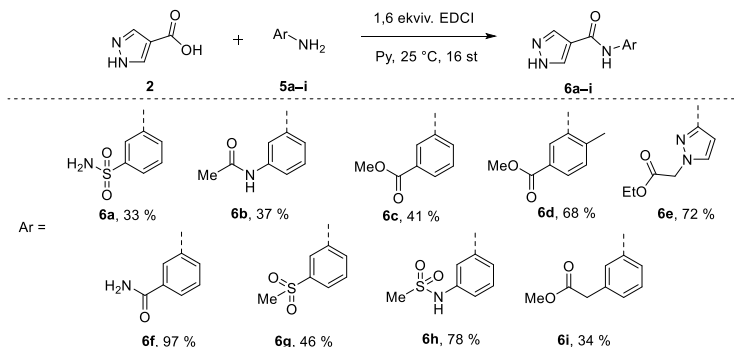
2. att. *T. Maritima* CheA CA domēna kristāliskā struktūra kompleksā ar savienojumu **1**.

Savienojums **1** šķita īpaši pievilcīgs turpmākai atvasināšanai molekulas karboksilgrupu plašo modifikācijas iespēju dēļ. Sadarbībā ar *Marko Albanese* (*Oxford Drug Design*) izveidota pirazolamīdu virtuālā bibliotēka, kas izmantota dokinga pētījumiem ar datorizētu zāļu dizaina (CADD) pieeju. Pēc vairākiem rezultātu precizējumiem sintēzei atlasīti daudzsoļošākie savienojumi **4a–j**. Amīdi **4a–j** iegūti no pirazol-4-karbonskābes **2** un atbilstošajiem amīniem **3a–j** kondensācijas aģentu EDCl un HOBt klātbūtnē (3. att.).



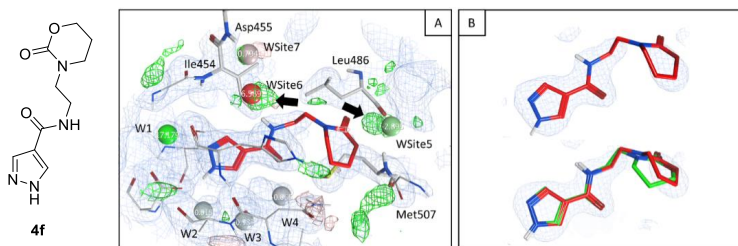
3. att. Amīdu **4a–j** sintēze.

Amīdi **4a–j** pārbaudīti enzīmatiskajā testā un baktēriju augšanas testā. Diemžēl nevienā no pārbaudēm savienojumi **4a–j** neuzrādīja detektējamu aktivitāti. Sākotnējie neveiksmīgie rezultāti mudināja izstrādāt “stingrākus” savienojumus bez kustīgās ķēdes starp molekulas strukturālajiem elementiem. Izmantojot CADD, kā potenciālie histidīna kināžu inhibitori izveidoti pirazolamīdi **6a–i**. Izmantojot EDCI kā kondensācijas reaģentu un piridīnu kā šķīdinātāju, anilīni **5a–i** pārvērsti par atbilstošajiem amīdiem **6a–i** (4. att.).



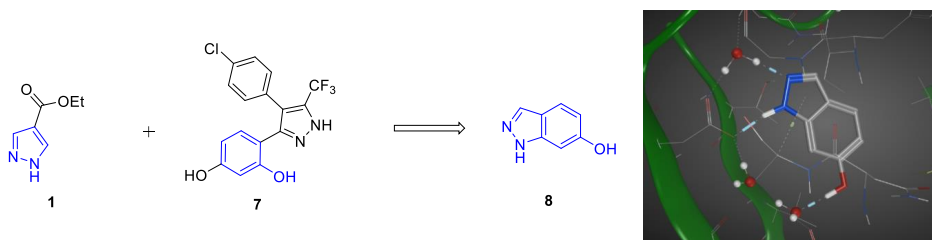
4. att. Anilīdu **6a–i** sintēze.

Savienojumiem **6a–i** bija vāja inhibējošā iedarbība mērķa proteīnu PhoR un EnvZ gadījumā. Autofosforilēšanas inhibēšanas, TNP–ATP aizvietošanas²³ un radikola aizvietošanas²⁴ testi neuzrādīja pētītās savienojumu klases aktivitāti. Savienojumiem nekavēja arī grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju kultūru augšanu. Jāatzīmē, ka *Anmol Adhav (IBV CSIC)* veikto kristalogrāfisko pētījumu rezultātā iegūta savienojuma **4f** kristāliskā struktūra ar CheA proteīnu (5. A att.), kas apstiprināja CADD prognozes. Reālā struktūras konformācija (sarkanā krāsā) un paredzamā saistīšanas konformācija (zaļā krāsā) ir gandrīz identiskas (5. B att.).



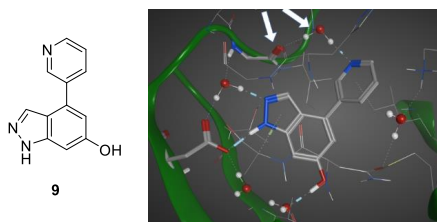
5. att. Savienojuma **4f** un CheA kompleksa kristāla rentgenstruktūranalīzes dati. A) Savienojuma **4f** (sarkanās saites) saistīšanas veids kompleksā ar CheA. B) Augšā – kristālā saistītā savienojuma **4f** konformācija (sarkanās saites). Apakšā – kristālā saistītās konformācijas (sarkanās saites) pārklājums ar enerģētiski minimizētu kristāla konformāciju (zaļās saites).

Pēc ne parāk perspektīvajiem rezultātiem ar pirazolamīda atvasinājumiem tika analizētas citas savienojuma **1** funkcionalizēšanas iespējas. Savienojums **1** tika virtuāli apvienots ar citu savienojumu – 4-[4-(4-hlorfenil)-5-(trifluormetil)-1H-pirazol-3-il]benzol-1,3-diolu (**7**), kas arī iegūts rentgena kristalogrāfijas pētījumos (*Anmol Adhav, IBV CSIC*) (6. att.).



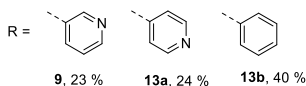
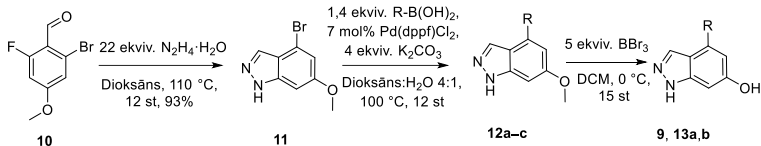
6. att. Savienojumu **1** un **7** apvienošana, lai iegūtu savienojuma **8** struktūru.

Tika noskaidrots, ka indazolu saturošais savienojums **8**, iespējams, saglabā galvenās pazīmes saistīšanai ar CA. Veikta virtuālā fragmenta **8** iespējamo modificēšanas variantu analīze un piedāvāts indazola 4. pozīcijā ieviest arilaizvietotāju. Ļoti vēlams būtu arī ūdeņraža saites akceptors, piemēram, piridīna slāpekļis (papildu mijiedarbības parādītas ar bultiņām). Līdz ar to indazols **9** noteikts kā perspektīvs savienojums turpmākai izpētei baktēriju augšanas testos (7. att.).



7. att. 4-(Piridīn-3-il)-1H-indazol-6-ola **9** iespējamais saistīšanās veids ar CheA.

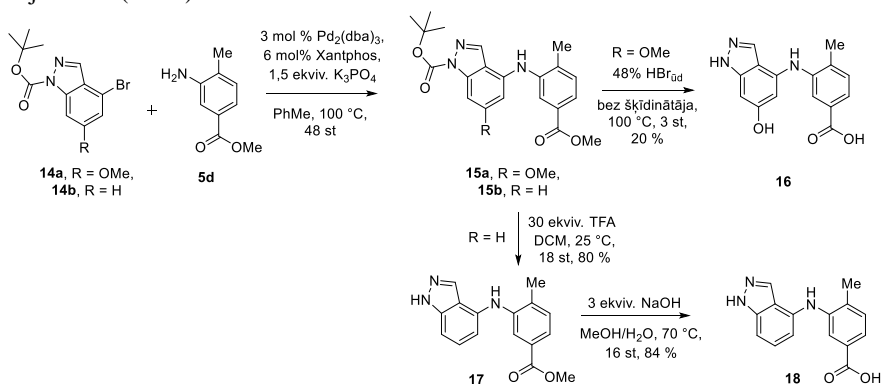
Lai indazola struktūrā ieviestu arilgrupu, izvēlēta bromoindazola **11** *Suzuki–Miyaura* reakcija ar arilborskābēm (8. att.). Galvenā starpprodukta bromoindazola **11** sintēze veikta, sākot no 2-fluorbenzaldehīda **10**, kas ciklizēts reakcijā ar hidrazīnu paaugstinātā temperatūrā.²⁵ Tālāk savienojums **11** stājās *Suzuki–Miyaura* reakcijai ar arilborskābēm, dodot savienojumus **12a–c**. Pēc tam savienojumos **12** hidroksigrupas aizsarggrupa tika nošķelta, izmantojot bora tribromīdu, un iegūti indazoli **9**, **13a,b**.



8. att. Indazolu **9**, **13a,b** sintēze.

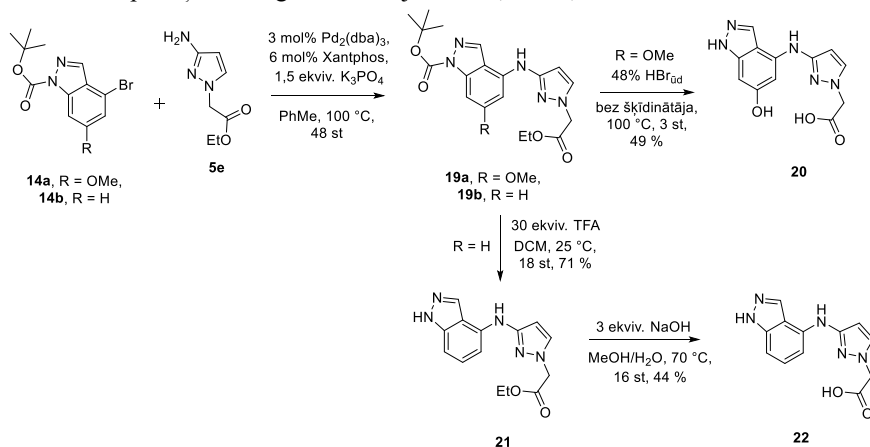
Indazoli **9**, **13a,b** pārbaudīti baktēriju augšanas tests. Savienojumi **9**, **13a,b** neuzrādīja *S. Aureus Newman* (kas pārstāv grampozitīvās baktērijas) augšanas inhibēšanu. Tomēr tika konstatēts, ka indazoli **9**, **13a,b** ir vāji *E. Coli* (kas pārstāv gramnegatīvās baktērijas) augšanas inhibitori ar MIC vērtībam 250 µg/mL savienojumiem **9** un **13a** un 62,5 µg/mL savienojumam **13b**. Diemžēl indazoli **9**, **13a,b** neinhibēja interesējošo PhoR enzīmu (IC₅₀ lielāks par 2 mM). Ir zināms, ka šāda veida olbaltumvielas pieder strukturāli nelokanai proteīnu saimei,²⁶ un, visticamāk, arī citus šāda veida proteīnus nevar inhibēt. Šis fakts nozīmē, ka indazolu antibakteriālā aktivitāte ir saistīta ar citu darbības mehānismu, kas neietver HK TCs inhibīciju.

Otrajā indazolu saturošu savienojumu sērijā ar saglabātu galveno karkasu tika modificēta 4. pozīcija, izmantojot *Buchwald–Hartwig* aminēšanas reakciju ar anilīnu **5d**. Boc aizsargāti indazoli **14a,b** tika lietoti kā izejas savienojumi (9. att.). Pēdējā solī savienojumam **15a**, vienlaikus nošķeļot Boc aizsarggrupu un metilesteri, tika iegūts savienojums **16**. Vienkāršots analogs **18**, kam nebija OH grupas indazola 6. pozīcijā, sintezēts no bromoindazola **14b**. Tas tika sametināts ar anilīnu **5d** aminēšanas reakcijas apstākļos, lai iegūtu starpproduktu **15b**. Pēc Boc grupas nošķelšanas iegūtā savienojuma **17** estera grupa tika hidrolizēta ar nātrija hidroksīdu, iegūstot savienojumu **18** (9. att.).



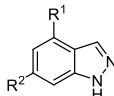
9. att. Indazola atvasinājumu **16** un **18** sintēze.

Savienojums **20** sintezēts līdzīgā veidā – bromoindazolu **14a,b** reakcijā ar aminopirazolu **5e** (10. att.). Visas trīs savienojuma **19a** aizsarggrupas nošķeltas vienā stadijā, izmantojot HBr ūdens šķīdumu, kas ļāva iegūt savienojumu **20**. Vienkāršots analogs **22**, kam nebija OH grupas indazola 6. pozīcijā, sintezēts, sākot no savienojumiem **14b** un **5e**, lai vispirms iegūtu savienojumu **19b**. Tajā ar TFA nošķelta Boc aizsarggrupa, iegūstot savienojums **21**. Tālāk estera grupa hidrolizēta bāziskos apstākļos, lai iegūtu savienojumu **22** (10. att.).



10. att. Indazolu **20** un **22** sintēze.

Savienojumiem **16–18**, **20–22** izpētīta to spēju saistīt baktēriju proteīnu PhoR no *E. Coli* un *S. Aureus* celmiem un strukturāli līdzīgu cilvēka karstuma šoka proteīnu 90 (Hsp90), izmantojot mikromēroga termoforēzes (MST) testu. MST eksperimentu rezultāti apkopoti 1. tabulā.

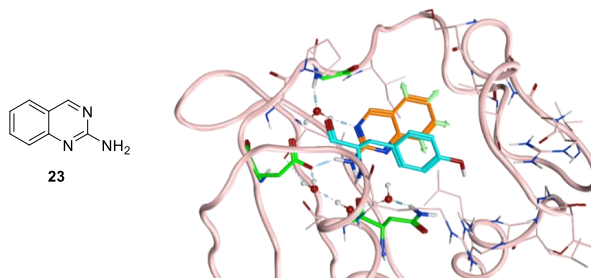
Sintezēto indazolu **16–18**, **20–22** IC₅₀ dati

Savienojuma numurs	R ¹	R ²	<i>S. Aureus</i> PhoR	<i>E. Coli</i> PhoR	Hsp90 K _d
16		OH	> 1 mM	> 1 mM	241 nM
17		H	> 500 μM	> 500 μM	474 nM
18		H	> 500 μM	> 500 μM	327 nM
20		OH	> 1 mM	> 1 mM	187 nM
21		H	67 μM	162 μM	457 nM
22		H	86 μM	143 μM	689 nM

Savienojumi **16** un **20**, kas satur hidroksigrupu indazola gredzena 6. pozīcijā, neuzrādīja izmērāmu saistīšanos ar *S. Aureus* PhoR un *E. Coli* PhoR – abos gadījumos bioloģiskie testi liecināja, ka aktivitātes līmenis bija augstāks par 1 mM. Neskatoties uz to, K_d dati testos ar Hsp90 šiem savienojumiem konstatēta afinitāte nanomolārā līmenī – 241 nM savienojumam **16** un 187 nM savienojumam **20**. Vienkāršoti analogi **17**, **18**, **21** un **22** bez OH grupas indazola 6. pozīcijā arī uzrādīja Hsp90 afinitāti 300–700 nM diapazonā. Taču tikai savienojumi **21** un **22** uzrādīja aktivitāti, veicot testus ar *S. Aureus* PhoR un *E. Coli* PhoR. Augstāka iedarbība bija *S. Aureus* PhoR proteīna gadījumā (67 μM savienojumam **21** un 86 μM savienojumam **22**), nedaudz zemāka – *E. Coli* PhoR gadījumā (attiecīgi 162 μM un 143 μM).

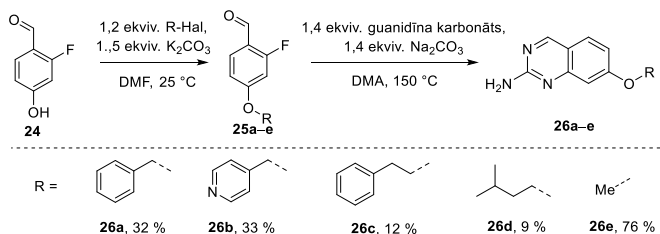
2. 2-Aminohinazolīna atvasinājumi kā iespējamie HK inhibitori

Pirazolu saturošais savienojums **1** nebija vienīgais savienojums ar potenciālu mijiedarbībai ar HK TCs. Plašā fragmentu bibliotēkas skrīningā ar rentgenstaru kristalogrāfijas metodi noskaidrots, ka 2-aminohinazolīns **23** spēj mijiedarboties ar CheA proteīna ATP saistošo domēnu (11. att.).



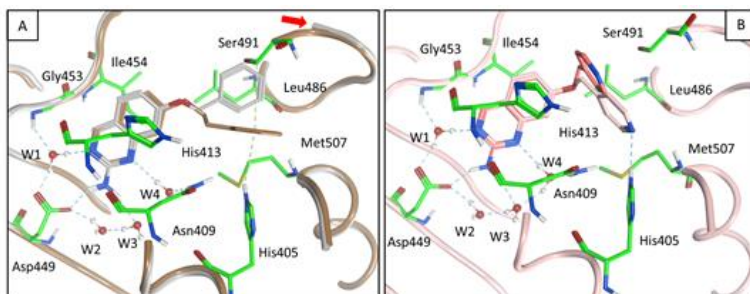
11. att. 2-Aminohinazolīns **23** kompleksā ar CheA proteīnu. Tirozīna atlikums – zilā krāsā, modificēšanas vektori – ar zaļām bultiņām.

Liganda–proteīna kompleksa kristāliskās struktūras analīze norādīja vairākus savienojuma **23** modificēšanas vektorus molekulas afinitātes uzlabošanai (zaļās bultiņas 11. att.). Pamatojoties uz novērojumiem un saskaņā ar CADD modelēšanas datiem, 2-aminohinazolīna **23** 7. pozīcija prioritāri tika izvēlēta kā labākā papildu strukturālā elementa ievadīšanas vieta. Pirmā aminohinazolīnu analoģu sērija saturēja aizvietotājus, kas pievienoti heterociklam 7. pozīcijā caur skābekļa atomu kā tiltiņū. Sākot no komerciāli pieejamā 2-fluor-4-hidroksibenzaldehīda (**24**), sintezēta virkne savienojumu **25a–e**. Otrajā sintēzes stadijā savienojumu **25a–e** 2-fluorbenzaldehīda fragments tika parvērsts par 2-aminohinazolīniem **26a–e**, izmantojot ciklizāciju ar guanidīnu 150 °C temperatūrā (12. att.).



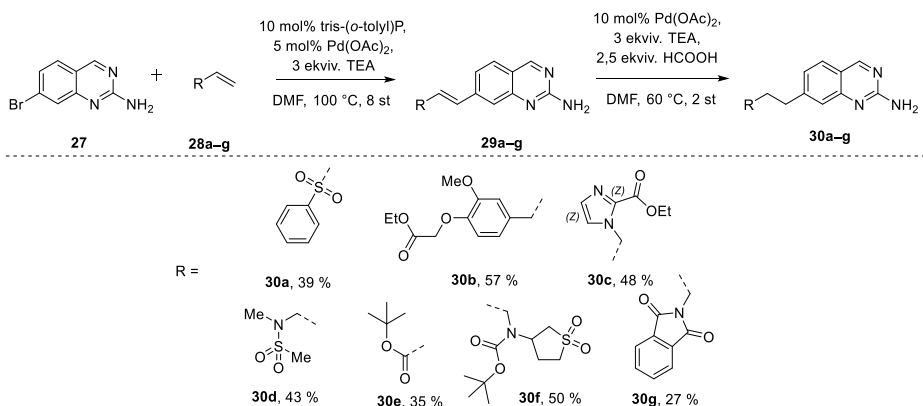
12. att. Alkilēšanas un ciklizācijas reakciju kaskāde 2-aminohinazolīnu **26a–e** sintēzei.

Sintezētie savienojumi **26a,b** kristalizēti kopā ar CheA proteīnu, iegūtie proteīna–liganda kompleksi analizēti ar rentgena kristalogrāfiju (profesora A. Marina grupa; 13. att.). Tika secināts, ka labākas afinitātes pret interesējošo proteīnu sasniegšanai savienojumiem kā aizvietotājus jāsaturs arilgrupas.



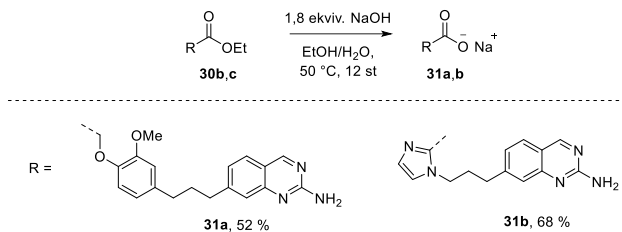
13. att. CheA rentgena kristālu struktūras kompleksā ar savienojumiem **26a** (A) un **26b** (B). Kristāla modelī izveidotas divas iespējamās savienojuma **26b** pozīcijas: tumši rozā saites (1. pozīcija) un rozā saites (2. pozīcija). Galvenie aminoskābju atlikumi – zaļā krāsā.

Diemžēl aminohinazolīniem **26a–e** nebija inhibējošas iedarbības uz PhoR (*S. Aureus*) un EnvZ (*E. Coli*) histidīna kināzēm. Negatīvi rezultāti iegūti arī *S. Aureus Newman* un *E. Coli* šūnu augšanas inhibēšanas testos. Saskaņā ar CADD rezultātiem (*M. Albanese, Oxford Drug Design*), potenciāliem HK TCs inhibitoriem jāsaturs papildu strukturāls elements, kas piestiprināts hinazolīna gredzena 7. pozīcijā caur kustīgu tiltiņu. Lai savienotu strukturālus elementus, kā vispiemērotākā šāda tipa savienojumu iegūšanai tika izvēlēta Heck reakcija. Šim nolūkam no 4-brom-2-fluorbenzalhēda reakcijā ar guanidīnu tika sintezēts 7-bromhinazolīn-2-amīns (**27**).²⁸ Heck reakcijā no bromhinazolīna **27** un terminālajiem alkēniem **28a–g** tika iegūti diazvietoti alkēni **29a–g**. Nākamajā solī alkēni tika reducēti par savienojumiem **30a–g** ar alkiltiltiņiem. Precīzs reducēšanas reaģenta ekvivalentu daudzums bija būtisks, lai izvairītos no vienlaicīgas pašā 2-aminohinazolīna reducēšanas (14. att.).



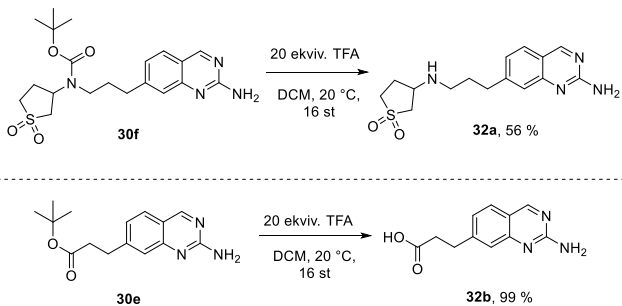
14. att. 2-Aminohinazolīnu **30a–g** sintēze izmantojot Heck reakciju.

Savienojumi **30b** un **30c**, kas satur estera grupu, hidrolizēti bāziskos apstākļos, lai iegūtu karbonskābes sāļus **31a** un **31b** (15. att.).



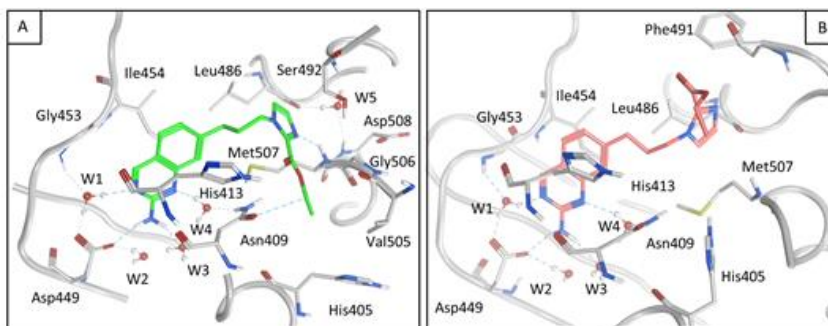
15. att. 2-Aminohinazolīnu **31a,b** sintēze, izmantojot esteru bāzisko hidrolīzi.

Savienojumi **32a** un **32b** iegūti, skābos apstākļos nošķeļot Boc un *t*-Bu aizsarggrupas savienojumos **30f** un **30e** (16. att.).



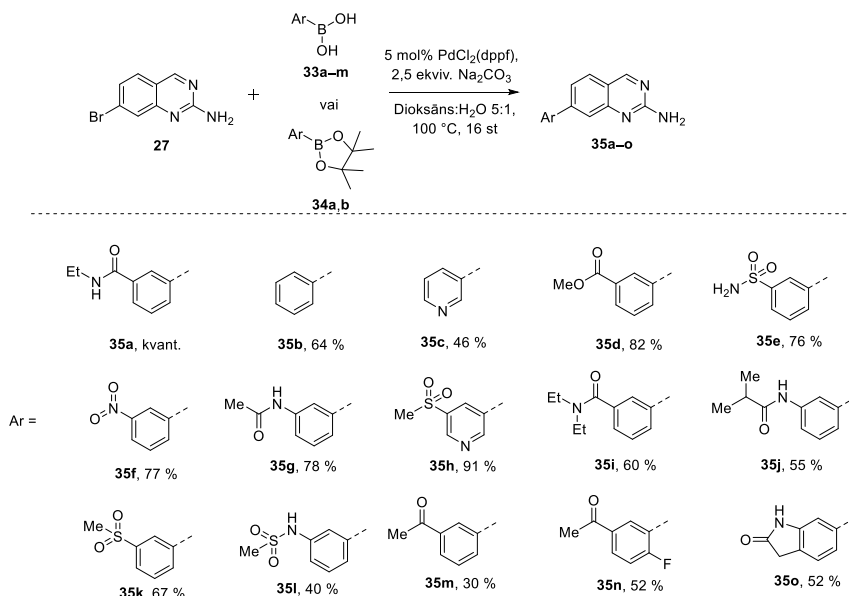
16. att. 2-Aminohinazolīnu **32a,b** sintēze ar aizsarggrupu nošķelšanu skābos apstākļos.

Savienojumu **30a–g**, **31a,b**, **32a,b** un CheA proteīna saistīšanas strukturālie pētījumi veikti ar rentgena kristalogrāfiju (*A. Adhav, IBV CSIC*). Tomēr izrādījās, ka ligandu–proteīnu kompleksu blīvuma kartes ir diezgan grūti atrisināt. 2-Aminohinazolīna karkass atradās tieši CADD prognozētajā apgabalā, savukārt savienojuma “astes” daļas atrašanās vieta kristāla struktūrā nebija skaidra. Tika pieņemts, ka tas ir tāpēc, ka kristāla kabatā molekulai ir vairākas enerģētiski līdzīgas konformācijas. Vienam no savienojumiem (**30c**) tika identificēti divi iespējamie saistīšanas veidi aktīvajā kabatā. CheA proteīns sastāv no divām līdzīgām, bet ne identiskām, asimetriskām daļām, un savienojumam **30c** ir atšķirīga kustīgas molekulas daļas konformācija katrā no šīm divām struktūrvienībām (17. att.).



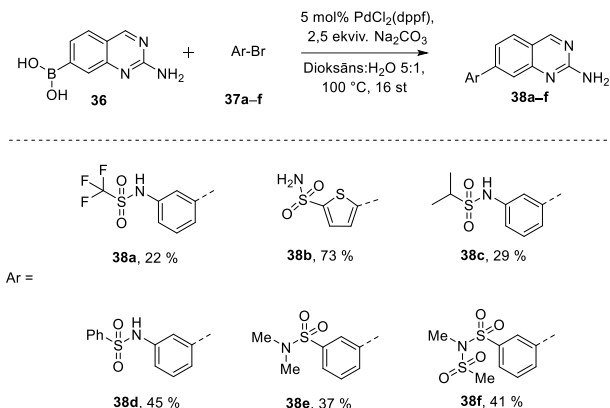
17. att. Divu CheA strukturālo elementu rentgena kristālu struktūra kompleksā ar savienojumu **30c**.

Saskaroties ar šīm problēmām, tika izstrādāta 2-aminohinazolīna atvasinājumu trešā sērija, kuras savienojumi saturēja arilaizvietotājus hinazolīna gredzena 7. pozīcijā. Saskaņā ar CADD prognozēm arilaizvietotājam vajadzētu saturēt ūdeņraža saites akceptorgrupu, piemēram, ketonu, amīdu vai sulfonamīdu. Šādu analoģu sintēzei izmantota 7-bromhinazolīn-2-amīna **27** *Suzuki–Miyaura* reakcija ar arilborskābēm **33** vai atbilstošiem pinakolātiem **34**, lai ievadītu arilgrupu vajadzīgajā 2-aminohinazolīna pozīcijā (18. att.). Izmantojot šo pieeju, sintezēta savienojumu **35a–o** bibliotēka.



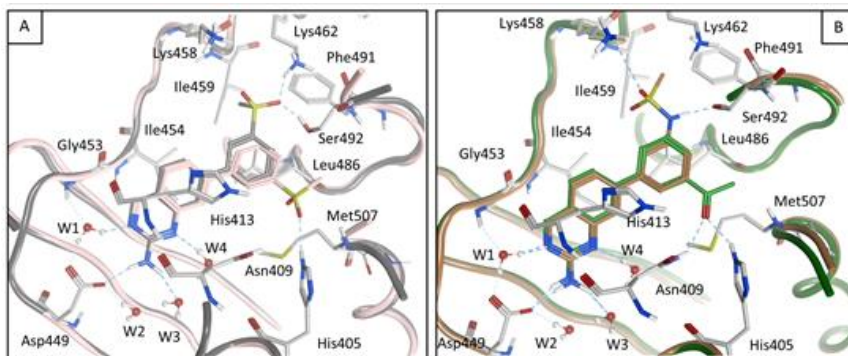
18. att. 7-Aril-2-aminohinazolīnu **35a–o** sintēze no 7-bromhinazolīn-2-amīna (**27**).

Lai paplašinātu sintezēto savienojumu klāstu, no 7-bromhinazolīn-2-amīna **27** tika sintezēts borskābes būvbloks **36**. Tas tika izmantots arilaizvietotu 2-aminohinazolīnu **38a-f** sintēzē, sametinot savienojumu **36** ar dažādiem pieejamiem arilbromīdiem **37** (19. att.).



19. att. *Suzuki-Miyaura* reakcija ar (2-aminohinazolīn-7-il)borskābi **36**.

Kristalogrāfijas pētījumi parādīja, ka polārais aizvietotājs fenilgredzenā orientēts proteīna kabatā tā, lai nodrošinātu papildu mijiedarbību. Abas CheA proteīna struktūrvienības var efektīvi mijiedarboties ar savienojumu **35k**, veidojot papildu ūdeņraža saites ar metilsulfonilatlikumu (parādīts superpozīcijā 20. A attēlā). Savienojumi **35l** un **35m** varētu stāties tāda paša tipa mijiedarbībās (20. B att.).



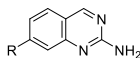
20. att. CheA rentgena kristālu struktūras kompleksā ar savienojumiem **35k** (A) un **35l,m** (B).

Sintezētajiem savienojumiem **26a-e**, **30a-g**, **31a,b**, **32a,b**, **35a-o**, **38a-f** pārbaudīta to saistīšanās spēja ar baktēriju proteīniem CheA, PhoR un HK853, izmantojot MST.²⁷ Cilvēka proteīns Hsp90 arī pārbaudīts ar sintezētajiem savienojumiem. Kā kontroles savienojums šajos testos izmantots AMP-PNP (adenililimidodifosfāts), kas strukturāli ir līdzīgs ATP. Ir zināms, ka –

pretēji ATP – AMP–PNP nevar pārnest terminālo fosfāta grupu, tāpēc tas ir ideāls proteīnu ATP saistīšanās vietas inhibitors.²⁹ *In vitro* testu rezultāti apkopoti 2. tabulā (savienojumiem ar ētera un alkiltiļņiem) un 3. tabulā (savienojumiem ar tiešo aril–aril- saiti). Rezultātus nodrošināja *Anmol Adhav (IBV CSIC)*.

2. tabula

K_d dati reprezentatīviem 2-aminohinazolīniem ar ētera un alkiltiļņiem



Savienojums	R	CheA K _d , μM	HK853 K _d , μM	PhoR K _d , μM	Hsp90 K _d , μM
AMP–PNP		32	0,43	2,1	8,8
23	H	12	141	34	6,7
26a		0,6	65	n. t.	n. t.
26b		0,441	10	15	n. t.
26e	MeO ⁻	0,881	89	32	n. t.
30b		0,317	62	74	15
30c		2,68	71	83	7,2
30e		0,712	96	67	n. t.
31a		27	46	31	35
31b		1,78	n. t.	n. t.	n. t.
32a		991	n. t.	n. t.	n. t.
32b		0,661	66	60	n. t.

n. t. – nav testēts.

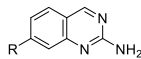
2-Aminohinazolīna trāpījuma savienojums **23** uzrādīja nedaudz labāku saistīšanos ar CheA, taču krietni zemāku afinitāti pret HK853 un PhoR, salīdzinot ar AMP-PNP. *O*-Metilgrupas ieviešana 7. pozīcijā (savienojums **26e**) uzlaboja afinitāti pret CheA un HK853, salīdzinot ar 2-aminohinazolīnu. *O*-Benzilatvasinājuma **26a** gadījumā afinitāte pret CheA un HK853 bija tādā pašā diapazonā kā *O*-metilatvasinājumam **26e**. Jāatzīmē, ka 7-(piridīn-4-ilmetoksi)hinazolīn-2-amīnam **26b** bija divas reizes lielāka afinitāte pret CheA un PhoR un deviņas reizes lielāka afinitāte pret HK853, salīdzinot ar *O*-metilatvasinājumu **26e**. Lipofilāki aizvietotāji savienojumos **26a,b** nedaudz palielināja afinitāti.

Savienojumi **30b,c,e**, **31a,b**, **32a,b**, kas satur alkiltiņņu starp hinazolīnu un funkcionālo grupu, uzrādīja nedaudz labāku saistīšanās ar HK853, salīdzinot ar 2-aminohinazolīnu **23**. Afinitāte pret CheA bija zemāka par 1 μM savienojumiem **30b,e** un **32b**, salīdzinoši zema savienojumiem **30c** un **31a,b** un līdz pat 27 μM savienojumam **31a**. Interesanti, ka strukturāli līdzīgi savienojumi **30c** un **31b** uzrāda gandrīz vienādu afinitātes līmeni pret CheA proteīnu. Savukārt karbonskābi saturošais savienojums **31a** uzrādīja zemāku afinitāti, salīdzinot ar etilesteri **30b**. Šī savienojumu sērija uzrādīja vispārēju tendenci, ka aktīvāki savienojumi parasti satur lipofilus atlikumus ar labu ūdeņraža saites akceptoru, piemēram, esteru grupu, kas ar alkiltiņņu pievienota aromātiskajai sistēmai (savienojums **30b**).

Iegūtās savienojumu **35a–o**, **38a–f** sērijas pārbaudītas galvenokārt ar CheA proteīnu, taču tikai daži no tiem uzrādīja vērā ņemamu aktivitāti. Dažu savienojumu aktivitātes dati apkopoti 3. tabulā.

Pat ar neaizvietotu fenilgruu 2-aminohinazolīna cikla 7. pozīcijā (savienojums **35b**) K_d vērtība CheA gadījumā sasniedza 375 nM. 3-Acetofenilgrupa (savienojums **35m**) uzrādīja līdzīgu rezultātu kā fenilgrupa (325 nM). *N,N*-Dietilkarboksiaizvietots analogs **35i** uzrādīja ļoti augstu K_d vērtību – 191 nM. Šie dati liecina, ka lipofilitātes palielināšanās fenilgredzena 3. pozīcijā palielina afinitāti. Savienojums **35j**, kas satur *N*-acilgrupu fenilgredzena 3. pozīcijā, uzrādīja līdzīgu tendenci attiecībā uz savienojuma aktivitātes izmaiņu, palielinoties lipofilitātei. Izosviestskābes amīdam **35j** K_d ir 226 nM. Sulfonamīda atvasinājumu **35l**, **38b** afinitāte nebija saistīta ar lipofilitātes izmaiņām atšķirībā no iepriekš apskatītajiem analogiem. Fenilsulfonamīds **38d** testos ar CheA saistījās divas reizes labāk nekā savienojums **35l**. Ar tiofēnsulfonamīda grupu aizvietotā 2-aminohinazolīna **38b** aktivitāte samazinājās līdz 667 nM.

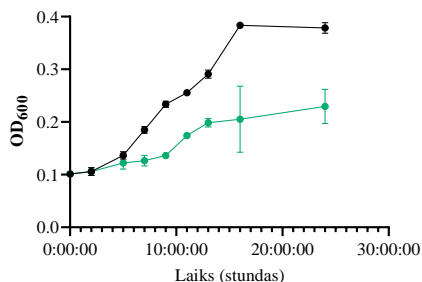
Gandrīz visi savienojumi **26a–e**, **30a–g**, **31a,b**, **32a,b**, **35a–o**, **38a–f** bija neaktīvi *in vitro* testos gan grampozitīvo (*S. Aureus Newman*), gan gramnegatīvo (*E. Coli*) baktēriju celmu gadījumā. To var izskaidrot ar HK TCs bioloģisko funkciju, jo tie ir 2-aminohinazolīna atvasinātu inhibitoru potenciālie mērķi. Lielākajai daļai HK TCs baktērijās noteicošā loma ir pielāgošanās videi. Taču šāda veida sistēmu inhibēšana nevar izraisīt tūlītēju baktēriju nāvi, jo HK TCs nav būtiski pašu baktēriju izdzīvošanai.

K_d dati dažiem 2-aminohinazolīniem ar aril–aril- saiti

Savienojums	R	CheA K _d , μM	HK853 K _d , μM	PhoR K _d , μM	Hsp90 K _d , μM
35b		0,375	n. t.	n. t.	n. t.
35i		0,191	n. t.	n. t.	n. t.
35j		0,226	n. t.	n. t.	n. t.
35l		0,43	16	3,2	0,57
35m		0,325	12	16	0,233
35o		0,71	n. t.	n. t.	n. t.
38b		0,667	n. t.	n. t.	n. t.
38d		0,162	n. t.	n. t.	n. t.

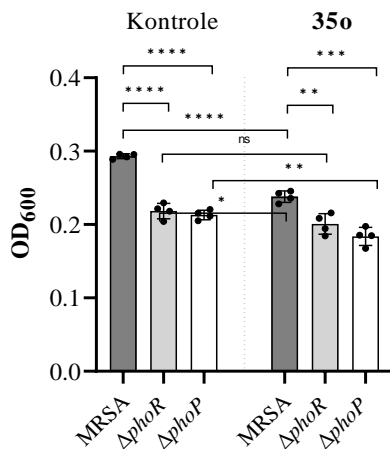
n. t. – nav testēts.

Neskatoties uz to, vairāki savienojumi uzrādīja aktivitāti specifiskos testos TCs iespējamai inhibēšanai (testa rezultātus nodrošināja Blanca Fernandez, Vāgeningenas Universitāte). PhoPR ir divkomponentu sistēma, kas *S. Aureus* nosaka ierobežotu fosfātu koncentrāciju un regulē divu no trim fosfātu transportētāju ekspresiju. *S. Aureus Newman* PhoPR mutants nespēj izaugt līdz tādām pašām blīvumam kā savvaļas tips ierobežotos fosfātu apstākļos. Lai pārbaudītu PhoPR inhibēšanu, *S. Aureus Newman* tika audzēts hinazolīna atvasinājumu klātbūtnē (100 μM koncentrācijā) zemā fosfātu koncentrācijā (50 μM). No visiem pārbaudītajiem savienojumiem **26a–e–38a–f** tikai savienojums **35o** uzrādīja baktēriju augšanas samazināšanos, salīdzinot ar kontroli pie zemas fosfātu koncentrācijas (50 μM, *S. Aureus Newman*). Tas liecina, ka tikai aminohinazolīna atvasinājums **35o** inhibē PhoPR (21. att.).



21. att. *S. Aureus Newman* augšanas līkne pie zemas (50 μM) fosfāta koncentrācijas savienojuma **350** klātbūtnē 100 μM koncentrācijā (zaļā līkne) un bez tā (melnā līkne).

Lai tālāk raksturotu savienojuma **350** antibakteriālo aktivitāti, tas tika pārbaudīts pret meticilīnu rezistentu *S. Aureus* (MRSA) JE2 celmu un mutantiem ar inaktivētām PhoR (ΔphoR celms) un PhoP (ΔphoP celms) sistēmām. Izrādījās, ka ΔphoR un ΔphoP mutantu augšana bija nepilnīga pie zemas fosfātu koncentrācijas. MRSA *S. Aureus* augšana pie zemas fosfātu koncentrācijas ievērojami samazinājās savienojuma **350** klātbūtnē, apstiprinot *S. Aureus Newman* gadījumā novēroto efektu (22. att.).

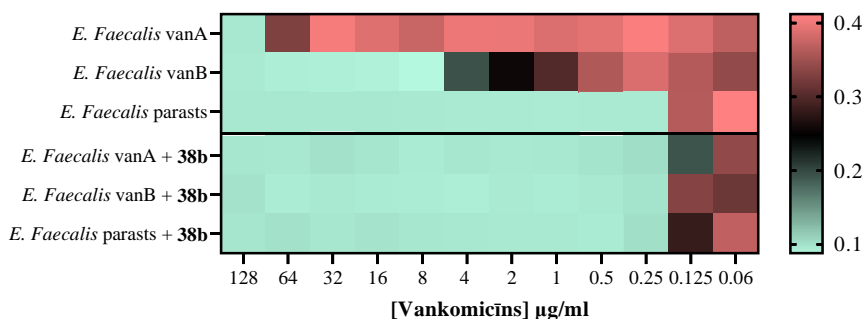


22. att. MRSA *S. Aureus* un bibliotēkas mutantu ΔphoP un ΔphoR augšana savienojuma **350** 100 μM koncentrācijā klātbūtnē (labajā pusē) un bez tā (kreisajā pusē) vidē ar zemu fosfātu koncentrāciju (50 μM).

Savienojuma **350** inhibējošā iedarbība pazuda, kad tā pati eksperimentu sērija tika atkārtota ar fosfātiem bagātā vidē.

Papildus tika izpētīts, vai 2-aminohinazolīna atvasinājumi atšķirīgi inhibē TCs enzīmus. Šim nolūkam tika pētīta 2-aminohinazolīnu ietekme uz VanSR ceļu *Enterococci* baktēriju celmā.

Šis ceļš ir atbildīgs par vankomicīna un citu glikopeptīdu antibiotiku uztveršanu un antibiotiku rezistences gēnu ekspresijas ierosināšanu.³⁰ VanSR inhibēšana izraisa vankomicīna minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC) samazināšanos rezistentos celmos. Izrādījās, ka, pievienojot citu 2-aminohinazolīnu **38b**, *E. Faecalis* VanA nespēj izaugt vankomicīna klātbūtnē. Tas nozīmē, ka vankomicīna rezistence savienojuma **38b** klātbūtnē ievērojami samazinās (23. att.).



23. att. Vankomicīna rezistences nomākšana *E. Faecalis* VanA un VanB rezistentos celmos, ko izraisa savienojums **38b**.

Turpmākie eksperimenti parādīja, ka savienojums **38b** nomāc vankomicīna rezistenci gan *E. Faecalis* VanA, gan VanB celmos. Savienojuma **38b** 100 µM koncentrācijā klātbūtnē MIC vērtības sasniedz aptuveni 0,25 µg/mL līmeni. Jūtīgā celma MIC nemainījās savienojuma **38b** klātbūtnē vai bez tā (23. att.).

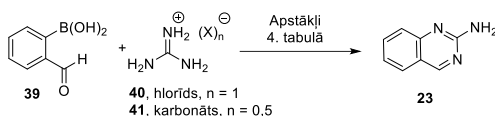
3. Jauna metode 2-aminohinazolīnu sintēzei no 2-formilfenilborskābēm un guanidīniem

Sintētiskie izaicinājumi parādījās, iegūstot CADD piedāvātās 2-aminohinazolīna bāzes struktūras, un radās nepieciešamība atrast vienkāršu un efektīvu metodi 2-aminohinazolīna karkasa sintēzei.

Chan–Evans–Lam reakcija³¹ ir pievilcīga metode C–N saites veidošanai, jo to var veikt salīdzinoši maigos vara katalīzes apstākļos spirtos kā šķīdinātājos. Tika izpētīts *Chan–Evans–Lam* reakcijas lietojums arī aminohinazolīnu sintēzei maigos apstākļos, izmantojot vienkārši pieejamus reaģentus.

Reakcijas apstākļu skrīnings veikts neaizvietota 2-aminohinazolīna **23** sintēzei no borskābes **39** un guanidīna hidrogēnhlorīda **40** (24. att.). Reprezentatīvi rezultāti apkopoti 4. tabulā. Produkta **23** polaritātes dēļ attīrīšana ar kolonnu hromatogrāfiju bija sarežģīta. Tāpēc tas

attīrīts, triturējot ar etilacetātu. Visos eksperimentos izmantots identisks mērogs un apstrāde, lai salīdzinātu citu reakcijas parametru efektivitāti. Tika konstatēts, ka metanols kā reakcijas šķīdinātājs, CuI kā katalizators un KOH kā bāze ir piemēroti apstākļi 2-aminohinazolīna **23** sintēzei no borskābes **39** un guanidīna hidrogēnchlorīda **40** (4. tab., 1., 2. piemērs). Bāzes un guanidīna pārākums labvēlīgi ietekmē produkta **23** iznākumu (4. tab., 2. piemērs). Citi vara katalizatori, piemēram, CuCl un Cu(OAc)₂, ir mazāk efektīvi (4. tab., 3., 4. piemērs). KOH kā bāzes izmantošana uzlabo produkta **23** iznākumu, ja guanidīna tiek lietots pārākumā (4. tab., 5., 6. piemērs). EtOH arī var izmantot kā reakcijas šķīdinātāju (4. tab., 7. piemērs). Guanidīnija karbonāts **41** arī izpētīts kā substrāts, tomēr tas deva zemāku hinazolīna **23** iznākumu (4. tab., 8., 9. piemērs).



24. att. Aminohinazolīna **23** sintēze.

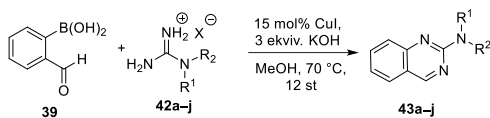
4. tabula

Chan–Evans–Lam reakcijas apstākļi 2-aminohinazolīna **23** sintēzei

Nr. p. k.	Šķīdinātājs, ^a temperatūra	40 vai 41 , ekviv.	Katalizators, mol%	Bāze, ekviv.	Iznākums, %
1.	MeOH, 70 °C	40 , 1,5	CuI, 15	K ₂ CO ₃ , 2,5	31
2.	MeOH, 70 °C	40 , 2,5	CuI, 15	K ₂ CO ₃ , 3	44
3.	MeOH, 70 °C	40 , 2,5	Cu(OAc) ₂ , 15	K ₂ CO ₃ , 3	35
4.	MeOH, 70 °C	40 , 2,5	CuCl, 15	K ₂ CO ₃ , 3	23
5.	MeOH, 70 °C	40 , 1,5	CuI, 15	KOH, 1,5	34
6.	MeOH, 70 °C	40 , 3	CuI, 15	KOH, 3	51 (65)^c
7.	EtOH, 90 °C	40 , 3	CuI, 15	KOH, 3	52
8.	MeOH, 70 °C	41 , 3	CuI, 15	–	13
9.	MeOH, 70 °C	41 , 1,5	CuI, 15	KOH, 3	17

^a Reakcijas veiktas gaisa atmosfērā, reakcijas laiks 12–17 st; ^b produkts **23** attīrīts, triturējot ar EtOAc, lai sasniegtu 98+ % tīrību; ^c KMR iznākums, izmantojot 1,3,5-trimetoksibenzolu kā iekšējo standartu.

2-Formilfenilboronskābe **39** tika izmantota reakcijā ar dažādiem guanidīniem optimālākajos reakcijas apstākļos (4. tab., 6. piemērs). Gan *N*-monoizvietotie guanidīni **42a–g**, gan *N,N*-diaizvietotie guanidīni **42h–j** deva 2-aminohinazolīnus **43a–j** ar labu iznākumu (25. att., 5. tab.).



25. att. Aminohinazolīnu **43a–j** sintēze.

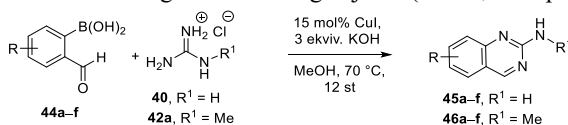
5. tabula

Dažādu guanidīnu pielietojums aminohinazolīnu sintēzei

Nr. p. k.	42 ^a	R ¹	R ²	43 , iznākums % ^b
1.	42a	H	Me	43a , 63
2.	42b	H	Ph	43b , 56
3.	42c	H	PhCH ₂	43c , 66 ^c
4.	42d	H	Ph(CH ₂) ₂	43d , 52
5.	42e	H	<i>n</i> -Pent	43e , 54
6.	42f	H	<i>ciklo</i> -Pent	43f , 55
7.	42g	H	<i>ciklo</i> -Heks	43g , 37
8.	42h	Me	Me	43h , 43
9.	42i	(CH ₂) ₄		43i , 47
10.	42j	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂		43j , 39

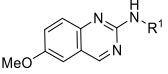
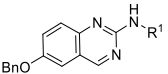
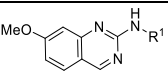
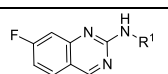
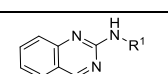
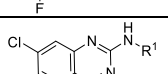
^a Guanidīni **42a,c–g,i,j** izmantoti hidroģēnchlorīda sāls veidā, **42b** – karbonāta, **42h** – sulfāta; ^b attīrīts ar kolonnu hromatogrāfiju, ja nav norādīts citādi; ^c attīrīts, tritūrējot ar EtOAc.

Vairākas 2-formilfenilborskābes **44a–f** izpētītas kā substrāti aminohinazolīnu **45a–f** un **46a–f** sintēzei (6. tab.). Guanidīn **40** un **42a** deva cerētos produktus, tomēr izolētie iznākumi bija nedaudz augstāki *N*-metil aizvietotā guanidīna **42a** gadījumā (6. tab., 3.-8. piemērs).



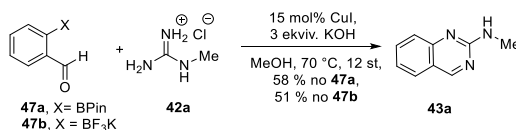
26. att. Aminohinazolīnu **45a–f**, **46a–f** sintēze.

Dažādu borskābju pielietojums aminohinazolīnu sintēzei

Nr. p. k.	Borskābe 44	Produkts	45 vai 46 , Iznākums, ^a %
1.	44a , R = 4-MeO		45a , 55
2.			46a , 59 ^b
3.	44b , R = 4-BnO		45b , 32 (53) ^c
4.			46b , 57 ^b
5.	44c , R = 5-MeO		45c , 17 (53) ^c
6.			46c , 48 ^b
7.	44d , R = 5-F		45d , 36 (45) ^c
8.			46d , 52 ^b
9.	44e , R = 3-F		45e , 52
10.			46e , 46 ^b
11.	44f , R = 5-Cl		45f , 35
12.			46f , 55 ^b

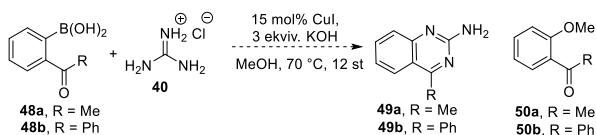
^a Attīrīts, triturējot ar EtOAc, ja nav norādīts citādi; ^b attīrīts ar kolonnu hromatogrāfiju; ^c KMR iznākums, izmantojot 1,3,5-trimetoksibenzolu kā iekšējo standartu.

Borskābju atvasinājumi, piemēram, pinakolāta esteris **47a** un trifluorborāts **47b**, arī bija piemēroti substrāti, dodot aminohinazolīnu **43a** ar iznākumu, kas ir salīdzināms ar iznākumu, izmantojot 2-formilfenilboronskābi **39** (27. att.). Šie piemēri papildina salīdzinoši reti aprakstītus gadījumus, kad borskābju atvasinājumi tiek izmantoti kā reaģenti *Chan–Evans–Lam* reakcijai.³²



27. att. 2-Aminohinazolīna **43a** sintēze no borskābes estera **47a** un trifluorborāta **47b**.

Turpretim borskābes **48a,b** ar ketogrupu izrādījās nepiemērotas izejvielas hinazolīnu **49a,b** sintēzei (28. att.). Šo substrātu gadījumā iegūti sarežģīti maisījumi ar *O*-arilēšanas produktiem **50a,b** kā vienīgajiem identificētajiem blakusproduktiem. Tas, ka 2-acilfenilborskābes **48a,b** nedod gaidītos produktus, nozīmē, ka aminohinazolīnu **23**, **43**, **45**, **46** sintēzē pirmais solis ir arilidēnguanidīna veidošanās, kam seko iekšmolekulāra arilēšana.



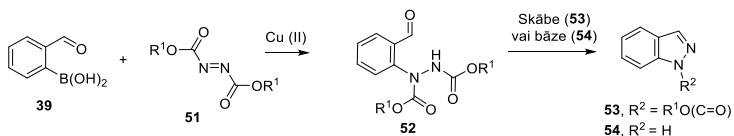
28. att. Mēģinājums kondensēt ketogrupu saturošas borskābes **48a,b** ar guanidīnu **40**.

Rezumējot iepriekš teikto, tiek piedāvāta efektīvs 2-aminohinazolīnu sintēzes metode, kas ir pievilcīgāka par tradicionālajām. Maigie reakcijas apstākļi ļauj izmantot šo metodi farmakoloģiski nozīmīgu 2-aminohinazolīna karkasu saturošu savienojumu sintēzei. Pieejas vienīgais trūkums ir salīdzinoši zemā 2-formilfenilborskābju pieejamība komerciālajos avotos.

4. Jauna metode indazolu sintēzei no 2-formilfenilborskābēm un azodikarboksilātiem vai hidrazīna dikarboksilātiem

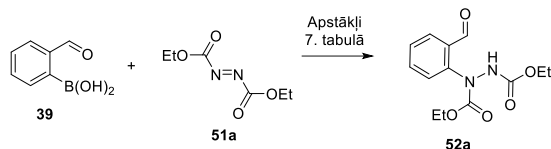
Iedvesmojoties no 2-formilfenilborskābju lietošanas 2-aminohinazolīnu sintēzei, mērķis bija paplašināt šo sintētisko bloku izmantošanu indazola kodola veidošanā.

Sākotnējie mēģinājumi sintezēt indazolu no 2-formilfenilborskābes un hidrazīna hidrāta vara katalīzes apstākļos neizdevās. Tad tika izmēģināts vairāku secīgu stadiju protokols līdzīgi *Uemura* un *Chatani*³³ aprakstītajai fenilborskābju reakcijai ar azodikarboksilātiem, dodot arilhidrazīna atvasinājumus. Izmantojot 2-formilfenilborskābi **39** kā substrātu N=N saitei pievienošanai azodikarboksilātos **51**, tiktu iegūts *N*-arilhidrazīna starpprodukts **52**, ko varētu tālāk pārvērst par indazoliem **53** un **54** (29. att.).



29. att. Indazolu sintēze no 2-formilfenilborskābes **39**.

Arilēšanas apstākļu izpētei tika izmantota 2-formilfenilborskābes **39** un dietilazodikarboksilāta (DEAD, **51a**) reakcija (30. att.), kā katalizatoru izmantojot $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dažādos šķīdinātājos (7. tab., 1.–6. piemērs). Tika konstatēts, ka tādi šķīdinātāji kā MeCN, DMF un DMA ir piemēroti produkta **52a** iegūšanai ar labiem iznākumiem (7. tab., 5., 6. piemērs). Samazināta katalizatora daudzums bija efektīvs, izmantojot DMA kā šķīdinātāju, neietekmējot produkta **52a** iznākumu (7. tab., 7. piemērs). Tika izpētīta arī virkne citu vara avotu (CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, $\text{Cu}(\text{acac})_2$), un tie izrādījās efektīvi katalizatori C–N saites veidošanai, nodrošinot produktu **52a** ar augstiem iznākumiem (7. tab., 8.–10. piemērs). Vara(I) avots, piemēram, CuCl , izrādījās neefektīvs katalizators, savukārt katalītisks CuI daudzums nodrošināja produkta **52a** veidošanos ar labu iznākumu (7. tab., 11., 12. piemērs).



30. att. Hidrazīna dikarboksilāta **52a** sintēze.

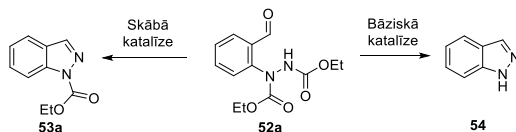
7. tabula

DEAD **51a** arilēšanas apstākļi

Nr. p. k.	Vara katalizators	Šķīdinātājs	Iznākums, %
1.	20 mol% Cu(OAc) ₂	MeOH ^a	0
2.	20 mol% Cu(OAc) ₂	PhMe	0
3.	20 mol% Cu(OAc) ₂	THF	64
4.	20 mol% Cu(OAc) ₂	MeCN	80
5.	20 mol% Cu(OAc) ₂	DMF	83
6.	20 mol% Cu(OAc) ₂	DMA	98
7.	10 mol% Cu(OAc) ₂	DMA	98
8.	10 mol% CuCl ₂	DMA	94
9.	10 mol% Cu(OTf) ₂	DMA	99
10.	10 mol% Cu(acac) ₂	DMA	97
11.	10 mol% CuCl	DMA	25
12.	10 mol% CuI	DMA	93

^a Novērota intensīva DEAD sadalīšanās.

Pēc tam tika izpētīti apstākļi indazola cikla saslēgšanai, izmantojot arilhidrazīnu **52a** (31. att., 8. tab.). Skābos reakcijas apstākļos arilhidrazīns **52a** kondensējās līdz 1*N*-etoksikarbonilindazolam **53a** (8. tab., 1.–5. piemērs). TFA DCM un MeCN šķīdumā deva gaidāmo produktu **53a** ar labu iznākumu (8. tab., 1., 2. piemērs). Veicot reakciju AcOH istabas temperatūrā, arilhidrazīna **52a** ciklizēšanās nenotika, bet karsēšana MeCN šķīdumā nodrošināja indazola **53a** veidošanos (8. tab., 3., 4. piemērs). Skudrskābe bija pietiekami spēcīga, lai istabas temperatūrā MeCN šķīdumā varētu veidoties indazols **53a** (8. tab., 5. piemērs). Izmantojot bāzi spirta šķīdumā, iegūts neaizsargāts indazols **54** (8. tab., 6.–8. piemērs). Gan K₂CO₃, gan KOH varētu efektīvi izmantot arilhidrazīna **52a** cikla saslēgšanas–deacilēšanas reakcijai.

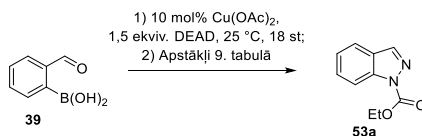


31. att. Indazolu **53a** un **54** sintēze.

Arihidrazīna **52a** ciklizācija par indazoliem **53a** un **54**

Nr. p. k.	Reāģents	Šķīdinātājs	Temp., laiks	Produkts	Iznākums, %
1.	5 ekviv. TFA	DCM	25 °C, 12 st	53a	63
2.	5 ekviv. TFA	MeCN	25 °C, 12 st	53a	64
3.	AcOH	bez šķīd.	ist. T., 12 st	53a	0
4.	30 ekviv. AcOH	MeCN	70 °C, 12 st	53a	56
5.	30 ekviv. HCO ₂ H	MeCN	ist. T., 12 st	53a	56
6.	3 ekviv. K ₂ CO ₃	MeOH	70 °C, 1 st	54	67
7.	3 ekviv. K ₂ CO ₃	MeOH	25 °C, 12 st	54	67
8.	4 ekviv. KOH	EtOH	Ist. t., 12 st	54	59

Pēc tam izpētīta 1*N*-etoksikarbonilindazola **53a** viena reaktora veidošanās no 2-formilfenilborskābes **39** (32. att., 9. tab.). Diemžēl DMA, kas bija optimāls šķīdinātājs DEAD arilēšanai ar augstu iznākumu, nebija piemērots cikla slēgšanas stadijai TFA klātbūtnē (9. tab., 1. piemērs). Šajā gadījumā saskaņā ar LC-MS arilhidrazīna **52a** starpprodukts nebija pārvērties par produktu **53a**. Savukārt TFA pievienošana DCM tādā daudzumā, lai pietiekami atšķaidītu DMA, ļāva iegūt gaidāmo produktu **53a** ar labu iznākumu (9. tab., 2. piemērs). DCM kā šķīdinātāja izmantošana abās stadijās deva zemāku iznākumu (9. tab., 3. piemērs). Tomēr tika konstatēts, ka MeCN ir piemērots šķīdinātājs gan arilēšanai, gan cikla slēgšanai TFA klātbūtnē, lai iegūtu 1*N* aizsargātu indazolu **53a** ar labu iznākumu (9. tab., 4. piemērs).

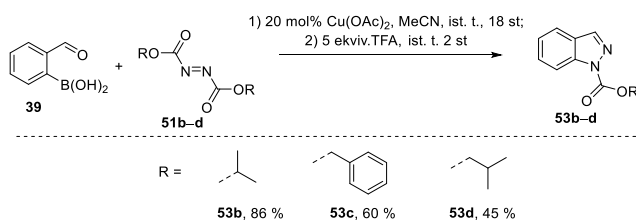
32. att. Indazola **53a** sintēze.

Borskābes **39** viena reaktora pārvēršana par indazolu **53a**

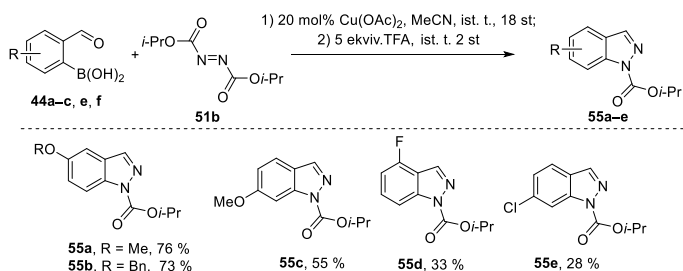
Nr. p. k.	Šķīdinātājs	Reakcijas apstākļi, 2. stadija	Iznākums, %
1.	DMA	10 ekviv. TFA, 25 °C, 2 st.	0
2.	DMA	TFA:DCM 1:4, ^a 25 °C, 2 st.	73
3.	DCM	5 ekviv. TFA, 25 °C, 1 st.	48
4.	MeCN	5 ekviv. TFA, 25 °C, 1 st.	78

^a Papildus pievienoti 3 mL TFA/DCM maisījuma uz 1 mL DMA.

Atrastie viena reaktora reakcijas apstākļi tika pārbaudīti arī citu alkoksikarbonilindazolu **53b–d** sintēzei no borskābes **39** reaģējot un azodikarboksilātiem **51b–d** (33. att.). Visaugstākais produkta iznākums bija savienojuma **53b** gadījumā, kas iegūts no diizopropilazodikarboksilāta **51b**.

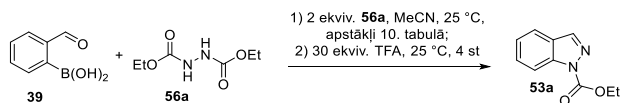


Borskābju aizvietošanas iespējas izpētītas dažādu formilborskābju **44a–c,e,f** reakcijā ar DIAD **51b**, kam sekoja ciklizācija (34. att.). Substrāti **44a–c**, kas satur elektrondonoras grupas (metoksi- un benziloksigrupas), deva indazolus **55a–c** ar labiem vai mēreniem iznākumiem. Substrātu **44e,f**, kas satur elektronakceptorus aizvietotājus, gadījumā produkta **55d,e** iznākums samazinājās.



Tika pārbaudīts arī hidrazīna dikarboksilāta **56a** lietojums indazolu sintēzei azodikarboksilāta **51a** vietā (35. att., 10. tab.). Tika veikta 2-Formilfenilborskābes **39** reakcija ar dietilhidrazīna dikarboksilātu **56a**, izmantojot divu stadiju viena reaktora procedūru, kas izstrādāta indazola **53a** iegūšanai. Cu(OAc)₂ katalītisks daudzums un trietilamīna pārākums nebija pietiekami efektīvi apstākļi, lai panāktu produkta **53a** veidošanās ar labu iznākumu (10. tab., 1. piemērs). Ekvimolāra Cu(OAc)₂ daudzuma un trietilamīna pārākuma izmantošana pirmajā stadijā nodrošināja labu produkta **53a** kopējo iznākumu divās stadijās, savukārt Cu(OAc)₂ daudzuma palielināšana samazināja produkta **53a** iznākumu (10. tab., 2., 3. piemērs). 2-Formilfenilborskābes **39** transformēšana par indazolu **53a** nebija efektīva, ja pirmajā stadijā nepievieno bāzi, tomēr TEA varēja aizstāt ar TMEDA vai DIPEA, būtiski nesamazinot produkta **53a** iznākumu (10. tab., 5., 6. piemērs).

Tika izmēģināti arī citi vara sāļi indazola **53a** sintēzes pirmajā stadijā, tomēr tie nebija efektīvi (10. tab., 7., 8. piemērs). Nepieciešamība pēc ekvimolāra Cu(OAc)₂ daudzuma veiksmīgai indazola **53a** sintēzei, izmantojot hidrazīna dikarboksilātu **56a**, nozīmē reaģenta **56a** *in situ* oksidēšanu par azodikarboksilātu **51a**. Tomēr nevar izslēgt C–N saites veidošanos ar hidrazīna dikarboksilātu **56a** Chan–Evans–Lam reakcijā.³⁴



35. att. Indazola **53a** sintēze no hidrazīna dikarboksilāta **56a**.

10. tabula

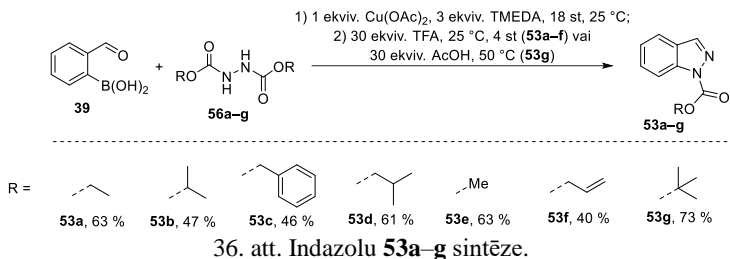
Indazola sintēze izmantojot hidrazīna dikarboksilātu **56a**

Nr. p. k.	Katalizators	Piedeve	Inzākums, ^a %
1.	20 mol% Cu(OAc) ₂	3 ekv. TEA	25
2.	1 ekv. Cu(OAc) ₂	3 ekv. TEA	66
3.	1.5 ekv. Cu(OAc) ₂	3 ekv. TEA	50
4.	1 ekv. Cu(OAc) ₂	nav	26
5.	1 ekv. Cu(OAc) ₂	2 ekv. TMEDA	67
6.	1 ekv. Cu(OAc) ₂	3 ekv. DIPEA	60
7.	1 ekv. CuCl	3 ekv. TEA	35
8.	1 ekv. CuCl ₂	3 ekv. TEA	25

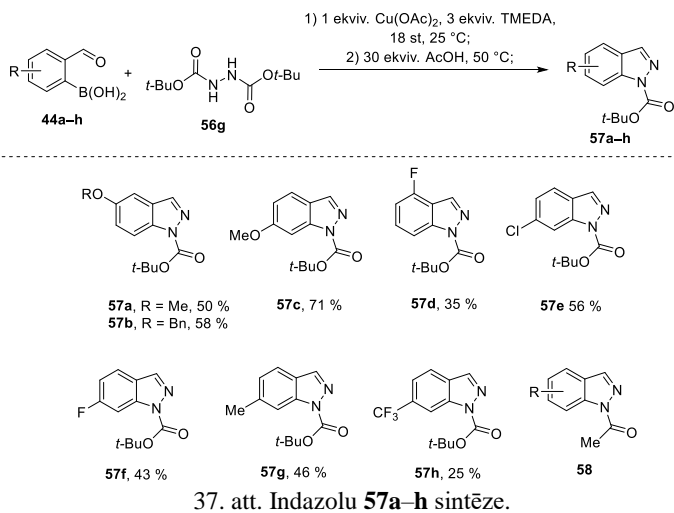
^a KMR iznākums, izmantojot 1,3,5-trimetoksibenzolu kā iekšējo standartu.

Pēc tam kā izejas savienojumi indazolu **53a–g** viena reaktora divu stadiju sintēzei tika izpētīti hidrazīna dikarboksilāti **56a–g** (36. att.). TFA bija piemērota skābe ciklizācijas posmam, iegūstot produktus **53a–f** no borskābes **39** reakcijā ar hidrazīna dikarboksilātiem **56a–f**. Produkta

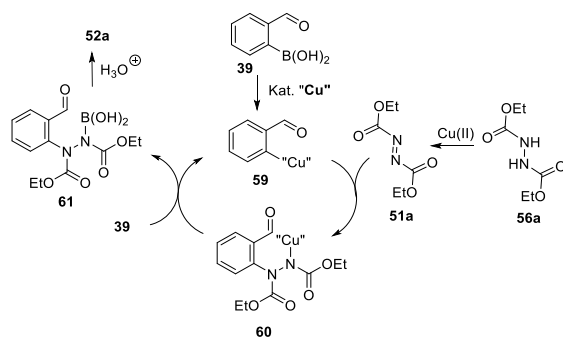
53g sintēzei, kas satur skābes labilu *t*-Bu grupu, TFA vietā tika izmantota etiķskābe paaugstinātā temperatūrā. Šī pieeja nodrošināja produktu **53g** ar ļoti labu iznākumu.



Fenilborskābes **44a–h** tika izpētītas kā izejas savienojumi reakcijās ar di-*t*-butilhidrazīna dikarboksilātu **56g** 1*N*-Boc indazolu **57a–h** sintēzei (37. att.). Galvenais zemo iznākumu iemesls bija 1*N*-acetilindazolu **58** blakusproduktu veidošanās.

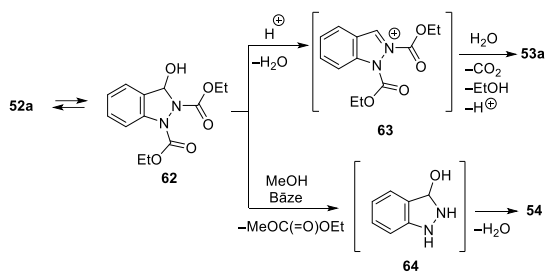


C–N saites veidošanās mehānismu vara katalizētajā arilborskābes reakcijā ar diazodikarboksilātiem piedāvāja *Uemura* un *Chatani*.³³ Saskaņā ar to arilborskābes **39** transmetalēšanas reakcijas apstākļos ar vara katalizatoru veidotu arilgrupu un varu saturošu daļiņu **59** (38. att.). Pievienojot starpproduktu **59** N=N dubultsaitei, iegūts arilhidrazīns **60**, kas stājas transmetalēšanas reakcijā ar borskābi **39**, lai iegūtu starpproduktu **61** un atgrieztu daļiņu **59** katalītiskajā ciklā. Reakcijas maisījuma apstrāde dotu arilhidrazīnu **52a**. Jāatzīmē, ka *Uemura* un *Chatani* parādīja, ka dialkoksikarbonilhidrazīni nav konkurējošie substrāti šajā reakcijā, ja vien netiek pievienots papildu oksidētājs. Tas nozīmē, ka hidrazīns **56a**, visticamāk, tiek oksidēts par diazodikarboksilātu **51a** ar stehiometrisku varu saturoša reaģenta daudzumu.



38. att. Piedāvātais mehānisms C–N saites veidošanas posmam.

Iespējamais mehānisms arilhidrazīna starpprodukta kondensācijai indazolā redzams 39. attēlā. Skābes klātbūtnē veidojas *N*-acilimīnija jons **63**. Selektīvi hidrolītiski nošķeļot vienu etoksikarbonilgrupu starpproduktā **63**, iegūst 1*N*-etoksikarbonilindazolu **53a**. Savukārt bāziskie apstākļi ļautu nošķelt abas etoksikarbonilgrupas, kā rezultātā veidojas starpprodukts **64**, kas pēc ūdens eliminēšanas dotu indazolu **54**.

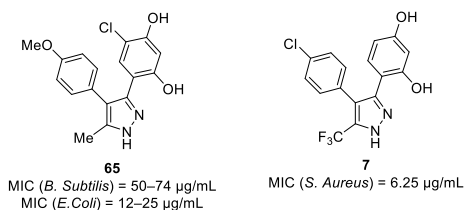


39. att. Piedāvātais kondensācijas posma mehānisms.

Rezumējot iepriekš teikto, vara katalizēta 2-formilborskābju reakcija ar diazodikarboksilātiem, kam seko skābes vai bāzes izraisīta cikla saslēgšana, ir ērta metode 1*N*-alkoksikarbonilindazola atvasinājumu sintēzei. Indazola sintēzi var veikt, izmantojot arī hidrazīna dikarboksilātus kā reakcijas substrātus, tomēr C–N saites veidošanas posmā ir nepieciešams stehiometrisks vara(II) acetāta daudzums.

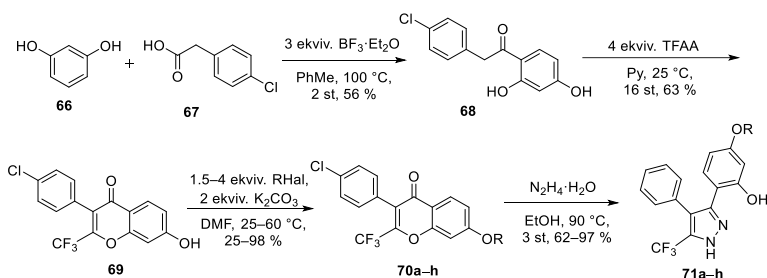
5. Difenilazoli kā antibakteriāli līdzekļi pret *S. Aureus Newman*

Jaunu HK TCs inhibitoru meklējumu procesā uzmanību piesaistīja antibakteriālo savienojumu sērija uz 3,4-diarilpirazola bāzes, kas pārveidoti no savienojumiem ar pretvēža aktivitāti, Hsp90 inhibitoriem (40. att.).³⁵ Šāds pieņēmums tika izdarīts, jo antibakteriālā aktivitāte ir saistīta ar baktēriju histidīna kināžu inhibēšanu 3,4-diarilpirazoliem koordinējoties ATP saistošajā domēnā, kam ir liela līdzība ar eikariotu Hsp90 ATPāzes domēnu. Reprerzentatīvais savienojums **65** uzrādīja mikromolāru histidīna kināžu *C. crescentus* CckA un *Salmonella* PhoQ inhibēšanu un vidēju aktivitāti pret noteiktiem gramnegatīviem un grampozitīviem baktēriju celmiem. Strukturāli līdzīgu trāpījuma molekulu **7** ar labu potenci pret *S. Aureus Newman* atklāja profesors *J. Wells*, veicot savienojumu bibliotēku skrīningu antibakteriālās jutības testos.³⁶



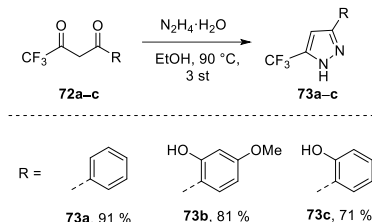
40. att. Antibakteriālie līdzekļi uz pirazola bāzes **65** un **7**.

Lai izpētītu 3,4-diarilpirazolus kā potenciālus antibakteriālus līdzekļus, sintezēta savienojumu sērija saskaņā ar 41. attēlu. Galvenais starpprodukts 3,4-diarilpirazolu **71a–h** sintēzei bija izoflavons **69**.³⁷ Tas sintezēts no viegli pieejama rezorcīnola **66** un 4-hlorfeniletikskābes **67** divās stadijās.^{37b, 38} Pirmajā stadijā veikta rezorcīna **66** Friedel–Crafts acilēšana, ko katalizēja bora trifluorīda dietilētērs. Iegūtais acilresorcīnols **68** kondensēts ar trifluoeretikskābes anhidrīdu, kam sekoja ciklizācija, iegūstot izoflavonu **69**. Tālāk *O*-alkilēšanas reakcijā iegūti izoflavona atvasinājumi **70a–h**, kas kondensēti ar hidrazīnu, un rezultātā iegūti jauni mērķa savienojumi **71a–h**.



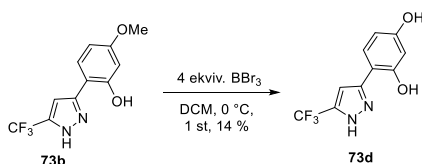
41. att. 3,4-Diarilpirazolu **71a–h** sintēze.

Tālāk, lai pārbaudītu katras molekulas daļas nozīmi, tika sintezēta atvasinājumu sērija ar mainītām vai noņemtām funkcinālām grupām. Monoarilpirazoli **73a–c** tika sintezēti, kondensējot diketonus **72a–c** ar hidrazīnu (42. att.).



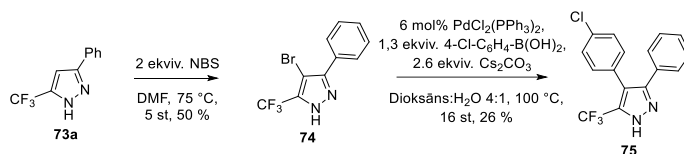
42. att. 3-Arīlpirazolu **73a–c** sintēze.

Pirazolā **73b** metoksiaizsarggrupa nošķelta, izmantojot bora tribromīdu (43. att.).



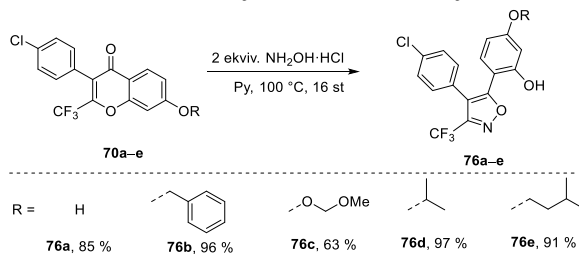
43. att. Aizsarggrupas noņemšana savienojumā **73b**.

Viens no monoarīlpirazoliem – savienojums **73a** – bromēts, lai iegūtu broma atvasinājumu **74**, kas *Suzuki–Miyaura* reakcijas apstākļos deva diarīlpirazolu **75** (44. att.).



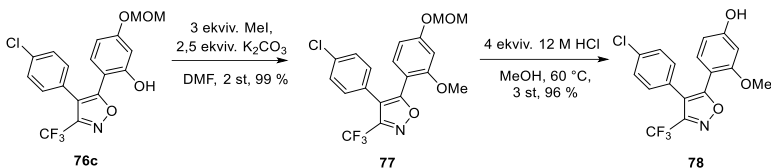
44. att. 3,4-Diarīlpirazola **75** sintēze.

Papildus tika izpētīta iespēja pirazola karkasu aizstāt ar izoksazola ciklu. Izoksazola analogi **76a–e** iegūti no izoflavona atvasinājumiem **70a–e** reakcijā ar hidroksilamīnu (45. att.).³⁹



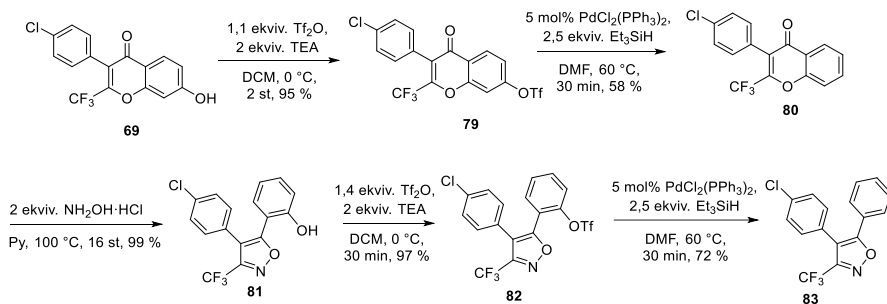
45. att. 4,5-Diarīlizoksazolu **76a–e** sintēze.

O-MOM aizsargātajā produktā **76c** metilēta brīvā fenola OH grupa, un iegūtajam atvasinājumam **77** nošķelta MOM grupa skābā vidē, lai iegūtu izoksazolu **78** ar augstu (96 %) iznākumu (46. att.).



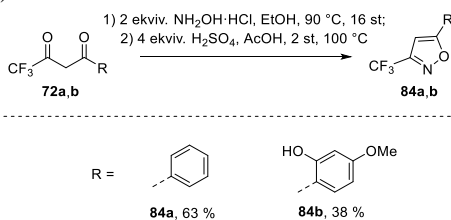
46. att. 4,5-Diarilizoksazola **78** sintēze.

Deoksigenētie diariloksazola analogi **81** un **83** sintezēti, sākot no izoflavona atvasinājuma **69** (47. att.). Tas pārvērsts par triflātu **79**, kurā C-O saite šķelta palādija katalizētas hidrogenolīzes apstākļos, izmantojot trietilsilānu kā ūdeņraža pārnese reaģentu. Iegūtais izoflavona atvasinājums **80** pārvērsts par izoksazolu **81**. Tas savukārt secīgi pārvērsts par triflātu **82** un reducēts, iegūstot produktu **83**.



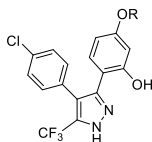
47. att. 4,5-Diarilizoksazolu **81** and **83** sintēze.

Izoksazoli **84a**⁴⁰ un **84b** bez aizvietotājiem heterocikla 4. pozīcijā sintezēti, sākot no diketoniem **72a,b** (48. att.).



48. att. 4,5-Diarilizoksazolu **84a,b** sintēze.

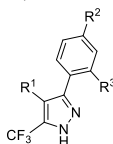
Visi sintezētie savienojumi **71a–h**, **73a–d**, **75**, **76a–e**, **78**, **81**, **83**, **84a,b** pārbaudīti *in vitro* *S. Aureus Newman* augšanas inhibēšanas testos. Testu rezultāti apkopoti 11.–14. tabulā.

Savienojumu **71a–h** antibakteriālā aktivitāte

Nr. p. k.	Savienojums	R	MIC, ^a µg/mL
1.	71a	Me	3,12
2.	71b	Bn	1,56
3.	71c	MOM	3,12
4.	71d	2,5-Cl ₂ C ₆ H ₃ CH ₂	1,56
5.	71e	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	1,56
6.	71f	PhSO ₂	1,56
7.	71g	<i>i</i> -Pr	0,78
8.	71h	<i>i</i> -Amil	< 0,39

^a *S. Aureus Newman*.

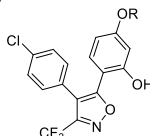
Antibakteriālās iedarbības paaugstināšanās salīdzinājumā ar trāpījuma savienojumu **7** panākta kā R aizvietotāju ievadot metilgrupu (savienojums **71a**, 11. tab., 1. piemērs). *O*-Benzilgrupai kā R aizvietotājam bija vēl lielāka pozitīva ietekme uz antibakteriālo aktivitāti (savienojums **71b**, 11. tab., 2. piemērs). MOM grupas klātbūtne (savienojums **71c**, 11. tab., 3. piemērs) tikai nedaudz palielināja aktivitāti, salīdzinot ar trāpījuma savienojuma **7**. Benzilgrupas aizstāšana ar 2,5-dihlorbenzilgrupu (savienojums **71d**, 11. tab., 4. piemērs), 4-brombenzilgrupu (savienojums **71e**, 11. tab., 5. piemērs) un fenilsulfonilgrupu (savienojums **71f**, 11. tab., 6. piemērs) savienojumu aktivitāti nemainīja, salīdzinot ar benzilanalogo **71b**. Vislabāko antibakteriālo aktivitāti šajā sērijā uzrādīja savienojumi, kas satur lipofilus R aizvietotājus, piemēram, *i*-propilgrupu (savienojums **71g**, 11. tab., 7. piemērs) un *i*-amilgrupu (savienojums **71h**, 11. tab., 8. piemērs).

Savienojumu **73a–d**, **75** antibakteriālā aktivitātē

Nr. p. k.	Savienojums	R ¹	R ²	R ³	MIC, ^a µg/mL
1.	73a	H	H	H	50
2.	73b	H	OMe	OH	25
3.	73c	H	H	OH	125
4.	73d	H	OH	OH	250
5.	75	4-ClC ₆ H ₄	H	H	1,56

^a*S. Aureus Newman.*

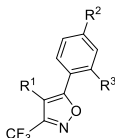
Atvasinājumi **73a–d**, kuriem nav aizvietotāju pirazola 4. pozīcijā, uzrādīja ievērojami sliktākus rezultātus, salīdzinot ar trāpījuma savienojumu **7** (12. tab., 1.–4. piemērs). Tomēr savienojums **75** ar 4-hlorfenilgrupu kā R¹ aizvietotāju un fenilgrupu kā R² aizvietotāju uzrādīja četras reizes lielāku aktivitāti nekā savienojums **7** (12. tab., 5. piemērs). Šie rezultāti liecina par divu arilaizvietotāju klātbūtnes nozīmi pirazola gredzenā, lai nodrošinātu augstu antibakteriālu aktivitāti. Turklāt savienojuma **75** augstā antibakteriālā aktivitātē nozīmē, ka hidroksilgrupas klātbūtne R¹ aizvietotāja fenilgredzenā nav būtiska.

Izoksazola atvasinājumu **76a–e** antibakteriālā aktivitātē

Nr. p. k.	Savienojums	R	MIC, ^a µg/mL
1.	76a	H	3,12
2.	76b	Bn	0,78
3.	76c	MOM	3,12
4.	76d	<i>i</i> -Pr	0,78
5.	76e	<i>i</i> -Amil	< 0,39

^a*S. Aureus Newman.*

Izoksazolu **76a–e** (13. tab.) antibakteriālā aktivitātē un struktūras–aktivitātes likumsakarības ir ļoti līdzīgas pirazola analogiem **7**, **71b**, **71c**, **71g**, **71h** (11. tab.).

Vienkāršotu izoksazola atvasinājumu **78**, **81**, **83**, **84a,b** antibakteriālā aktivitāte

Nr. p. k.	Savienojums	R ¹	R ²	R ³	MIC, ^a μg/mL
1.	78	4-ClC ₆ H ₄	OH	OMe	3,12
2.	81	4-ClC ₆ H ₄	H	OH	3,12
3.	83	4-ClC ₆ H ₄	H	H	neaktīvs
4.	84a	H	H	H	neaktīvs
5.	84b	H	OMe	OH	6,25

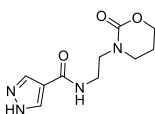
^a *S. Aureus Newman*.

Interesanta atkāpe novērota izoksazolīem **78**, **81**, **83** un **84a,b** (14. tab.). Savienojums **84a**, pretēji tā pirazola analogam **73a**, pilnībā zaudēja aktivitāti pret *S. Aureus Newman*. Savienojumam **84b** ir lielāks aktivitātes līmenis, salīdzinot ar **73b**. Pārsteidzoši, ka ortohidroksigrupas metilēšana R² aizvietotājā (savienojums **78**, 14. tab., 1. piemērs) neietekmēja MIC vērtību – tā saglabājās 3,12 μg/mL līmenī. Visbeidzot, savienojums **83** pilnībā zaudēja antibakteriālo aktivitāti (14. tab., 3. piemērs), salīdzinot ar pirazola atvasinājumu **75** ar tādu pašu aizvietotāju klāstu (12. tab.).

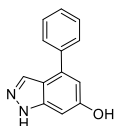
Savienojumu SAR analīze norāda virzienus turpmākiem strukturāliem uzlabojumiem, lai iegūtu spēcīgākus antibakteriālus līdzekļus uz fenilazolu bāzes. Lipofilo grupu ievadīšana molekulas fenola gredzena 5. pozīcijā palielināja savienojumu aktivitāti (**71g**, **71h**). Turpmāka lipofilitātes palielināšanās šajās pozīcijās varētu vēl paaugstināt aktivitāti. Turpmākajā darbā būtu jāizpēta citi piemēroti pieclocēkļu cikli, piemēram, imidazols, 1,2,3-triazols vai izotiazols kā struktūras pamats, lai uzlabotu savienojumu efektivitāti. Tomēr savienojumu **81** un **83**, vai **75** un **83** pāru SAR analīze liecina, ka inhibitorās aktivitātes saglabāšanai molekulā jābūt vismaz vienai NH vai OH grupai.

SECINĀJUMI

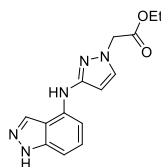
1. Bioloģiskās aktivitātes novērtēšanai sintezētas četras perspektīvu HK TCs inhibitoru sērijas: pirazol-4-karboksamīda, 2-aminohinazolīna, indazola un 3,4-difenilpirazola atvasinājumi.
2. Pirazol-4-karboksamīdu bibliotēka izveidota, kondensējot pirazol-4-karbonskābi ar dažādiem alkil- un arilamīniem. Diemžēl bibliotēkai nebija potenciāla turpmākai attīstībai: enzīmatiskās un *in vitro* antibakteriālās pārbaudes neatklāja nozīmīgu aktivitāti. No otras puses, CheA proteīna–liganda kompleksa rentgenstaru kristalogrāfija ar amīdu, kas satur ciklisku karbamāta daļu, parādīja savienojuma mijiedarbību tieši tā, kā prognozēts CADD modeļos. Šādu neatbilstību var izskaidrot ar minētā liganda vāju mijiedarbību ar proteīnu.



3. Indazola atvasinājumu bibliotēka veidota, sākot no aizvietotajiem 4-bromoindazoliem, izmantojot dažāda veida palādija katalizētas šķērssavienojumu reakcijas. Savienojums ar fenila aizvietotāju uzrādīja vāju antibakteriālo aktivitāti pret *E. Coli*, un tā antibakteriālās iedarbības mehānisms palika neskaidrs. Indazols, kas satur 3-aminopirazola aizvietotāju, un tā strukturālie analogi enzīmatiskajā testā uzrādīja mērenu potenciālu, bet antibakteriālo aktivitāti neuzrādīja.

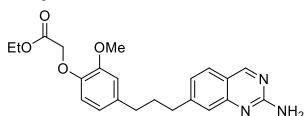


E. Coli MIC = 62,5 µg/mL

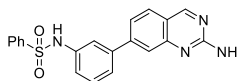


S. Aureus Newman PhoR IC₅₀ = 67 µM

4. 2-Aminohinazolīnu bibliotēka izveidota, izmantojot *Heck* reakciju starp 7-bromhinazolīn-2-amīnu un dažādiem alkēniem. Jaunizveidotie alkēni selektīvi reducēti, veidojot alkiltiņus. Papildu savienojumi iegūti *Suzuki–Miyaura* reakcijā starp 7-bromhinazolīn-2-amīnu un arilborskābēm vai starp (2-aminohinazolīn-7-il)borskābi un arilbromīdiem. Visi savienojumi no šīm sērijām pārbaudīti, lai noteiktu to spēju saistīties ar CheA proteīnu (MST tests), un divi savienojumi uzrādīja vislabāko saistīšanās afinitāti savās sērijās.

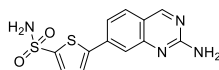
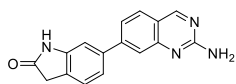


CheA K_D = 317 nM

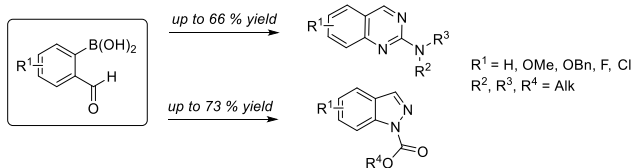


CheA K_D = 162 nM

5. Kopumā 2-aminohinazolīna atvasinājumi neuzrādīja vērā ņemamu *in vitro* antibakteriālo aktivitāti standarta apstākļos. Tomēr savienojums ar indolīnona aizvietotāju inhibēja *S. Aureus* augšanu vidē ar zemu fosfātu saturu, un ar tiofēnsulfonamīdu aizvietots savienojums spēja samazināt rezistenci pret vankomicīnu *E. Faecalis* rezistentā celmā.



6. Izoflavonu un β -diketonu reakcijā ar hidrazīna hidrātu sintezēti vairāki 3-fenilpirazola atvasinājumi. To pašu izejvielu ciklizācija ar hidroksilamīnu ļāva iegūt izoksazolus ar aizvietošanas modeli, kas identisks pirazoliem. Savienojumi ar nošķeltu hidroksigrupu sintezēti, pārveidojot OH grupu par triflātu ar sekojošu Pd katalizētu reducēšanu. SAR pētījumi parādīja svarīgākās funkcionālās grupas, kas nodrošina antibakteriālo aktivitāti. Pirazola kodolu var aizstāt ar izoksazolu, neietekmējot aktivitāti, tomēr, lai saglabātu antibakteriālo iedarbību, molekulā jāpaliek vismaz vienai polārai grupai. Antibakteriālās iedarbības mehānisms šāda veida savienojumiem palika neskaidrs, bet, visticamāk, tas nav saistīts ar HK TCs inhibēšanu.
7. Izstrādātas jaunas metodes 2-aminohinazolīnu un *N*-aizsargāto indazolu sintēzei, izmantojot vara katalizētu *Chen–Evans–Lam* reakciju, sākot no 2-formilfenilborskābēm. Reakcijā ar guanīdīniem veidojas 2-aminohinazolīni, savukārt reakcijā ar azodikarboksilātiem un hidrazīna dikarboksilātiem veidojas *N*-aizsargāti indazoli. Reakciju var veikt maigākos apstākļos, salīdzinot ar zināmajām 2-halobenzaldehīdu šķērssavienojumu reakcijām.



**DOCTORAL THESIS PROPOSED
TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR THE PROMOTION
TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE**

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (Ph. D.), the present Doctoral Thesis has been submitted for the defence at the open meeting of RTU Promotion Council on July 13, 2023 at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street 3, Room 272.

OFFICIAL REVIEWERS

Associate Professor Dr. chem. Nelli Batenko,
Riga Technical University

Professor, Ph. D. Antimo Gioiello,
University of Perugia, Italy

Senior Researcher, Dr. chem. Kārlis Pajuste,
Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for the review to Riga Technical University for the promotion to the scientific degree of Doctor of Science (Ph. D.) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis had not been submitted to any other university for the promotion to other scientific degree.

Vitalii Solomin (signature)

Date.....

The Doctoral Thesis has been written in English. It consists of an Introduction, 5 chapters, 17 figures, 76 schemes, 20 tables, and Conclusions and includes 3 publications; the total number of pages is 134. The Bibliography contains 101 titles.

CONTENTS

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS	47
Introduction	47
Aims and objectives	49
Scientific novelty and main results	50
Structure of the thesis	50
Publications and approbation of the thesis	51
MAIN RESULTS OF THE THESIS	52
1. Pyrazole amide and indazole derivatives as putative HK inhibitors	52
2. 2-Aminoquinazoline derivatives as putative HK inhibitors	58
3. New method for the synthesis of 2-aminoquinazoline from 2-formylphenylboronic acids and guanidines	67
4. New method for the synthesis of indazoles from 2-formylphenylboronic acids and azodicarboxylates or hydrazine dicarboxylates	71
5. Diphenylazoles as antibacterials active against <i>S. Aureus Newman</i>	78
CONCLUSIONS	84
REFERENCES	86

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Bacterial infections have a great impact on public health.¹ Starting from the middle of the 20th century a lot of deaths were prevented by introducing antibiotics, and average life expectancy at birth rose almost to 79 years.² A number of antibiotic classes were established between 1930 and 1960, while only few of them were discovered in recent decades.³ The long term use of the same lifesaving antimicrobials was the strong evolutionary factor for bacterial species – bacteria developed mechanisms help them to neutralize antibiotics,⁴ e.g. bacteria evolves the mechanisms of resistance to several types of antimicrobial drugs, which makes it a multidrug resistant bacteria. Such mechanisms can occur either by accumulation of the multiple genes, responsible for resistance to a particular drug, or by overexpression of genes coding efflux pumps of bacteria.⁵ Clinical therapy of infections, caused by resistant bacteria, usually require higher doses of medicines, or the use of more efficient but also more toxic drugs.^{2, 6}

The above-mentioned reasons have motivated a research to discover new perspective antimicrobials, which are able to target antibiotic-resistant strains. Primary task of such a research is the definition of potential target for a new drug. Most of the traditional antibiotics target cell wall synthesis (penicillines, cephalosporines, polypeptides) and bacterial protein synthesis (tetracyclines, amphenicols, macrolides).⁷ All of these drugs induce bacterial death, which is a significant factor to the bacteria for adaptation to such therapeutics.⁸ Prospectively, compounds which target bacterial systems involved in the adaptation to antibiotics can be a solution to the problem of multidrug resistant bacteria. One group of such possible targets is histidine kinase two-component systems (HK TCs).⁹

HK TCs of bacteria are responsible for the signal transduction pathways, including regulation of virulence, secretion systems and antibiotic resistance. Additionally, TCs are ubiquitous among bacteria and absent in mammalian cells.¹⁰

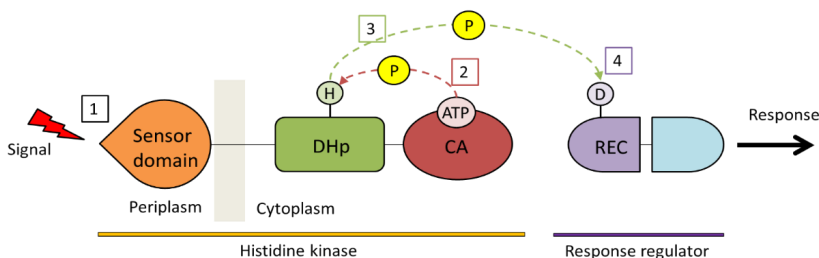


Fig. 1. Histidine kinase two-component system signaling pathway: DHp – dimerization and histidine phosphotransfer domain (DHp); CA – catalytic domain; REC – receiver domain; H – histidine residue; D – aspartate residue; ATP – adenosine triphosphate; P - phosphate. Numbers in the scheme correspond to the order of signal transduction pathway: 1 – receiving of extracellular signal; 2 – ATP binding and phosphate transfer to histidine; 3 – phosphate transfer to aspartate residue on receiver domain; 4 – structural change of receiver domain.

Signal cascade in HK TCs starts from a sensor domain (1), located in periplasmic or extracellular media.¹¹ Then ATP binds to catalytic domain (CA) followed by transfer of a phosphate group to a conserved histidine at histidine phosphotransfer domain (DHp). Subsequently the high-energy phosphoryl group is transferred to a conserved aspartate at the receiver domain (REC) of the response regulator. The response regulator, in turn, undergoes conformational change, which leads to a specific response.¹²

The most attractive point for targeting in the HK TCs signaling pathway is the catalytic domain (CA), as this domain is already evolved to bind the small ATP molecule. Using properly designed inhibitors, specifically targeting CA, the transduction pathway can be interrupted leading to a reduced bacterial fitness or inducing a bactericidal effect.¹³

Our work was directed to the design and synthesis of novel HK TCs inhibitors starting from hit molecules identified by X-ray crystallography of the corresponding protein-ligand structures. Perspective for the further modification scaffolds then were subjected to computer-aided drug design (CADD) studies to reveal possible structure modifications which can enhance the potency of compounds. After CADD modelling the most interesting compounds were selected for the synthesis. To measure biological activity of the compounds, both enzymatic assays on bacterial proteins and *in vitro* tests on bacterial cultures were performed.

One of the proteins used in the enzymatic tests was chemotaxis protein (CheA), which is a central regulator of bacterial chemotaxis. It belongs to a protein group that controls gene expression in response to environmental conditions changes. The CheA binds ATP and catalyzes the phosphorylation of one of its own histidine residues.¹⁴ Another protein used in our research is phosphate regulon sensor protein (PhoR), which is the part of two component signal transduction pathway. In live cell PhoR indirectly senses and responds to the level of extracellular inorganic phosphate by phosphorylating and dephosphorylating its cognate response regulator PhoB.¹⁵ Also HK853 protein was applied for the tests. HK853 is the C-terminal catalytic and ATP-binding domain¹⁶ which is proved to possess an ATP-dependent autokinase activity *in vitro* and to support

phosphotransfer to PhoP response regulator.¹⁷ The last member of this protein family used in the assays is EnvZ, playing the key role in phosphorylation of the activator protein OmpR. Phosphorotransfer between EnvZ and OmpR in *E. Coli* regulates adaptation to changes in environmental osmotic pressure.¹⁸

For the *in vitro* bacterial growth inhibition assays were used Gram positive bacterial strains: *S. Aureus Newman*,¹⁹ and *E. Faecalis*.²⁰ Gram negative strains were represented by *E. Coli*.²¹ Additionally, antibiotic resistant strains were used, such as Methicillin-resistant (MRSA) *S. Aureus*²¹ and Vancomycin-resistant *E. Faecalis*.²²

The research was performed in collaboration with the group of Dr. A. Marina from Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC (X-ray crystallography, screening of fragment library, enzymatic and biophysical binding assays), group of Prof. J. Wells from University of Wageningen (antibacterial cell-based assays), and with the team of Prof. P. Finn from company Oxford Drug Design (CADD).

Our main contribution to the discovery of HK TCs inhibitors was the synthetic development of hit compounds resulting from screening libraries. This included the generation of focused libraries based on a defined core of a hit compound as well as fragment merging and fragment growth. To enable access of certain compound classes such as quinazolines and indazoles with expanded functionalization pattern, we also developed new synthetic methods to construct these heterocycles.

Aims and objectives

The aim of the Thesis is to develop new potent inhibitors of HK TCs based on fragment-based lead discovery approach and virtual screening hits. Concomitantly new methods of synthesis of the most potent heterocyclic motifs may be explored. The following tasks were set:

- 1) to synthesize putative HK TCs inhibitors designed by project partners – derivatives of pyrazole, quinazoline and indazole heterocyclic motifs – and analyze their structure-activity relationship (SAR) using the data provided by collaboration institutions;
- 2) to explore novel milder ways of assembling of the most perspective 2-aminoquinazoline and indazole scaffolds, starting from readily available 2-formylphenylboronic acids;
- 3) to synthesize 3,4-diphenylpyrazole derivatives with proved antimicrobial activity, possibly connected with inhibition of HK TCs, and analyze their SAR regarding inhibition of growth of *S. Aureus Newman*.

Scientific novelty and main results

As the result of the Thesis, new chemotypes of the HK TCs inhibitors were proposed:

- 1) indazole derivatives, modified with aryl substituent on the 4th position of heterocyclic ring;
- 2) 2-aminoquinazoline derivatives, modified on the 7th position with aryl substituents.

Additionally, antimicrobial efficiency of arylazoles against *S. Aureus Newman* and their SAR were described. New synthesis methods of heterocycles of interest were discovered:

- 1) convenient and mild copper-catalyzed synthesis of 2-aminoquinazolines from 2-formylphenylboronic acids and guanidines;
- 2) copper-mediated synthesis of indazoles from 2-formylphenylboronic acids and azodicarboxylates or hydrazine dicarboxylates.

Structure of the Thesis

The Thesis consists of literature review, dedicated to the ways of synthesis of 2-aminoquinazolines and medicinal chemistry application of thereof, description of synthesis of putative HK TCs inhibitors and results of their biological activity studies. Additionally, a description of antimicrobial activity of novel phenylpyrazoles and phenylisoxazoles against *S. Aureus Newman* was added together with new methods of synthesis of 2-aminoquinazolines and indazoles.

Publications and approbation of the Thesis

Main results of the Thesis were summarized in 3 scientific publications. Results of the research were presented at three conferences.

Scientific publications:

1. **V. V. Solomin**, A. Seins, and A. Jirgensons. 2-Aminoquinazolines by Chan–Evans–Lam Coupling of Guanidines with (2-Formylphenyl)boronic Acids. *Synlett*, 31, **2020**, 1507-10 (IF(2020): 2.454).
2. **V. V. Solomin**, A. Seins, and A. Jirgensons. Synthesis of indazoles from 2-formylphenylboronic acids. *RSC Advances*, 11, **2021**, 22710-14 (IF(2021): 4.036).
3. **V. V. Solomin**, B. Fernandez Ciruelos, N. Velikova, J. Wells, M. Albanese, A. Adhav and A. Jirgensons. Synthesis and SAR of phenylazoles, active against Staphylococcus Aureus Newman. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 58 (12), **2022**, 737–748 (IF(2021): 1.490).

Results of the Thesis were presented at the following conferences:

1. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Synthesis of 2-Aminoquinazolines and Indazoles from 2-Formylphenylboronic Acids. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia, February 11, **2022**, Riga, Latvia.
2. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Synthesis of 2-Aminoquinazolines and Indazoles from 2-Formylphenylboronic Acids. Balticum Organicum Synthetium (BOS 2022), July 3–6, **2022**, Vilnius, Lithuania.
3. **V. V. Solomin**, A. Jirgensons. Chan-Evans-Lam reaction inspired synthesis of 2-aminoquinazolines and N-protected indazoles. SPRINGBOARD project Summer School: Major milestones in design and development of novel antimicrobials, August 23–25, **2022**, Apšuciems, Latvia.
4. **V. V. Solomin**, D. Zaharova. Synthesis of Quinazolines and Indazoles from 2-formylphenylboronic acids. 81th International Scientific Conference of the University of Latvia, March 17, **2023**, Riga, Latvia.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

1. Pyrazole amide and indazole derivatives as putative HK inhibitors

Initial work has started with screening of library of small compounds, which could interact with the proteins of interest. The X-Ray crystallography screening was performed by the group of Dr. A. Marina (IBV CSIC). Ethyl 1*H*-pyrazole-4-carboxylate **1** was one of the first fragment hits, which was co-crystallized with CA domain of CheA (Fig. 2).

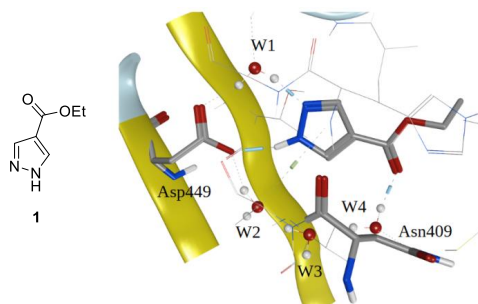


Fig. 2. Crystal structure of CA domain of CheA from *T. Maritima* in a complex with molecule **1**.

Compound **1** was particularly attractive for further derivatization because of accessibility of modifications, which can be made with the carboxyl group of the molecule. A virtual library of amides **4a–j** was created in collaboration with Marco Albanese (Oxford Drug Design), which was subjected to the docking studies, using computer-aided drug design (CADD). After several refinements of the results, the most promising compounds **4a–j** were selected for the synthesis. Amides **4a–j** were prepared from pyrazole-4-carboxylic acid **2** and corresponding amines **3a–j** by using EDCI in pair with HOBt as coupling agents (Fig. 3).

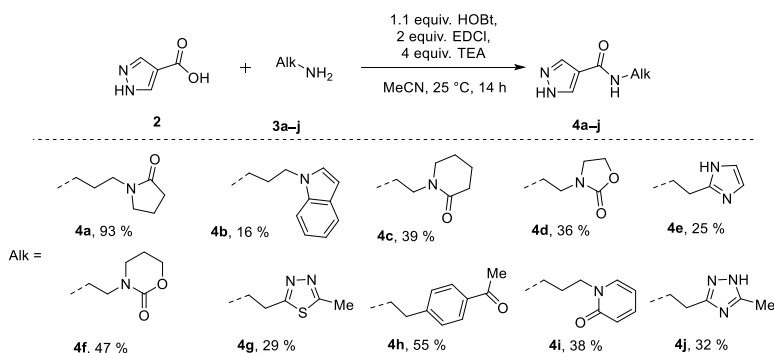


Fig. 3. Synthesis of amides **4a–j**.

The amides **4a–j** were subjected to enzymatic assay and bacterial growth assay. Unfortunately, the compounds **4a–j** showed no detectable activity in any of the assays. The initial unsuccessful results prompted us to propose more “rigid” compounds without flexible chain between structural elements of the molecule. Using CADD, another series of pyrazole amides **6a–i** was designed as potential inhibitors for histidine kinases. Using EDCI as a coupling reagent and pyridine as a solvent, anilines **5a–i** were converted to the corresponding amides **6a–i** (Fig. 4).

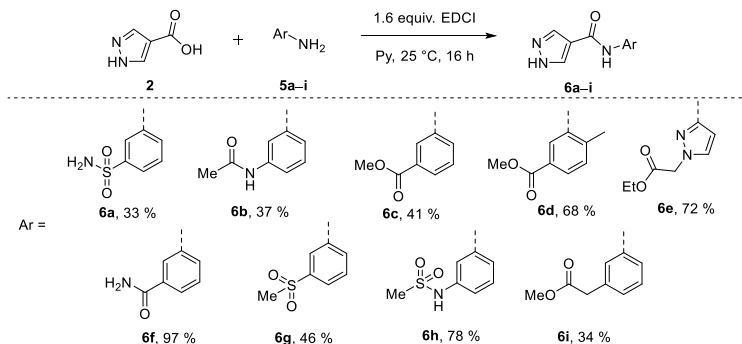


Fig. 4. Synthesis of anilides **6a–i**.

Compounds **6a–i** showed a weak inhibitory potency in the case of target proteins PhoR and EnvZ as well as autophosphorylation inhibition, TNP-ATP displacement²³ and radical replacement²⁴ assays revealed the inactivity of the proposed class of compounds alongside with no activity to inhibit the growth of Gram positive and Gram negative bacterial cultures. Noteworthy, that upon crystallography studies in IBV CSIC, X-Ray crystal structure of compound **4f** with CheA protein was obtained (Fig. 5 A), which confirmed the predictions made by CADD. Real structure position (in red) and predicted binding mode (in green) are almost identical (Fig. 5 B).

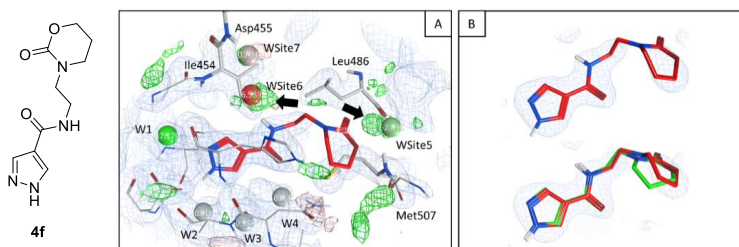


Fig. 5. X-ray crystal structure of **4f** in complex with CheA. A – Crystal binding mode of **4f** (red tubes) in complex with CheA. B – Top: crystal bound conformation of **4f** (in red tubes). Bottom: an overlay of the crystal-bound conformation (red tubes) onto the energy minimized crystal bound conformation (green tubes).

After obtaining of not promising results with pyrazole amide derivatives, other possibilities for fragment **1** enrichment were analyzed. Fragment **1** was virtually merged with other X-Ray fragment 4-(4-(4-chlorophenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-3-yl)benzene-1,3-diol (**7**) obtained by crystallography studies (group of Prof. A. Marina at CSIC) (Fig. 6).

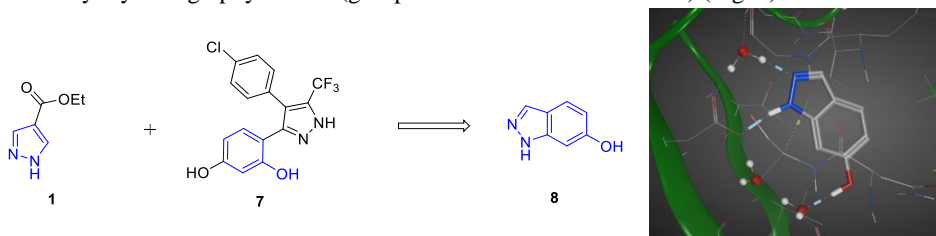


Fig. 6. Ligands **1** and **7** merging to obtain ligand **8** structure.

It was detected that indazole-containing compound **8** probably retains main connection features to CA. Analysis of possible options for modification of virtual fragment **8** was made and it was proposed to introduce an aryl substituent at the 4th position of the indazole, whereas hydrogen bond acceptor, such as pyridine nitrogen (additional interaction showed with arrows) is very preferable. Consequently, indazole **9** was determined as perspective compound for further investigation in bacteria growth assays (Fig. 7).

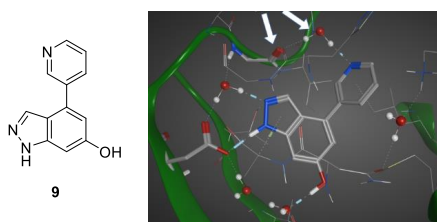


Fig. 7. A predicted binding mode of 4-(pyridin-3-yl)-1H-indazol-6-ol **9** with CheA.

Suzuki-Miyaura reaction of bromoindazole **11** with aryl boronic acids was chosen to introduce an aryl group at the indazole moiety (Fig. 8). The synthesis of the key intermediate bromoindazole **11** was performed starting from 2-fluorobenzaldehyde **10**, which was cyclized under the reaction with hydrazine at elevated temperature.²⁵ Further, compound **11** was subjected to *Suzuki-Miyaura* reaction with arylboronic acids to obtain compounds **12a–c**, followed by deprotection of hydroxy group using boron tribromide to obtain indazoles **9**, **13a,b**.

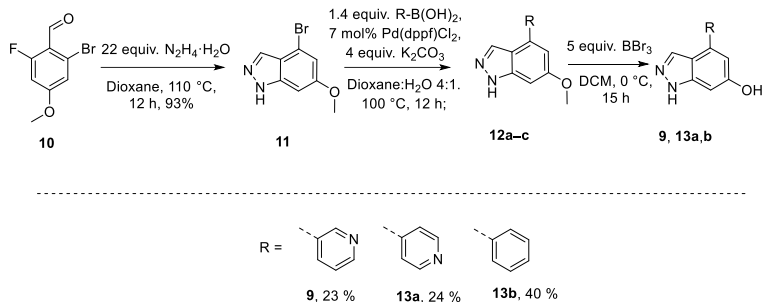


Fig. 8. Synthesis of indazoles **9**, **13a**, **b**.

Indazoles **9**, **13a**, **b** were subjected to bacterial growth assays. Compounds **9**, **13a**, **b** showed no inhibition of growth of *S. Aureus Newman* representing Gram positive bacteria. Nevertheless, indazoles **9**, **13a**, **b** were found to be weak inhibitors of growth of *E. Coli* representing Gram negative bacteria with a MIC value $250\ \mu\text{g/mL}$ for **9** and **13a**, and $62.5\ \mu\text{g/mL}$ for **13b**. Unfortunately, indazoles **9**, **13a**, **b** showed no inhibitory activity of target PhoR (IC_{50} was higher than $2\ \text{mM}$). It is known that this type of protein belongs to the family of highly structurally conserved proteins,²⁶ and most likely other proteins of this type could not be inhibited, too. This fact implies that the antibacterial activity of these indazoles is linked to other mechanism of action not involving inhibition of HK TCs.

The second series of indazole-based compounds that retained the main scaffold were modified at 4th position using *Buchwald–Hartwig* amination reaction with aniline **5d** using Boc-protected indazoles **14a**, **b** as starting materials (Fig. 9). At the final step, Boc group of **15a** was cleaved together with methyl ester to produce compound **16**. A simplified analog **18** lacking OH group at the 6th position of indazole was synthesized starting from bromoindazole **14b**. This was coupled with aniline **5d** under amination reaction conditions to obtain intermediate **15b**. Then, after Boc-group cleavage, the ester group of the obtained compound **17** was hydrolyzed with sodium hydroxide providing compound **18** (Fig. 9).

Compound **20** was synthesized in a similar way, using aminopyrazole **5e** for the coupling with bromoindazoles **14a**, **b** (Fig. 10). Deprotection of all of three protecting groups of compound **19a** was done in one step using aqueous HBr, which allowed to obtain compound **20**. A simplified analog **22** lacking OH group at the 6th position of the indazole was synthesized starting from available **14b** and **5e** to give the compound **19b**. This was deprotected with TFA to obtain compound **21**. Ester group was further hydrolyzed under basic conditions to obtain compound **22** (Fig. 10).

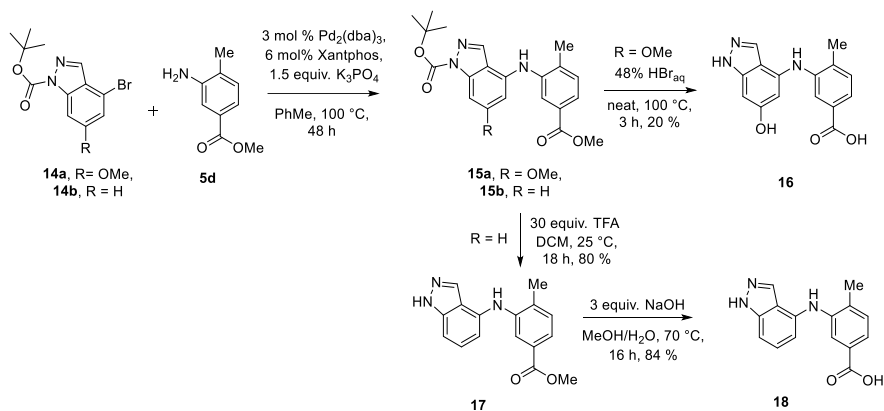


Fig. 9. Synthesis of indazoles derivatives **16**, **18**.

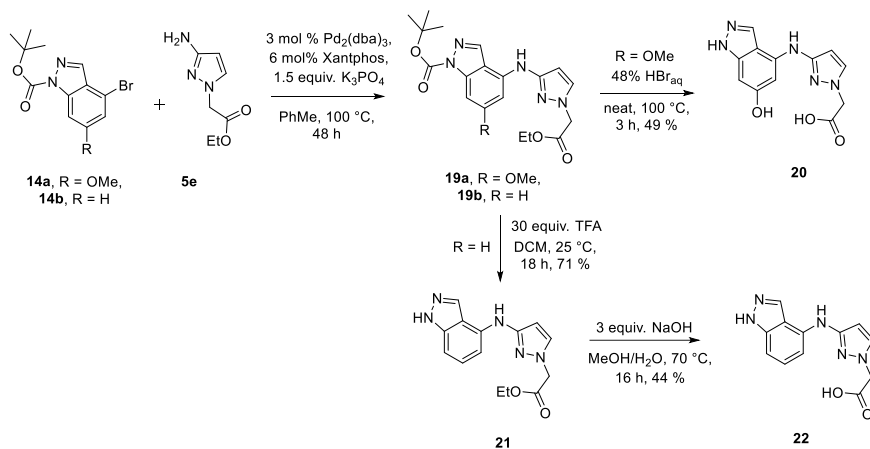
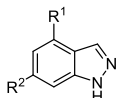


Fig. 10. Synthesis of indazoles **20**, **22**.

The compounds **16–18**, **20–22** were investigated for their ability to bind bacterial protein PhoR from *E. Coli* and *S. Aureus* strains, and a structurally similar human heat shock protein 90 (Hsp90) using microscale thermophoresis (MST) assay.²⁷ Results of the MST experiments are summarized in Table 1.

Table 1

IC₅₀ data for the synthesized indazoles **16–18**, **20–22**



Number	R ¹	R ²	<i>S. Aureus</i> PhoR	<i>E. Coli</i> PhoR	Hsp90 K _d
16		OH	>1 mM	> 1 mM	241 nM
17		H	>500 μM	>500 μM	474 nM
18		H	>500 μM	>500 μM	327 nM
20		OH	>1 mM	> 1 mM	187 nM
21		H	67 μM	162 μM	457 nM
22		H	86 μM	143 μM	689 nM

Compounds **16** and **20** bearing hydroxy group at the 6th position of indazole ring showed no measurable binding to *S. Aureus* PhoR and *E. Coli* PhoR – in both cases biological tests indicated that activity level was higher than 1 mM. Nevertheless, K_d data in tests with Hsp90 revealed nanomolar affinity levels for these compounds – 241 nM for **16** and 187 nM for **20**. Simplified analogues without OH group in the 6th position of indazoles **17**, **18**, **21** and **22** also exhibited affinity to Hsp90 in range 300–700 nM. But only compounds **21** and **22** showed activity with tests in pair with *S. Aureus* PhoR and *E. Coli* PhoR. Remarkably, higher potency was exhibited in the case of *S. Aureus* PhoR protein (67 μM for **21** and 86 μM for **22**), and slightly lower in the case of *E. Coli* PhoR (162 μM and 143 μM, respectively).

2. 2-Aminoquinazoline derivatives as putative HK inhibitors

Pyrazole-based compound **1** was not the only one compound which exhibited potential for the interaction with HK TCs. Extensive work on screening of fragment library by X-ray crystallography revealed 2-aminoquinazoline ligand **23** to be able to interact with ATP binding domain of CheA protein (Fig. 11).

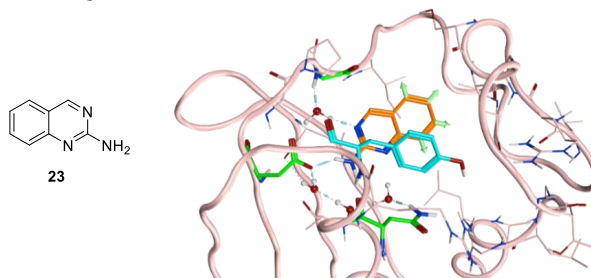


Fig. 11. 2-Aminoquinazoline **23** in the complex with CheA protein. Tyrosine residue is shown in blue, growth vectors are shown in green.

Analysis of the crystal structure of the ligand-protein complex suggested several fragment **23** growth vectors for the improvement of the molecule affinity (green arrows in Fig. 11). Based on observation, the 7th position of 2-aminoquinazoline **23** was prioritized as the best attachment point for an additional structural element according to CADD modelling data. The first set of aminoquinazoline analogues was implemented bearing the substituents attached to the heterocycle at the 7th position *via* oxygen as a linker. Starting from commercially available 2-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde (**24**), a scope of compounds **25a–e** was synthesized. On the second stage of transformation, 2-fluorobenzaldehyde moiety of **25a–e** was converted to 2-aminoquinazolines, using cyclization with guanidine at 150 °C to achieve compounds **26a–e** (Fig. 12).

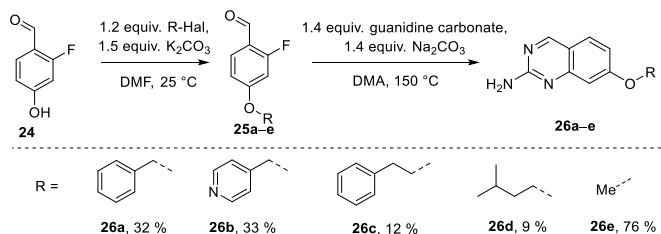


Fig. 12. Alkylation and cyclization cascade towards 2-aminoquinazolines **26a–e**.

Synthesized compounds **26a,b** were crystallized together with CheA protein, and the obtained protein-ligand complexes were analysed using X-Ray crystallography (group of Prof. A. Marina) (Fig. 13). This shows that compounds should contain aryl groups as substituents to show better affinity towards the protein of interest.

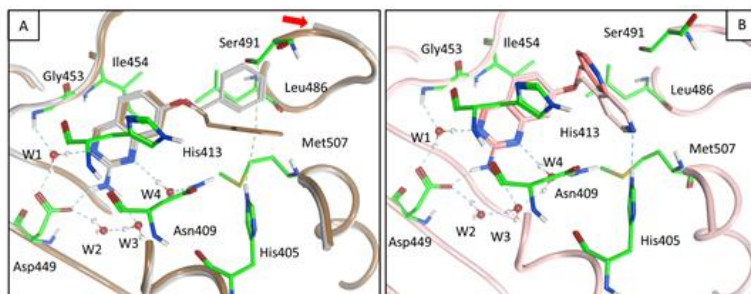


Fig. 13. X-ray crystal structures of CheA in complex with **26a** (A) and **26b** (B). Two alternate positions of **26b** were built in the crystal model: alternate 1 in dark pink tubes and alternate 2 in pink. Key residues are shown in green tubes.

Unfortunately, aminoquinazolines **26a–e** showed no inhibitory potency for PhoR (*S. Aureus*) and EnvZ (*E. Coli*) histidine kinases. Negative results were obtained also for the growth inhibition of *S. Aureus Newman* and *E. Coli* cells. According to CADD results (M. Albanese, Oxford Drug Design), putative HK TCS inhibitors should contain an additional structural element attached at the 7th position of quinazoline ring *via* a flexible linker. For such a type of compounds the *Heck* reaction was chosen as the most feasible way to connect the building blocks. For this purpose, 7-bromoquinazolin-2-amine (**27**) was synthesized from 4-bromo-2-fluorobenzaldehyde in the reaction with guanidine.²⁸ The *Heck* reaction of bromoquinazoline **27** with terminal alkenes **28a–g** provided disubstituted alkenes **29a–g**. In the next step, alkene was reduced to form compounds **30a–g** with alkyl linker. Precise amount of equivalents of reducing agents was essential to avoid concomitant reduction of 2-aminoquinazoline heterocyclic core (Fig. 14).

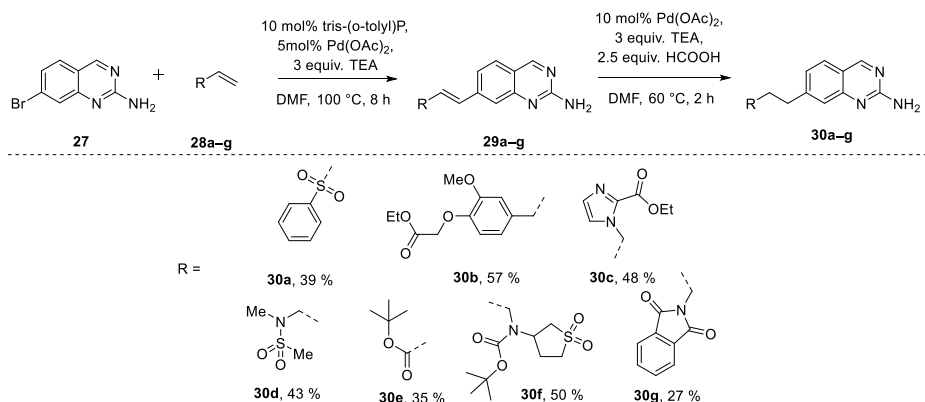


Fig. 14. Synthesis of 2-aminoquinazolines **30a–g** using *Heck* reaction.

Compounds **30b** and **30c**, bearing an ester group, were hydrolyzed under basic conditions to obtain carboxylic acid salts **31a** and **31b** (Fig. 15).

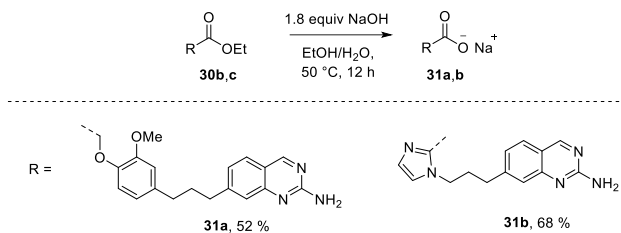


Fig. 15. Synthesis of 2-aminoquinazolines **31a,b** using basic hydrolysis of esters.

Compounds **32a** and **32b** were obtained by acidic cleavage of Boc and *t*-Bu groups from the **30f** and **30e**, respectively (Fig. 16).

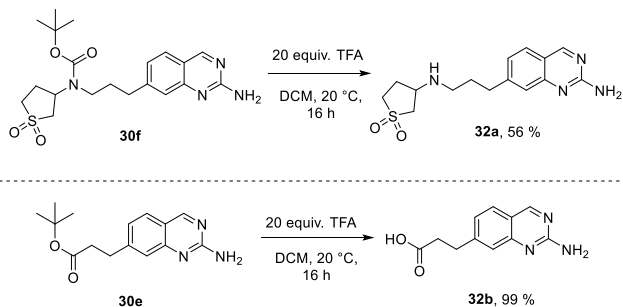


Fig. 16. Synthesis of 2-aminoquinazolines **32a,b** using acidic cleavage of protecting groups.

The structural investigations of the compounds **30a–g**, **31a,b**, and **32a,b** binding to the CheA protein were attempted by X-ray crystallography (group of Prof. A. Marina). However, it appeared that the density maps of ligand-protein complexes were too hard to resolve. 2-Aminoquinazoline core was located properly in the area predicted by CADD, while the location of “tail” part of the compound inside the crystal structure was unclear. This was assumed to be the result of several energetically similar conformations of the molecule inside the crystal pocket. For one of the compounds (**30c**) it was possible to distinguish two possible ways of binding inside the pocket. The CheA protein consists of two similar but not identical asymmetric parts. Compound **30c** has different conformation of the flexible part in each of these two structural units (Fig. 17).

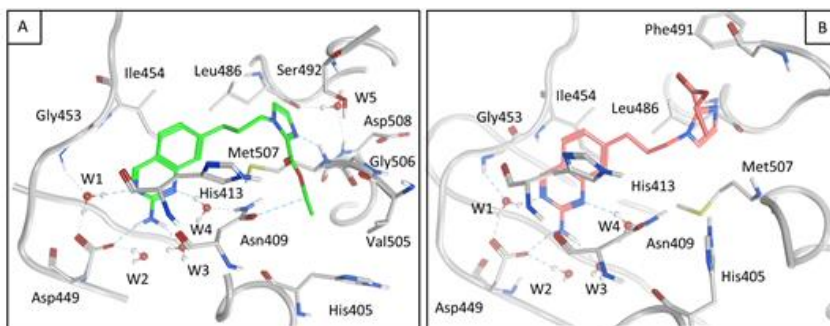


Fig. 17. X-ray crystal structure of two structural elements of CheA in complex with **30c**.

Facing these problems, the 3rd series of 2-aminoquinazoline derivatives was designed bearing aryl substituents attached to the 7th position of quinazoline ring. According to the CADD predictions the aryl substituent should contain hydrogen bond acceptor group such as ketone, amide or sulphonamide. To prepare such analogues, *Suzuki–Miyaura* reaction of 7-bromoquinazolin-2-amine **27** with arylboronic acids **33a–m** or the corresponding pinacolates **34** were used to attach an aryl group to the required position of 2-aminoquinazoline (Fig. 18). Using this approach, a library of compounds **35a–o** was synthesized.

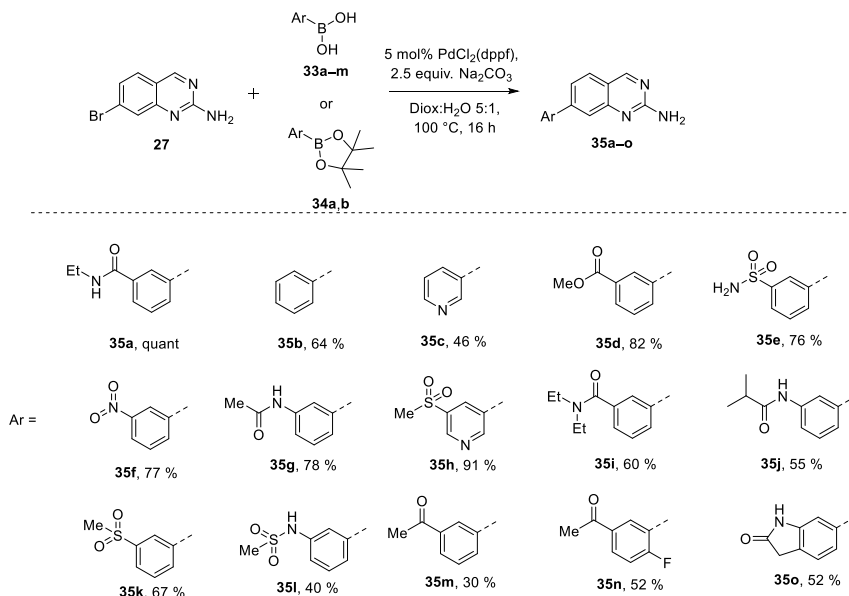


Fig. 18. Synthesis of 7-aryl 2-aminoquinazolines **35a–o** from 7-bromoquinazolin-2-amine **27**.

To expand the range of synthesized compounds, a boronic acid building block **36** was prepared from 7-bromoquinazolin-2-amine **27**. Then it was used in synthesis of aryl-substituted 2-aminoquinazolines **38a–f** by the coupling with a variety of readily available aryl bromides (Fig. 19).

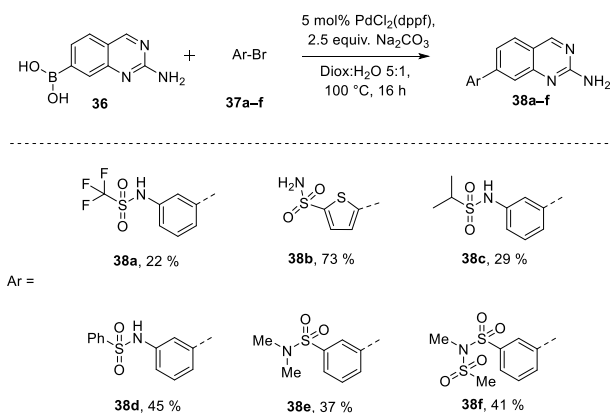


Fig. 19. Suzuki–Miyaura reaction with (2-aminoquinazolin-7-yl)boronic acid **36**.

Crystallography studies showed that polar substituent on phenyl points towards protein pocket to maintain additional interactions. Both of the structural units of CheA protein can effectively interact with **35k** by formation of additional hydrogen bonds with methylsulfone moiety (shown in superposition in Fig. 20 A). Compounds **35l** and **35m** could form the same type of interactions (Fig. 20 B).

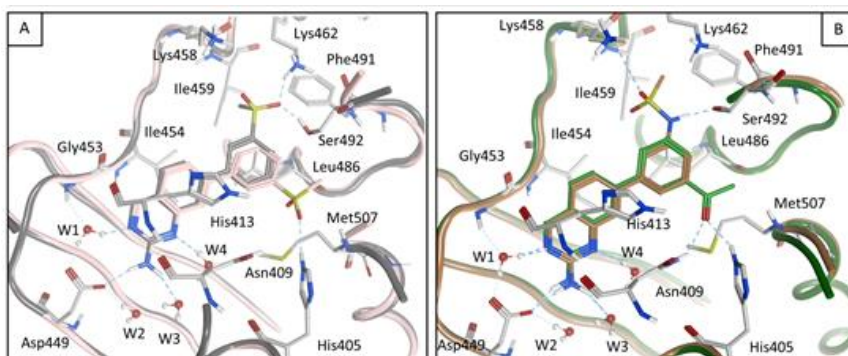


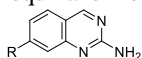
Fig. 20. X-ray crystal structures of CheA in complex with **35k** (A) and **35l,m** (B).

The synthesized compounds **26a–e**, **30a–g**, **31a,b**, **32a,b**, **35a–o**, and **38a–f** were tested for their binding to bacterial proteins CheA, PhoR, and HK853 using MST.²⁷ Human protein Hsp90 was also tested in pair with the compounds. Structurally similar to ATP,AMP-PNP (Adenylyl-

imidodiphosphate) was used as the control compound in these tests. It is known, that contrary to ATP, AMP-PNP can not transfer the terminal phosphate group, so this is a perfect inhibitor of ATP-binding site of proteins.²⁹ Results of the *in vitro* tests are depicted in Tables 2 (with ethereal and alkyl linker) and 3 (direct aryl-aryl connection). The results are provided by Anmol Adhav from IBV CSIC.

Table 2

K_d data for the selected 2-aminoquinazolines with ethereal and alkyl linker



Number	R	CheA K_d , μM	HK853 K_d , μM	PhoR K_d , μM	Hsp90 K_d , μM
AMP-		32	0.43	2.1	8.8
23	H	12	141	34	6.7
26a		0.6	65	n.d.	n.d.
26b		0.441	10	15	n.d.
26e	MeO ⁻	0.881	89	32	n.d.
30b		0.317	62	74	15
30c		2.68	71	83	7.2
30e		0.712	96	67	n.d.
31a		27	46	31	35
31b		1.78	n.d.	n.d.	n.d.
32a		991	n.d.	n.d.	n.d.
32b		0.661	66	60	n.d.

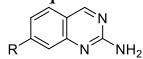
The original 2-aminoquinazoline hit **23** showed slightly better binding to CheA but had much lower affinity against HK853 and PhoR in comparison with AMP-PNP. Introduction of *O*-methyl group at the 7th position (compound **26e**) improved affinity against CheA and HK853 in comparison with 2-aminoquinazoline. In the case of *O*-benzyl derivative **26a** affinity against CheA and HK853 was in the same range as for *O*-methyl derivative **26e**. Remarkably, 7-(pyridin-4-ylmethoxy)quinazolin-2-amine **26b** showed 2-fold higher affinity against CheA and PhoR, and 9-fold higher affinity against HK853 compared to *O*-methyl derivative **26e**. More lipophilic substituents in compounds **26a,b** generally increased the affinity, but not drastically.

Compounds **30b,c,e**, **31a,b**, and **32a,b**, containing alkyl linker between quinazoline and a functional group, showed slight improvement in binding to HK853 in comparison with original 2-aminoquinazoline **23**. Affinity to CheA was below 1 μM for the compounds **30b,e** and **32b**, while relatively low for the compounds **30c** and **31a,b** – up to 27 μM for the compound **31a**. Curiously, structurally similar compounds **30c** and **31b** retained the same level of affinity against CheA protein. But carboxylic acid containing compound **31a**, showed 2-fold lower affinity in comparison with ethyl ester **30b**. This set of compounds showed general tendency that more active compounds usually need to have lipophilic residue with good hydrogen bond acceptor such as ester group attached by alkyl linker to aromatic system (compound **30b**).

The obtained series of the compounds **35a–o**, **38a–f** was tested mainly in pair with CheA protein, however only few of them showed a valuable activity. Those selected analogues are presented in Table 3.

Even with the simple phenyl substituent at the 7th position of 2-aminoquinazoline ring (compound **35b**), K_d value in the case of CheA reached 375 nM. 3-Acetophenyl group (compound **35m**) showed similar to phenyl group result (325 nM). However *N,N*-diethylcarboxamide analogue **35i** showed a very low K_d value – 191 nM. This data implies that increasing of lipophilicity at the 3rd position of phenyl ring is improving affinity. Compound **35j** bearing *N*-acyl moiety at the 3rd position of phenyl ring showed similar tendency regarding shift of the activity of the compound with increasing lipophilicity. Isobutyric acid amide **35j** has K_d 226 nM. The affinity of sulfonamide derivatives **35l** and **38b** were not in line with change in the lipophilicity, as observed for the analogues discussed above. Phenylsulfonamide **38d** was a 2-fold better binder in the tests with CheA compared to compound **35l**. 2-Aminoquinazolines **38b**, substituted with thiophenesulfonamide moiety, decreased activity value to 667 nM.

Almost all of the compounds **26a–e**, **30a–g**, **31a,b**, **32a,b**, **35a–o**, and **38a–f** were inactive in MIC *in vitro* tests both in the case of Gram positive (*S. Aureus Newman*) and Gram negative (*E. Coli*) bacterial strains. This can be explained by biological function of the HK TCs, which are potentially targeted by 2-aminoquinazoline based inhibitors. Most of HK TCs in bacteria play an essential role for an environmental adaptation. But inhibition of those types of system cannot cause an immediate death of bacteria because HK TCs are not essential for the survival of bacteria itself.

Table 3K_d data for the selected 2-aminoquinazolines with aryl-aryl connection

Number	R	CheA K _d , μM	HK853 K _d , μM	PhoR K _d , μM	Hsp90 K _d , μM
35b		0.375	n.d.	n.d.	n.d.
35i		0.191	n.d.	n.d.	n.d.
35j		0.226	n.d.	n.d.	n.d.
35l		0.43	16	3.2	0.57
35m		0.325	12	16	0.233
35o		0.71	n.d.	n.d.	n.d.
38b		0.667	n.d.	n.d.	n.d.
38d		0.162	n.d.	n.d.	n.d.

Nevertheless, several compounds showed activity in specific tests, dedicated to the potential inhibition of TCs (test results provided by Blanca Fernandez, Wageningen University). PhoPR is a two-component system that in *S. Aureus* detects limited phosphate concentration and upregulates the expression of two out of three phosphate transporters. *S. Aureus Newman* PhoPR mutant is not able to grow to the same density as the wild type in limited phosphate conditions. To screen for PhoPR inhibition, *S. Aureus Newman* was grown in the presence of 100 μM of quinazoline library compounds at low phosphate concentration (50 μM). Between all the tested compounds **26a–e–38a–f** only compound **35o** showed a reduction of bacterial growth compared to control at low phosphate concentration (50 μM, *S. Aureus Newman*), which suggests that only aminquinazoline derivative **35o** inhibits PhoPR pathways (Fig. 21).

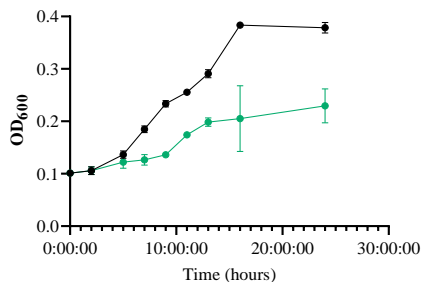


Fig. 21. Growth curve of *S. Aureus Newman* at low (50 μM) phosphate concentration in the presence (green curve) and absence (black curve) of 100 μM of **350**.

To further characterize antibacterial activity of **350**, it was tested against methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) JE2 strain and mutants with inactivated PhoR (ΔphoR strain) and PhoP (ΔphoP strain) systems. Growth of ΔphoR and ΔphoP mutants appeared to be defective at low phosphate concentration. Growth of MRSA *S. Aureus* at low phosphate concentration was significantly decreased when **350** was present, confirming the effect observed for *S. Aureus Newman* (Fig. 22).

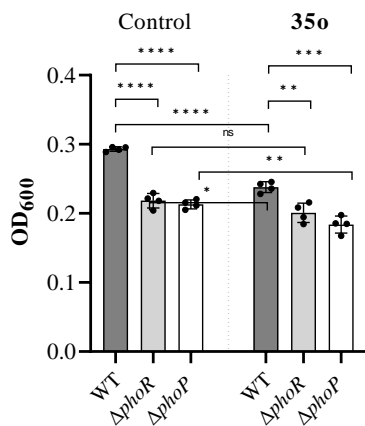


Fig. 22. Growth of MRSA *S. Aureus* and library mutants ΔphoP and ΔphoR in the absence (on the left) and presence of 100 μM (on the right) of **350** in low (50 μM) phosphate media.

This inhibitory effect of **350** vanished when the same set of experiments was repeated in phosphate rich medium.

Additionally, it was investigated whether 2-aminoquinazoline derivatives inhibit TCS enzymes in different way. For this purpose, the influence of 2-aminoquinazolines on VanSR pathway in *Enterococci* was studied. This pathway is responsible for sensing Vancomycin and other glycopeptide antibiotics and inducing expression of antibiotic resistance genes.³⁰ Inhibition

of VanSR leads to a reduction of the minimal inhibitory concentration (MIC) for Vancomycin in resistant strains. It turned out that in the presence of another 2-aminoquinazoline – **38b**, *E. Faecalis VanA* is unable to grow in the presence of vancomycin. This means that Vancomycin resistance in the presence of **38b** significantly decreased (Fig. 23).

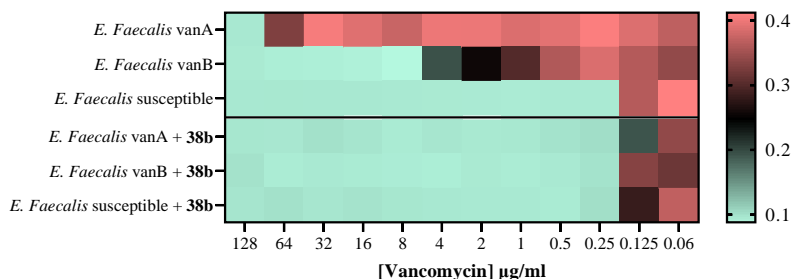


Fig. 23. Suppression of Vancomycin resistance in *E. Faecalis VanA* and *VanB* resistant strains induced by **38b**.

Further experiments showed that **38b** suppresses Vancomycin resistance in both *E. Faecalis VanA* and *VanB* strains. In the presence of 100 µM of **38b**, MIC go to the level around 0.25 µg/mL. MIC of susceptible strain did not change in the presence and absence of **38b** (Fig. 23).

3. New method for the synthesis of 2-aminoquinazoline from 2-formylphenylboronic acids and guanidines

The synthetic challenges appeared while obtaining the proposed by CADD 2-aminoquinazoline-based structures, facing the exigency to find a mild and an efficient process to assemble 2-aminoquinazoline core.

The *Chan–Evans–Lam* coupling³¹ is an attractive C–N bond forming a reaction, as it can be presented under relatively mild copper catalyzed conditions and tolerates alcoholic solvents. We explored whether the *Chan–Evans–Lam* coupling can be applied also for the synthesis of aminoquinazolines under mild reaction conditions using readily available reagents.

The screening of the reaction conditions was performed for the synthesis of unsubstituted 2-aminoquinazoline **23** from boronic acid **39** and guanidine hydrochloride **40** (Fig. 24). The representative results are given in Table 4. Due to the polarity of the product **23**, the purification by column chromatography was difficult. Therefore, it was purified by trituration from ethyl acetate. Identical scale and the workup were applied for all experiments in order to compare the efficiency of other reaction parameters. Methanol as a reaction solvent, CuI as a catalyst, and KOH

as a base were found to be productive conditions for 2-aminoquinazoline **23** formation from boronic acid **39** and guanidine hydrochloride **40** (Table 4, entries 1 and 2). Excess of base and guanidine was beneficial to improve the yield of product **23** (Table 4, entry 2). Other copper catalysts such as CuCl and Cu(OAc)₂ were found to be less efficient (Table 4, entries 3 and 4). The use of KOH as base improved the yield of product **23** when an excess of guanidine was used (Table 4, entries 5 and 6). EtOH could also be successfully used as the reaction solvent (Table 4, entry 7). Guanidine carbonate **41** was explored as the reaction partner, however, this provided a reduced yield of quinazoline **23** (Table 4, entries 8 and 9).

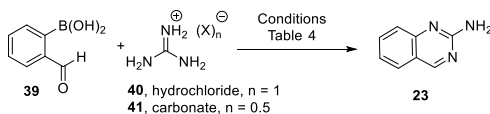


Fig. 24. Synthesis of aminoquinazoline **23**.

Table 4

Chan–Evans–Lam conditions for the synthesis of 2-aminoquinazoline **23**

Entry	Solvent ^a , t ^o	40 or 41 , equiv.	Catalyst, mol%	Base, eq	Yield, ^b %
1	MeOH, 70 °C	40 , 1.5	CuI, 15	K ₂ CO ₃ , 2.5	31
2	MeOH, 70 °C	40 , 2.5	CuI, 15	K ₂ CO ₃ , 3	44
3	MeOH, 70 °C	40 , 2.5	Cu(OAc) ₂ , 15	K ₂ CO ₃ , 3	35
4	MeOH, 70 °C	40 , 2.5	CuCl, 15	K ₂ CO ₃ , 3	23
5	MeOH, 70 °C	40 , 1.5	CuI, 15	KOH, 1.5	34
6	MeOH, 70 °C	40 , 3	CuI, 15	KOH, 3	51 (65)^c
7	EtOH, 90 °C	40 , 3	CuI, 15	KOH, 3	52
8	MeOH, 70 °C	41 , 3	CuI, 15	-	13
9	MeOH, 70 °C	41 , 1.5	CuI, 15	KOH, 3	17

^a Reactions were performed open to air, reaction time 12–17 h. ^b The product **23** purified by trituration with EtOAc to reach purity 98 + %. ^c NMR yield using 1,3,5-trimethoxybenzene as an internal standard.

2-Formylphenylboronic acid **39** was subjected to the reaction with a range of guanidines under the most productive reaction conditions (Table 4, entry 6). Both *N*-monosubstituted guanidines **42a–g** and *N,N*-disubstituted guanidines **42h–j** provided 2-aminoquinazolines **43a–j** in fair yields (Fig. 25, Table 5).

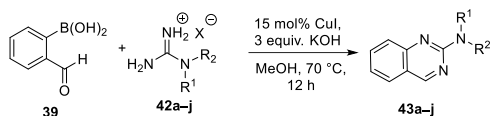


Fig. 25. Synthesis of aminoquinazolines **43a–j**.

Table 5

Guanidine scope for the synthesis of aminoquinazolines

Entry	42 ^a	R ¹	R ²	43 , yield % ^b
1	42a	H	Me	43a , 63
2	42b	H	Ph	43b , 56
3	42c	H	PhCH ₂	43c , 66 ^c
4	42d	H	Ph(CH ₂) ₂	43d , 52
5	42e	H	<i>n</i> -Pent	43e , 54
6	42f	H	<i>cy</i> -Pent	43f , 55
7	42g	H	<i>cy</i> -Hex	43g , 37
8	42h	Me	Me	43h , 43
9	42i	(CH ₂) ₄		43i , 47
10	42j	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂		43j , 39

^aGuanidines **42a,c–g,i,j** used as hydrochlorides, **42b** as carbonate, **42h** as sulphate ^bPurified by column chromatography if not stated otherwise. ^cPurified by trituration with EtOAc.

Several 2-formylphenylboronic acids **44a–f** were explored as substrates for the synthesis of aminoquinazolines **45a–f** and **46a–f** (Table 6). Both guanidines **40** and **42a** gave the expected products, however the isolated yields were slightly higher in the case of *N*-methylsubstituted guanidine **42a** (Table 6, entries 3 vs 4, 5 vs 6, 7 vs 8).

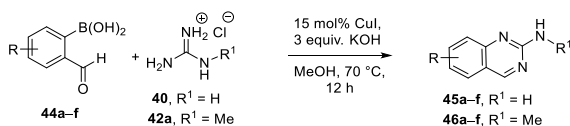
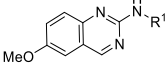
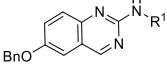
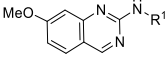
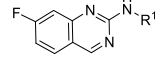
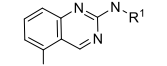
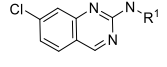


Fig 26. Synthesis of aminoquinazolines **45a–f** and **46a–f**.

Table 6

Boronic acid scope for the synthesis of aminoquinazolines

Entry	Boronic acid 44	Product	45 or 46 , Yield, % ^a
1	44a , R = 4-MeO		45a , 55
2			46a , 59 ^b
3	44b , R = 4-BnO		45b , 32 (53) ^c
4			46b , 57 ^b
5	44c , R = 5-MeO		45c , 17 (53) ^c
6			46c , 48 ^b
7	44d , R = 5-F		45d , 36 (45) ^c
8			46d , 52 ^b
9	44e , R = 3-F		45e , 52
10			46e , 46 ^b
11	44f , R = 5-Cl		45f , 35
12			46f , 55 ^b

^a Purified by trituration with EtOAc if not stated otherwise. ^b Purified by column chromatography. ^c NMR yield using 1,3,5-trimethoxy benzene as an internal standard.

Boronic acid derivatives such as pinacolate ester **47a** and trifluoroborate **47b** were also competent substrates providing aminoquinazoline derivative **43a** in yields comparable to initial boronic acid **39** (Fig. 27). These results complement relatively few cases of the use of boronic acid derivatives as partners for the *Chan–Evans–Lam* coupling.³²

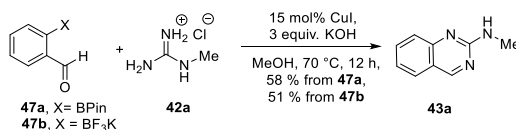


Fig 27. Synthesis of 2-aminoquinazoline **43a** from boronic acid ester **47a** and trifluoroborate **47b**.

In contrast, boronic acids **48a,b** bearing a keto group were found to be unsuitable reaction partners for the synthesis of quinazolines **49a,b** (Fig. 28). In the case of these substrates, complex mixtures were obtained with *O*-arylation products **50a,b** as the only identified by-product. The failure of 2-acyl-phenyl boronic acids **48a,b** to give the expected products implies that for the synthesis of aminoquinazolines **23**, **43**, **45**, and **46**, arylidene guanidine formation is the first step followed by intramolecular arylation.

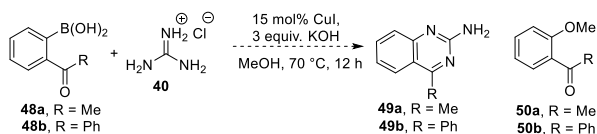


Fig. 28. An attempt to condense the keto group containing boronic acids **48a,b** with guanidine **40**.

In summary, the proposed by us efficient method of synthesis of 2-aminoquinazolines is more attractive than the traditional ones. Thus, mild reaction conditions enable the use of this method for the synthesis of pharmacologically relevant compounds bearing 2-aminoquinazoline scaffold. The drawback of such approach is relatively low availability of 2-formylphenyl-boronic acids from the commercial sources.

4. New method for the synthesis of indazoles from 2-formylphenylboronic acids and azodicarboxylates or hydrazine dicarboxylates

Inspired by the application of 2-formylphenylboronic acids for the construction of 2-aminoquinazolines we aimed to expand the use of these building blocks for assembly of indazole core.

Initial attempts to synthesize indazole starting from 2-formylphenylboronic acid and hydrazine hydrate under copper-catalyzed conditions failed. Next, we tried a stepwise protocol based on the work of *Uemura* and *Chatani*³³ who have reported that phenylboronic acids undergo smooth reaction with azodicarboxylates providing arylhydrazine derivatives. Using 2-formylphenylboronic acid **39** as substrate, the addition to N=N bond in azodicarboxylates **51** would give *N*-arylhaziridine intermediate **52**, which could be further transformed to indazoles **53** and **54** (Fig. 29).

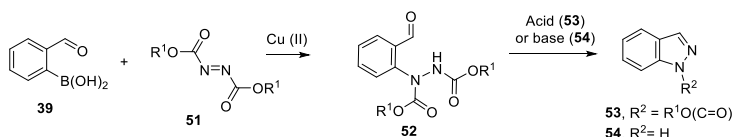


Fig. 29. Indazole synthesis from 2-formylphenylboronic acid **39**.

The investigation of the arylation conditions was performed for the reaction of 2-formylphenylboronic acid **39** with diethylazodicarboxylate (DEAD, **51a**) (Fig. 30) using $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ as a catalyst in a range of solvents (Table 7, entries 1–6). Solvents such as MeCN, DMF and DMA were found to be appropriate to obtain the product **52a** in a good yield (Table 7, entries 5–6). Decreased catalyst loading was also possible using DMA as a solvent without affecting the product **52a** yield (Table 7, entry 7). A range of other copper sources (CuCl_2 ; $\text{Cu}(\text{OTf})_2$; $\text{Cu}(\text{acac})_2$) was investigated and proved to be efficient catalysts for C–N bond formation giving the product

52a in high yield (Table 7, entries 8–10). Copper (I) source such as CuCl turned out to be an ineffective catalyst, while catalytic amount of CuI enabled product **52a** formation in good yield (Table 7, entries 11 and 12).

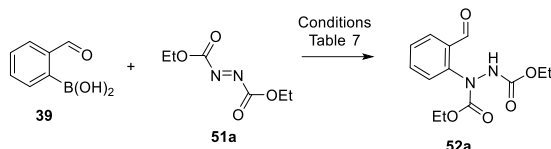


Fig. 30. Synthesis of hydrazine dicarboxylate **52a**.

Table 7

Conditions for the arylation of DEAD **51a**

Entry	Copper catalyst	Solvent	Yield, %
1	20 mol% Cu(OAc) ₂	MeOH ^a	0
2	20 mol% Cu(OAc) ₂	PhMe	0
3	20 mol% Cu(OAc) ₂	THF	64
4	20 mol% Cu(OAc) ₂	MeCN	80
5	20 mol% Cu(OAc) ₂	DMF	83
6	20 mol% Cu(OAc) ₂	DMA	98
7	10 mol% Cu(OAc) ₂	DMA	98
8	10 mol% CuCl ₂	DMA	94
9	10 mol% Cu(OTf) ₂	DMA	99
10	10 mol% Cu(acac) ₂	DMA	97
11	10 mol% CuCl	DMA	25
12	10 mol% CuI	DMA	93

^a Violent DEAD decomposition observed.

Next, the conditions were investigated for the indazole ring closure using arylhydrazine **52a** (Fig. 31), (Table 8). Acidic reaction conditions enabled the condensation of arylhydrazine **52a** to 1-*N*-etoxy carbonyl indazole **53a** (Table 8, entries 1–5). TFA in DCM and in MeCN gave the expected product **53a** in good yield (Table 8, entries 1 and 2). Neat AcOH at r.t. did not enable the cyclization of arylhydrazine **52a**, while heating in a solution of MeCN induced formation of indazole **53a** (Table 8, entries 3 and 4). Formic acid was strong enough to enable the formation of indazole **53a** at room temperature in a solution of MeCN (Table 8, entry 5). The use of a base in alcoholic solvent provided unprotected indazole **54** (Table 8, entries 6–8). Both K₂CO₃ and KOH could be efficiently used for the ring closure – deacylation reaction of arylhydrazine **52a**.

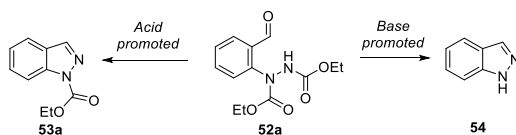


Fig. 31. Synthesis of indazoles **53a** and **54**.

Table 8

Cyclization of arylhydrazine **52a** to indazoles **53a** and **54**

Entry	Reagent	Solvent	Temp., time	Product	Yield, %
1	5 equiv. TFA	DCM	25 °C, 12 h	53a	63
2	5 equiv. TFA	MeCN	25 °C, 12 h	53a	64
3	AcOH	neat	r.t., 12 h	53a	0
4	30 equiv. AcOH	MeCN	70 °C, 12 h	53a	56
5	30 equiv. HCOOH	MeCN	r.t., 12 h	53a	56
6	3 equiv. K ₂ CO ₃	MeOH	70 °C, 1 h	54	67
7	3 equiv. K ₂ CO ₃	MeOH	25 °C, 12 h	54	67
8	4 equiv. KOH	EtOH	r.t., 12 h	54	59

Subsequently, the one pot formation of 1*N*-ethoxycarbonyl indazole **53a** from 2-formylphenylboronic acid **39** was investigated (Fig. 32), (Table 9). Unfortunately, DMA which was the solvent of choice for high yielding arylation of DEAD was not suitable for the ring closure step in the presence of TFA (Table 9, entry 1). In this case, the arylhydrazine **52a** intermediate was not transformed to product **53a**, according to LC-MS. In turn, the addition of TFA in DCM in an amount to sufficiently dilute DMA, enabled the formation of expected product **53a** in a good yield (Table 9, entry 2). The use of DCM as a solvent for both steps was less productive (Table 9, entry 3). However, MeCN was found as an appropriate solvent for both arylation and ring closure in the presence of TFA to give 1*N*-protected indazole **53a** in a good overall yield (Table 9, entry 4).

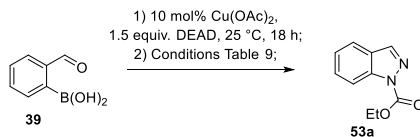


Fig. 32. Synthesis of indazole **53a**.

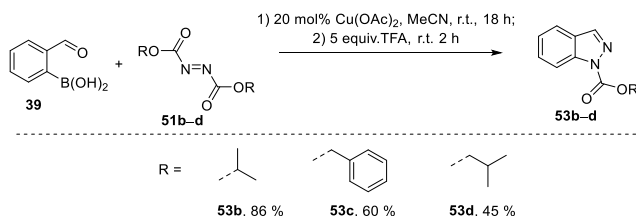
Table 9

One-pot conversion of boronic acid **39** to indazole **53a**

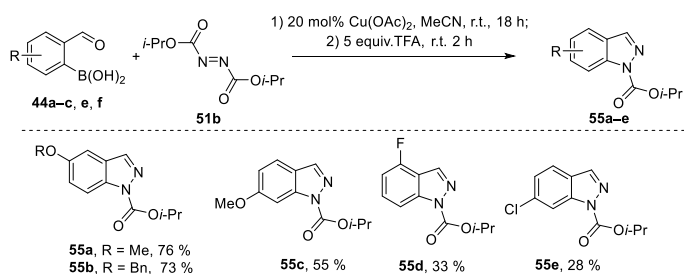
Entry	Solvent	Conditions, step 2	Yield, %
1	DMA	10 equiv. TFA, 25 °C, 2 h	0
2	DMA	TFA:DCM 1:4 ^a , 25 °C, 2 h	73
3	DCM	5 equiv. TFA, 25 °C, 1 h	48
4	MeCN	5 equiv. TFA, 25 °C, 1 h	78

^a 3 mL of TFA/DCM mixture added per 1 mL of DMA.

With one-pot conditions in hand, the synthesis of other alkoxy-carbonylindazoles **53b–d** was performed by the reaction of boronic acid **39** with azodicarboxylates **51b–d** (Fig. 33). The best yield of product **53b** was obtained with diisopropyl azodicarboxylate **51b**.

Fig. 33. Synthesis of indazoles **53b–d**.

The scope of boronic acid substitution was investigated in the reaction of a range of formylboronic acids **44a–c,e,f** with DIAD **51b** followed by cyclization (Fig. 34). Substrates **44a–c** bearing electron-donating groups (methoxy and benzyloxy groups) provided indazoles **55a–c** in a good to moderate yield. In the case of substrates **44e,f** bearing electron-withdrawing substituents, yields of products **55d,e** were decreased.

Fig. 34. The reaction of substituted formylboronic acids **44a–c,e,f** with DIAD **51b**.

Hydrazine dicarboxylate **56a** was also explored as a reagent for the synthesis of indazoles instead of azodicarboxylate **51a** (Fig. 35), (Table 10). 2-Formylphenylboronic acid **39** was

subjected to the reaction with diethyl hydrazine dicarboxylate **56a** using the two-step one-pot procedure for the formation of indazole **53a**. A catalytic amount of Cu(OAc)₂ together with excess of triethylamine was not sufficient to achieve good yield of product **53a** formation (Table 10, entry 1). The use of equimolar amount of Cu(OAc)₂ and an excess of triethylamine for the first step enabled good yield of product **53a** over two steps, while increasing the amount of Cu(OAc)₂ reduced the yield of product **53a** (Table 10, entries 2,3). The transformation of 2-formylphenylboronic acid **39** to indazole **53a** was not efficient in the absence of base for the first step, however, TEA could be replaced by TMEDA and DIPEA without significantly reducing the product **53a** yield (Table 10, entries 5 and 6). Several other Cu salts were tried for the first step of indazole **53a** formation, however, were found to be ineffective (Table 10, entries 7 and 8). The need for an equimolar amount of Cu(OAc)₂ for successful synthesis of indazole **53a** using hydrazine dicarboxylate **56a** implies *in situ* oxidation of reagent **56a** to azodicarboxylate **51a**. However, C–N bond formation with hydrazine dicarboxylate **56a** in the *Chan–Evans–Lam* reaction cannot be excluded.³⁴

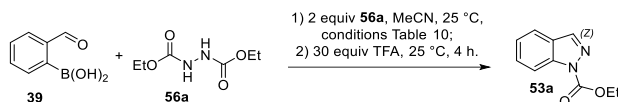


Fig. 35. Synthesis of indazole **53a** from hydrazine dicarboxylate **56a**.

Table 10

Synthesis of indazole using of hydrazine dicarboxylate **56a**

Entry	Catalyst	Additive	Yield ^a , %
1	20 mol% Cu(OAc) ₂	3 equiv. TEA	25
2	1 equiv. Cu(OAc) ₂	3 equiv. TEA	66
3	1.5 equiv. Cu(OAc) ₂	3 equiv. TEA	50
4	1 equiv. Cu(OAc) ₂	none	26
5	1 equiv. Cu(OAc) ₂	2 equiv. TMEDA	67
6	1 equiv. Cu(OAc) ₂	3 equiv. DIPEA	60
7	1 equiv. CuCl	3 equiv. TEA	35
8	1 equiv. CuCl ₂	3 equiv. TEA	25

^a NMR yield, using 1,3,5-trimethoxybenzene as internal standard.

Then, a range of hydrazine dicarboxylates **56a–g** was explored as reaction components for a one-pot two-step synthesis of indazoles **53a–g** (Fig. 36). TFA was a suitable acid for the cyclization step to give the corresponding products **53a–f** from the reaction of boronic acid **39** with hydrazine dicarboxylates **56a–f**. For the synthesis of product **53g** bearing acid labile *t*-Bu group, acetic acid at elevated temperature was used instead of TFA. This approach successfully provided product **53g** in a very good yield.

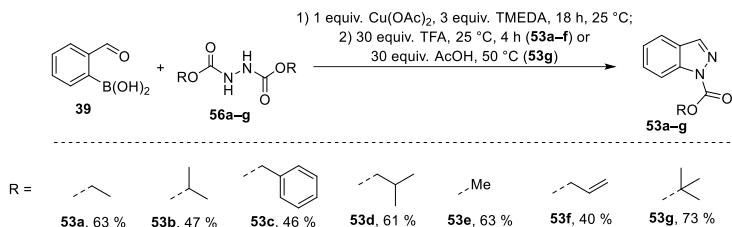


Fig. 36. Synthesis of indazoles **53a–g**.

The scope of phenyl boronic acids **44a–h** was explored with di-*t*-butyl hydrazine dicarboxylate **56g** as a reaction component for the synthesis of 1*N*-Boc indazoles **57a–h** (Fig. 37). The major reason for the yield reduction was formation of 1*N*-acetyl indazoles **58** as a by-product.

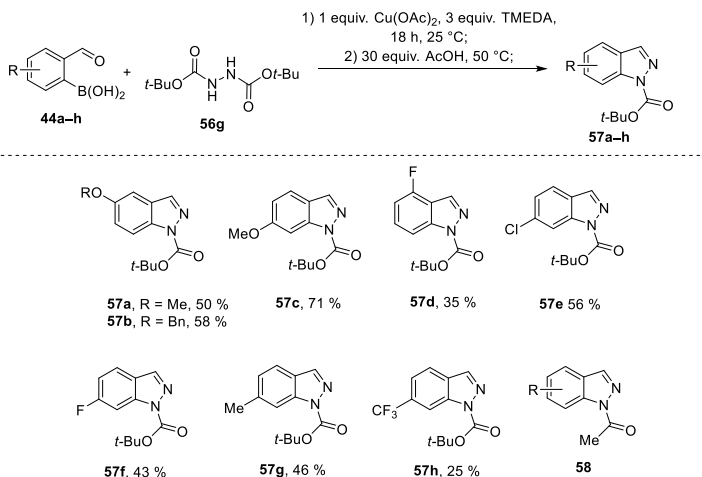


Fig. 37. Synthesis of indazoles **57a–h**.

The mechanism for the C–N bond formation in the copper catalysed reaction of arylboronic acids with diazodicarboxylates has been proposed by *Uemura* and *Chatani*.³³ According to this, the transmetalation reaction of arylboronic acid **39** with a copper catalyst would form an arylcopper species **59** (Fig. 38). Addition of intermediate **59** to N=N double bond gives an arylhydrazine **60**, which undergoes the transmetalation with boronic acid **39** to give intermediate **61** and return arylcopper species **59** into catalytic cycle. Work-up would produce arylhydrazine **52a**. Noteworthy, it was shown by *Uemura* and *Chatani* that dialkoxycarbonyl hydrazines are not competent substrates for this reaction unless additional oxidant is added. This implies that hydrazine **56a** is likely oxidised to diazodicarboxylate **51a** by stoichiometric amount of copper source.

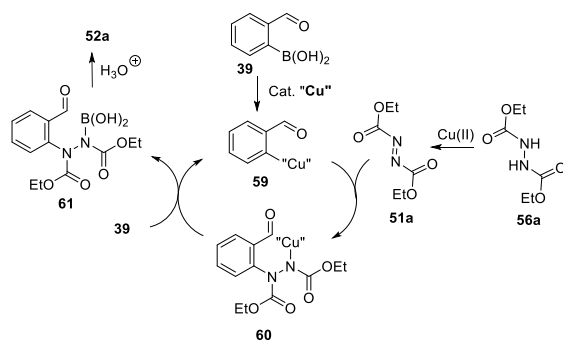


Fig. 38. Proposed mechanism for the C–N bond forming step.

The proposed mechanism for the condensation of arylhydrazine intermediate into indazole is given in Fig. 39. In the presence of acid, *N*-acyliminium ion **63** is formed. Selective hydrolytic cleavage of one ethoxycarbonyl group in intermediate **63** gives 1*N*-ethoxycarbonyl indazole **53a**. In turn, basic conditions would enable cleavage of both ethoxycarbonyl groups leading to intermediate **64**, which eliminates water to give indazole **54**.

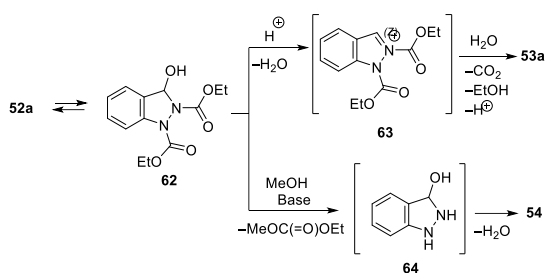


Fig. 39. Proposed mechanism for the condensation step.

In summary, copper catalyzed reaction of 2-formylboronic acids with diazadicarboxylates followed by acid or base induced ring closure is a convenient method for the synthesis of 1*N*-alkoxycarbonyl indazole derivatives. The indazole synthesis can also be performed using hydrazine dicarboxylates as reaction partners for the synthesis of indazoles; however, a stoichiometric amount of copper (II) acetate for the C–N bond formation step is required.

5. Diphenylazoles as antibacterials active against *S. Aureus Newman*

In line with the search of new HK TCs inhibitors our attention was attracted by 3,4-diarylpyrazole based antibacterial compound series which was repurposed from compounds with anticancer activity acting as Hsp90 inhibitors (Fig. 40).³⁵ The antibacterial activity was proposed to be linked to the inhibition of bacterial histidine kinases by the binding of 3,4-diarylpyrazoles to ATP binding domain which share high similarity to the ATPase domain of eukaryotic Hsp90. The representative compound **65** displayed micromolar inhibition of histidine kinases *C. crescentus* CckA and *Salmonella* PhoQ and medium activity against certain Gram negative and Gram positive bacterial strains. Structurally similar hit **7** with good potency against *S. Aureus Newman* was revealed in prof. J. Wells laboratory by screening of compounds libraries in antibacterial susceptibility tests.³⁶

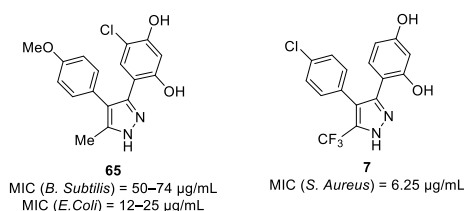


Fig. 40. Pyrazole-based antimicrobials **65** and **7**.

To explore potential of 3,4-diarylpyrazoles as antibacterials series of compounds were made according to the Fig. 41. The key intermediate for the synthesis of 3,4-diarylpyrazoles **71a–h** was isoflavone **69**.³⁷ This was synthesized from a readily available resorcinol **66** and 4-chlorophenylacetic acid **67** in two steps.^{37b,38} The first step included the *Friedel-Crafts* acylation of resorcinol **66**, catalyzed by boron trifluoride diethyl etherate. The resulting acylresorcinol **68** underwent condensation with trifluoroacetic acid anhydride followed by the cyclization to give isoflavone **69**. O-Alkylation provided isoflavone derivatives **70a–h** which were condensed with hydrazine to provide the novel target compounds **71a–h**.

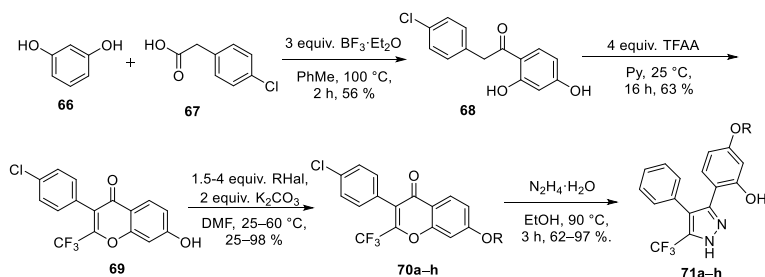


Fig. 41. Synthesis of 3,4-diarylpyrazoles **71a–h**.

Furthermore, to check importance of each part of the molecule, series of derivatives with changed or removed substructures were synthesized. Synthesis of monoaryl pyrazoles **73a–c** was achieved by the condensation of diketones **72a–c** with hydrazine (Fig. 42).

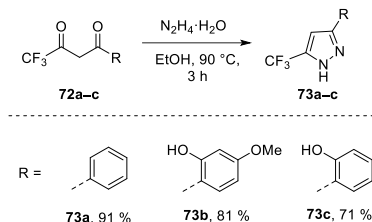


Fig. 42. Synthesis 3-arylpyrazoles **73a–c**.

Pyrazole **73b** was deprotected from methoxy group using boron tribromide (Fig. 43).

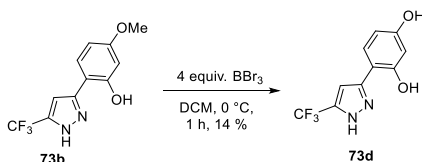


Fig. 43. Deprotection of compound **73b**.

One of the monoaryl pyrazoles, compound **73a**, was further brominated to obtain bromo derivative **74**, which was subjected to the *Suzuki-Miyaura* coupling to provide diaryl pyrazole **75** (Fig. 44).

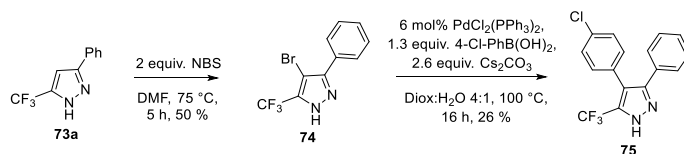
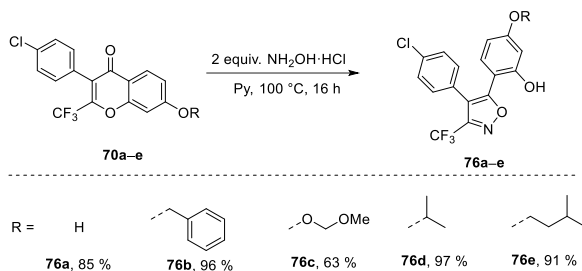
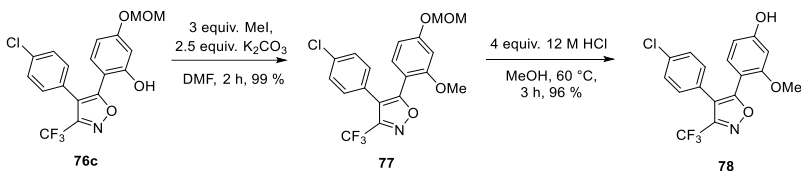


Fig. 44. Synthesis of 3,4-diarylpyrazole **75**.

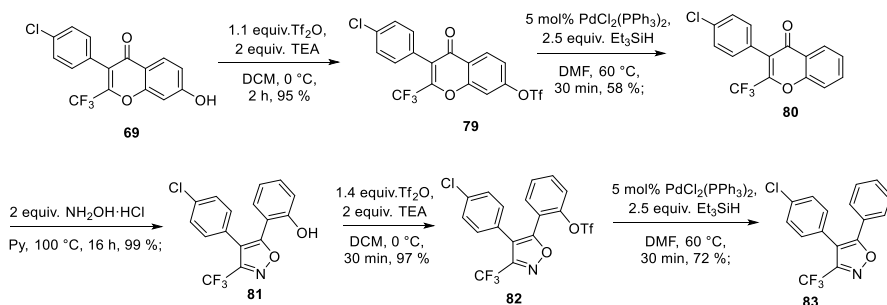
Additionally, a possibility to replace the pyrazole core with isoxazole moiety was explored. Isoxazole based analogues **76a–e** were obtained from isoflavone derivatives **70a–e** (Fig. 45). under the reaction with hydroxylamine.³⁹



O-MOM protected product **76c** was methylated at the free phenolic OH group, and the resulting derivative **77** was subjected to MOM deprotection in acidic media to obtain isoxazole **78** in high yield of 98 % (Fig. 46).



Deoxygenated diaryloxazole analogues **81** and **83** were prepared starting from isoflavone derivative **69** (Fig. 47). This was transformed to triflate **79** in which the C–O bond was cleaved under palladium-catalyzed hydrogenolysis conditions using triethylsilane as a hydrogen transfer reagent. The resulting isoflavone derivative **80** was converted to isoxazole **81**. It was then transformed to the triflate **82**, which was reduced to give the product **83**.



Isoxazoles **84a**⁴⁰ and **84b** without a substituent at the 4th position of the heterocycle were prepared starting from diketones **72a,b** (Fig. 48).

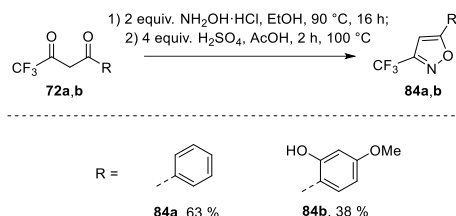
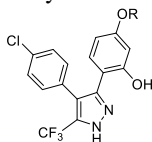


Fig. 48. Synthesis of 4,5-diarylisoxazoles **84a,b**.

All of the synthesized compounds **71a–h**, **73a–d**, **75**, **76a–e**, **78**, **81**, **83**, and **84a,b** were subjected to *in vitro* growth inhibition tests of *S. Aureus Newman*. The results of these assays are summarized in Tables 11–14 (test results provided by Blanca Fernandez, Wageningen University).

Table 11

Antibacterial activity of the compounds **71a–h**



Entry	Number	R	MIC ^a , µg/mL
1	71a	Me	3.12
2	71b	Bn	1.56
3	71c	MOM	3.12
4	71d	2,5-Cl ₂ C ₆ H ₃ CH ₂	1.56
5	71e	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	1.56
6	71f	PhSO ₂	1.56
7	71g	<i>i</i> -Pr	0.78
8	71h	<i>i</i> -Amyl	<0.39

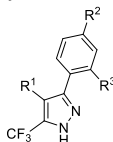
^a *S. Aureus Newman*.

An improvement of the antibacterial potency in comparison with original hit **7** was achieved by addition of methyl group as R substituent (**71a**, Table 11, entry 1). *O*-benzyl group as R substituent had even higher positive effect on antibacterial potency (**71b**; Table 11, entry 2). The presence of MOM group (**71c**; Table 11, entry 3) only slightly increased the activity in comparison with the hit compound **7**. Substitution of benzyl group with 2,5-dichlorobenzyl (**71d**; Table 11, entry 4), 4-bromobenzyl (**71e**; Table 11, entry 5) and phenylsulfonyl (**71f**; Table 11, entry 6) group did not change the activity of the compounds in comparison with the benzyl analogue **71b**. The best antimicrobial activity in this series was exhibited by the compounds bearing lipophilic R

substituents such as *i*-propyl group (**71g**, Table 11, entry 7) and *i*-amyl group (**71h**, Table 11, entry 8).

Table 12

Antibacterial activity of the compounds **73a–d**, **75**



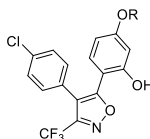
Entry	Number	R ¹	R ²	R ³	MIC ^a , µg/mL
1	73a	H	H	H	50
2	73b	H	OMe	OH	25
3	73c	H	H	OH	125
4	73d	H	OH	OH	250
5	75	4-ClC ₆ H ₄	H	H	1.56

^a *S. Aureus Newman*.

Derivatives **73a–d** lacking substituents at the 4th position of pyrazole showed significantly worse results in comparison with the hit compound **7** (Table 12, entries 1–4). However, compound **75** with 4-chlorophenyl group as R¹ substituent and phenyl group as R² substituent exhibited activity four times higher than that of compound **7** (Table 12, entry 5). These results point to the importance of the two aryl substituents at the pyrazole to ensure a high antimicrobial potency. In addition, the high antimicrobial potency of compound **75** implies that hydroxyl groups at the phenyl group as the R¹ substituent are not essential.

Table 13

Antibacterial activity of isoxazole-based compounds **76a–e**



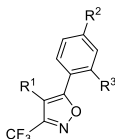
Entry	Number	R	MIC ^a , µg/mL
1	76a	H	3.12
2	76b	Bn	0.78
3	76c	MOM	3.12
4	76d	<i>i</i> -Pr	0.78
5	76e	<i>i</i> -Amyl	<0.39

^a *S. Aureus Newman*.

The isoxazole analogues **76a–e** (Table 13) showed similar potency and structure activity relationships to their pyrazole peers **7**, **71b**, **71c**, **71g**, and **71h**, respectively (Table 11).

Table 14

Antibacterial activity of simplified isoxazole-based compounds **78**, **81**, **83**, **84a,b**



Entry	Number	R ¹	R ²	R ³	MIC ^a , µg/mL
1	78	4-ClC ₆ H ₄	OH	OMe	3.12
2	81	4-ClC ₆ H ₄	H	OH	3.12
3	83	4-ClC ₆ H ₄	H	H	<i>inactive</i>
4	84a	H	H	H	<i>inactive</i>
5	84b	H	OMe	OH	6.25

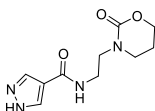
^a *S. Aureus Newman*.

An interesting deviation was observed for isoxazoles **78**, **81**, **83** and **84a,b** (Table 14). Compound **84a**, contrary to its pyrazole-based analogue **73a**, completely lost activity against *S. Aureus Newman*. Compound **84b** increased activity level in comparison with **73b**. Surprisingly, methylation of ortho hydroxy group in R² substituent (compound **78**, Table 14, entry 1) did not affected MIC value – it was retained at 3.12 µg/mL. Finally, compound **83** totally lost the antimicrobial potency (Table 14, entry 3) in comparison with pyrazole derivative **75** with the same substitution pattern (Table 12).

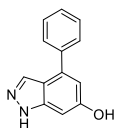
The SAR of the compounds provides the directions for further structural improvements to achieve more potent phenylazole based antimicrobials. Thus, introduction of the lipophilic groups at the 5th position of phenolic ring of the molecule increased the potency of the compounds (**71g**, **71h**). Further increase of lipophilicity in these positions could increase the potency. Additionally, further work should explore other suitable 5-membered cycles such as imidazole, 1,2,3-triazole or isothiazole as scaffolds to improve the potency of the compounds. Nevertheless, the SAR of the pairs of the compounds **81** and **83**, or **75** and **83** implies that at least one NH or OH group might be retained in the inhibitor to preserve its potency.

CONCLUSIONS

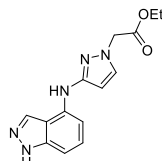
1. Four series of perspective HK TCs inhibitors were synthesized for biological activity evaluation: derivatives of pyrazole-4-carboxamide, 2-aminoquinazoline, indazole and 3,4-diphenylpyrazole.
2. Library of pyrazole-4-carboxamides was made by coupling of pyrazole-4-carboxylic acid with various alkyl and aryl amines. Unfortunately, this library showed no potential for the further development: enzymatic and *in vitro* antibacterial assays revealed no significant activity. On the other hand, X-Ray crystallography of CheA protein-ligand complex with the amide, bearing cyclic carbamate moiety, showed interaction of the compound exactly as predicted in CADD models. Such a discrepancy can be explained by weak interactions of the mentioned ligand with the protein.



3. Indazole based library was made starting from substituted 4-bromoindazoles using different types of palladium couplings. The compound with phenyl substituent possessed weak antibacterial activity against *E. Coli*, but its mechanism of antibacterial action remained unclear. Indazole bearing 3-aminopyrazole substituent and its structural analogues revealed moderate potency in enzymatic assay but showed no antibacterial activity.

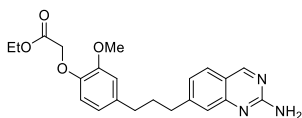


E. Coli MIC = 62.5 µg/mL

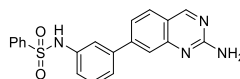


S. Aureus PhoR IC₅₀ = 67 µM

4. Library of 2-aminoquinazolines was made using *Heck* reaction between 7-bromoquinazoline-2-amine and various alkenes. Newly formed alkenes were selectively reduced to form an alkyl linker. Additional compounds were derived from *Suzuki-Miyaura* reaction between 7-bromoquinazoline-2-amine and arylboronic acids or between (2-aminoquinazolin-7-yl)boronic acid and aryl bromides. All compounds from these series were tested for their ability to bind to CheA protein (MST assay), and two compounds displayed the best binding affinity in their series.



CheA K_D = 317 nM



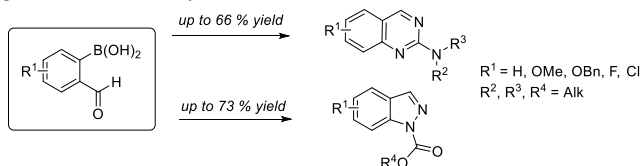
CheA K_D = 162 nM

5. 2-Aminoquinazoline derivatives generally represented no measurable *in vitro* antimicrobial activity at standard conditions. However, the compound with indolinone substituent inhibited

growth of *S. Aureus* in low phosphate medium, and the compound substituted with thiophene sulfonamide was able to reduce resistance to Vancomycin in *E. Faecalis* resistant strain. This data provides an evidence of interaction of those aminoquinazolines with bacterial HK TCs in a cell.



- A range of 3-phenylpyrazole derivatives were synthesized by reaction of isoflavones and β -diketones with hydrazine hydrate. Cyclization of the same starting materials with hydroxylamine allowed to obtain isoxazoles with identical to pyrazoles substitution pattern. Moreover, compounds with removed hydroxyl groups were synthesized by transformation of OH group to triflate with subsequent Pd-catalyzed reduction. SAR studies revealed the crucial parts of the molecules for antibacterial activity. Pyrazole core can be replaced with isoxazole without change in activity; however at least one polar group shall be retained in molecule to preserve an antibacterial potency. The mechanism of the antibacterial effect for these types of compounds remained unclear but presumably is not connected with HK TCs inhibition.
- New methods for the synthesis of 2-aminoquinazolines and *N*-protected indazoles were developed by usage of copper catalysed *Chen-Evans-Lam* reaction starting from 2-formylphenylboronic acids. Reaction with guanidines proceeds to 2-aminoquinazolines when the reaction with azodicarboxylates and hydrazine dicarboxylates delivering *N*-protected indazoles. The reaction can be done in milder conditions compared to the known coupling reactions using 2-halobenzaldehydes.

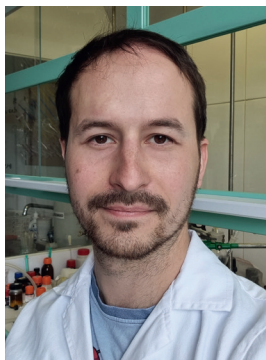


LITERATŪRAS SARAKSTS

REFERENCES

- (1) Doron, S.; Gorbach, S. L. In *International Encyclopedia of Public Health*; Heggenhougen, H. K., Ed.; Academic Press: Oxford, **2008**.
- (2) Adedeji, W. A. *Annals of Ibadan postgraduate medicine* **2016**, *14*, 56.
- (3) Coates, A. R.; Halls, G.; Hu, Y. *British Journal of Pharmacology* **2011**, *163*, 184.
- (4) Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* **2017**, *33*, 300.
- (5) Nikaido, H. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 119.
- (6) McKenna, M. *Nature* **2013**, *499*, 394.
- (7) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. *Current Opinion in Microbiology* **2019**, *51*, 72.
- (8) Felden, B.; Cattoir, V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62*, e02503.
- (9) Tierney, A. R.; Rather, P. N. *Future Microbiology* **2019**, *14*, 533.
- (10) Thomason, P.; Kay, R. *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 3141.
- (11) Cheung, J.; Hendrickson, W. A. *Current Opinion in Microbiology* **2010**, *13*, 116.
- (12) Buschiazzo, A.; Trajtenberg, F. *Annual Review of Microbiology* **2019**, *73*, 507.
- (13) Boibessot, T.; Zschiedrich, C. P.; Lebeau, A.; Bénimèlis, D.; Dunyach-Rémy, C.; Lavigne, J.-P.; Szurmant, H.; Benfodda, Z.; Meffre, P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 8830.
- (14) Stock, J. B.; Baker, M. D. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*; Schaechter, M., Ed.; Academic Press: Oxford, 2009.
- (15) (a) Makino, K.; Shinagawa, H.; Amemura, M.; Nakata, A. *Journal of molecular biology* **1986**, *192*, 549(b) Carmany, D. O.; Hollingsworth, K.; McCleary, W. R. *Journal of bacteriology* **2003**, *185*, 1112.
- (16) Casino, P.; Rubio, V.; Marina, A. *Cell* **2009**, *139*, 325.
- (17) Marina, A.; Waldburger, C. D.; Hendrickson, W. A. *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 4247.
- (18) Kanamaru, K.; Aiba, H.; Mizushima, S.; Mizuno, T. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 21633.
- (19) Baba, T.; Bae, T.; Schneewind, O.; Takeuchi, F.; Hiramatsu, K. **2008**, *190*, 300.
- (20) Van Tyne, D.; Martin, M. J.; Gilmore, M. S. **2013**, *5*, 895.
- (21) Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2*, 123.
- (22) Ahmed, M. O.; Baptiste, K. E. *Microbial Drug Resistance* **2017**, *24*, 590.
- (23) Woodbury, D. J.; Whitt, E. C.; Coffman, R. E. *Biophysical Reports* **2021**, *1*, 100012.
- (24) Neckers, L.; Blagg, B.; Haystead, T.; Trepel, J. B.; Whitesell, L.; Picard, D. *Cell Stress and Chaperones* **2018**, *23*, 467.
- (25) Su, Y.; Wang, J.; Bao, R.; Shanghai Hansoh Biomedical Co., Ltd., Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Group Co., Ltd., **2020**; WO2020228756.

- (26) Stock, A.; Chen, T.; Welsh, D.; Stock, J. **1988**, 85, 1403.
- (27) Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. *Journal of Molecular Structure* **2014**, 1077, 101.
- (28) Zhao, F.; Yu, J.; Zuo, H.; Wang, Y.; Zhang, C.; Hao, L.; Hong, Y.; Liao, X.; Xia, G.; Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., **2021**; CN112979615.
- (29) Penefsky, H. *The Journal of biological chemistry* **1974**, 249, 3579.
- (30) (a) Li, G.; Walker, M. J.; De Oliveira, D. M. P. **2023**, 11, 24. (b) Lockey, C.; Edwards, R. J.; Roper, D. I.; Dixon, A. M. *Scientific Reports* **2020**, 10, 5727.
- (31) Chan, D. M. T.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 2933.
- (32) Marcum, J. S.; McGarry, K. A.; Ferber, C. J.; Clark, T. B. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, 81, 7963.
- (33) Uemura, T.; Chatani, N. *Synfacts* **2005**, 2005, 0337.
- (34) Raus, L.; Tsubrik, O.; Maeorg, U. *Estonian Academy of Sciences: Chemistry* **2005**, 54, 12+.
- (35) Vo, C. D.; Shebert, H. L.; Zikovitch, S.; Dryer, R. A.; Huang, T. P.; Moran, L. J.; Cho, J.; Wassarman, D. R.; Falahee, B. E.; Young, P. D.; Gu, G. H.; Heintl, J. F.; Hammond, J. W.; Jackvony, T. N.; Frederick, T. E.; Blair, J. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27, 5235.
- (36) Wells, J.; Velikova, N.; Wageningen Universiteit, **2021**; EP3827825.
- (37) (a) Kupchevskaya, I. P.; Khilya, V. P. *Dopov. Akad. Nauk Ukr. RSR, Ser. B: Geol., Khim. Biol. Nauki* **1978**, 234; (b) Drysdale, M. J.; Dymock, B. W.; Barril-Alonso, X.; Workman, P.; Pearl, L. H.; Prodromou, C.; MacDonald, E.; Ribotargets Limited, Cancer Research Technology Limited, The Institute of Cancer Research, **2003**; WO2003055860.
- (38) (a) Pivovarenko, V. G.; Khilya, V. P.; Vasil'ev, S. A. *Khim. Prir. Soedin.* **1989**, 639. (b) Schiltz, G. E.; Mishra, R. K.; Han, H.; Abdulkadir, S. A.; Izquierdo-Ferrer, J.; Jain, A. D.; Northwestern University, **2020**; WO2020046382.
- (39) (a) Moskvina, V. S.; Shilin, S. V.; Khilya, V. P. *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **2015**, 51, 799. (b) Drysdale, M. J.; Dymock, B. W.; Finch, H.; Webb, P.; McDonald, E.; James, K. E.; Cheung, K. M.; Mathews, T. P.; Vernalis Cambridge Limited Cancer Research Technology Ltd, The Institute of Cancer Research et al., **2004**; WO2004072051.
- (40) Sloop, J. C.; Bumgardner, C. L.; Loehle, W. D. *J. Fluorine Chem.* **2002**, 118, 135.



Vitalii Solomin dzimis 1993. gadā Harkivā, Ukrainā. Kijivas Tarasa Ševčenko Nacionālajā universitātē ieguvis bakalaura grādu ķīmijā (2014), Augsto tehnoloģiju institūtā – maģistra grādu (2016). Paralēli studijām kopš 2011. gada strādājis "Enamine Ltd", Kijivā. 2018. gadā saņēmis Marijas Sklodovskas-Kirī stipendiju. Patlaban strādā Latvijas Organiskās sintēzes institūtā profesora *Dr. chem. Aigars Jirgensons* vadībā. Kompānijā "Oxford Drug Design", Lielbritānijā, apguvis datorizētās zāļvielu dizainēšanas prasmes (CADD). Zinātniskā darba rezultāti publicēti trīs starptautiski citējamās žurnālos. Zinātniskās intereses saistītas ar heterociklisku savienojumu sintēzi un to lietojumu medicīnas ķīmijā.

Vitalii Solomin was born in 1993 in Kharkiv, Ukraine. He obtained a Bachelor's degree in Chemistry from Taras Shevchenko National University of Kyiv in 2014 and a Master's degree from the Institute of High Technologies in 2016. From 2011 to 2018 he was working as a Synthetic Chemist at Enamine Ltd in Kyiv. In 2018, V. Solomin was awarded the Marie Skłodowska-Curie scholarship and started his career at the Latvian Institute of Organic Synthesis under the supervision of Professor *Dr. chem. Aigars Jirgensons*. In 2019, Vitalii performed a secondment to Oxford Drug Design company to master his skills in the field of computer-aided drug design (CADD). The results of V. Solomin's Doctoral Thesis are published in three international scientific journals. V. Solomin's main research interests are connected with the synthesis of heterocyclic compounds and their medicinal chemistry research.