



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių, skirtų patogeninių mikroorganizmų slopinimui, sintezė ir *in silico* tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Raimonda Gedvilaitė

Projekto autorė

Lekt. Kazimieras Anusevičius

Vadovas

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių, skirtų patogeninių mikroorganizmų slopinimui, sintezė ir *in silico* tyrimai

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Raimonda Gedvilaitė

Projekto autorė

Lekt. Kazimieras Anusevičius

Vadovas

Doc. Kristina Kantminienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Raimonda Gedvilaitė

Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių, skirtų patogeninių mikroorganizmų slopinimui, sintezė ir *in silico* tyrimai

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Raimonda Gedvilaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Gedvilaitė, Raimonda. Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių, skirtų patogeninių mikroorganizmų slopinimui, sintezė ir *in silico* tyrimai. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovas lekt. Kazimieras Anusevičius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): biotechnologijos, technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: mikobakterijos, sulfanilamidas, tiosemikarbazidas, β-alaninas, hidrazidas, ciklizacija, kondensacija.

Kaunas, 2021. 61 p.

Santrauka

Projekto metu, atsižvelgiant į mikobakterijų fiziologinius ypatumus, susintetinti potencialūs vaistiniai dariniai. Sintezės metu, gauti, sulfanilamido fragmentą turintys, tiadiazolų, tiokarbamidų tipo junginiai ir Šifo bazės. Visų gautų struktūrų bioprieinamumui įvertinti atlikti *in silico* tyrimai, kurių metu „ADMETlab 2.0“ žiniatinklio įrankiu nustatytas junginių terapinis priimtumas, pagal „Lipinski'o taisyklę“, apibūdinančią darinių vartojimo enteraliniu būdu galimybę. Taip pat bioprieinamumas įvertintas, nustatant galimą absorbciją žarnyne, giminingumą P-glikoproteinui, citochromo CYP3A4 inhibavimą ir kraujo-smegenų barjero pralaidumą. Remiantis gautais rezultatais, nustatyta, kad mažiausia enteralinio vartojimo tikimybė būdinga 4-[(2-{4-[(E)-(2-chlor-5-nitrobenzilideno)amino]-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidui, neatitinkančiam „Lipinski'o taisyklės“, o geriausiai žarnyne gali būti pasisavinami tiadiazolų tipo dariniai. Siekiant sužinoti susintetintų darinių teorinį poveikį *Mycobacterium* genties patogenuose, „AutoDockTools 1.5.7“ programa atliktas molekulinis modeliavimas. Tyrimo metu įvertintas visų susintetintų struktūrų giminingumas *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* bakterijų baltymui InhA, o didžiausiu afinitetu taikiniui pasižymėjo N-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai.

Gedvilaitė, Raimonda. Synthesis and in Silico Studies of Derivatives with Sulphanilamide Moiety for Inhibition of Pathogenic Microorganisms. Master's Final Degree Project / supervisor lect. Kazimieras Anusevičius; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): biotechnology, technological sciences.

Keywords: mycobacteria, sulphanilamide, thiosemicarbazide, β -alanine, hydrazide, cyclization, condensation.

Kaunas, 2021. 61 p.

Summary

Potential drug derivatives were synthesized during the project by taking into account the physiological features of *Mycobacterium* pathogens. During the synthesis, thiadiazoles, thiourea-type compounds and Schiff bases containing a sulphanilamide moiety were obtained. To assess the bioavailability of all the resulting structures, *in silico* studies were performed to determine the therapeutic acceptability of the compounds using the „ADMETlab 2.0“ web tool, based on Lipinski's rule describing the possibility of derivatives consumption by enteral administration. Bioavailability was also assessed by determining possible intestinal absorption, P-glycoprotein affinity, cytochrome CYP3A4 inhibition, and blood-brain barrier permeability. Based on the results, it was identified that the minimum probability of enteral administration is typical for 4-[(2-{4-[(*E*)-(2-chloro-5-nitrobenzylidene)amino]-5-sulfanyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl}ethyl)amino]benzenesulfonamide, which does not comply with the Lipinski's rule, but also, it was determined that the best gut absorption is achieved with thiadiazole-type derivatives. To elucidate the theoretical effects of synthesized derivatives on pathogens of the *Mycobacterium*, molecular modeling has been performed using „AutoDockTools 1.5.7“. The study assessed the affinity of all synthesized structures for the *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* enzyme InhA, with *N*-(5-{2-[(4-sulfamoylphenyl)amino]ethyl}-1,3,4-thiadiazol-2-yl) benzamide having the highest affinity for the target.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Mikobakterijos.....	10
1.2. Sulfanilamido tipo darinių sintezė ir pritaikymas mikobakteriozėms gydyti.....	13
1.3. Tiosemikarbazidų tipo darinių sintezė ir poveikis prieš mikobakterijas	16
1.4. Tiosemikarbazido tipo darinių ciklizacijos reakcijos ir gautų junginių antimikobakterinis aktyvumas.....	19
1.5. Farmakokinetinių savybių įvertinimo svarba	22
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	23
2. Medžiagos ir tyrimo metodai.....	24
2.1. Naudotos medžiagos.....	24
2.2. Tyrimo metodai	24
2.3. <i>In silico</i> analizė.....	31
2.3.1. Susintetintų junginių 4–24 farmakokinetinių savybių prognozė.....	31
2.3.2. Molekulinis modeliavimas	32
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	34
3.1. 4-[(3-Hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido (4) sintezė.....	34
3.2. Tiosemikarbazidų tipo darinių sintezė.....	34
3.3. Sulfanilamido fragmentą turinčių tiokarbamido darinių 11–16 sintezė	37
3.4. Šifo bazių 19–24 sintezė.....	38
3.5. <i>In silico</i> analizės rezultatai	40
3.5.1. Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių 4–24 farmakokinetinių savybių tyrimo rezultatai. 40	
3.5.2. Sulfanilamido fragmentą turinčių junginių 4–24 molekulinio giminingumo InhA fermentui nustatymas	45
4. Rekomendacijų dalis	51
Išvados	53
Literatūros sąrašas	54
Priedai.....	60
1 priedas. Projekto metu susintetintų darinių 4–24 farmakokinetinių savybių analizės rezultatai	60
2 priedas. Molekulinio modeliavimo, atlikto „AutoDock Tools 1.5.7” programa, rezultatai	61

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

lekt. – lektorius;

doc. – docentas;

pav. – paveikslas;

žr. – žiūrėti;

m. – metai;

a. – amžius;

pr. – pradžia;

mln. – milijonas;

pab. – pabaiga;

val. – valanda;

k. t. – kambario temperatūra;

v. t. – virimo temperatūra;

s – singletas;

d – dubletas;

t – tripletas;

kv. – kvadrupletas;

mln. d. – milijoninė dalis;

pvz. – pavyzdžiui;

PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija;

INH – izoniazidas;

NADH – nikotinamido adenino dinukleotidas;

ETH – etionamidas;

TAC – tioacetazonas

DMF – dimetilformamidas;

TEA – trietilaminas;

NMP – *N*-metil-2-pirolidonas;

TsCl – 4-toluensulfonilo chloridas;

TPSA – topologinis polinis paviršiaus plotas;

P-gp – P-glikoproteinas;

BBBP – prasiskverbimas per kraujo-smegenų barjerą (*angl.*, blood brain barrier penetration);

HIA – absorbcija virškinamajame trakte (*angl.* human intestinal absorption);

HD – vandenilinių ryšių donoras;

HA – vandenilinių ryšių akceptorius;

RB – laisvai besisukantis cheminis ryšys;

BMR – branduolių magnetinis rezonansas;

DMSO-*d*₆ – deuterintas dimetilsulfoksidas;

FT-IR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija;

MS – masių spektroskopija;

m/z – masės ir krūvio santykis;

Da – daltonas;

Acil-KoA – Acilkofermantas A;

mtFabH – *Mycobacterium tuberculosis* štamo β-Ketoacil-ACP sintazė III;

mtFabD – *Mycobacterium tuberculosis* štamo Malonilo KoA-ACP transacilazė;

KasA – β-Ketoacil-AcpM sintazė;

KasB – 3-Oksoacil- ACP sintazė 2;

MabA – 3-Oksoacil- ACP reduktazė;

HadABC – β-Hidroksiacil-ACP dehidratazių kompleksas;

InhA – Enoil-ACP reduktazė;

Pks13 – *Mycobacterium* genties bakterijų poliketido sintazė;

KatG – katalazės peroksidazė;

EthA – flavino adenino dinukleotido monooksigenazė;

PT70 – 2-(*O*-toliloksi) -5-heksilfenolis;

QSAR – kiekybinis struktūros-aktyvumo sąryšis;

Įvadas

Didėjant patogeninių mikroorganizmų atsparumui vaistiniams preparatams, mokslininkai ieško efektyvių medžiagų, slopinančių jų augimą. Į pavojingų bakterijų sąrašą patenka mikobakterijos, kurios sukelia įvairias organų ir jų sistemų ligas, pažeidžia odą, audinius, kaulus, sąnarius, limfinę sistemą, kvėpavimo takus [1].

Viena iš pavojingiausių mikobakterijų laikoma *Mycobacterium abscessus* padermė, kuriai slopinti vis dar nėra veiksmingų medikamentų [2]. Plaučių infekcijas sukeliantis *Mycobacterium abscessus* štamai yra vienas iš labiausiai antimikrobinėms medžiagoms atsparių patogenų ir antras pagal paplitimą Azijoje bei daugelyje kitų regionų. Šios mikobakterijos patekimas į organizmą gali būti mirtinas sergantiems lėtinėmis, uždegiminėmis plaučių ligomis – bronhektazija, lėtine obstrukcine plaučių liga, cistine fibroze [3]. Pastaruoju atveju, medikamentinis bakterinės infekcijos gydymas trunka iki 2 m. ir tik apie 30 % pacientų sėkmingai pasiekia remisiją. *Mycobacterium abscessus* kultūra infekuoti ir cistine fibroze sergantys asmenys, kai kuriose šalyse yra neįtraukiami į plaučių transplantacijos sąrašus, dėl bakterijų atsparumo vaistams ir progresyvaus plaučių irimo. Vienintelė išeitis tokiems ligoniams – efektyvūs vaistiniai preparatai, galintys pakeisti šiuo metu naudojamus medikamentus – amikaciną, tigecikliną, antibiotikų makrolidus [4].

Sveikatos sistemai taip pat svarbi išlieka *Mycobacterium tuberculosis* bakterija. PSO duomenimis [5], 2018 m. nuo šio patogeno sukeltos infekcijos pasaulyje mirė 1,5 mln. žmonių. Taip pat nustatyta 484 000 asmenų, sergančių tuberkulioze, kurią sukelia pirmos eilės antibiotikui – rifampicinui – atsparios *Mycobacterium tuberculosis* padermės. Remiantis šiais statistikos duomenimis, ateityje tokių susirgimų skaičius gali ir padidėti, jei nebus atrasti efektyvesni medikamentai. Tiesa, šias infekcijas galima gydyti ir antros eilės antibiotikais – ofloksacinu, etionamidu, 4-aminosalicilo rūgštimi [6], tačiau tokios gydymo galimybės yra ribotos, dėl ilgai trunkančios, intensyvios terapijos, toksiškų ir brangių vaistinių medžiagų.

Mokslininkai nuo XX a. pr. sintetina sulfanilamidų darinius, kaip potencialiai efektyvius farmakoforus. Iš tokių darinių išskiriami komerciniai preparatai – sulfametoksazolas ir sulfadiazinas [7], kurie slopina mikobakterijų augimą. Taip pat vaistinių medžiagų kūrime, dėl didelio biologinio potencialo, panaudojami ir tiosemikarbazidų dariniai, turintys tiokarbonilo fragmentą [8]. Tad baigiamojo studijų projekto metu, buvo numatyta, susintetinti sulfanilamido fragmentą turinčius tiosemikarbazidus, jų ciklinius analogus, taip pat tiokarbamidų tipo darinius bei Šifo bazes, tikintis, kad visi gauti junginiai ateityje bus panaudoti mikobakteriozėms gydyti.

Darbo tikslas – susintetinti darinius, turinčius sulfanilamido fragmentą, atlikti gautų junginių *in silico* analizę, įvertinant jų bioprieinamumą ir tinkamumą mikobakteriozėms gydyti.

Darbo uždaviniai:

1. ištirti 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido reakcijas su izotiocianatais, atlikti gautų produktų ciklizaciją rūgštinėje terpėje ir ciklinių junginių hidrolizę;
2. susintetinti tiokarbamido fragmentą turinčius darinius, panaudojant 4-aminosulfanilamidą ir 4-amino-*N*-[2-piridil]benzensulfonamidą, palyginti jų bioprieinamumą su tiosemikarbazidų tipo junginiais;
3. susintetinti 4-[[2-(4-amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidą ir ištirti jo kondensacijos reakcijas su benzkarbaldehydais;
4. atlikti visų susintetintų darinių *in silico* analizę, įvertinant jų bioprieinamumą.

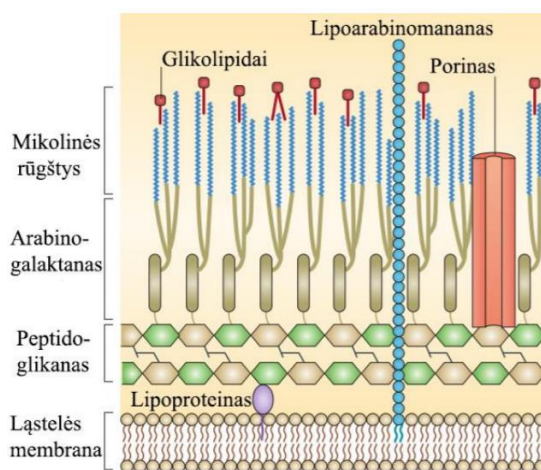
1. Literatūros apžvalga

1.1. Mikobakterijos

Mikobakterijų tyrimų raida prasidėjo XIX a. pab., kai 1882 m. vokiečių kilmės mikrobiologas Robertas Koch'as pranešė, jog pavyko identifikuoti ir izoliuoti tuberkuliozę sukeltantį patogeną – *Mycobacterium tuberculosis* [9]. Šiuo metu pasaulyje galima rasti net 170 skirtingų *Mycobacterium* genties padermių [10], kurių didžiąją dalį sudaro patogenai, suskirstyti į tris pagrindines grupes:

- tuberkuliozės bakterijų kompleksą (*MTBC*);
- raupsus ir opas sukeliančius mikroorganizmus (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*);
- atipines mikobakterijas (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* ir kt.).

Ieškodami potencialių antibiotikų, *Mycobacterium* genties patogenams naikinti, mokslininkai, visų pirma, atsižvelgia į mikobakterijų savybes. Nustatyta, kad šie prokariotai yra nejudrūs, kapsulių neturintys ir sporų neformuojantys obligatiniai aerobai [11]. Mikobakterijos yra atsparios rūgštinei aplinkai, todėl jas identifikuoti naudojamas klasikinis Cylio dažymo karbolio fuksinu metodu [12]. Tokiu būdu, mikroskopu, yra stebimos raudona spalva nudažytos bakterijos. Šią mikobakterijų dažymo savybę ir atsparumą lemia savita ląstelių sienelių sudėtis bei didelis hidrofobiškumas [13].



1.1 pav. Mikobakterijų ląstelių sienelių struktūra [69]

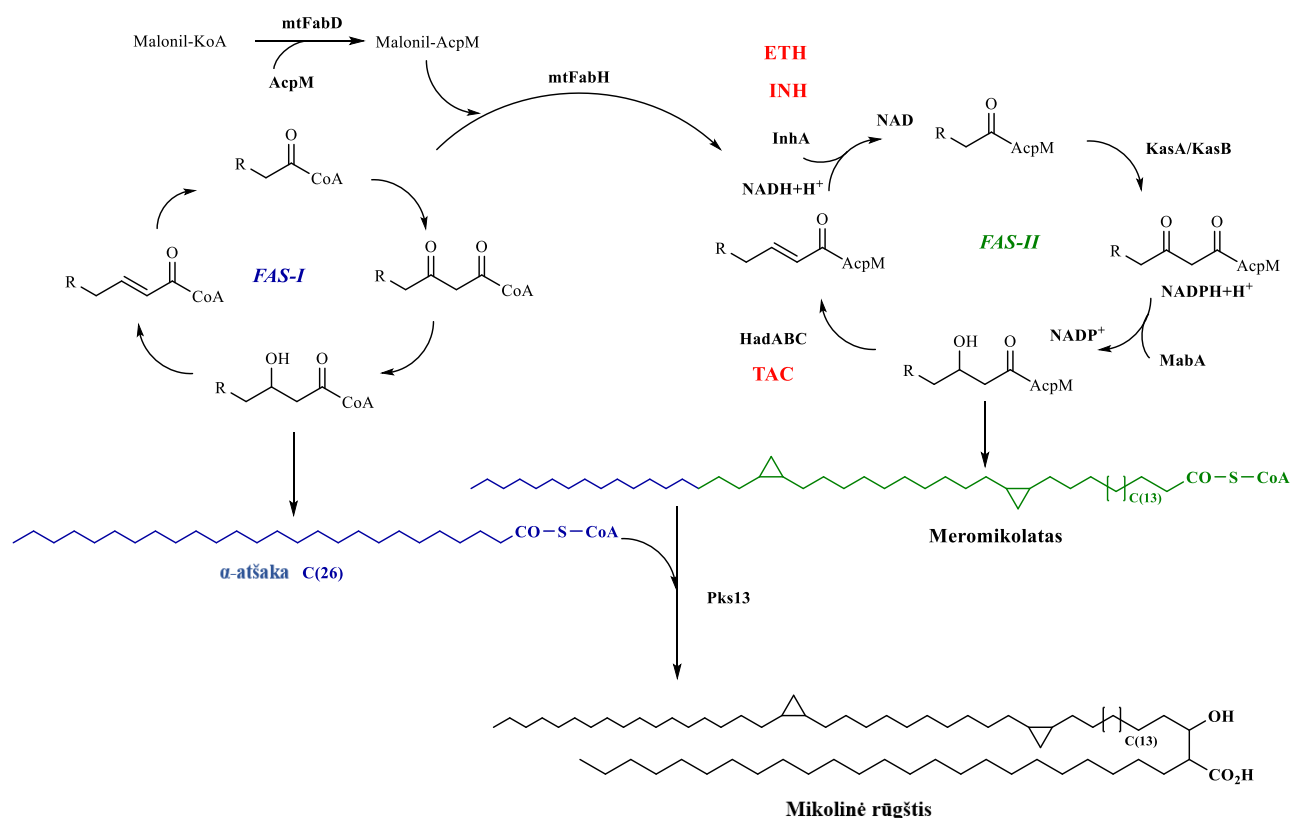
Mikobakterijų sienelės, sudarytos iš keturių sluoksnių, yra daug storesnės nei daugelio kitų bakterijų. Pagrindiniai skiriamieji komponentai: ilgų grandinių mikolio rūgštys, arabinogalaktanas bei peptidoglikanas, sudarantis savitą kryžminį tinklą (žr. 1.1 pav.). Taip pat bakterijų sienelėse randami nedideli kiekiai glikolipidų, lipoproteinų, lipoarabinomananų, transportinių baltymų – porinų, per kuriuos į ląstelę gali patekti nedidelės, tačiau gyvybiškai svarbios hidrofilinės medžiagos. Būtent sienelių komponentų biosintezės būdai yra dažniausiai tyrinėjami, ieškant potencialių vaistinių preparatų, skirtų mikobakterijų sukeltoms infekcijoms gydyti.

Mikolio rūgštys yra esminis mikobakterijų sienelių komponentas, reguliuojantis visos ląstelės pralaidumą, efektyvų dažymą rūgštimi, bakterijų gyvybingumą ir virulentiškumą [14]. Sienelėje mikolio rūgštys yra prisitvirtinusi prie arabinogalaktano komplekso, tačiau nedidelė dalis gali būti

laisvos formos arba sujungtos su kitais sacharidais, sudarydamos trehalozės mono/dimikolatus ir gliukozės monomikolatus.

Mikolio rūgštys yra sudarytos iš ilgų riebalų rūgščių grandinių, turinčių iki 60–90 vienetų anglies atomų. Taip pat struktūroje aptinkami *-cis*, *-trans* ciklopropano fragmentai, *-keto*, *-metoksi* funkcinės grupės. Šių rūgščių biosintezę citoplazmoje inicijuoja riebalų rūgščių sintazės: eukariotinio pobūdžio *FAS-I* ir prokariotinio pobūdžio *FAS-II* fermentinės sistemos [15].

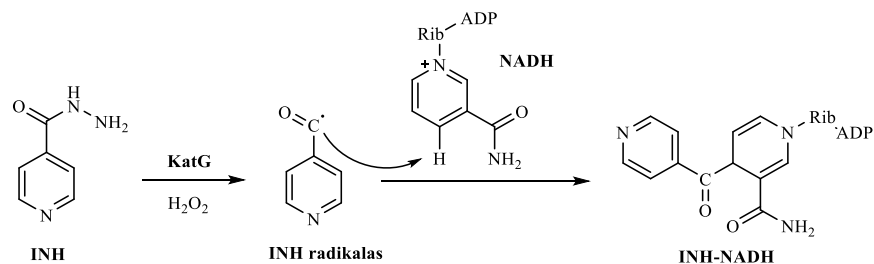
FAS-I etapo metu sintetinami Acil-KoA ($R - C_{16}/C_{26}$) (žr. 1.1 schemą). C_{26} acil-KoA darinys sudaro galutinės mikolio rūgšties α atšaką, o C_{16} acil-KoA yra tiekiamas į *FAS-II* ciklą, kaip meromikolinių rūgščių prekursorius. Elongacijos procesams *FAS-II* etape taip pat yra reikalingas malonil-AcpM, gaunamas iš malonil-KoA, veikiant AcpM transacilazei mtFabD. Esant abiem dariniams, vyksta kondensacijos reakcija, inicijuojama fermento mtFabH, o gautas acil-AcpM darinys yra modifikuojamas, vykstant redukcijos bei dehidratacijos procesų ciklui, kurį katalizuoja *FAS-II* sistemos fermentai: KasA/KasB, MabA, HadABC ir InhA.



1.1 schema. Mikolinių rūgščių biosintezė

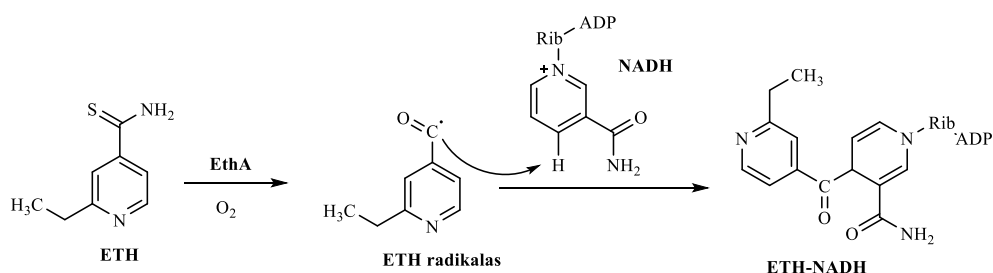
Sudėtingas *FAS-II* ciklas baigiasi meromikolato suformavimu, kuris kondensacijos reakcijos metu yra prijungiamas prie C_{26} acil-KoA atšakos, veikiant fermentui poliketido sintazei Pks13. Taip gaunamas galutinis biosintezės produktas – mikolio rūgštis (žr. 1.1 schemą).

Dauguma veiksmingų komercinių preparatų stabdo mikolio rūgščių biosintezę *FAS-II* cikle. Vienas pagrindinių antibiotikų yra piridino darinys – izoniazidas (INH) (žr. 1.2 schemą), provaistas, patenkantis į mikroorganizmą pasyviosios difuzijos būdu [16]. Tai idealus variantas, kai cheminis junginys neturi žalingo poveikio eukariotinėms ląstelėms, tačiau suaktyvintas specifinio fermento, sukelia patogeno žūtį.



1.2 schema. Isoniazido **INH** mikolio rūgščių sintezės stabdymo mechanizmas

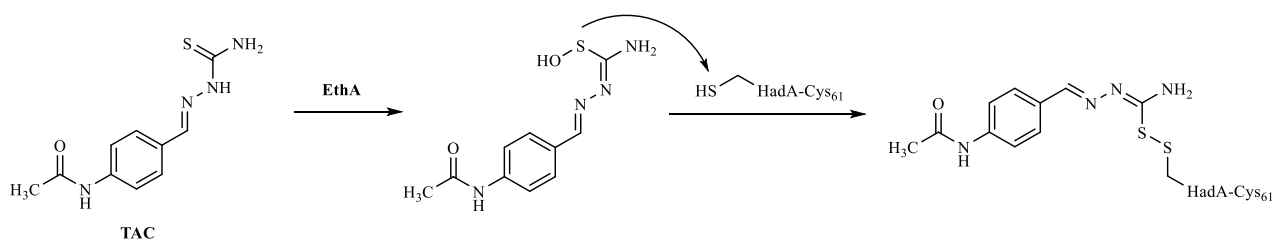
Ląstelėje izoniazidas yra aktyvuojamas mikobakterijų fermentu – peroksidaze KatG (žr. 1.2 schemą), taip gaunama aktyvi izonikotilo INH radikalo forma [17]. Pastarasis su *NADH* suformuoja INH-NADH darinį, kuris kaip inhibitorius prisijungia prie InhA fermento, reikalingo *FAS-II* prailgėjimo sistemai (žr. 1.1 schemą). Inhibavus šį fermentą, mikolio rūgščių biosintezė sustoja, mikobakterijų sienelė tampa pralaidi ir neatspari aplinkos veiksniams.



1.3 schema. Etionamido **ETH** mikolio rūgščių sintezės slopinimo mechanizmas

Kitas komercinis preparatas yra etionamidas (ETH) (žr. 1.3 schemą). Tai baktericidinis junginys, kurio veikimo principas panašus į izoniazido [18]. Tik šiuo atveju provaistas yra aktyvinamas kito fermento – monooksigenazės EthA. Suaktyvinatas ETH toliau sudaro inhibitorinį junginį su NADH ir slopina fermentą InhA (žr. 1.1 schemą).

Vienu iš aktyviausių antros eilės antibiotikų prieš mikobakterijas yra laikomas – tioacetazonas (TAC) (žr. 1.4 schemą), kuris patekęs į organizmą yra suaktyvinamas, fermentui monooksigenazei EthA veikiant tiokarbonilo fragmentą [19].



1.4 schema. Tioacetazono **TAC** mikolio rūgščių sintezės stabdymo mechanizmas

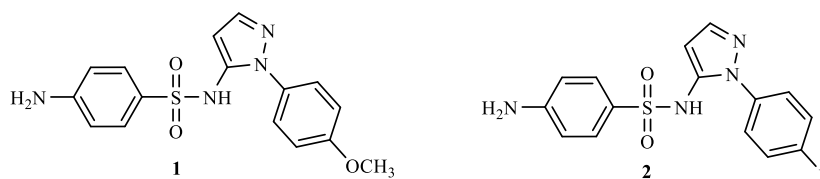
Aktyvi TAC forma inhibuoja *FAS-II* ciklo dehidratazių sistemą HadABC (žr. 1.4 schemą), sudarydama disulfidinį ryšį su fermento HadA cisteino fragmentu – Cys 61. Sutrikus šios fermentinės sistemos veiklai, slopinama mikolio rūgščių biosintezė. Tad atsižvelgdami į tuberkuliozei gydyti skirtų vaistinių darinių veikimo principus, mokslininkai neatmeta galimybės, kad ateityje mikobakteriozėms gydyti bus taikomi įvairūs, sieros elementų turintys junginiai.

1.2. Sulfanilamido tipo darinių sintezė ir pritaikymas mikobakteriozėms gydyti

Junginiai, struktūroje turintys organinės sieros atomų, pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu, kuris dažnai grindžiamas oksidacijos procesu [20]. Nustatyta, jog tokių darinių oksidacijos mechanizmas yra svarbus ląstelių požiūriu, vykstant redukciniui hormonų ir baltymų skaidymui. Taip pat oksidacija vyksta ir proteinų sintezės metu bei palaikant pastovų tarpląstelinį redokso potencialą. Tad šios biologinės savybės tyrėjams leidžia daryti prielaidą, jog sieros atomų struktūroje turintys junginiai yra potencialūs farmakoforai, kurie gali būti pritaikyti anksčiau aptartoms mikobakterijoms slopinti (žr. 1.1 skyrių).

Sieros fragmentą struktūroje turintys sulfanilamidų klasės junginiai, pasižymi dideliu veikimo spektru, o didžioji dalis komercinių preparatų naudojami kaip efektyvūs antimikrobiniai vaistai [21]. XIX a. pr. sulfanilamidai buvo pradėti naudoti ir prieš mikobakterijas [22], pavyzdžiui, *Mycobacterium leprae* patogeno sukeliams raupsams gydyti. Taip pat sulfanilamido fragmentą turintys dariniai pritaikomi *Mycobacterium tuberculosis* bakterijų augimui slopinti. Vienas iš tokių junginių – sulfametoksazolas, kuris veiksmingai slopina tuberkuliozės progresavimą ŽIV sergantiems asmenims. Tad remiantis sulfanilamidų savybėmis, mokslininkai sintetina tokio tipo junginius, kurie ateityje galėtų būti panaudoti mikobakteriozėms gydyti.

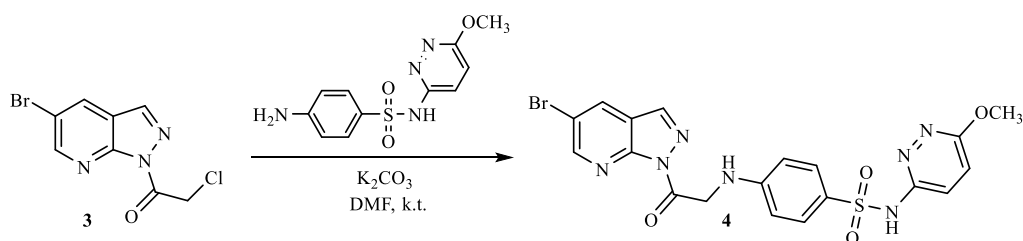
Štai straipsnio [23] autoriai susintetino sulfanilamido fragmentus turinčius darnius **1**, **2**, kurie aktyviai veikė prieš tuberkuliozė sukeliančias bakterijas – *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (žr. 1.2 pav.).



1.2 pav. Sulfanilamido fragmentus turintys dariniai **1**, **2**

Biologinių tyrimų *in vitro* metu nustatyta, kad sulfanilamidas **1** (žr. 1.2 pav.) veikė prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* patogeną, esant 5,69 µg/mL minimaliai slopinimo koncentracijai, o fluoro fragmentą turintis jo analogas **2** – 6,88 µg/mL.

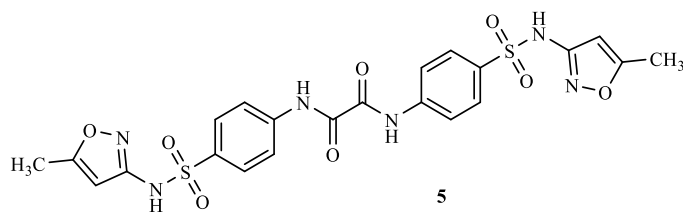
Sulfanilamido fragmentą turintis junginys **4** buvo susintetintas ir reakcijos metu (žr. 1.5 schemą), iš darinio **3**, alkilinant jį kalio karbonato ir DMF tirpale, kambario temperatūroje.



1.5 schema. Sulfonamido fragmentą turinčio junginio **4** sintezės schema

Biologinių tyrimų metu nustatyta, kad sulfanilamido fragmentą turintis darinys **4** (žr. 1.5 schemą) slopino *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* kultūros augimą, esant 6,25 µg/mL inhibitorinei koncentracijai.

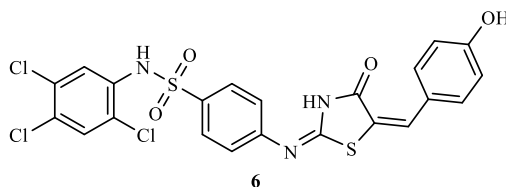
Remdamiesi sulfametoksazolo pavyzdžiu, mokslininkai susintetino kelis sulfanilamido fragmentus turintį darinį **5** (žr. 1.3 pav.) bei ištyrė jo antibakterines savybes [25].



1.3 pav. Sulfanilamido fragmentą turintis junginys **5**

Tyrimų *in vitro* metu, nustatyta, kad gauta medžiaga **5** (žr. 1.3 pav.) ne tik efektyviai slopino *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 augimą, tačiau taip pat aktyviai veikė ir prieš kitas mikobakterijas. Esant 2,00 μM koncentracijai, darinys **5** stabdė bakterijų *Mycobacterium kansasii* 235/80 augimą, o esant 4,00 μM slopino *Mycobacterium kansasii* 6509/96 patogenus.

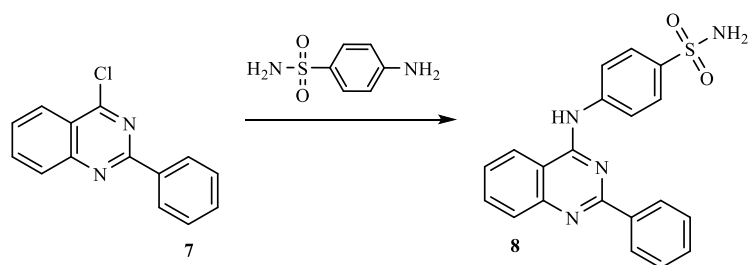
Geru poveikiu prieš mikobakterijas pasižymėjo publikacijos autorių [26] susintetintas darinys **6**, struktūroje turintis ne tik sulfanilamidinį, bet ir heterociklinį tiazolidino fragmentą (žr. 1.4 pav.).



1.4 pav. Biologiškai aktyvus junginys **6**

Atlikus biocheminius tyrimus su *Mycobacterium tuberculosis* patogenais, nustatyta, kad junginys **6** (žr. 1.4 pav.) veikė prieš bakterijas taip pat gerai, kaip ir komercinis preparatas – ciprofloksacinas. Abiejų darinių minimalios inhibitorinės koncentracijos vertės – 3,12 $\mu\text{g/mL}$.

Ieškodami potencialių vaistinių medžiagų, patogenų augimui slopinti, mokslininkai taip pat atlieka *in silico* tyrimus, kurių metu siekiama nuspėti tyrimų prieš bakterijas *in vitro* ir *in vivo* rezultatus, taip pat nustatyti fizikochemines, farmakokinetines junginių savybes [27]. Štai straipsnio [28] autoriai susintetino sulfanilamido fragmentą turintį darinį **8** (žr. 1.6 schemą), skirtą mikobakterijoms naikinti, taip pat atliko teorinę *in silico* analizę.

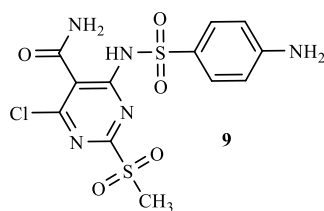


1.6 schema. Potencialiai biologiškai aktyvaus junginio **8** sintezė

Vienas iš pagrindinių *in silico* tyrimo etapų – molekulinis modeliavimas, atliekamas, panaudojant specialius programinius paketus, pavyzdžiui „AutoDock“, „AutoDock Vina“, „SwissDock“, „GOLD“, „Surflex-Dock“ [29]. Šios sintezės metu (žr. 1.6 schemą) tyrėjai pasirinko „AutoDock 4.0“ programą ir nustatė darinio **8** giminingumą *Mycobacterium tuberculosis* InhA fermentui. Atlikus molekulinį

modeliavimą, nustatyta, kad sulfanilamido **8** afinitetas minėtam biokatalizatoriui yra -9,31 kcal/mol. Įrodyta, jog stiprus ryšys su reduktaze InhA stebimas dėl vandenilinės jungties, susidarančios su fermento izoleucino likučiu – Ile 194. Junginio **8** veiksmingumą taip pat įrodo ir „SwissADME“ internetinėje platformoje apskaičiuotos fizikocheminės, farmakokinetinės savybės bei „Lipinski'o taisyklė“ [30], pagal kurią susintetintas darinys yra mediciniškai priimtinas. Tad remiantis *in silico* skaičiavimų rezultatais, galima prognozuoti, kad junginys **8** aktyviai inhibuos InhA fermentą ir stabdys mikolio rūgščių biosintezę patogeno ląstelėje.

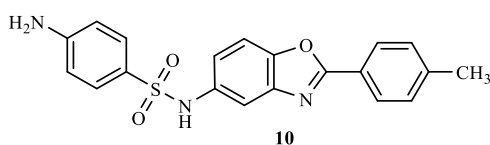
Sulfanilamido fragmentas buvo panaudotas ir sintetinant darinį **9** (žr. 1.5 pav.), kuris pasižymėjo dideliu efektyvumu prieš *Mycobacterium tuberculosis* bakterijas [31].



1.5 pav. Sulfanilamido fragmentą turintis ir prieš mikobakterijas veikiantis junginys **9**

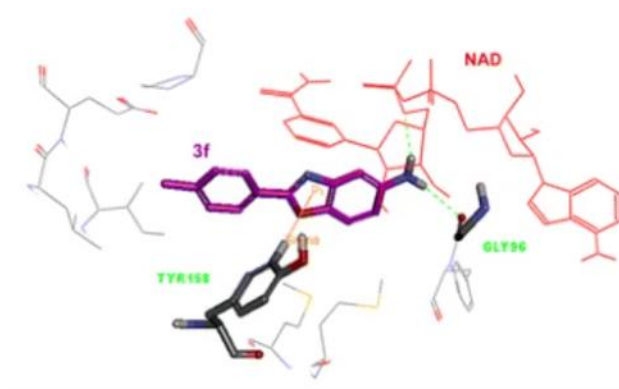
Biologinių tyrimų metu paaiškėjo, kad sulfanilamidas **9** (žr. 1.5 pav.) veikia prieš mikobakterijas, esant 0,02 µg/mL minimaliai inhibitorinei koncentracijai, o palyginimui panaudotas izoniazidas – 0,03 µg/mL.

Ieškodami potencialių farmakoforų mikobakteriozėms gydyti, mokslininkai [32] sintetina sulfanilamidų ir heterociklų fragmentus turinčius junginius. Pavyzdžiui, prie benzoksazolo prijungus 4-aminosulfanilamidą buvo gautas biologiškai aktyvus darinys **10** (žr. 1.6 pav.).



1.6 pav. Sulfanilamido fragmentą turintis benzoksazolas **10**

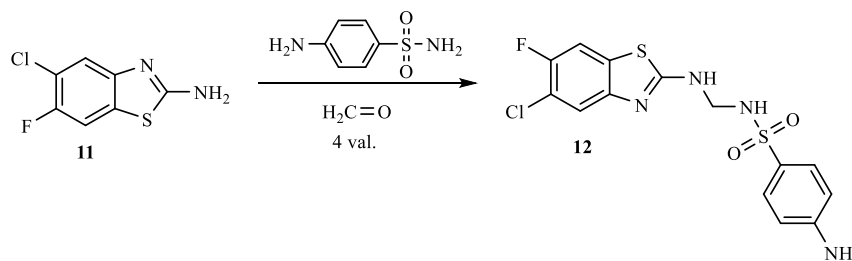
Tyrimų *in vitro* metu, nustatyta, kad junginys **10** (žr. 1.6 pav.) veikia prieš *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 štamą, esant 8 µg/mL slopinimo koncentracijai. Taip pat darinys **10** buvo panaudotas, atliekant molekulinį modeliavimą su baltymu InhA. Analizei reikalingas *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fermentas buvo parsisiųstas iš baltymų duomenų bazės, kurio validuotas identifikacijos kodas – 3FNE. Įvertinus parinkto baltymo InhA ir ligando **10** tarpusavio giminingumą, nustatyta, kad sulfanilamido **10** afinitetas taikiniui lygus -15,78 kcal/mol.



1.7 pav. Sulfanilamido fragmentą turinčio benzoksazolo **10** sąveika su 3FNE baltymu [32]

Taip pat molekulinio modeliavimo metu, nustatyta, kad junginio **10** giminingumą InhA fermentui lemia vandenilinis ryšys, susidarantis tarp darinio **10** -NHSO₂ grupės vandenilio atomo ir 3FNE glicino (Gly 96) likučio (žr. 1.7 pav.).

Sulfanilamido fragmentą prie heterociklinio darinio prijungė ir straipsnio [33] autoriai. Reakcijos metu, tarp benzotiazolo **11** ir 4-aminosulfanilamido, panaudojant formaldehidą, susidarė junginys **12** (žr. 1.7 schemą).

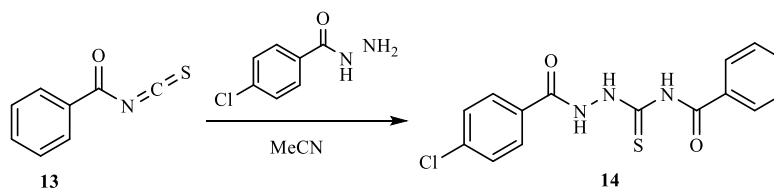


1.7 schema. Sulfanilamido fragmentą turinčio benzotiazolo **12** gavimo reakcija

Ištirus junginio **12** (žr. 1.7 schemą) antimikrobines savybes, prieš *Mycobacterium tuberculosis* patogenus, nustatyta, kad bakterijų ląstelių augimas nustoja, esant 50,00 µg/mL slopinimo koncentracijai.

1.3. Tiosemikarbazidų tipo darinių sintezė ir poveikis prieš mikobakterijas

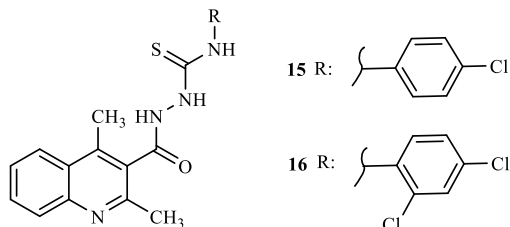
Atsižvelgdami į tiokarbonilo fragmentą turinčio tioacetazono bei etionamido pavyzdžius, kovojant prieš *Mycobacterium* genties patogenus, mokslininkai sintetina panašaus tipo darinius – įvairius tiosemikarbazidus ir tiosemikarbozonus. Štai vykstant reakcijai (žr. 1.8 schemą) tarp izotiocianato **13** bei pasirinkto hidrazido, kaip tirpiklį panaudojant acetonitrilą, buvo susintetintas junginys **14** [34].



1.8 schema. Tiosemikarbazido **14**, slopinančio *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bakterijų augimą sintezė

Nustatyta, kad gautas tiosemikarbazidas **14** (žr. 1.8 schemą) efektyviai slopina bakterijų *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* augimą, o minimali inhibitorinė koncentracija prieš patogeną – 15,60 µg/mL.

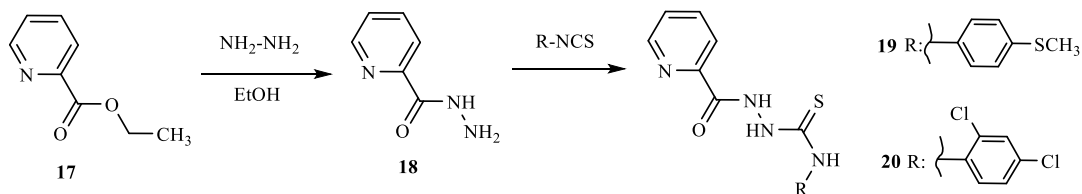
Mycobacterium tuberculosis H37Rv bakterijų dauginimąsi taip pat gali stabdyti tyrėjų [35] susintetinti, sudėtyje chloro turintys tiosemikarbazido dariniai **15** ir **16** (žr. 1.8 pav.).



1.8 pav. Tiosemikarbazidai **15**, **16**, slopinantys *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* bakterijų dauginimąsi

Atlikus *in vitro* tyrimus, nustatyta, kad abu junginiai **15**, **16** (žr. 1.8 pav.) veikia prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* štamą, esant 25,00 µg/mL minimaliai slopinimo koncentracijai.

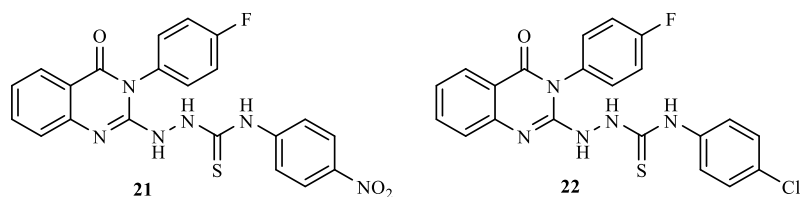
Tiosemikarbazidų gamybai dažnai pasirenkamas piridino fragmentas [36]. Štai iš esterio **17** gautas 2-piridinkarboksirūgšties hidrazidas **18** buvo paveiktas izotiocianatu (žr. 1.9 schemą.). Reakcijos metu susintetinti tiosemikarbazidai **19**, **20**, buvo aktyvūs prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* bakterijas.



1.9 schema. Tiosemikarbazidų tipo junginių **19** ir **20**, turinčių piridino fragmentą sintezė

Biologinių tyrimų metu, nustatyta, kad dariniai **19**, **20** (žr. 1.9 schemą.) aktyviai veikia prieš infekcijos sukėlėjus, esant minimaliai slopinimo koncentracijai – 15,63 µg/mL. Remiantis inhibavimo zonų duomenimis, efektyviau prieš tuberkuliozės sukėlėjus veikė junginys **19**, kurio slopinimo zona siekė 30,5 mm. Ši reikšmė artima ir palyginimui naudoto medikamento – rifampicino – inhibavimo zoni, kurios vertė – 35,4 mm.

Publikacijoje [37] taip pat pateikiami potencialiai biologiškai aktyvūs tiosemikarbazidai **21** ir **22** (žr. 1.9 pav.).

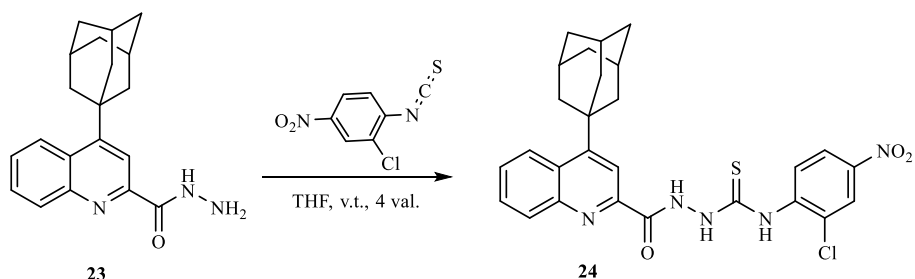


1.9 pav. Ciprofloksacino fragmentą turintys tiosemikarbazidų dariniai **21**, **22**

Nustatyta, kad junginiai **21**, **22** (žr. 1.9 pav.) pasižymi panašiu biologiniu aktyvumu prieš *Mycobacterium tuberculosis* bakterijas, kaip ir antros eilės prieštuberkuliozinis antibiotikas –

ciprofloksacinas. Darinių **21**, **22** minimali inhibitorinė koncentracija – 3,00 µg/mL, o standartinio preparato – 1,00 µg/mL. Tad yra galimybė, kad ateityje į antibiotikų sąrašą bus įtraukti ir tokio tipo dariniai.

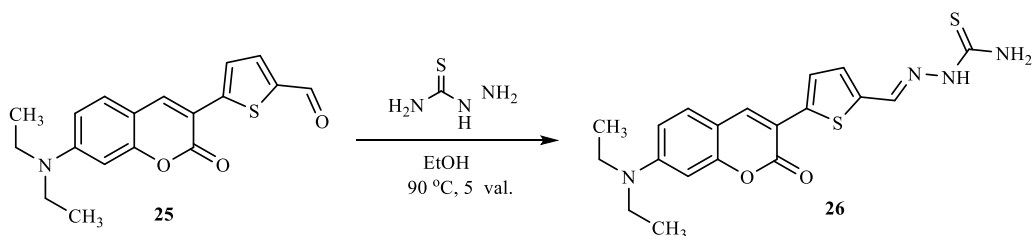
Tioseмикarbazidų tipo junginiai dažnai derinami su farmaciniu požiūriu svarbiomis molekulėmis, pvz., adamantanu. Štai publikacijoje [38] pateikta tokio tipo biologiškai aktyvaus darinio **24** sintezė (žr. 1.10 schemą) ir tyrimai prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* bakterijas.



1.10 schema. Adamantano fragmentą turintis, biologiškai aktyvus tiosemikarbazidas **24**

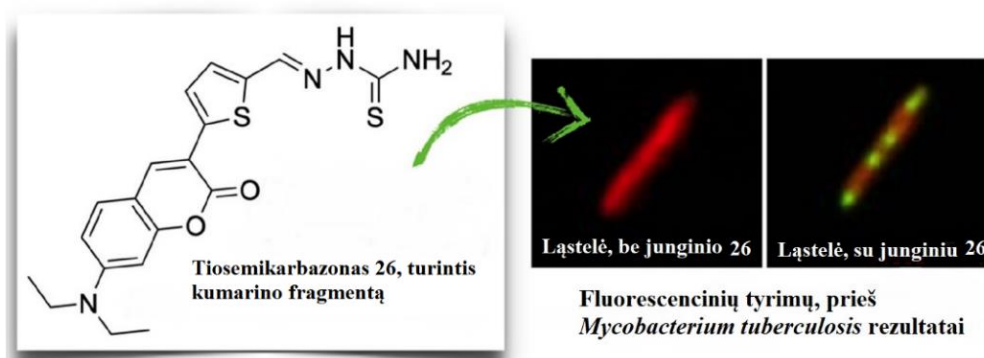
Tyrimų *in vitro* metu, nustatyta, kad tiosemikarbazidas **24** (žr. 1.10 schemą) stabdo tuberkuliozę sukeliančio patogeno *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* augimą, esant 6,25 µg/mL minimaliai slopinimo koncentracijai. Šiuo atveju, inhibavimo zona siekia 96 %.

Tioseмикarbazidų klasei priskiriamas medžiagas mokslininkai derina ir su kumarinų tipo dariniais. Štai tyrėjai [39], panaudodami heterociklą **25**, susintetino tiosemikarbazoną **26** (žr. 1.11 schemą). Reakcijos metu, chromenonui **25** sureagavus su hidrazinkarbotioamidu, buvo gautas junginys **26**, kuris aktyviai veikė prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* padermę, esant minimaliai slopinimo koncentracijai – 0,50 µg/mL.



1.11 schema. Chromenono fragmentą turinčio tiosemikarbazono **26** sintezė

Žinodami, jog kumarinų klasės junginiai pasižymi fluorescencinėmis savybėmis, tyrėjai darinį **26** (žr. 1.11 schemą) panaudojo kaip biožymeklį, stebint jo poveikį *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* ląstelėse. Mokslininkai nusprendė, kad vietose, kuriose ląstelės spalva kinta iš raudonos į žalią, turimas junginys **26** jungiasi su mikolio rūgščių biosintezėi reikalingu fermentu HadA (žr. 1.10 pav.).



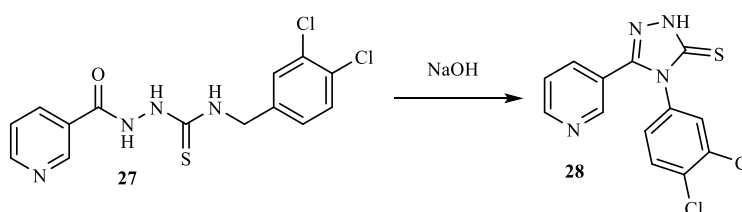
1.10 pav. Tiosemikarbazono **26** poveikis *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ląstelėje [39]

Šiuo atveju, medžiagos **26** (žr. 1.10 pav.) tiokarbonilo fragmentas sudaro tvirtą disulfidinį ryšį su HadA cisteino fragmentu – Cys 61. Dėl šios priežasties mikolio rūgščių biosintezė sustabdoma, o tiosemikarbazonas **26** pasižymi dideliu efektyvumu prieš tuberkuliozę sukeltantį patogeną.

1.4. Tiosemikarbazido tipo darinių ciklizacijos reakcijos ir gautų junginių antimikobakterinis aktyvumas

Siekdami pagerinti turimų junginių savybes, mokslininkai dažnai atlieka ciklizacijos procesus. Ne išimtis ir tiokarbonilo fragmentą turintys dariniai, iš kurių galima gauti biologiškai aktyvius heterociklinius darinius. Mokslinėje literatūroje [40] dažnai minima tiosemikarbazidų ciklizacija, kurios metu galima gauti įvairius tiadiazolus, triazolus, potencialiai tinkamus mikobakteriozėms gydyti.

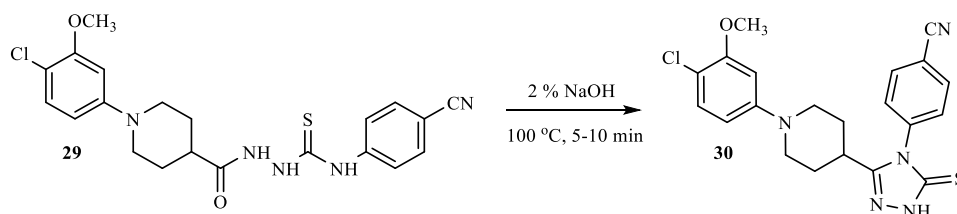
Tiosemikarbazidų ciklizacijos reakcijas mokslininkai dažnai atlieka šarminėje aplinkoje, o procesų metu yra gaunami triazolų klasei priskiriami junginiai. Štai publikacijos [41] autoriai susintetino 1,2,4-triazolą **28**, kuris pasižymėjo geru antimikrobinu poveikiu (žr. 1.12 schemą).



1.12 schema. Tiosemikarbazido **27** ciklizacija šarminėje aplinkoje

Tyrimų *in vitro* metu nustatyta, kad triazolas **28** (žr. 1.12 schemą), gautas iš piridino fragmentą turinčio tiosemikarbazido **39**, efektyviai slopino *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra patogenų augimą. Junginys **28** veikė prieš bakterijas, esant 0,98 µg/mL minimaliai inhibitorinei koncentracijai.

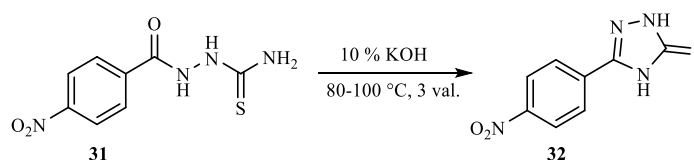
Triazolų efektyvumas prieš tuberkuliozės sukėlėją įrodomas ir kitame literatūros šaltinyje [42]. Šiuo atveju, tiosemikarbazido **29** ciklizacijai šarminėje aplinkoje mokslininkai panaudojo mikrobangas, taip pagreitindami vykstantį procesą (žr. 1.13 schemą).



1.13 schema. Tiosemikarbazido **29** ciklizacijos reakcija šarminėje aplinkoje, panaudojant mikrobangas

Paiškėjo, kad 5–10 min vykusios reakcijos metu, gautas 1,3,4-triazolas **30** (žr. 1.13 schemą) aktyviai veikė prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* štamą, esant 0,63 μM minimaliai slopinimo koncentracijai. Junginys **30** nedideliu skirtumu, tačiau buvo efektyvesnis už standartinę medžiagą – izoniazidą, kurio minimali inhibitorinė koncentracija tyrimo metu siekė 0,70 μM .

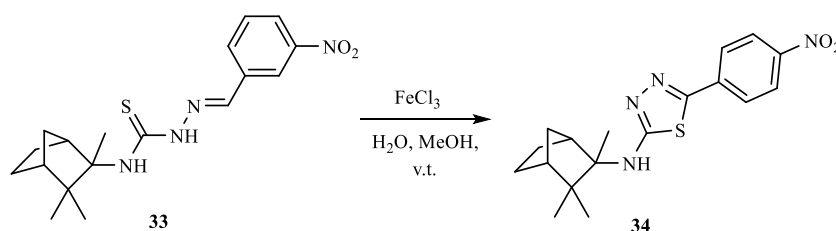
Ieškodami potencialių prieštuberkuliozinių preparatų, mokslininkai [43] susintetino 1,2,4-triazolą **32** iš tiosemikarbazido **31**, vykdydami ciklizaciją 10 % kalio hidroksido tirpale (žr. 1.14 schemą).



1.14 schema. Tiosemikarbazido **31** ciklizacijos reakcija

Reakcijos metu, šarminėje aplinkoje susidaręs triazolų klasei priskiriamas junginys **32** (žr. 1.14 schemą), buvo veiksmingas prieš *Mycobacterium tuberculosis* bakterijas, esant 9,05 $\mu\text{g/mL}$ minimaliai slopinimo koncentracijai aktyviojoje fazėje.

Iš tiosemikarbazidų, ciklizacijos procesų metu, galima gauti tiadiazolų tipo junginius [44]. Štai pateikta tiosemikarbazono **33** kondensacijos reakcijos schema (žr. 1.15 schemą), kurios metu geležies trivalenčiu chloridu veikiant pradinį junginį **33** vandens ir metanolio mišinyje, gautas tiadiazolas **34**.



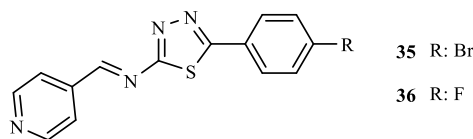
1.15 schema. Kamfeno fragmentą turinčio tiadiazolo **34** sintezė

Ištirus tiadiazolo **34** (žr. 1.15 schemą) biologines savybes, paaiškėjo, kad darinys **34** gerai slopina tuberkuliozę sukeliančių *Mycobacterium tuberculosis* bakterijų augimą, esant 3,90 $\mu\text{g/mL}$ minimaliai slopinimo koncentracijai, o tinkamumą naudoti preparatą *in vivo* įrodo, tyrėjų atlikti *in silico* tyrimai.

In silico analizės metu, panaudojant „SwissADME“ žiniatinklio įrankį, nustatyta, kad tiadiazolas **34** (žr. 1.15 schemą) atitinka medicininius reikalavimus, pagal „Lipinski'o taisyklę“. Jo molekulinė masė neviršija 500 g/mol ir siekia 358,14 g/mol. Taip pat molekulės struktūroje rasti 5 vandenilio atomų akceptoriai ir tik 1 donoras. Lipofiliškumo parametras $\log P$ taip pat atitinka standartą – <5 , o „SwissADME“ įrankio sugeneruota vertė siekia – 3,07. Tad remiantis tyrimų *in silico* ir *in vitro* prieš

Mycobacterium tuberculosis rezultatais, galima teigti, kad junginys **34** ateityje galėtų būti panaudotas mikobakteriozėms gydyti.

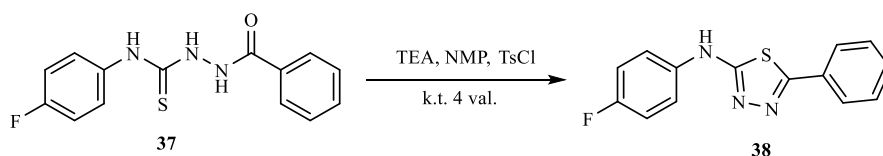
Tiadiazolus sintetinto ir straipsnio [45] autoriai, o gauti junginiai **35**, **36** buvo ištirti prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* patogeną (žr. 1.11 pav.).



1.11 pav. Halogenų elementus turintys ir antimikobakteriniu poveikiu pasižymintys tiadiazolai **35**, **36**

Biologinių tyrimų metu, nustatyta, kad tiadiazolai **35**, **36** (žr. 1.11 pav.) pasižymi potencialiu antibakteriniu veikimu, stabdant tuberkuliozę sukeliančių patogenų augimą. Junginys **35**, turintis bromo fragmentą, veikė prieš *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* mikroorganizmus, esant 58,00 µg/mL, o darinys su fluoro elementu **36** – 69,00 µg/mL minimalioms slopinimo koncentracijoms.

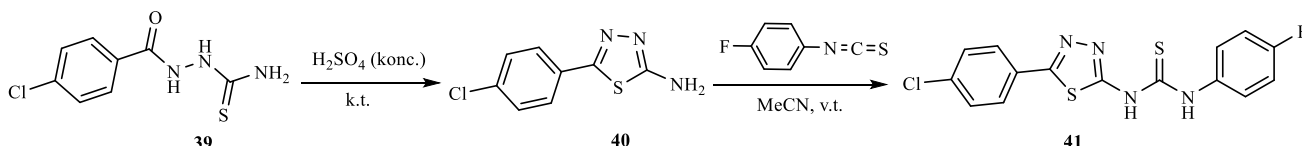
Halogenintų tiadiazolų sintezės metu [46], iš pradinio junginio **37** gautas ciklinis darinys **38** (žr. 1.16 schemą). Šiuo atveju, tiosemikarbazidas **37** buvo virinamas trietilamino (TEA), *N*-metil-2-pirolidono (NMP) ir 4-toluensulfonilo chlorido (TsCl) mišinyje 4 val., o susintetintas tiadiazolas **38** ištirtas *in vitro*, prieš *Mycobacterium smegmatis MC155* bakteriją.



1.16 schema. Fluoro fragmentą turinčio tiosemikarbazido **37** ciklizacijos reakcija

Biologijų tyrimų metu, nustatyta, kad tiadiazolas **38** (žr. 1.16 schemą) veikia prieš *Mycobacterium smegmatis MC155* patogeną, esant 26,46 µM minimaliai slopinimo koncentracijai. Taip pat buvo atlikta *in silico* analizė, siekiant išsiaiškinti junginio **38** farmakokinetines savybes. Panaudojant „MolSoft“ platformą, nustatyta, jog tiadiazolas **38** atitinka „Lipinski'o taisyklę“, o jo panašumo į realius vaistinius preparatus balo vertė buvo lygi -0.93. Šie parametrai įrodo, jog ciklizuojant tiosemikarbazidus, gaunami tiadiazolai gali būti aktyvūs prieš patogenus ir mediciniškai priimtini.

Tiadiazolo tipo junginiai, dažnai gaunami, vykdant tiosemikarbazidų ciklizacijos procesus su koncentruota sieros rūgštimi [47, 48]. Štai publikacijoje [49] pateikta biologiškai aktyvaus tiadiazolo **41** dviejų etapų gamybos schema (žr. 1.17 schemą).



1.17 schema. Tiadiazolo **41** sintezė

Pirmojo etapo metu iš tiosemikarbazido **39**, maišant jį kambario temperatūroje su koncentruota sieros rūgštimi, gautas tarpinis tiadiazolas **40**, kurį paveikus atitinkamu izotiocianatu, turinčiu fluoro pakaitą, gautas potencialiai biologiškai aktyvus junginys **41** (žr. 1.17 schemą). Ištyrus susintetinto

tiadiazolo **41** poveikį prieš tuberkuliozę sukeltą patogeną *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, nustatyta, kad darinys **41** slopina bakterijų augimą, esant 10,96 μM minimaliai slopinimo koncentracijai.

Atlikus tiadiazolo **41** (žr. 1.17 schemą) *in silico* analizę, nustatytas junginio farmakokinetinis priimtumas, remiantis „Lipinski'o taisykle“. Pasinaudodami „Molinspiration Cheminformatics“ žiniatinklio įrankiu, mokslininkai [49] sugeneravo pagrindinius priimtumą patvirtinančius parametrus. Nustatyta, kad junginio molekulinė masė lygi 364,86 g/mol, molekulės struktūroje randami 4 vandenilio atomų akceptorai ir 2 donorai. Taip pat įvertintas lipofiliškumo parametras logP, kurio vertė 4,52. Kadangi visos „Molinspiration Cheminformatics“ sistemos pateiktos parametrų vertės atitina „Lipinski'o taisyklių“ ribas, galima prognozuoti, kad tiadiazolas **41** yra mediciniškai naudingas ir ateityje bus panaudotas mikobakteriozėms gydyti.

1.5. Farmakokinetinių savybių įvertinimo svarba

Ieškant potencialių vaistinių preparatų, svarbu įvertinti jų galimą efektyvumą *in silico* analize. Šie tyrimai leidžia sumažinti biologiškai aktyvių molekulių paieškos laiką, gamybos kaštus, suteikia galimybę sužinoti virtualius ligando ir baltymo sąveikos modelius. Literatūros apžvalgoje minimi atvejai [28, 32, 44, 46], kai buvo atliekama ne tik potencialių antimikobakterinių darinių sintezė, tačiau ir atlikti preliminarūs *in silico* skaičiavimai. Šių tyrimų metu nustatomos cheminių junginių fizikocheminės bei farmakokinetinės savybės. Naudojantis specialiais žiniatinklio įrankiais, sugeneruojami pagrindiniai, gerą absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą ir ekskreciją apibūdinantys parametrai, lemiantys potencialių vaistinių medžiagų klinikinių tyrimų sėkmę.

Analizuojant junginių tinkamumą naudoti terapijoje, dažnai įvertinamas priimtumas pagal „Lipinski'o taisyklę“ [50], kurią sudaro penkios dedamosios – molekulinė masė, vandenilinių ryšių donorų bei akceptorų kiekis, laisvai besisukančių cheminių jungčių skaičius bei lipofiliškumas. Iš šių kriterijų, svarbiausias yra lipofiliškumas, įvertinantis tiriamų darinių gebėjimą pasyviais pernašos būdu pereiti biologines membranas, tokias kaip virškinimo traktas arba hematoencefalinis barjeras [51]. Lipofiliškumas *in silico* tyrimuose išreiškiamas logaritmine išraiška logP, apibūdinančia preparato pasiskirstymą dvifazėje sistemoje – oktanolis/vanduo. Nustatyta, kad optimali logP vertė yra nuo 1 iki 3, tuomet medikamentas bus absorbuojamas organizme ir turės gerą biologinio prieinamumo potencialą [52]. Jeigu logP reikšmė viršys ribas, vaistinio preparato molekulės bus mažai tirpios ir bus pašalintos iš organizmo neprasidėjus veikimo procesui. Priešingu atveju, kai logP <1, vaistinis preparatas gali pradėti kauptis organizme, dėl to padidės šalutinių poveikių tikimybė.

Pagerinti junginio bioprieinamumą gali tirpumas vandenyje. *In silico* analizės metu tirpumas išreiškiamas neigiama logaritmine forma – logS [53]. Kai logS reikšmės vertė yra nuo -10 iki -6, junginys laikomas netirpiu, o esant nuo -6 iki -4 – vidutinio tirpumo. Kai logS > -4 tiriami junginiai bus laikomi tirpiaisiais ir priimtinais vartoti terapijoje.

Junginio absorbciją virškinamajame trakte apibūdina ir topologinis polinis paviršiaus plotas *TPSA*. Šis rodiklis parodo bendrą tiriamo junginio polinių grupių skaičių, išreikštą Å vienetais [54]. Optimali *TPSA* reikšmė vaistiniams preparatams – 60–120 Å. Kai *TPSA* vertė yra mažesnė už 60 Å, junginys bus stipriai absorbuojamas ir pereis hematoencefalinį barjerą. Kai reikšmė yra didesnė už 120 Å, junginio absorbcija sumažės, jo molekulės sunkiai pereis biologines membranas.

P–glikoproteinai (P-gp) yra transmembraniniai baltymai [55], kurie randami epitelyje, hematoencefaliniame barjere bei organizmo virškinamajame trakte. Šie proteinai yra svarbūs vaistinių darinių, aminorūgščių, glikozidų, alkaloidų transportui organizme, todėl kuriant naujus terapinius preparatus reikia įvertinti, ar tiriamas junginys yra P-gp substratas, ar inhibitorius.

Tinkamos medžiagų apykaitos procesus apibūdina ir geras kenksmingų darinių suardymas bei pašalinimas iš organizmo. Daugelyje tokių biotransformacijos procesų dalyvauja monooksigenazių fermentai – citochromai CYP450 [56]. Tai hemoproteinai, atliekantys oksidacijos reakcijas organizme, o jų substratai – riebalų rūgštys, prostaglandinai, riebaluose tirpūs vitaminai, maisto priedai, įvairios vaistinės medžiagos. Pagrindiniai citochromai CYP450, tiriami vaistinių medžiagų prieinamumui įvertinti – CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4. Nustatyta, kad CYP1A2 yra atsakingas už endogeninių steroidų, kenksmingų karcinogenų, kofeino metabolizmą organizme, o CYP2C19 fermentas metabolizuoja antimaliarinius, antiepilepsinius, chemoterapinius ir antivirusinius preparatus. CYP2C9 citochromo fermentai skaido deguonies turinčius darinius – karboksirūgštis, alkoholius, net sulfonamidus, o CYP2D6 taikiniai yra azoto struktūroje turinčios medžiagos. CYP3A4 citochromo metabolizmas yra sudėtingiausias, dėl mažo specifiškumo substratui. Tokiu atveju, daugelis medžiagų gali prisitaikyti prie CYP3A4 aktyviojo centro ir turėti jam neigiamą poveikį. Tad sintetinant potencialius vaistinius preparatus, svarbu atsižvelgti į galimą citochromų CYP450 slopinimą, kuris gali sukelti kenksmingų metabolitų kaupimąsi ir šalutinius poveikius organizme.

1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Literatūros apžvalgoje aptarti *Mycobacterium* genties patogenai ir jų atsparumą vaistiniams preparatams lemiantys veiksniai. Remiantis 2012–2021 metais publikuota mokslinė literatūra, pastebėta, kad tyrėjai vis dar ieško aktyvių farmakoforų mikobakteriozėms gydyti, atsižvelgdami į bakterijų ląstelių sienelių sudėtį, jos komponentų biosintezės mechanizmus. Pagrindiniu taikiniu laikoma mikolio rūgščių gamyba, kuriai stabdyti sintetinami įvairūs sulfanilamidai, jų *N*-pakeisti dariniai. Taip pat stebima nauja tendencija – tiokarbonilo darinių, tiosemikarbazidų, tiosemikarbazonų, tiadiazolų ir triazolų sintezė. Literatūros šaltiniuose šie dariniai apibūdinami, kaip potencialios antimikrobinės medžiagos, skirtos *Mycobacterium* genties sukeliams infekcijoms gydyti. Tokio tipo medžiagų sintezė gali būti atlikta vienapakopio proceso metu, nereikalaujant tarpinių produktų išskyrimo, o gauti junginiai dažnai būna aktyvesni už komercinius preparatus. Pastebėta, kad daugeliui sintetinamų junginių yra įvertinamos potencialios farmakokinetinės, fizikocheminės savybės bei biologinis prieinamumas. Tad remiantis turima informacija, verta tęsti minėtų struktūrų tyrimus, *in silico* analizę bei atlikti potencialiai biologiškai aktyvių molekulių sintezę.

2. Medžiagos ir tyrimo metodai

2.1. Naudotos medžiagos

2.1 lentelė. Projekto metu naudotų reagentų sąrašas

Reagentas	Bruto formulė	Pardavėjas/gamintojas	Grynumas
4-aminosulfanilamidas	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	„Sigma-Aldrich“	≥ 99,0 %
Akrilo rūgštis	C ₃ H ₄ O ₂	„Sigma-Aldrich“	99,0 %
Hidrazino monohidratas	N ₂ H ₄ ·H ₂ O	„Sigma-Aldrich“	98,0 %
Kalio tiocianatas	KSCN	„Sigma-Aldrich“	≥ 99,0 %
Benzoilo chloridas	C ₇ H ₅ OCl	„Sigma-Aldrich“	99,0 %
2-hidroksibenzoilchloridas	C ₇ H ₅ ClO ₂	„Sigma-Aldrich“	99,0 %
Nikotinoilo chloridas	C ₆ H ₄ ClNO	„Sigma-Aldrich“	97,0 %
Sulfapiridinas	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	„Sigma-Aldrich“	≥ 99,0 %
4-chlorbenzoilchloridas	C ₇ H ₄ OCl ₂	„Sigma-Aldrich“	99,0 %
2-chlorbenzoilchloridas	C ₇ H ₄ OCl ₂	„Sigma-Aldrich“	95,0 %
Anglies disulfidas	CS ₂	„Sigma-Aldrich“	≥ 99,0 %
Benzkarbaldehidas	C ₇ H ₆ O	„Sigma-Aldrich“	≥ 99,0 %
4-chlorbenzkarbaldehidas	C ₇ H ₅ OCl	„Sigma-Aldrich“	97,0 %
4-metoksibenžkarbaldehidas	C ₈ H ₈ O ₂	„Sigma-Aldrich“	98,0 %
2-chlor-5-nitrobenžkarbaldehidas	C ₇ H ₄ NO ₃ Cl	„Sigma-Aldrich“	97,0 %
4-metilbenžkarbaldehidas	C ₈ H ₈ O	„Sigma-Aldrich“	97,0 %

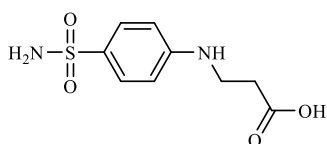
2.2. Tyrimo metodai

Reakcijų eiga ir gautų junginių grynumas stebėti plonasluoksnės chromatografijos būdu, naudojant *Merc Silica gel 60 F₂₅* plokšteles. Chromatogramos ryškintos UV šviesa, esant 254 nm ir 336 nm bangos ilgiams. Lydymosi temperatūros nustatytos atviruose kapiliaruose. BMR spektriniai duomenys užrašyti *Bruker Avance III* (¹H 400 MHz, ¹³C 101 MHz) spektrometru, kaip vidinį standartą panaudojant tetrametilsilaną, o tirpiklį– DMSO-*d*₆. Cheminiai poslinkiai δ skalėje išmatuoti milijoninėmis dalimis (mln. d.). Junginių FT-IR spektrai užrašyti *PERKIN ELMER Spectrum 100 FT-IR* aparatu, naudojant KBr tabletes. Elementinė analizė atlikta *Exerter Analytical CE-440 Elemental* aparatu, masių spektrai užrašyti, panaudojant *Agilent 6530 Q-TOF LC/MS* įrangą.

Pradinių junginių 2–4 sintezė

3-[(4-Sulfamoilfenil)amino]propano rūgštis (2)

Į vandenį (100 ml) ištirpinto 4-aminosulfanilamido **1** (17,20 g, 100 mmol) tirpalą sulašinta akrilo rūgštis (10,29 ml, 150 mmol), reakcijos mišinys virintas 8 val. Procesui pasibaigus, iškritę produkto kristalai filtruoti ir gryninti, perkristalizuojant juos iš vandens.

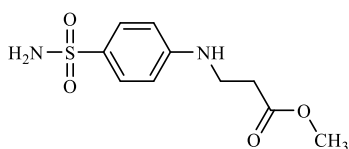


CAS Registracijos numeris: 6541-98-6.

Išeiga 15,92 g (65 %). Nustatyta Lyd. t., 138–139 °C. Literatūroje [57] pateikta Lyd. t., 138–139 °C.

Metil-3-[(4-sulfamoilfenil)amino]propanoatas (3)

3-[(4-Sulfamoilfenil)amino]propano rūgštis (2) (15,92 g, 65 mmol) ištirpinta metanolyje (80 ml). Į reakcijos mišinį įlašintas katalitinis koncentruotos sieros rūgšties kiekis (2–3 lašai), procesas vykdytas 6 val. Esterifikacijai pasibaigus, iš reakcijos mišinio rotaciniu garintuvu pašalintas metanolis, kolbos turinys praskiestas 5 % NaHCO₃ tirpalu, gauti kristalai nufiltruoti ir gryninti, perkristalizuojant juos iš 2-propanolio.

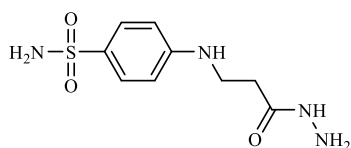


CAS Registracijos numeris: 1183040-20-1.

Išeiga 15,76 g (94 %). Nustatyta Lyd. t., 75–76 °C. Literatūroje [57] pateikta Lyd. t., 76–77 °C.

4-[(3-Hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamidas (4)

Metil-3-[(4-sulfamoilfenil)amino]propanoatas (3) (15,76 g, 61 mmol) ištirpintas 1,4-dioksane, į mišinį sulašintas hidrazino monohidratas (8,87 ml, 183 mmol), reakcija vykdyta 4 val., tirpiklio virimo temperatūroje. Procesui pasibaigus, iškritę produkto kristalai filtruoti ir gryninti, perkristalizuojant juos iš 2-propanolio ir vandens mišinio.



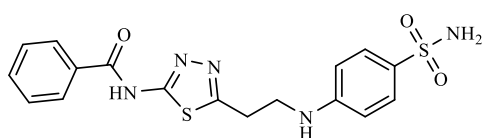
CAS Registracijos numeris: 1211471-67-8.

Išeiga 14,18 g (90 %). Nustatyta Lyd. t., 146–147 °C. Literatūroje [57] pateikta Lyd. t., 145–146 °C.

Bendras 1,3,4-tiadiazolų darinių 8a–8e gavimo būdas

Į išdžiovintą ir acetonitrile ištirpintą kalio tiocianatą (0,11 g, 1,1 mmol) atsargiai sulašintas atitinkamas rūgšties halogenidas (1,0 mmol). Mišinys maišytas 4 val. kambario temperatūroje, inertinėje argono atmosferoje. Toliau į tą patį mišinį supiltas DMF (5 ml) ištirpintas rūgšties hidrazidas 4 (0,26 g, 1,0 mmol), reakcija vykdyta 24 val. Po reakcijos, mišinys atvėsintas ir skiestas 5 % NaHCO₃ tirpalu bei paliktas stovėti k. t. 24 val. Gauti kristalai buvo nufiltruoti, plauti vandeniu, džiovinti ir be papildomo gryninimo veikti 80 % sieros rūgštimi. Ciklizacija vykdyta kambario temperatūroje, 24 val. Reakcijai pasibaigus, kolbos turinys išpiltas į ledą, gauti kristalai filtruoti, gausiai plauti vandeniu. Gauta medžiaga gryninta, perkristalizuojant ją iš 1,4-dioksano.

N-(5-{2-[(4-Sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (8a)

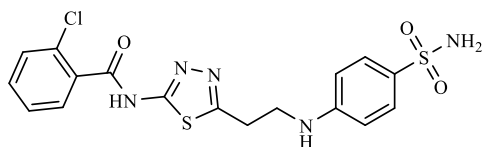


Išeiga 0,29 g (72 %). Lyd. t. 256–257 °C.

IR (KBr), ν , cm⁻¹: 1603 (C=N); 1653 (CONH); 3158; 3254 (ArNH + CONH); 3343; 3383 (NH₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,29 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz, CH₂CH₂NH); 3,53 (kv., 2H, *J* = 6,5 Hz, CH₂CH₂NH); 6,66 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, CH₂CH₂NH); 6,71 (d, 2H *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 6,95 (s, 2H, *J* = 6,3 Hz, NH₂); 7,54–8,12 (m, 7H, H-Ar); 12,96 (s, 1H, *J* = 8,5 Hz, CONH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 29,26 (CH₂CH₂NH); 42,28 (CH₂CH₂NH); 111,51; 127,92; 128,80; 129,08; 131,00; 132,28; 133,32; 151,37

(C-Ar); 160,30; 162,36 (C=N); 165,78 (CONH); **HRMS** (ESI) C₁₇H₁₈N₅O₃S₂ ([M+H⁺]) apskaičiuota 404,0851; nustatyta 404,0844.

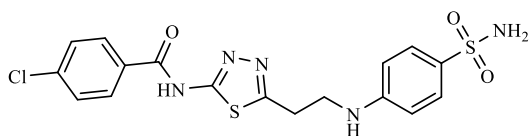
2-Chlor-N-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (8b)



Išiga 0,32 g (74 %). Lyd. t. 211–212 °C.

IR (KBr), ν , cm⁻¹: 1601 (C=N); 1655 (CONH); 3169; 3244; (ArNH + CONH); 3351 (NH₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,27 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂CH₂NH); 3,53 (kv., 2H, *J* = 6,4 Hz, CH₂CH₂NH); 6,61 (t, 1H, *J* = 5,9 Hz, CH₂CH₂NH); 6,70 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 6,95 (s, 2H, *J* = 6,3 Hz, NH₂); 7,55–8,12 (m, 6H, H-Ar); 13,06 (s, 1H, *J* = 8,7 Hz, CONH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 29,28 (CH₂CH₂NH); 42,24 (CH₂CH₂NH); 111,50; 127,91; 128,93; 129,21; 130,75; 131,01; 131,06; 132,97; 138,22; 151,36 (C-Ar) 162,43; 164,96 (C=N); 170,37 (CONH); **HRMS** (ESI) C₁₇H₁₇ClN₅O₃S₂ ([M+H⁺]) apskaičiuota 438,0461; nustatyta 438,0493.

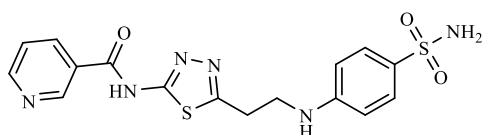
4-Chlor-N-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (8c)



Išiga 0,32 g (73 %). Lyd. t. 248–249 °C.

IR (KBr), ν , cm⁻¹: 1600 (C=N); 1659 (CONH); 3165; 3244 (ArNH + CONH); 3352; 3385 (NH₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,29 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂CH₂NH); 3,53 (kv., 2H, *J* = 6,4 Hz, CH₂CH₂NH); 6,61 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, CH₂CH₂NH); 6,71 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 6,95 (s, 2H, *J* = 6,3 Hz, NH₂); 7,54–8,13 (m, 6H, H-Ar); 13,07 (s, 1H, *J* = 8,8 Hz, CONH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 29,28 (CH₂CH₂NH); 42,24 (CH₂CH₂NH); 111,51; 127,92; 129,21; 130,76; 131,01; 131,60; 138,26; 151,36 (C-Ar); 162,48; 164,94 (C=N); 166,92 (CONH); **HRMS** (ESI) C₁₇H₁₇ClN₅O₃S₂ ([M+H⁺]) apskaičiuota 438,0461; nustatyta 438,0485.

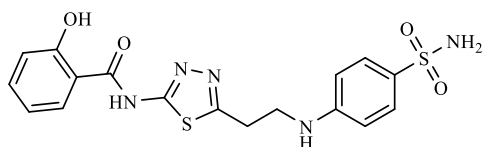
N-(5-{2-[(4-Sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)piridin-3-karboksiamidai (8d)



Išiga 0,25 (61 %). Lyd. t. 272–273 °C.

IR (KBr), ν , cm⁻¹: 1603 (C=N); 1665 (CONH); 3160; 3300 (ArNH + CONH); 3369 (NH₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,29 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz, CH₂CH₂NH); 3,53 (kv., 2H, *J* = 6,4 Hz, CH₂CH₂NH); 6,61 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, CH₂CH₂NH); 6,71 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 6,96 (s, 2H, *J* = 6,5 Hz, NH₂); 7,57–9,22 (m, 6H, H-Ar); 13,23 (s, 1H, *J* = 8,9 Hz, CONH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 29,29 (CH₂CH₂NH); 42,22 (CH₂CH₂NH); 111,52; 124,09; 127,92; 128,33; 131,02; 136,25; 136,53; 149,78; 151,36 (C-Ar); 153,60; 162,60 (C=N); 164,62 (CONH); **HRMS** (ESI) C₁₆H₁₇N₆O₃S₂ ([M+H⁺]) apskaičiuota 405,0804; nustatyta 405,0949.

2-Hidroksi-N-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (8e)



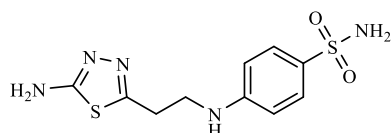
Išiga 0,26 g (63 %). Lyd. t. 252–253 °C.

IR (KBr), ν , cm⁻¹: 1602 (C=N); 1680 (CONH); 3029; 3066 (ArNH + CONH); 3266 (NH₂); **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,27 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, CH₂CH₂NH); 3,53 (kv., 2H, *J* = 6,3 Hz, CH₂CH₂NH); 6,60 (t, 1H, *J* = 5,9 Hz, CH₂CH₂NH); 6,71 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, H-Ar); 6,95 (s, 2H, *J* = 6,5 Hz, NH₂); 6,96–7,98 (m,

6H, H-Ar); 12,31 (s, 2H, CONH + OH); ^{13}C BMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 29,42 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42,09 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,54; 117,37; 117,66; 119,99; 127,92; 128,52; 130,84; 131,05; 135,06; 149,19 (C-Ar); 151,33; 158,48 (C=N); 162,12 (CONH); HRMS (ESI) $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) apskaičiuota 420,0800; nustatyta 420,0788.

4-{[2-(5-Sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino}benzensulfonamido (9) sintezė

Tiadiazolo darinio **8a** (0,20 g, 0,5 mmol) ir 10 ml 4 % vandeninio NaOH tirpalo mišinys virintas 24 val. Reakcijai pasibaigus, mišinys atvėsintas, iškritę kristalai filtruoti ir gryninti, perkristalizuojant juos iš 2-propanolio.



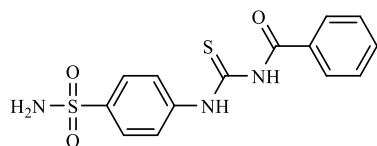
Išeiga 0,11 g (76 %). Lyd. t. 205–206 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1606 (C=N); 3154 (ArNH); 3354; 3376; 3434 (NH_2SO_2 , NH_2C); ^1H BMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,05 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,41 (kv., 2H, $J = 6,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,60 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,66 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-Ar); 6,94 (s, 2H, $J = 6,4$ Hz SO_2NH_2); 7,02 (s, 2H, $J = 6,8$ Hz, C-NH $_2$); 7,53 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ar). ^{13}C BMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 29,65 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 42,20 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,39; 127,88; 130,83; 151,40 (C-Ar); 156,20; 169,00 (C=N); HRMS (ESI) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$) apskaičiuota 300,0589; nustatyta 300,0583.

Bendras *N*-[(4-sulfamoilfenil)karbamotioil]benzamido darinių 11–16 gavimo būdas

Junginiai **11–13** susintetinti, pagal žinomą metodiką [58]. Gautų struktūrų IR, BMR spektriniai analizės duomenys, lydymosi temperatūros atitinka, nurodytas literatūroje. Remiantis tiokarbamidų **11–13** gavimo reakcijų sąlygomis [58], taip pat buvo susintetinti dariniai **14–16**, kaip pradinį junginį, panaudojant 4-amino-*N*-[2-piridil]benzensulfonamidą (**10**). Pirmame reakcijos etape, išdžiovintas kalio tiocianatas (0,11 g, 1,1 mmol) buvo paveiktas atitinkamu rūgšties halogenidu (1,0 mmol). Reakcija vykdyta acetone (30 ml), 4 val., kambario temperatūroje, inertinėje argono atmosferoje. Po reakcijos, į mišinį supiltas pasirinktas ir DMF (10 ml) ištirpintas sulfanilamidas (1,0 mmol), viskas virta 20–24 val. Procesui pasibaigus, mišinys skiestas 1 % HCl tirpalu (30 ml), gauti kristalai filtruoti, plauti vandeniu ir gryninti, perkristalizuojant juos iš 1,4-dioksano.

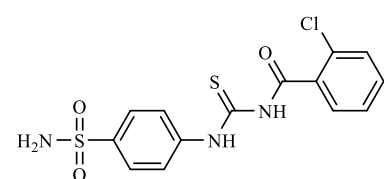
N-[(4-Sulfamoilfenil)karbamotioil]benzamidą (11)



CAS Registracijos numeris: 92166-72-8.

Išeiga 0,26 g (77 %). Nustatyta Lyd. t., 204–205°C. Literatūroje [58] pateikta Lyd. t., 205–207 °C.

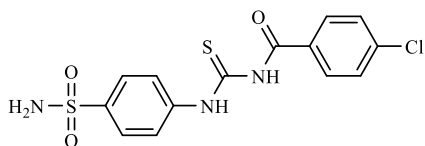
2-Chlor-*N*-[(4-sulfamoilfenil)karbamotioil]benzamidą (12)



CAS Registracijos numeris: 160788-25-0.

Išeiga 0,28 g (75 %). Nustatyta Lyd. t., 211–212 °C. Literatūroje [58] pateikta Lyd. t., 210–212 °C.

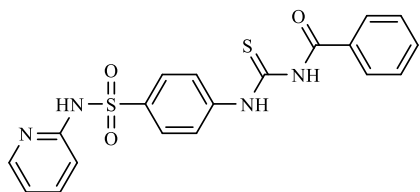
2-Chlor-*N*-[4-sulfamoilfenil]karbamotioil]benzamidaz (13)



CAS Registracijos numeris: 400872-39-1.

Išeiğa 0,27 g (73 %). Nustatyta Lyd. t., 210–211°C. Literatūroje [58] pateikta Lyd. t., 209–211 °C.

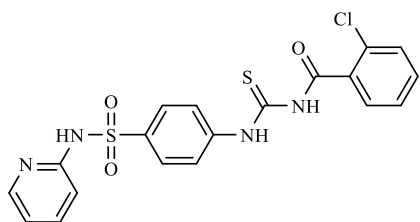
N-[4-(Piridin-2-ilsulfamoil)fenil]karbamioil]benzamidaz (14)



Išeiğa 0,32 g (78 %). Lyd. t. 239–240 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1671 (CONH); 3023; 3231; 3294 (CSNH + CONH + NHSO₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6,88–8,07 (m, 13H, H-Ar); 11,68 (s, 1H, $J = 6,9$ Hz, NHSO₂); 12,72 (s, 2H, CONH + CSNH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 114,53; 124,54; 127,63; 128,92; 129,20; 129,35; 129,73; 132,51; 133,68; 139,70; 141,25; 141,63; 153,79 (C-Ar); 168,62 (CONH); 179,69 (CSNH). **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, C₁₉H₁₆N₄O₃S₂, %: C 55,33; H 3,91; N 13,58. Nustatyta, %: C 55,63; H 4,06; N 13,88.

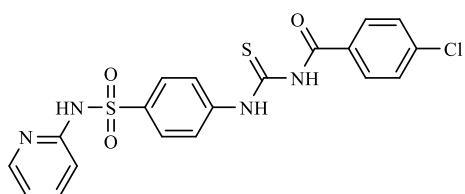
2-Chlor-*N*-[4-(piridin-2-ilsulfamoil)fenil]karbamioil]benzamidaz (15)



Išeiğa 0,36 g (81 %). Lyd. t. 245–246 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1694 (CONH); 3020; 3173; 3209 (CSNH + CONH + NHSO₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6,88–8,12 (m, 12H, H-Ar); 11,77 (s, 1H, $J = 7,0$ Hz, NHSO₂); 12,19 (s, 1H, $J = 6,8$ Hz CONH), 12,61 (s, 1H, $J = 7,4$ Hz, CSNH); **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 114,54; 115,65; 120,08; 124,56; 124,81; 127,63; 129,00; 131,18; 131,38; 138,54; 139,77; 141,26; 141,60; 142,68; 153,78 (C-Ar); 167,55 (CONH); 179,58 (CSNH). **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, C₁₉H₁₅ClN₄O₃S₂, %: C 51,06; H 3,38; N 12,54. Nustatyta, %: C 51,13; H 3,33; N 12,52.

4-Chlor-*N*-[4-(piridin-2-ilsulfamoil)fenil]karbamioil]benzamidaz (16)



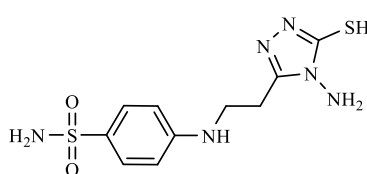
Išeiğa 0,36 g (80 %). Lyd. t. 246–247 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1694 (CONH); 3019; 3172; 3204 (CSNH + CONH + NHSO₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6,88–8,00 (m, 12H, H-Ar); 11,77 (s, 1H, $J = 7,0$ Hz, NHSO₂); 12,61 (s, 2H, CONH + CSNH). **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 114,54; 115,65; 124,56; 127,63; 129,01; 129,21; 131,18; 131,38; 131,61; 138,53; 141,22; 141,60; 153,78 (C-Ar); 167,55 (CONH); 179,58 (CSNH). **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, C₁₉H₁₅ClN₄O₃S₂, %: C 51,06; H 3,38; N 12,54. Nustatyta, %: C 51,11; H 3,24; N 12,37.

4-[[2-(4-Amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino}benzensulfonamido (18) gavimo būdas

Maltos kalio hidroksido granulės (6 mmol), ištirpintos metanolyje (50 ml). Į gautą šarminį tirpalą atsargiai sulašintas anglies disulfidas (0,11 g, 1,5 mmol). Mišinys maišytas kambario temperatūroje

40 min. Toliau į reakcijos indą subertas rūgštis hidrazidas **4** (0,26 g, 1 mmol), kolbos turinys maišytas dar 20 min kambario temperatūroje, po to 4 val. virintas. Po reakcijos, mišinys atvėsintas ir praskiestas dietilo eteriu. Gauti produkto kristalai nufiltruoti, papildomai praplaunant eteriu. Toliau gauti kristalai buvo veikiami hidrazino monohidratu (0,15 g, 3 mmol), 2-propanolio ir vandens mišinyje (1 : 1), virinant 24 val. Reakcijai pasibaigus, mišinys atvėsintas, parūgštintas ledine acto rūgštimi iki pH 6. Gauti produkto kristalai nufiltruoti, praplauti vandeniu ir perkristalizuoti iš 50 % acto rūgštis.



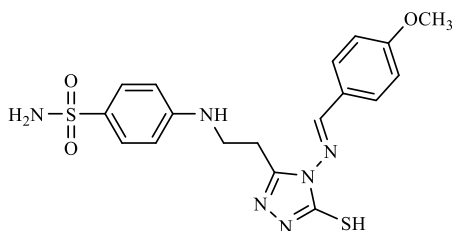
Išeiga 0,24 g (79 %). Lyd. t. 238–239 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1598 (C=N); 2853 (SH); 3158; 3274 (Ar-NH + N-NH₂); 3323; 3389 (NH₂SO₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,90 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH₂CH₂NH); 3,46 (kv., 2H, $J = 6,7$ Hz, CH₂CH₂NH); 5,58 (s, 2H, $J = 8,0$ Hz, N-NH₂); 6,50 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH₂CH₂NH); 6,67 (d, 2H $J = 8,4$ Hz, H-Ar); 6,93 (s, 2H, $J = 6,3$ Hz, NH₂SO₂); 7,53 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, H-Ar); 13,52 (s, 1H, $J = 9,5$ Hz, SH); **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 24,77 (CH₂CH₂NH); 41,48 (CH₂CH₂NH); 111,36; 127,88; 130,84; 150,76 (C-Ar); 151,35; 166,44 (C=N); **HRMS** (ESI) C₁₀H₁₅N₆O₂S₂ ([M+H⁺]) apskaičiuota 315,0698; nustatyta 315,0716.

Šifo bazių 19–24 sintezė

4-Amino-1,2,4-triazolas **18** (0,31 g, 1 mmol) ir atitinkamas benzkarbaldehidus (1,2 mmol) virinti 20 ml 1,4-dioksano ir DMF mišinyje (10 : 1), esant katalitiniui (1–2 lašai) druskos rūgštis kiekiui. Po 24 val. trukusio proceso, reakcijos tirpalas skiestas 50 ml vandeniniu 1 % K₂CO₃ tirpalu bei ekstrahuotas etilo acetatu. Organinė frakcija su ištirpusiu produktu nugarinta rotaciniu garintuvu iki sausumo ir skiesta 2-propanoliu. Gauti kristalai nufiltruoti, plauti vandeniu ir gryninti, perkristalizuojant juos iš 2-propanolio ir 1,4-dioksano mišinio (1 : 1).

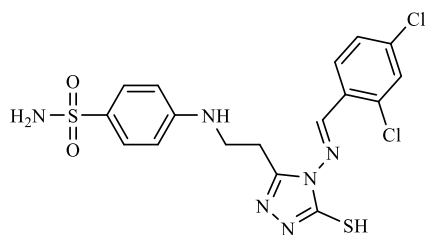
4-[(2-{4-[(*E*)-(4-Metoksibenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (**19**)



Išeiga 0,40 g (92 %). Lyd. t. 242–243 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1604 (C=N); 2752 (SH); 3127 (Ar-NH); 3241; 3312 (NH₂SO₂). **¹H BMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,98 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₂NH); 3,49 (kv., 2H, $J = 6,8$ Hz, CH₂CH₂NH); 3,87 (s, 3H, $J = 7,0$ Hz, OCH₃); 6,57 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, CH₂CH₂NH); 6,63 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ar); 6,93 (s, 2H, $J = 6,2$ Hz, NH₂); 7,12–7,84 (m, 8H, H-Ar); 9,77 (s, 1H, $J = 6,8$ Hz, N=CH); 13,79 (s, 1H, $J = 9,8$ Hz, SH); **¹³C BMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 24,97 (CH₂CH₂NH); 56,03 (OCH₃); 66,82 (CH₂CH₂NH); 111,25; 115,17; 124,95; 127,90; 130,84; 131,02; 149,67 (C-Ar) 151,25; 161,75 (C=N); 163,36 (N=CH); 164,31 (C-Ar). **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, C₁₈H₂₀N₆O₃S₂, %: C 49,99; H 4,66; N 19,43. Nustatyta, %: C 49,93; H 4,57; N 19,42.

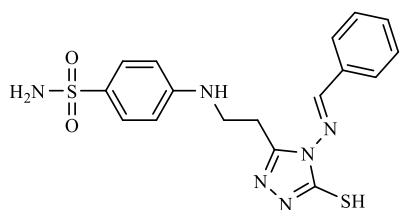
4-[(2-{4-[(*E*)-(2,4-Dichlorbenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (20)



Išėiga 0,42 g (89 %). Lyd. t. 204–205 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1601 (C=N); 2769 (SH); 3117 (Ar-NH); 3296; 3380 (NH_2SO_2). **^1H BMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,03 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,50 (kv., 2H, $J = 6,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,56 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,62 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-Ar); 6,92 (s, 2H, $J = 6,3$ Hz, NH_2); 7,77–8,17 (m, 5H, H-Ar); 10,16 (s, 1H, $J = 6,8$ Hz, N=CH); 13,90 (s, 1H, $J = 9,6$ Hz, SH); **^{13}C BMR** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24,94 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 66,82 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,24; 127,90; 128,63; 130,46; 130,87; 131,98; 132,67; 133,38; 135,53; 150,09 (C-Ar); 151,27; 160,34 (C=N); 161,82 (N=CH); **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$, %: C 43,32; H 3,42; N 17,83. Nustatyta, %: C 43,12; H 3,36; N 17,57.

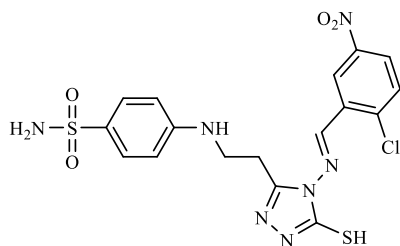
4-[(2-{4-[(*E*)-Benzilidenamino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (21)



Išėiga 0,36 g (89 %). Lyd. t. 184–185 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1597 (C=N); 2855 (SH); 3063 (Ar-NH); 3242; 3331 (NH_2SO_2). **^1H BMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,01 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,53 (kv., 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,45 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,69 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ar); 7,00 (s, 2H, $J = 6,1$ Hz, NH_2); 7,31–8,01 (m, 6H, H-Ar); 9,96 (s, 1H, $J = 6,9$ Hz, N=CH); 13,85 (s, 1H, $J = 9,7$ Hz, SH); **^{13}C BMR** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24,90 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 66,82 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,86; 128,99; 129,58; 130,19; 131,38; 132,85; 135,19; 149,82 (C-Ar) 153,02; 163,92 (C=N); 169,39 (N=CH); **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$, %: C 50,73; H 4,51; N 20,88. Nustatyta, %: C 50,83; H 4,33; N 20,59.

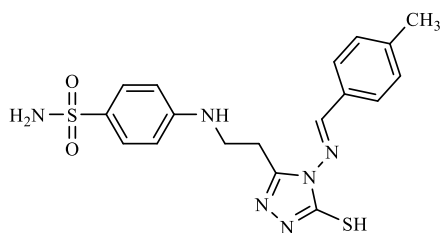
4-[(2-{4-[(*E*)-(2-Chlor-5-nitrobenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (22)



Išėiga 0,39 g (81 %). Lyd. t. 199–200 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1602 (C=N); 2853 (SH); 3162 (Ar-NH); 3317; 3248 (NH_2SO_2). **^1H BMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,06 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,50 (kv., 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,51 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,57 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-Ar); 6,90 (s, 2H, $J = 6,1$ Hz, NH_2); 7,47–8,86 (m, 5H, H-Ar); 10,88 (s, 1H, $J = 6,8$ Hz, N=CH); 14,01 (s, 1H, $J = 9,8$ Hz, SH); **^{13}C BMR** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24,87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 66,56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,16; 127,84; 128,12; 130,74; 134,29; 135,32; 140,04; 148,36; 151,75 (C-Ar); 154,88; 156,95 (C=N); 161,49 (N=CH); **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClN}_7\text{O}_4\text{S}_2$, %: C 42,37 H 3,35; N 20,35. Nustatyta, %: C 42,16; H 3,38; N 20,15.

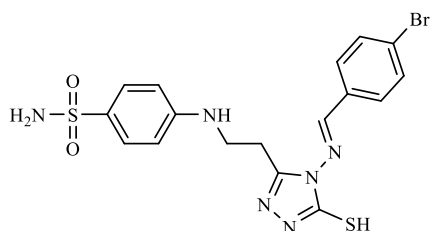
4-[(2-{4-[(*E*)-(4-Metilbenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (23)



Išėiga 0,35 g (84 %). Lyd. t. 238–239 °C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1603 (C=N); 2735 (SH); 3129 (Ar-NH); 3308; 3378 (NH_2SO_2). **^1H BMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2,41 (s, 3H, $J = 5,9$ Hz, CH_3); 2,99 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,49 (kv., 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,57 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,62 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-Ar); 6,92 (s, 2H, $J = 6,2$ Hz, NH_2); 7,38–7,80 (m, 6H, H-Ar); 9,91 (s, 1H, $J = 6,8$ Hz, N=CH); 13,82 (s, 1H, $J = 9,7$ Hz, SH); **^{13}C BMR** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 21,77 (CH_3); 25,01 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 66,96 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,24; 127,89; 129,03; 129,88; 130,27; 130,85; 143,54; 149,77 (C-Ar); 151,25; 161,77 (C=N); 164,13 (N=CH); **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$, %: C 51,91; H 4,84; N 20,18. Nustatyta, %: C 51,64; H 4,78; N 19,82.

4-[(2-{4-[(*E*)-(4-Brombenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (24)



Išėiga 0,38 g (80 %). Lyd. t. 251–252°C

IR (KBr), ν , cm^{-1} : 1600 (C=N); 2742 (SH); 3124 (Ar-NH); 3316; 3399 (NH_2SO_2). **^1H BMR** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3,01 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,50 (kv., 2H, $J = 6,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,56 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 6,63 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-Ar); 6,93 (s, 2H, $J = 6,3$ Hz, NH_2); 7,50–7,80 (m, 6H, H-Ar); 10,07 (s, 1H, $J = 6,9$ Hz, N=CH); 13,87 (s, 1H, $J = 9,7$ Hz, SH); **^{13}C BMR** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 24,93 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 66,38 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 111,26; 126,80; 127,89; 130,75; 130,87; 131,86; 132,77; 149,96 (C-Ar); 151,27; 161,77 (C=N); 162,27 (N=CH); **Elementinė sudėtis** apskaičiuota, $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{BrN}_6\text{O}_2\text{S}_2$, %: C 42,42; H 3,56; N 17,46. Nustatyta, %: C 42,17; H 3,37; N 17,26.

2.3. In silico analizė

2.3.1. Susintetintų junginių 4–24 farmakokinetinių savybių prognozė

Projekto metu susintetintų junginių 4–24 farmakokinetiniai parametrai buvo sugeneruoti „ADMETlab 2.0“ žiniatinklio įrankiu, kuris yra tinkamas vartoti tyrimų ir akademiniais tikslais [59]. Serveris suteikia vartotojui prieigą prie išsamaus, tikslaus ADMET profilių numatymo, įvertinant gerą absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą ir ekskreciją apibūdinančius parametrus. Iš viso „ADMETlab 2.0“ įrankiu galima sugeneruoti 82 skirtingus parametrus, kurių skaičiavimo algoritmas grindžiamas QSAR modeliais. „ADMETlab 2.0“ platformos sugeneruoti duomenys randami recenzuojamose publikacijose [60, 61], kurios talpinamos į tokias duomenų bazes, kaip *ChEMBL*, *PubChem*, *OCHEM*, užtikrinančiomis įrankio pateikiamų rezultatų patikimumą.

Projekto metu, susintetintiems dariniams 4–24 buvo sugeneruoti pagrindiniai fizikocheminiai parametrai, kurie apibūdina galimybę, vartoti juos enteraliniu būdu, kaip geriamuosius vaistinius preparatus. Priimtinumai įvertinti pagal „Lipinski'o taisyklę“:

- molekulinė masė, Da (< 500 Da);
- vandenilinių ryšių donorų skaičius, vnt. (< 5);

- vandenilinių ryšių akceptorių skaičius, vnt. (< 10);
- laisvai besisukančių cheminių ryšių skaičius, vnt. (< 10);
- lipofiliškumas $\log P$ (< 5).

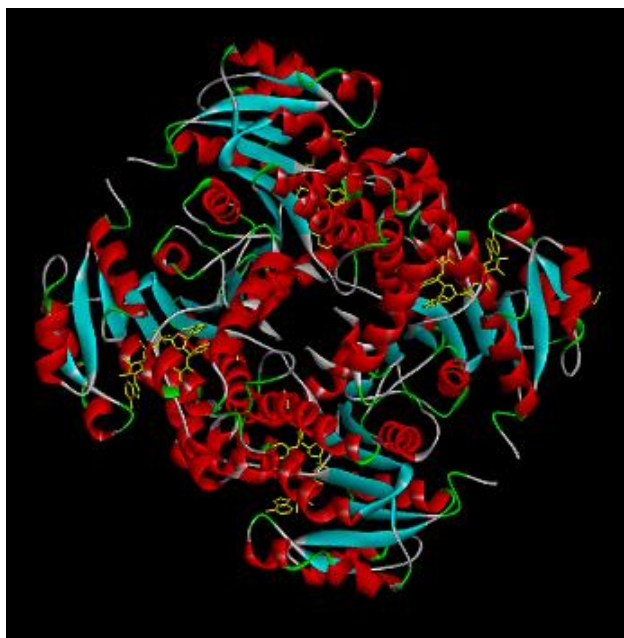
Taip pat junginiams **4–24** nustatyta absorbcija virškinamajame trakte HIA, hematoencefalinio barjero pralaidumas BBBP, giminingumas P-gp baltymui ir inhibitorinė įtaka CYP3A4 fermentui. Šie farmakokinetiniai parametrai buvo pateikti „*ADMETlab 2.0*“ platformoje sugeneruotomis kiekybinėmis atitikčių vertėmis, intervale 0–1. Šios skaitinės reikšmės gali būti traktuojamos, kaip atvirkštinės tikimybės: kuo vertė mažesnė, tuo tiriamo parametro rezultatas yra labiau priimtinas. Remiantis šiuo „*ADMETlab 2.0*“ įrankio algoritmu, visos sugeneruotos vertės skirstomos į tris grupes:

- didžiausia tikimybė, kai atitikties vertė yra intervale nuo 0 iki 0,3;
- tikimybė atitikti parametras yra vidutinė, kai rezultato reikšmė kinta nuo 0,3 iki 0,7;
- tikimybė yra nedidelė, kai tiriamo parametro atitikties vertė viršija 0,7.

2.3.2. Molekulinis modeliavimas

Baigiamojo projekto metu susintetintų darinių **4–24** poveikiui mikobakterijose įvertinti pasirinkta oksireduktazė InhA, o tyrimui atlikti panaudota „*AutoDockTools 1.5.7*“ programos versija. „*AutoDock*“ įrankiu galima sugeneruoti ligando konformacijų prognozes, atlikti modeliavimą, nežinant tikslios baltymo aktyviojo centro vietos, o sistemos pateikiamų rezultatų patikimumą įrodo duomenų bazėse randamų, su šia programa susijusių publikacijų gausa [62].

Modeliavimui skirtas taikynys InhA parsijustas iš Baltymų Duomenų Banko (angl., *Protein Data Bank*), su validuotu tarptautiniu kodu „2x23“ (žr. 2.1 pav.).



2.1 pav. „*Discovery Studio 2021*“ programos pateikiama, „2x23“ baltymo 3D struktūra

„2x23“ – tai *Mycobacterium tuberculosis* bakterijose aptinkamos oksireduktazės InhA kristalinė struktūra, slopinama PT70 substrato [63]. Remiantis natyvinio ligando PT70 išsidėstymu InhA struktūroje, yra nustatyta šio fermento aktyviojo centro vieta [64], pagal kurią gali būti atliekamas

molekulinis modeliavimas. Ši taikinio-ligando sritis apibrėžiama koordinatėmis: x (-20,088), y (-4,456), z (2,202).

Projekto metu, molekulinio modeliavimas atliktas, pagal šiuos, pagrindinius etapus:

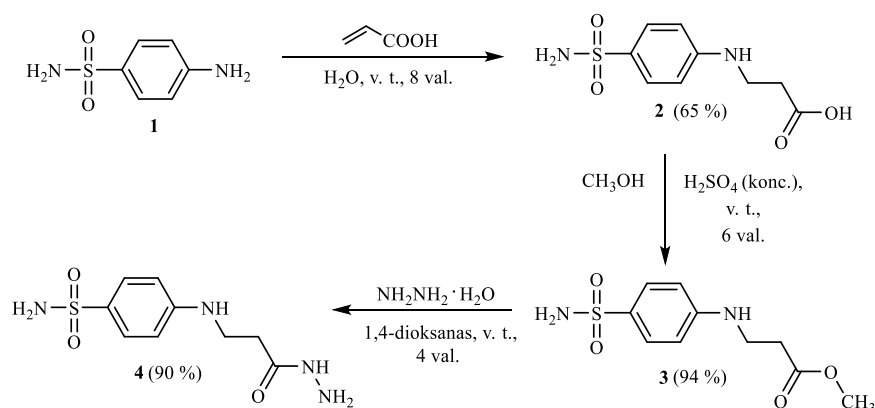
- tiriamų junginių **4–24** ir standartinių komercinių preparatų – izoniazido ir etionamido – trimatės struktūros, iš anksto buvo paruoštos „Chem3D“ programoje, optimizuojant jas iki erdvinės energijos minimumo;
- „AutoDockTools 1.5.7“ programoje baltymui InhA pašalintos erdvėje esančios vandens molekulės (Edit>Delete Water) ir pridėti poliniai vandenilio atomai (Edit > Hydrogens>Polar Only);
- taikiniui ir tiriamiems ligandams **4–24** suteikti krūviai (Edit>Charges);
- „AutoDockTools 1.5.7“ programoje užfiksuotos žinomos baltymo InhA koordinatės – x (-20,088), y (-4,456), z (2,202), (Grid > GridBox> Set the BOX);
- sistemoje paleista modeliavimo užduotis (Run > Run AutoDock);
- atlikta gautų rezultatų analizė (Analyze > Docking > Open).

Molekulinis modeliavimo metu, „AutoDockTools 1.5.7“ programoje sugeneruotos tiriamų darinių **4–24** jungimosi prie taikinio aktyviojo centro energijos vertės, įvertintos sąveikos sritys, susidarančių vandenilinių ryšių kiekis ir sąveikaujantys aminorūgščių likučiai. Didžiausio, nustatyto giminingumo dariniai, buvo apdoroti „Discovery Studio 2021“ programa, skirta taikinio-ligando sąveikos vizualizacijai atlikti. Šiuo programiniu įrankiu buvo sugeneruoti 2D ir 3D sąveikos modeliai, kuriuose matomi „AutoDockTools 1.5.7“ programos nustatyti, taikininio ir ligando sudaromi ryšiai, sąveikos atstumų vertės.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. 4-[(3-Hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido (4) sintezė

Remiantis baigiamojo bakalauro studijų projekto „3-[(4-Sulfamoilfenil)amino]propano rūgšties kondensacijos reakcijos, gautų produktų antibakteriniai ir antioksidaciniai tyrimai“ rezultatais, nuspręsta, tęsti tyrimus su sulfanilamidų tipo junginiais. Baigiamajam magistro projektui pasirinktas tapatus hidrazidas **4**, susintetintas pagal žinomą metodiką [57], vykstant 3 etapų sintezei (žr. 3.1 schemą).



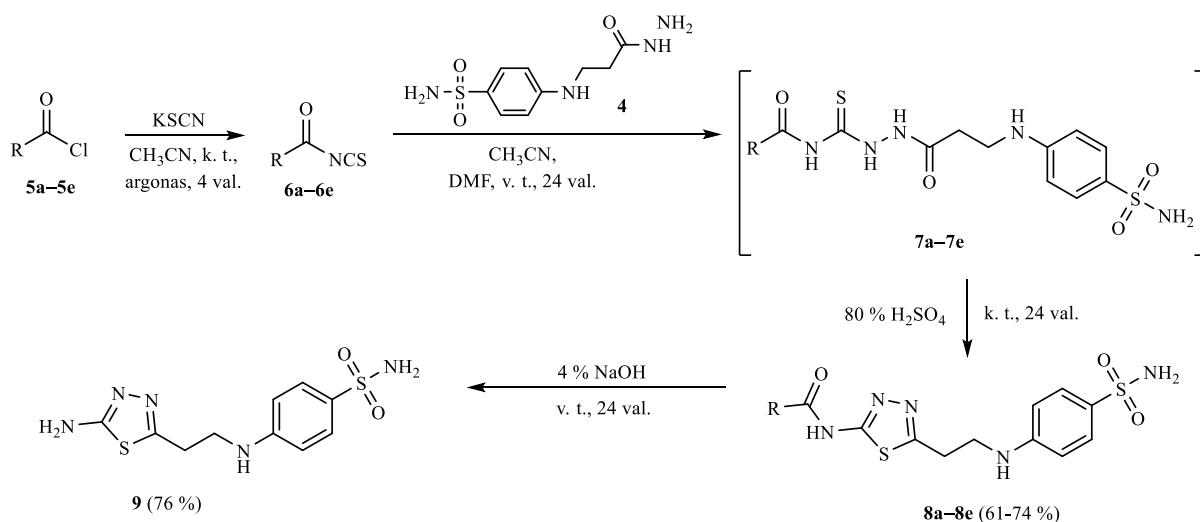
3.1 schema. 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido (**4**) sintezė

Pirmame etape, reakciją vykdant vandenyje, 4-aminosulfanilamidą **1** paveikus akrilo rūgštimi gauta 3-[(4-sulfamoilfenil)amino]propano rūgštis (**2**), kuri buvo panaudota Fišerio esterifikacijos reakcijai metanoliumi (žr. 3.1 schemą). Toliau esterį **3** paveikus hidrazino monohidratu 1,4-dioksane, po 4 val. trukusios reakcijos gautas rūgšties hidrazidas **4**. Struktūrų **2–4** susidarymą patvirtina ^1H ir ^{13}C BMR, IR spektroskopijos, elementinės analizės duomenys, o junginių lydymosi temperatūros atitinka, nurodytas mokslinėje literatūroje [57].

3.2. Tioseмикarbazidų tipo darinių sintezė

Remiantis literatūros apžvalga, tiosemikarbazidų tipo dariniai, sudėtyje turintys chloro atomą [34, 35, 36] rodo gerą aktyvumą prieš *Mycobacterium tuberculosis* patogenus, o piridino fragmentas randamas tokiuose komerciniuose preparatuose, kaip izoniazidas ir etionamidas. Remiantis šia informacija, projektu metu nuspręsta susintetinti tiosemikarbazidų tipo darinius, panaudojant antibakterinomis savybėmis pasižyminčių, aromatinių rūgščių halogenidus – benzoilchloridą, 2-chlorbenzoilchloridą, 4-chlorbenzoilchloridą, nikotinoilo chloridą. Taip pat atsižvelgiant į 4-aminosalicilo rūgšties veikmingumą, gydant tuberkuliozę [65], numatyta susintetinti tiosemikarbazidą, turintį salicilo rūgšties fragmentą. Šiam tikslui buvo panaudotas 2-hidroksibenzoilchloridas.

Pirmojo tiosemikarbazidų gavimo etapo metu (žr. 3.2 schemą), minėti rūgščių halogenidai **5a–5e** buvo paveikti kalio tiocianatu, reakciją vykdant acetonitrile, inertinėje argono atmosferoje. Remiantis mokslinės literatūros duomenimis [66], tiosemikarbazidų tipo darinius, gera išeiga galima gauti, vykdant izotiocianatų prijungimo reakcijas su rūgščių hidrazidais. Tad susintetinti pirmo etapo dariniai **6a–6e**, be papildomo gryninimo, buvo paveikti 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamidu (**4**), tiksliniams produktams gauti **7a–7e** (žr. 3.2 schemą, 3.1 lentelę).

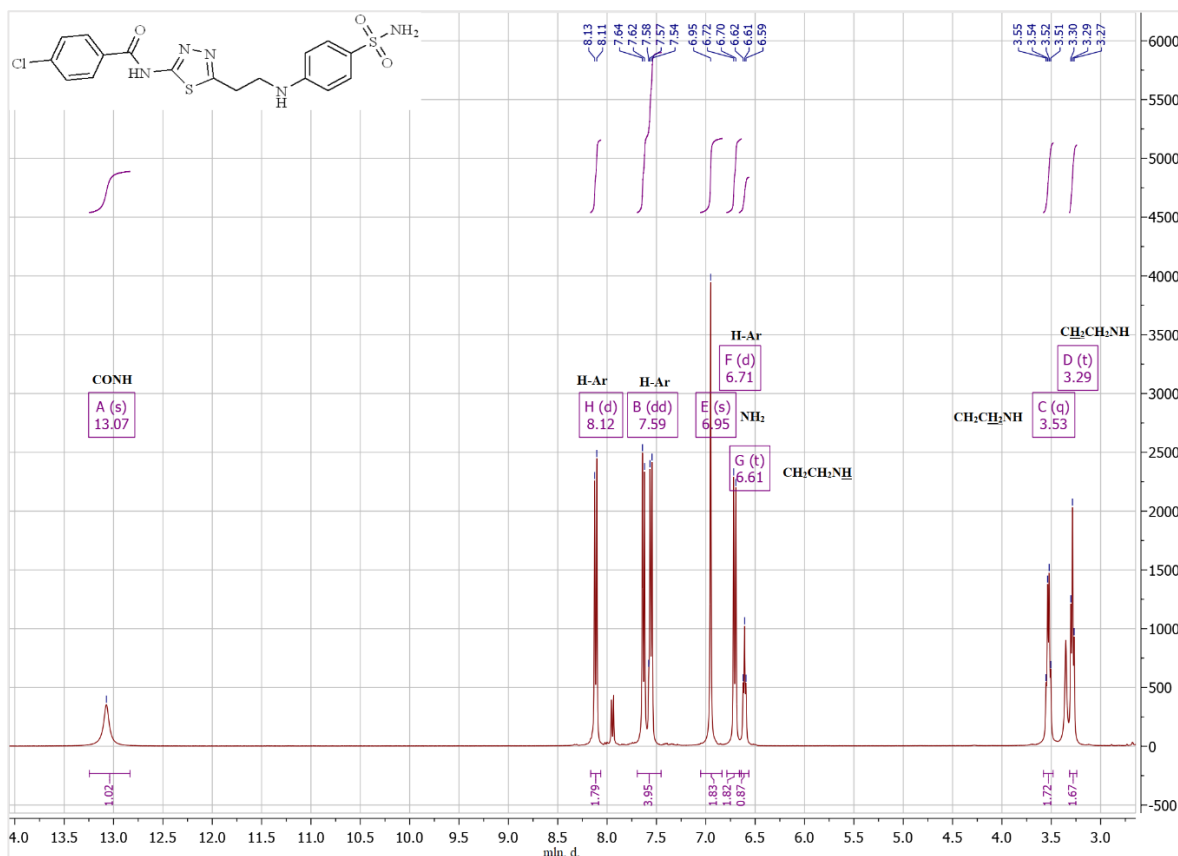


3.2 schema. Tiadiazolų **8a–8e** sintezės reakcijos ir hidrolizė šarminėje aplinkoje. Pakaitai *R* pateikti 3.1 lentelėje (žr. 3.1 lentelę).

3.1 lentelė. Tiadiazolo dariniai **8a–8e**, reakcijų išeią

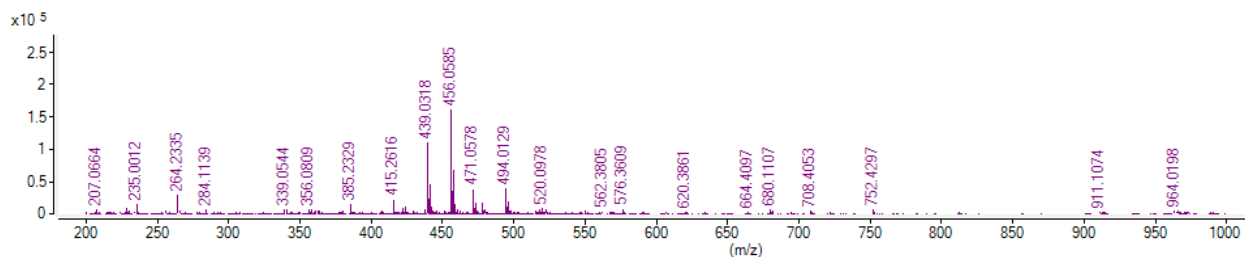
Junginio Nr.	8a	8b	8c	8d	8e
R =					
Išeią, %	72	74	73	61	63

Ištirus gautus darinius **7a–7e** BMR spektrinės analizės metodu, pastebėta, kad ^1H spektruose, nėra visų reikalingų NH fragmentus atitinkančių protonų signalų. Pavyzdžiui, tiosemikarbazido **7c** (žr. 3.1 pav.) ^1H BMR spektre stebimi signalai, ties 6,61 ir 6,95 mln. d., atitinkamai priskirti grupių NH-Ar ir NH_2SO_2 protonams. Taip pat nustatytas singletas ties 13,07 mln. d. atitinkantis CONH fragmentą (žr. 3.1 pav.). Išanalizavus tariamo tiosemikarbazido **7c** ^{13}C BMR spektrą, užfiksuotas tik vienas signalas, atitinkantis C=O fragmentą, ties 166,92 mln. d., nors struktūroje turėtų būti du tokio tipo anglies atomai. Taip pat neaptikta C=S ryšį apibūdinanti smailė, todėl struktūros įrodymui panaudota masių spektrometrijos analizė.



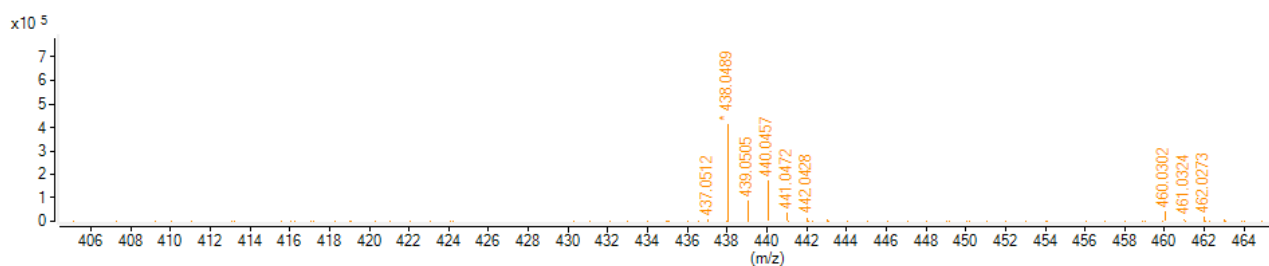
3.1 pav. Tioseмикarbazido **7c** tariamas ¹H BMR spektras

Atlikus tiosemikarbazido **7c** sintezės metu gautų kristalų masių spektrometrinius tyrimus, nustatyta, kad be pagrindinio produkto **7c**, šios reakcijos metu susidarė ir tiadiazolas **8c**, o jį atitinkantis protonizuoto molekulinio jono signalas stebimas ties 439,0318 m/z (žr. 3.2 pav.). Šiuo atveju, tiosemikarbazidą **7c** atitinkantis signalas – 456,0585 m/z (žr. 3.2 pav.). Vadinasi, sintezės metu susidaro aciklinio tiosemikarbazido **7c** ir tiadiazolo **8c** mišinys.



3.2 pav. Tioseмикarbazido **7c** ir tiadiazolo **8c** mišinio susidarymą įrodantis MS analizės spektras

Dėl sudėtingo chromatografinio tiosemikarbazidų ir tiadiazolų skirstymo, įvykdyta gautų produktų **7a–7e** ciklizacija, galutinai paverčiant turimus aciklinius junginius **7a–7e** į tiadiazolus **8a–8e** (žr. 3.1 schemą). Reakcijoms atlikti panaudota 80 % sieros rūgštis, o pats procesas vykdytas kambario temperatūroje, 24 val. Gautų tiadiazolų **8a–8e** susidarymą įrodo masių spektrometriniai duomenys, kuriuose neaptikti junginių **7a–7e** molekulinio jono signalai. Štai tiadiazolo **8c** masių spektre (žr. 3.3 pav.), po ciklizacijos proceso, neaptiktas aciklinį tiosemikarbazidą **7c** atitinkantis molekulinio jono signalas. Šiuo atveju, stebima tik viena, darinį **8c** atitinkanti smailė, kurios m/z vertė lygi 438,0489.



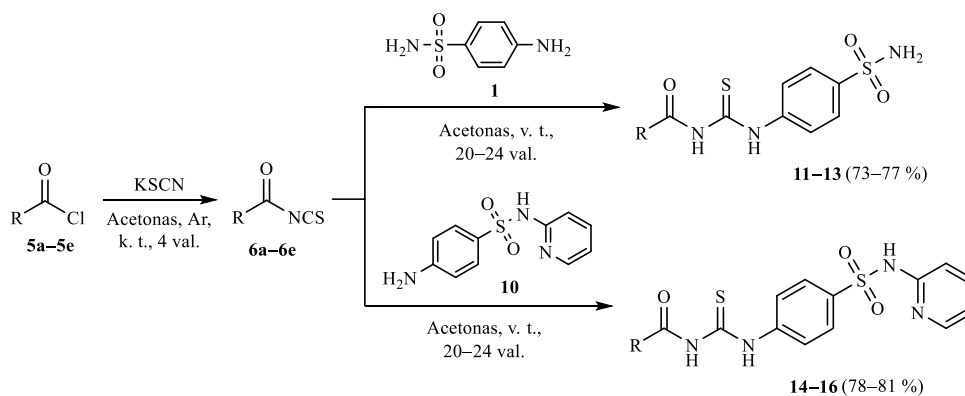
3.3 pav. Tiadiazolo **8c** susidarymą įrodantis MS analizės spektras

Pastebėta, kad 3.3 paveiksle (žr. 3.3 pav.) junginio **8c** molekulinio jono signalas lygus 439,0318 m/z, o 3.4 iliustracijoje (žr. 3.4 pav.) pateiktame spektre – 438,0489 m/z. Skirtingą to pačio darinio molekulinio jono susidarymą lemia halogeno, šiuo atveju chloro, izotopinis pasiskirstymas. Kadangi gamtoje vyraujančių Cl izotopų – ^{35}Cl ir ^{37}Cl – atominės masės yra skirtingos, kiekvieno jų masės dalis tiriamajame junginyje lems skirtingas susidarancio protonizuoto molekulinio jono vertes.

Projekto metu, hidrolizuojant tiadiazolą **8a** 4 % vandeniniame NaOH tirpale (žr. 3.1 schemą), gautas laisvą NH_2 funkcinę grupę turintis darinys **9**, kurio struktūrą įrodo ^1H BMR spektre stebimas singletas ties 7,02 mln. d., priskiriamas amino grupės protonamas, ir sumažėjęs aromatinę sistemą apibūdinančių signalų kiekis. Junginio **9** suformavimą taip pat įrodo ^{13}C BMR spektras, kuriame neaptiktas amidinio ryšio CONH anglies atomo signalas, ties 165,78 mln. d. Taip pat darinio **9** IR spektre pastebėtas sugerties linijos maksimumas, ties 3434,24 cm^{-1} , apibūdinantis minėtą NH_2 funkcinę grupę, o masių spektre stebimas junginį **9** atitinkančio protonizuoto molekulinio jono signalas 300,0583 m/z.

3.3. Sulfanilamido fragmentą turinčių tiokarbamido darinių **11–16** sintezė

Baigiamojo studijų projekto metu buvo nuspręsta susintetinti tiokarbamidų tipo darinius, potencialiai galinčius veikti prieš mikobakterijas (žr. 3.3 schemą). Kadangi junginiai **11–13** yra žinomi, tačiau nebuvo tirti *in vitro* ir *in silico* prieš *Mycobacterium* genties patogenus, jie buvo susintetinti, pagal publikacijoje [58] pateiktą metodiką. Literatūros duomenimis [67], 4-amino-*N*-[2-piridil]benzensulfonamido (**10**) fragmentą turintys junginiai, efektyviai slopina *Mycobacterium tuberculosis* patogenus. Tad bioprieinamumui palyginti, projekto metu taip pat susintetinti tiokarbamido dariniai **14–16** (žr. 3.3 schemą).



3.3 schema. Sulfanilamido fragmentą turinčių tiokarbamido darinių **11–16** sintezės mechanizmas. Pakaitai R pateikti 3.2 lentelėje (žr. 3.2 lentelę)

3.2 lentelė. Tiokarbamidų dariniai **11–16**, sintezės trukmė ir reakcijų išeiga

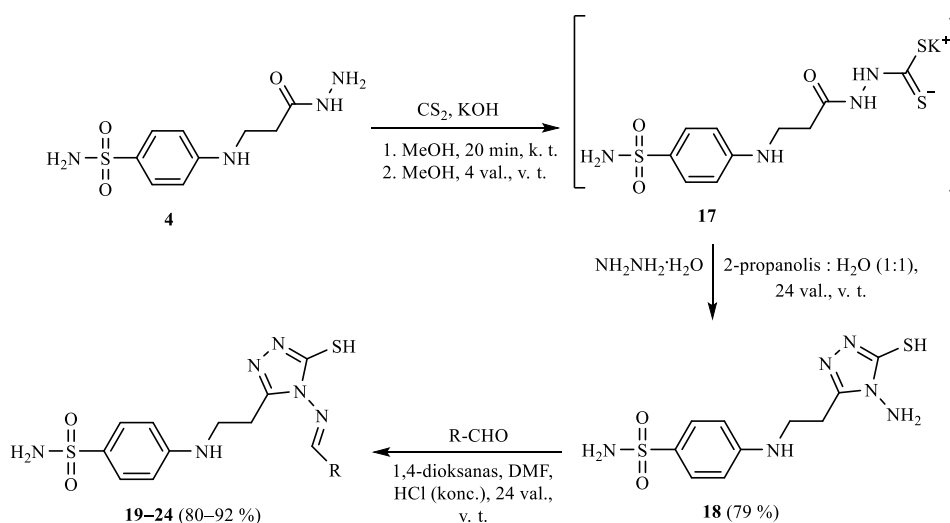
Junginio Nr.	11	12	13	14	15	16
R =						
Išeiga, %	77	75	73	78	81	80
Reakcijos trukmė, val.	20	24	22	21	23	22

Tiokarbamidų dariniai **11–16** susintetinti iš atitinkamų aromatinių rūgščių halogenidų **5a–5e**, vykdant vienapakopį procesą (žr. 3.3 schemą). Pirmojo etapo metu, rūgščių halogenidai **5a–5e** buvo veikiami kalio tiocianatu. Toliau, be papildomo tarpinių produktų išskyrimo, vykdytos izotiociantų **6a–6e** ir pasirinktų sulfanilamidų prijungimo reakcijos, kurių metu gera 73–81 % išeiga gauti tiokarbamido dariniai **11–16**.

Darinių **11–16** susidarymą įrodo ^1H , ^{13}C BMR, IR spektriniai analizės duomenys. Štai junginio **15** protoniniame BMR spektre stebimi du singletai, ties 12,19 ir 12,61 mln. d., atitinkamai priskiriami CONH ir CSNH ryšių protonams. ^{13}C BMR spektre, taip pat randami struktūrą **15** įrodantys C=O ir C=S funkcinių grupių signalai, atitinkamai esantys ties 167,55 ir 179,58 mln. d. IR spektre matomi NH grupėms priskiriami sugerties linijos maksimumai, atitinkamai esantys ties 3019,95, 3172,90 ir 3208,79 cm^{-1} , įrodantys tiokarbamido darinio **15** susidarymą. Analogiški signalai stebimi ir kitų tiokarbamido darinių **11–16** ^1H , ^{13}C BMR, IR spektruose.

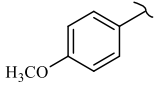
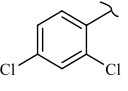

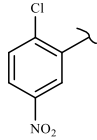
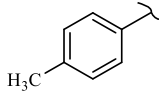
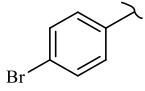
3.4. Šifo bazių 19–24 sintezė

Atsižvelgiant į literatūros apžvalgoje minėtų ciklinių junginių antimikobakterinį aktyvumą (žr. 1.4 poskyrį), projekto metu buvo nuspręsta susintetinti 4-[[2-(4-amino-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidą (**18**), kaip pradinį junginį Šifo bazėms **19–24** gauti (žr. 3.4 schemą, 3.3 lentelę). Darinio **18** sintezė vykdyta per tarpinį kalio ditiokarbazato darinį **17**, kuris gautas 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamidą (**4**) veikiant anglies disulfidu metanoliniame kalio šarmo tirpale (žr. 3.4 schemą). Toliau gautą kalio ditiokarbazatą **17** paveikus hidrazino monohidratu 2-propanolio ir vandens mišinyje (1 : 1), gera 79 % išeiga susintetintas 4-amino-1,2,4-triazolas **18**.



3.4 schema. Sulfanilamido fragmentą turinčių Šifo bazių **19–24** sintezė. Pakaitai *R* pateikti 3.3 lentelėje (žr. 3.3 lentelę)

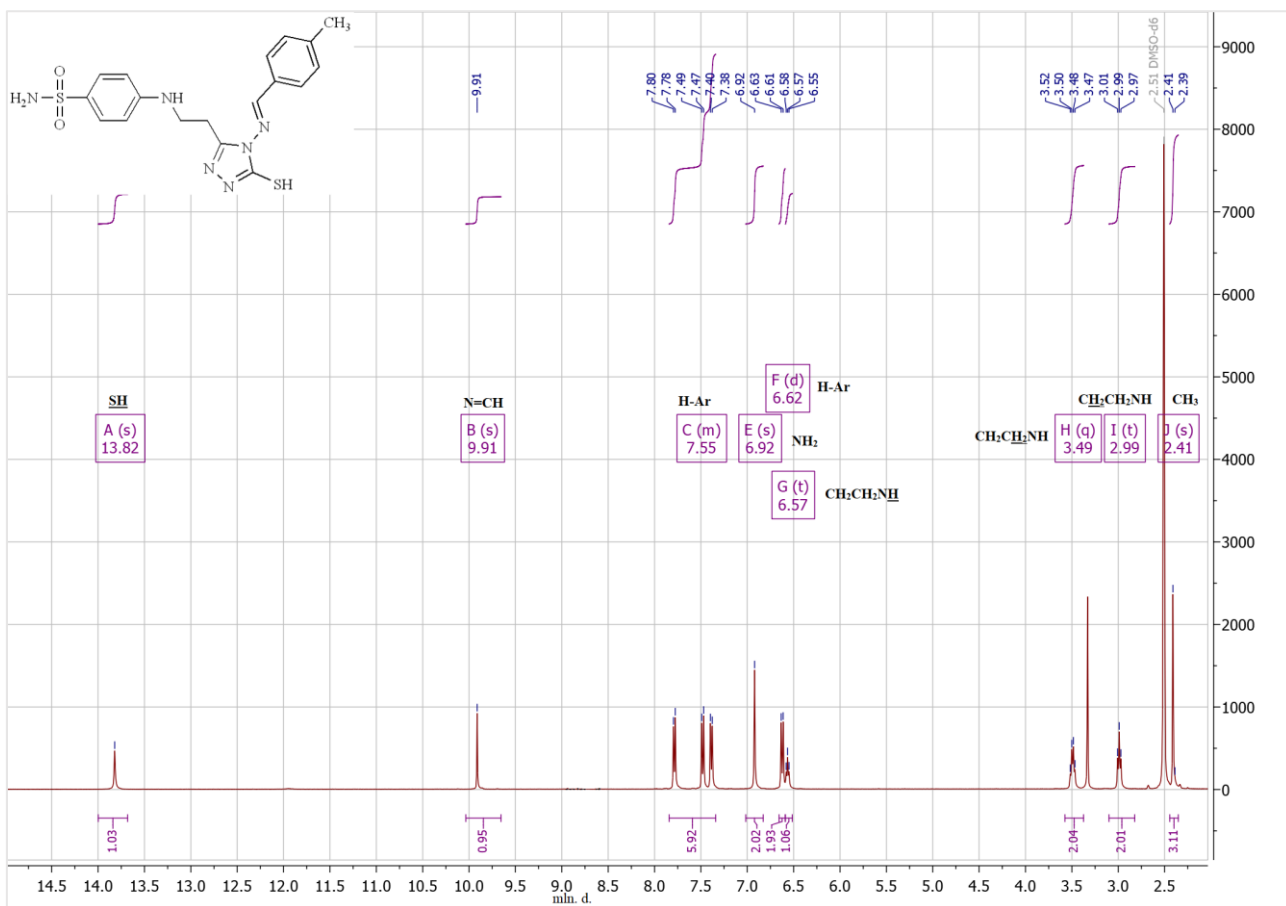
3.3 lentelė. Sintezės produktai **19–24**, reakcijų išeigos

Junginio Nr.	19	20	21	22	23	24
R =						
Išeiga, %	92	89	89	81	84	80

Darinio **18** gavimą įrodo BMR ir IR spektriniai analizės duomenys. ^1H BMR spektre stebima N-NH₂ ryšio protonus apibūdinanti smailė, ties 5,58 mln. d., o ^{13}C BMR spektre stebimi dviejų C=N grupių anglies atomų signalai, ties 151,35; 166,44 mln. d., kurie įrodo 4-amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazolo fragmento susiformavimą molekulėje **18**. Tiolinės grupės (SH) signalas stebimas IR spektre, kuriame užfiksuotas sugerties linijos maksimumas ties 2852,74 cm⁻¹, o masių spektroskopijos analizės metu nustatytas 4-amino-1,2,4-triazolą **18** atitinkantis molekulinio jono 315,0716 m/z signalas.

Norint įvertinti pakaitų įtaką biologiniam aktyvumui ir bioprieinamumui, atliktos 4-amino-1,2,4-triazolo **18** kondensacijos reakcijos, su įvairiais benzkarbaldehidais, 1,4-dioksano ir DMF mišinyje (žr. 3.4 schemą). Stebint proceso eigą plonasluoksnės chromatografijos būdu, pastebėta, kad reakcijos vyksta lėtai, todėl buvo panaudotas katalitinis koncentruotos druskos rūgšties kiekis.

Gautų produktų **19–24** (žr. 3.4 schemą, 3.3 lentelę) struktūras įrodo spektriniai analizės duomenys. Pavyzdžiui, anilo **19** ^1H BMR spektre randamas signalas, apibūdinantis N=CH ryšio egzistavimą, esantis tolimojoje spektro dalyje, ties 9,77 mln. d. Žinoma [68], kad junginiai turintys dvigubųjų ryšių dažnai sudaro izomerų mišinius, o N=CH jungtis lemia galimą geometrinių izomerų – *E/Z* – susidarymą. Junginių **19–24** ^1H BMR analizės metu nebuvo pastebėta izomerams būdingo smailių pasidalinimo. Pavyzdžiui, Šifo bazės **23** spektre ^1H BMR stebimas vienas, N=CH ryšį apibūdinantis signalas, randamas ties 9,91 mln. d. (žr. 3.4 pav.).



3.4 pav. Šifo bazės **23** ^1H BMR spektras

Kadangi ^1H BMR spektrinės analizės metu nebuvo pastebėta izomerams būdingo smailių pasidalinimo (žr. 3.4 pav.), o remiantis mokslinė literatūra [68], dažniausiai sudaro *E* izoforma, sudaranti 80–90 % tikslinio produkto. Tad šiame darbe susintetinto junginio **23** spektrinius duomenis palyginus su aprašytais literatūroje, galima daryti prielaidą, kad susidarė *E* izomeras.

3.5. *In silico* analizės rezultatai

3.5.1. Sulfanilamido fragmentą turinčių darinių 4–24 farmakokinetinių savybių tyrimo rezultatai.

Baigiamojo studijų projekto metu, susintetintiems dariniams 4–24 įvertintos farmakokinetinės savybės, panaudojant „ADMETlab 2.0“ žiniatinklio įrankį. Junginių vartojimo enteraliniu būdu priimtumas įvertintas „Lipinski'o taisykle“ (žr. 2.3.1 skyrių), o tyrimo rezultatai pateikti 3.4 lentelėje (žr. 3.4 lentelę).

3.4 lentelė. Darinių 4–24 priimtumo įvertinimas, remiantis „Lipinski'o taisykle“

Junginio Nr.	Molekulinė masė, Da	HD, vnt.	HA, vnt.	RB, vnt.	Lipofiliškumas logP	„Lipinski'o taisyklės“ patvirtinimas, Taip/Ne
4	258,08	6	7	6	-0,888	Taip
8a	403,08	4	8	7	2,005	Taip
8b	437,04	4	8	7	2,313	Taip

3.4 lentelės tęsinys kitame puslapyje

3.4 lentelės tęsinys

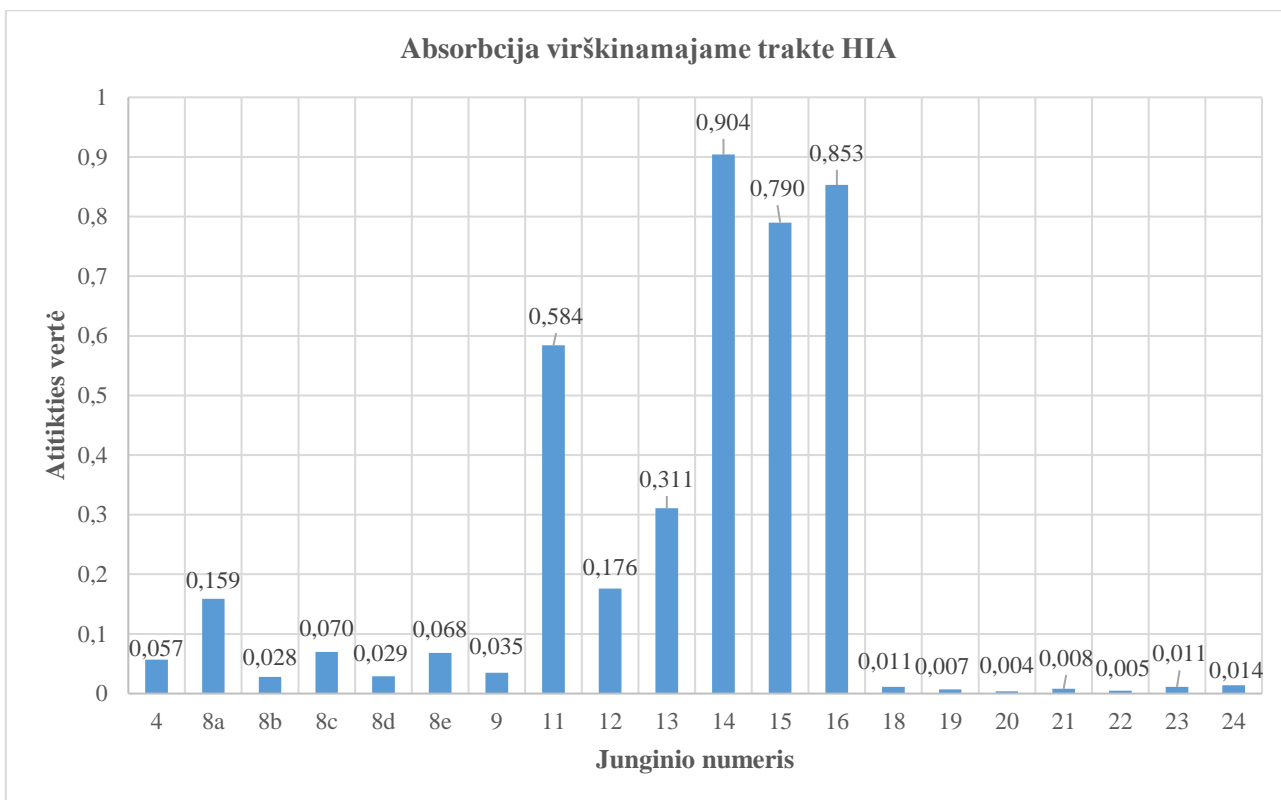
8c	437,04	4	8	7	2,680	Taip
8d	404,07	4	9	7	1,127	Taip
8e	419,07	5	9	7	2,262	Taip
9	299,05	5	7	5	0,254	Taip
11	335,04	4	6	6	1,824	Taip
12	369,00	4	6	6	2,173	Taip
13	369,00	4	6	6	2,657	Taip
14	412,07	3	7	7	2,605	Taip
15	446,03	3	7	7	2,942	Taip
16	446,03	3	7	7	3,383	Taip
18	314,06	6	8	5	0,231	Taip
19	432,10	4	9	8	2,490	Taip
20	470,02	4	8	7	3,609	Taip
21	402,09	4	8	7	2,379	Taip
22	481,04	4	11	8	2,965	Ne
23	416,11	4	8	7	2,038	Taip
24	480,00	4	8	7	3,266	Taip

Remiantis šiuo apibrėžimu, tik vienas darinys **22** neatitiko reikalavimų dėl per didelio vandenilinių ryšių akceptorių skaičiaus HA, kuris buvo didesnis už ribinę vertę – <10 (žr. 3.4 lentelę).

Potencialių vaistinių medžiagų prieinamumą per virškinamąjį traktą apibūdina ir absorbcija HIA (žr. 1 priedą), kuri „ADMETlab 2.0“ platformoje apibūdinama kiekybinėmis atitikties vertėmis nuo 0 iki 1. „ADMETlab 2.0“ įrankio pateiktos vertės priskiriamos kaip potencialiai naudingos, kai parametro vertė patenka į ribas 0–0,3. Esant 0,3–0,7 intervalui, darinys bus vidutinio tinkamumo, o ribos 0,7–1,0 rodys neigiamą reikšmę pasirinktam parametru.

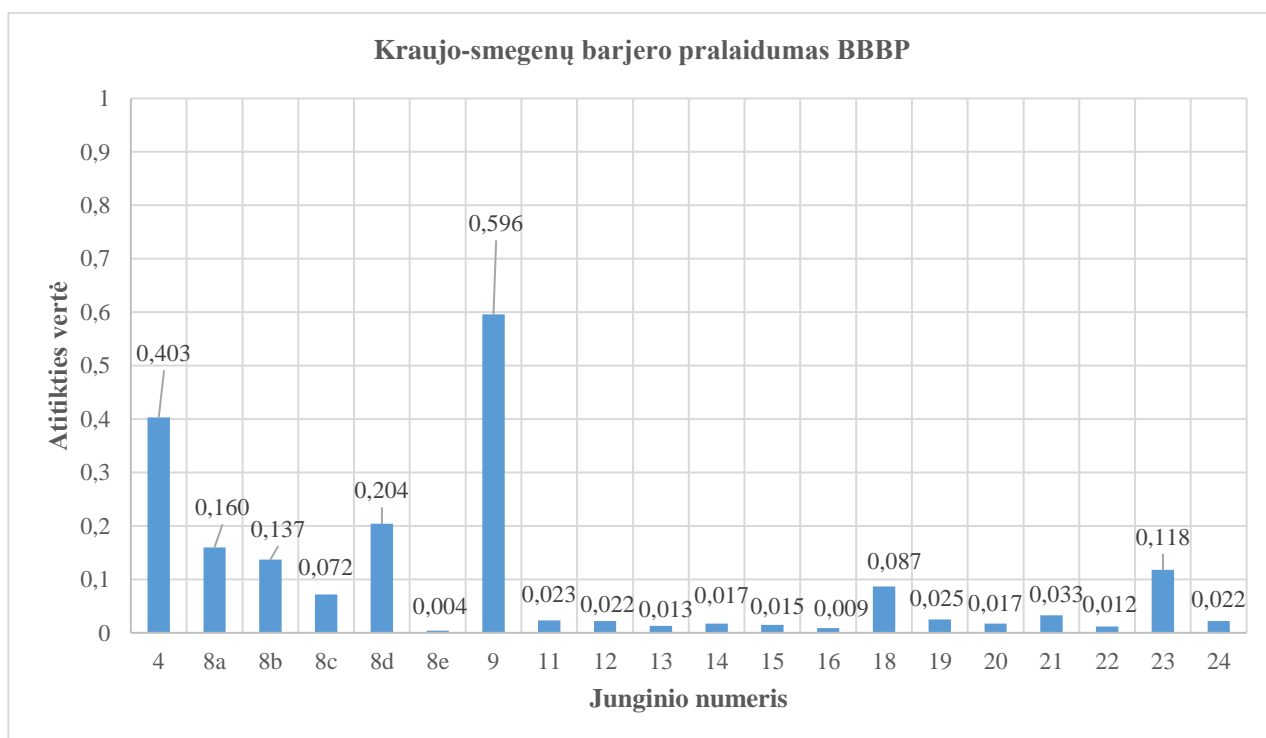
Darbo metu nustatyta, kad didžiausią potencialą pasisavinti per žarnyną, turi Šifo bazės **19–24** ir jų sintezei reikalingas 4-amino-1,2,4-triazolas **18**, o jų atitikčių vertės siekia nuo 0,004 iki 0,014 (žr. 3.5 pav.). Taip pat į pasisavinimo enteraliniu būdu tinkamumo ribas patenka, projekto metu susintetintas pradinis 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamidas (**4**) ir tiadiazolai **8a–8e**.

In silico skaičiavimų duomenimis, tiokarbamidų tipo dariniai **11–16** turi mažiausią galimybę, būti pasisavintiems virškinamajame trakte, dėl „ADMETlab 2.0“ įrankio pateiktų didelių atitikties verčių. Iš šių darinių **11–16** galima išskirti 2-chlor-*N*-[(4-sulfamoilfenil)karbamotioil]benzamidą (**12**), kuris patenka į reikiamas teorines ribas, o jo pasisavinimo atvirkštinė tikimybė lygi 0,176 (žr. 3.5 pav.). Visi kiti, susintetinti tiokarbamidai patenka į vidutines ir neigiamas atitikčių ribas, apibūdinančias prastą absorbciją žarnyne.



3.5 pav. Darinių 4–24 absorbcijos virškinamajame trakte HIA atitikties reikšmės

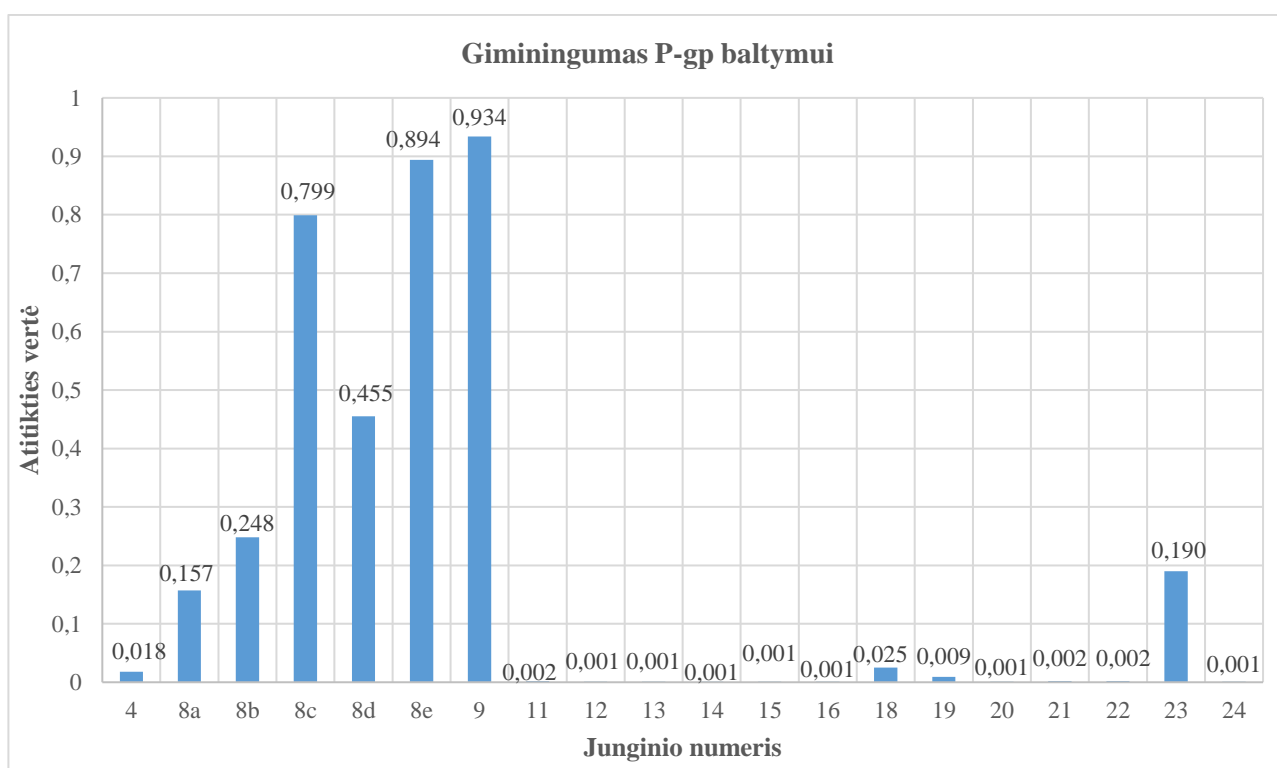
Atliekant potencialių vaistinių preparatų *in silico* analizę, svarbu nustatyti junginių gebėjimą pereiti hemoencefalinį barjerą BBBP. Geras kraujo-smegenų barjero pralaidumas padidina tiriamo darinio galimybę, veikti centrinę nervų sistemą. Kadangi baigiamojo studijų projekto metu buvo sintetinami dariniai, kurių tikslas yra veikti mikobakteriozes sukeliančius patogenus, o ne centrinę organizmo nervų sistemą, tai junginių 4–24 BBBP pralaidumas turi būti kuo mažesnis (žr. 1 priedą).



3.6 pav. Kraujo-smegenų barjero pralaidumo BBBP junginiams 4–24 atitikties vertės

Kaip ir absorbcijos virškinamajame trakte atveju (žr. 3.5 pav.), junginių 4–24 pralaidumo per hemoencefalinį barjerą vertės yra išreiškiamos atvirkštinėmis tikimybėmis, nuo 0 iki 1. Iš grafinės priklausomybės (žr. 3.7 pav.) matyti, kad mažiausią tikimybę veikti centrinę nervų sistemą turės 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamidas (4) ir 4-[[2-(5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidas (9), o jų atitikčių vertės atitinkamai bus lygios 0,403 ir 0,596. Likę ištirti dariniai patenka į didelės tikimybės, pereiti kraujo-smegenų barjerą, intervalą ir gali būti laikomi biologiškai nepriimtinais.

Vaistinių medžiagų pasisavinimą lemia sąveika su P-glikoproteino baltymu. Žinoma, kad P-glikoproteinas skatina vaistų eliminaciją iš žarnyno sienelės į spindį, iš kepenų į tulžį ir iš inkstų į šlapimą [55]. Veikdamas kaip šalutinių medžiagų transportavimo „siurblys“, P-gp baltymas giminingus darinius padeda greitai pašalinti iš organizmo. Tad didelis giminingumas šiam pernašos baltymui gali reikšti prastą vaisto pasisavinimą organizme, mažą bioprieinamumą ir greitą eliminaciją.



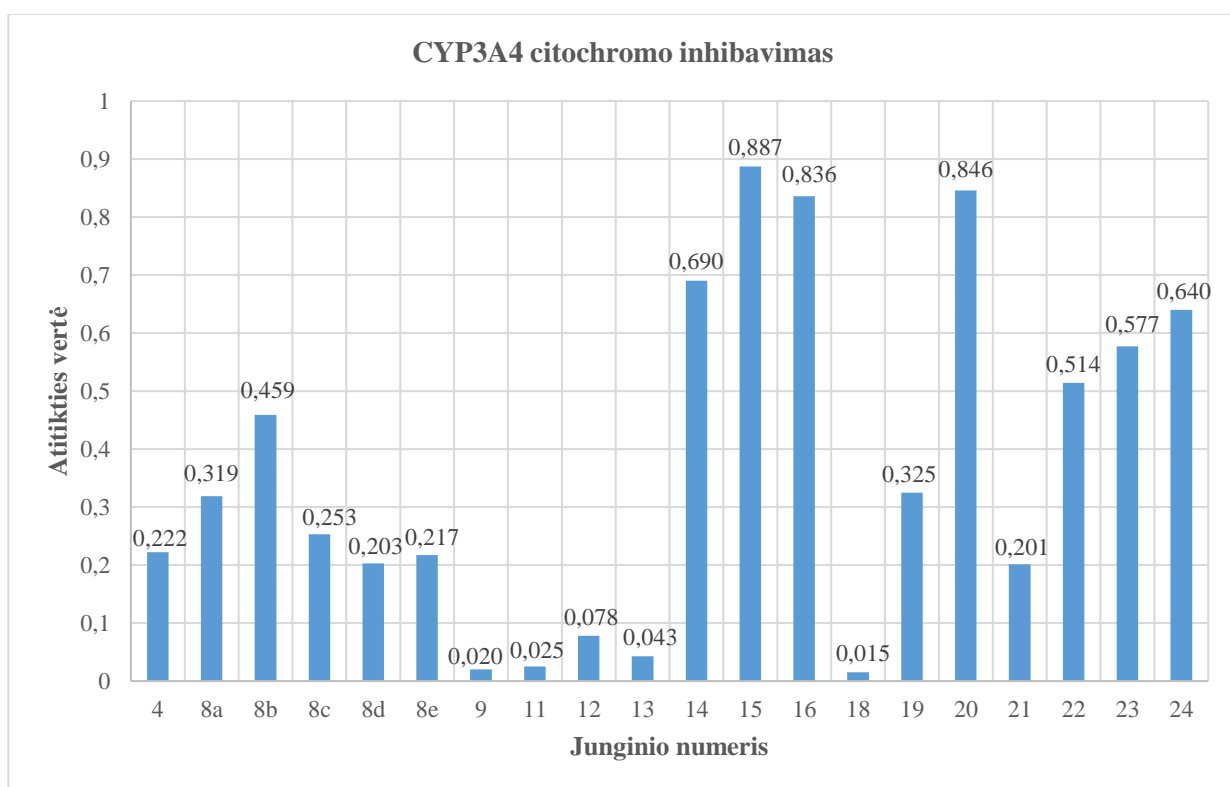
3.7 pav. Junginių 4–24, kaip potencialių substratų P-gp baltymui, atitikties vertės

Atlikus *in silico* analizę „ADMETlab 2.0“ žiniatinklio įrankiu, nustatyta, kad didžioji dalis projekto metu susintetintų darinių bus P-glikoproteino substratai (žr. 1 priedą). Prie šių, didžiausiu giminingumu pernašos baltymui P-gp pasižymėjusių darinių, priskiriami visi tiokarbamidų tipo junginiai 11–16, 4-amino-1,2,4-triazolas 18 ir iš jo susintetintos Šifo bazės 19–24 (žr. 3.7 pav.). Iš anilų 19–24, galima išskirti 4-[(2-{4-[(E)-(4-metilbenzilideno)amino]-5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino] benzensulfonamidą (23), kurio giminingumas buvo mažiausias, o „ADMETlab 2.0“ įrankio sugeneruota išvesties vertė atitiko 0,190.

Didžiausias potencialus bioprieinamumas buvo stebėtas tiadiazolų 8a–8e šarminės hidrolizės produktui 9. Iš grafinės priklausomybės matyti, kad 4-[[2-(5-sulfanil-4H-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidas (9) turi mažiausią teorinį giminingumą P-glikoproteino baltymui,

o jį atitinkanti vertė 0,934 patenka į neigiamą parametro tikimybę apibūdinantį intervalą – 0,7–1,0 (žr. 3.7 pav.). Tiadiazolai **8a–8e** taip pat parodė gerą bioprieinamumą, o mažiausiu giminingumu P-gp baltymui pasižymėjo junginiai – 4-chlor-*N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (**8c**) ir 2-hidroksi-*N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (**8e**), kurių tikimybių vertės atitinkamai siekė 0,799 bei 0,894 (žr. 3.7 pav.).

Projekto metu, susintetintiems dariniams **4–24** „*ADMETlab 2.0*“ žiniatinklio įrankiu buvo sugeneruotos tikimybių vertės, apibūdinančios CYP3A4 inhibicijos galimybę (žr. 3.8 pav.). CYP3A4 fermentas yra priskiriamas citochromų CYP450 šeimai, atsakingai už vaistų metabolizmą organizme [56]. CYP3A4 slopinimas gali sukelti pirminio vaisto koncentracijos kaupimąsi organizme, gali pradėti kauptis toksinai, atsirasti nepageidaujami šalutiniai poveikiai.



3.8 pav. Junginių **4–24**, kaip potencialių inhibitorių CYP3A4 citochromui, tikimybių vertės

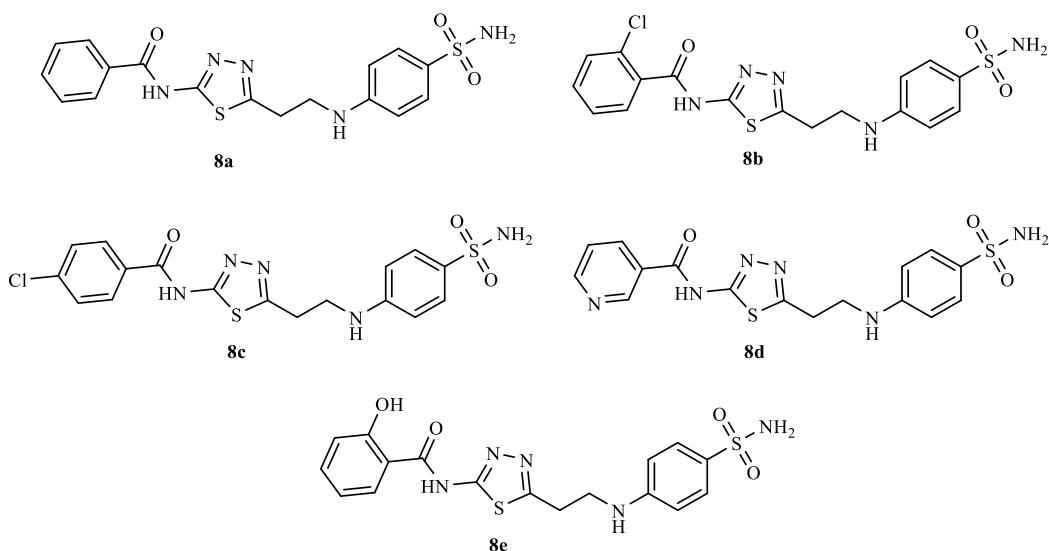
Pagal „*ADMETlab 2.0*“ įrankio pateiktas vertes ir tinkamumo ribas, didžiausia inhibicija pasižymi projekto metu susintetinti tiokarbamidai **11–13**, kurių tikimybių vertės pateko į inhibicijai palankiausių darinių ribas (0–0,3) bei atitinkamai buvo – 0,025, 0,078, 0,043 (žr. 3.8 pav.). Taip pat į didelės tikimybės intervalą pateko 4-[[2-(5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidai (**9**) ir 4-[[2-(4-amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidai (**18**), potencialiai galintys būti gerais CYP3A4 inhibitoriais.

Iš grafinės priklausomybės matyti (žr. 3.8 pav.), kad geriausiu bioprieinamumu ir mažiausia galimybe inhibuoti citochromą CYP3A4 pasižymi sulfapiridino fragmentą struktūroje turintys tiokarbamidai **14–16**. Nustatyta, kad aktyviausias iš jų yra 2-chlor-*N*-{[4-(piridin-2-ilsulfamoil)fenil]karbamioil}benzamidai (**15**), kurio atitikties vertė – 0,887.

Remiantis „*ADMETlab 2.0*“ sugeneruotomis inhibitorinio poveikio CYP3A4 citochromui vertėmis, taip pat nustatyta, kad geru bioprieinamumu pasižymi beveik visos Šifo bazės **19–24** (žr. 3.8 pav.). Iš

jų galima išskirti mažiausia inhibicija pasižymėjusį 4-[(2-{4-[(*E*)-(2,4-dichlorbenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidą (**20**), kuriam „ADMETlab 2.0“ įrankio sugeneruota išvesties vertė siekė 0,846. Vertinant projekto metu susintetintų tiadiazolų **8a–8e** CYP3A4 fermento inhibavimo galimybes, nustatyta, kad junginiai **8a**, **8b** pasižymi vidutine tikimybe, neigiamai veikti citochromą (žr. 3.8 pav.), o jų išvesties vertės, sugeneruotos „ADMETlab 2.0“ įrankiu, atitinkamai lygios 0,319 ir 0,459.

Apibendrinus visas „ADMETlab 2.0“ platformoje sugeneruotas farmakokinetinių parametru vertes, galima teigti, kad didžiausią potencialų bioprieinamumą turės tiadiazolai **8a–8e** (žr. 3.9 pav.).



3.9 pav. Junginiai **8a–8e**, turintys didžiausią potencialų bioprieinamumą

Šie junginiai (žr. 3.10 pav.) atitiko „Lipinski'o taisyklę“, pasižymėjo gera absorbcija žarnyne HIA. Taip pat tiadiazolų **8a–8e** hematoencefalinio pralaidumo BBBP vertės buvo vienos mažiausių, lyginant visus susintetintus darinius **4–24**. Remiantis *in silico* skaičiavimų rezultatais, tiadiazolai **8a–8e** turi mažiausią giminingumą P-glikoproteino baltymui, todėl jų bioprieinamumas bus didesnis nei projekto metu susintetintų tiokarbamidų **11–16** ir Šifo bazių **19–24**.

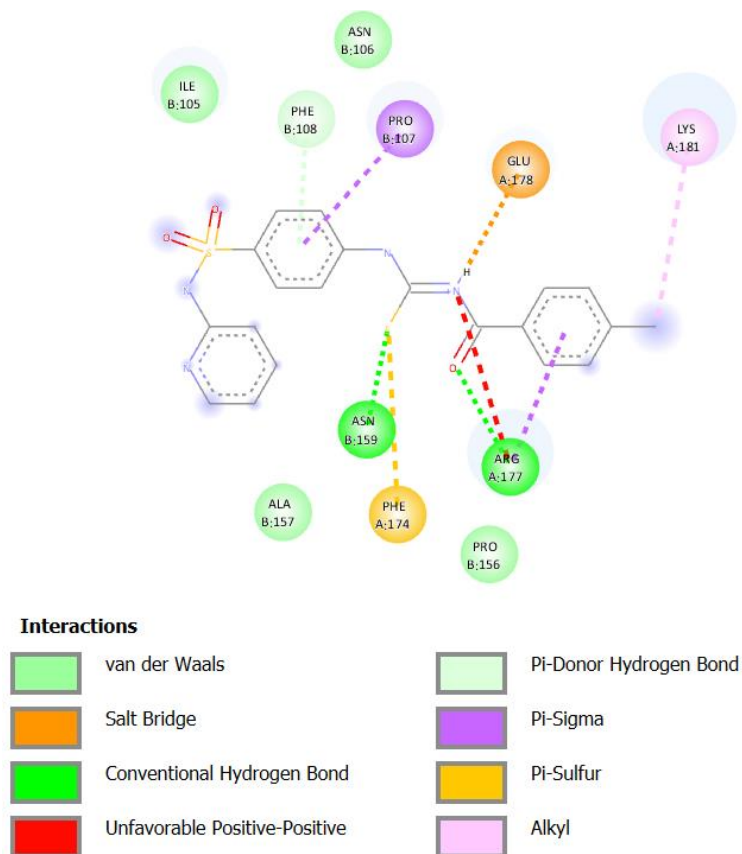
3.5.2. Sulfanilamido fragmentą turinčių junginių **4–24** molekulinio giminingumo InhA fermentui nustatymas

Projekto metu susintetintų darinių **4–24** teoriniui poveikiui *Mycobacterium* genties patogenuose įvertinti, buvo atliktas molekulinis modeliavimas. Taikiniu pasirinkta oksireduktazė InhA, reikalinga mikobakterijų sienelės komponento, mikolių rūgščių, biosintezai. Molekulinio modeliavimo metu, panaudojant „AutoDockTools 1.5.7“ programą, nustatyta tiriamų darinių **4–24** jungimosi su tiksliniu fermentu energija, apibūdinanti giminingumą taikiniui. Taip pat „AutoDockTools 1.5.7“ įrankio pagalba taip pat buvo įvertinti galimi vandeniliniai ryšiai, sudaromi su baltymo aktyviojo centro aminorūgščių likučiais bei nustatytas bendras šių jungčių kiekis. Visi molekulinio modeliavimo tyrimų rezultatai pateikti 2 priede (žr. 2 priedą), o didžiausią giminingumą InhA baltymui turėję dariniai – 3.5 lentelėje (žr. 3.5 lentelę).

3.5 lentelė. Didžiausią giminingumą InhA baltymui turinčių junginių savybės

Junginys	Suformuotų vandenilinių ryšių kiekis, vnt.	Aminorūgštys, dalyvaujančios vandenilinių ryšių susidaryme	Jungimosi energija, kcal/mol
8a	3	Arg177:HE, Arg177:HH12, Glu178:OE2	-5,19
8b	2	Arg177:HH12, Arg177:O	-4,64
8d	2	Glu178:OE2, Phe108:HN	-4,62
12	2	Gln224:O, Lys181:HZ1	-4,37
13	2	Met155:O, Lys181:HZ1	-4,48
14	1	Phe108:HN	-4,65
15	1	Lys181:HZ1	-4,22
16	2	Arg177:HE, Arg177:HH12	-5,16
20	2	Met155:O, Asn159:OD1	-4,29
21	2	Ile105:HN, Glu178:OE2	-4,36
Izoniazidas	2	Glu178:OE2, Ala157:HN	-4,34
Etionamidas	1	Ala157:HN	-4,20

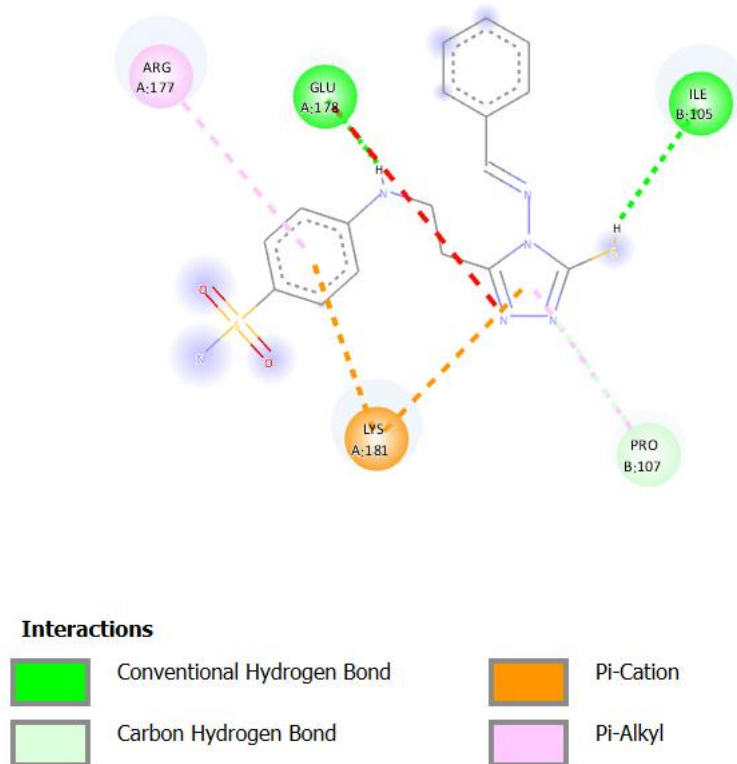
Remiantis tyrimų rezultatais (žr. 3.5 lentelę), didžioji dalis susintetintų darinių pasižymėjo geru giminingumu oksireduktazei InhA. Iš projekto metu gautų tiokarbamido junginių **11–16**, beveik visi dariniai pateko tarp aktyviausių junginių, potencialių InhA ligandų, aktyvesnių už standartinius preparatus – izoniazidą ir etionamidą. Iš šios grupės struktūrų, tvirčiausią ryšį su baltymo aktyviuoju centru sudarė tiokarbamido darinys **16**, kurio jungimosi energijos vertė buvo -5,16 kcal/mol. Programos „AutoDockTools 1.5.7” pateiktais duomenimis, 4-chlor-*N*-{[4-(piridin-2-ilsulfamoil)fenil]karbamioil}benzamidą (**16**) sudaro 2 vandenilinius ryšius su oksireduktazės InhA aktyviojo centro aminorūgštimis – Arg177:HE, Arg177:HH12 (žr. 3.5 lentelę), o jungčių susidarymą įrodo „Discovery Studio 2021” programa atlikta 2D vizualizacija (žr. 3.10 pav.).



3.10 pav. Tiokarbamido darinio **16** poveikis fermento InhA aktyviajame centre (2D)

Remiantis šiais duomenimis (žr. 3.10 pav.), tiokarbamido darinys **16** potencialiai sudaro vandenilinį ryšį su arginino 177 likučiu, per ligando C=O funkcinės grupės deguonies atomą. Taip pat stebimas vandenilinio ryšio sudarymas su asparagino 159 aminorūgšties likučiu, kurį sudaro junginio **16** C=S funkcinė grupė. Taip pat „Discovery Studio 2021“ programos pateiktoje 2D vizualizacijoje galima pamatyti kitas, silpnesnes, tačiau potencialiai sudaromas chemines sąveikas, pavyzdžiui Van der Valso sąveiką, π - σ , alkilinius ryšius (žr. 3.10 pav.).

Taip pat geru giminingumu InhA baltymui pasižymėjo Šifo bazė **21**, o jos jungimosi energijos vertė -4,36 kcal/mol buvo didesnė už komercinių antibiotikų – izoniazido ir etionamido – energetinius dydžius (žr. 3.5 lentelę). Remiantis programos „AutoDockTools 1.5.7“ pateiktais duomenimis, 4-[(2-{4-[(*E*)-benzilidenamino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (**21**) su *Mycobacterium tuberculosis* patogene randama oksireduktaze InhA sudaro du vandenilinius ryšius (žr. 3.11 pav.).



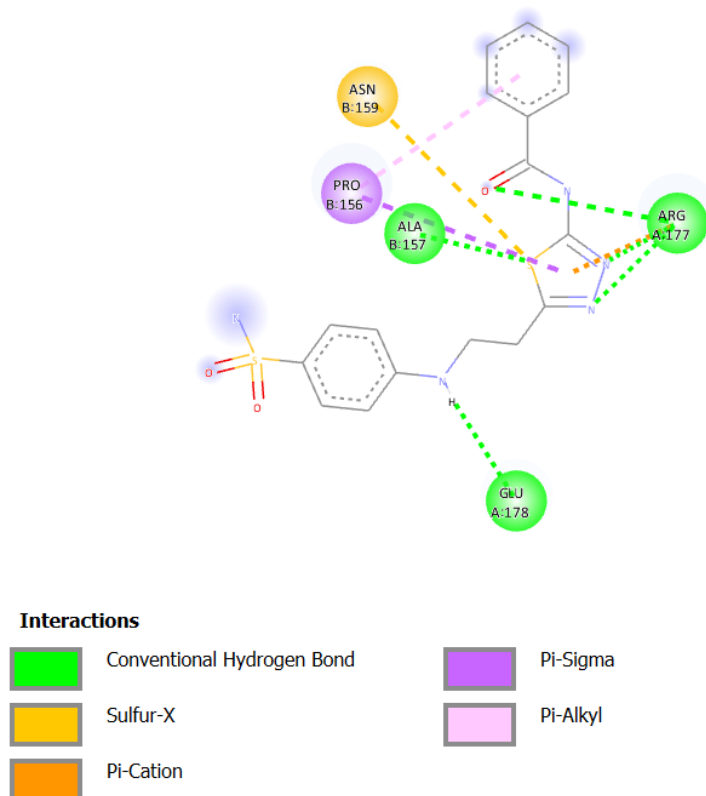
3.11 pav. Šifo bazės **21** poveikis fermento InhA aktyviajame centre (2D).

Vieną iš galimų vandenilinių ryšių sudaro ligando **21** SH grupės vandenilio atomas, jungdamasis su InhA fermento izoleucino 105 aminorūgšties likučiu (žr. 3.11 pav.). Antrąjį vandenilinį ryšį suformuoja baltymo InhA glutamo rūgšties 178 likutis ir Šifo bazės **21** NH funkcinės grupė (žr. 3.11 pav.).

Taip pat 2D vizualizacijoje pateiktas galimas alkilinis ryšys, kurį sudaro baltymo InhA arginino 177 likutis ir Šifo bazės **21** sulfanilamidinio fragmento, aromatinio žiedo sistema (žr. 3.11 pav.). Šį fenilo žiedą bei heterociklinį triazolo fragmentą gali veikti ir oksireduktazės InhA aktyviajame centre esantis lizinas 181, sudarantis du katijoninius ryšius.

Projekto metu buvo nustatyta, kad didžiausią afinitetą taikiniui InhA turi tiadiazolas **8a** (žr. 3.5 lentelę). Šis darinys buvo aktyviausias ne tik tarp ciklinių tiosemikarbazidų tipo junginių **8a–8e**, bet ir visų sintezės metu gautų struktūrų **4–24** atžvilgiu.

Gerą *N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamido (**8a**) afinitetą *Mycobacterium tuberculosis* oksireduktazei InhA lėmė taikinio-ligando sąveika, išreikšta trimis vandenilniais ryšiais, kuriuos sudaro fermento aktyviajame centre randamos aminorūgštys – Arg177:HE, Arg177:HH12, Glu178:OE2 (žr. 3.5 lentelę).

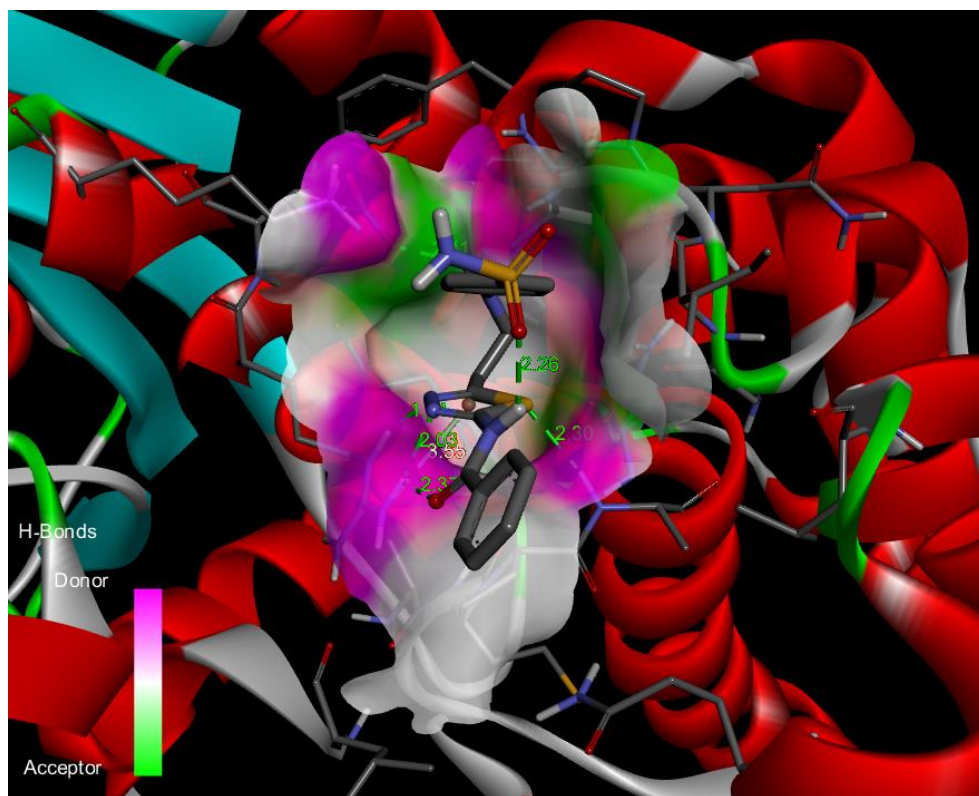


3.12 pav. Didžiausią afinitetą taikiniui InhA turėjusio tiadiazolo **8a** poveikis fermento aktyviajame centre (2D)

Remiantis „AutoDockTools 1.5.7” programos sugeneruotais duomenimis ir „Discovery Studio 2021” 2D vizualizacija (žr. 3.13 pav.), tiadiazolo **8a** NH grupė gali sudaryti vandenilinį ryšį su glutamo rūgšties 178 likučiu, o triazolo azoto atomas dalyvauja vandenilinio ryšio sudaryme su alanino 157 fragmentu.

Iliustracijoje (žr. 3.12 pav.) taip pat matyti, kad InhA aktyviajame centre esantis arginino 177 likutis turi net tris galimybes, sudaryti vandenilinį ryšį su tiriamu ligandu **8a**. Molekulinio modeliavimo metu nustatyta, kad ši aminorūgštis gali veikti du triazolo fragmente randamus azoto atomus ir C=O grupės deguonies atomą (žr. 3.12 pav.). Tad tokia sąveika tik padidina tiadiazolo **8a** galimybę prisitvirtinti prie tikslinio baltymo InhA aktyviojo centro ir slopinti jo veikimą.

Projektu metu, molekulinio modeliavimo duomenys taip pat buvo apdoroti „Discovery Studio 2021” programos aplinkoje, pateikiant susintetintų darinių **4–24** 3D vizualizacijas. Štai iliustracijoje (žr. 3.13 pav.) matoma aktyviausio junginio, tiadiazolo **8a**, erdvinė sąveika su InhA baltymo aktyviuoju centru.



3.13 pav. Didžiausią afinitetą taikiniui InhA turėjusio tiadiazolo **8a** poveikis fermento aktyviajame centre (3D)

3.6 lentelė. Tiadiazolo **8a** funkcinę grupę ir InhA fermento aminorūgščių likučių sudaromų vandenilinių ryšių atstumų vertės

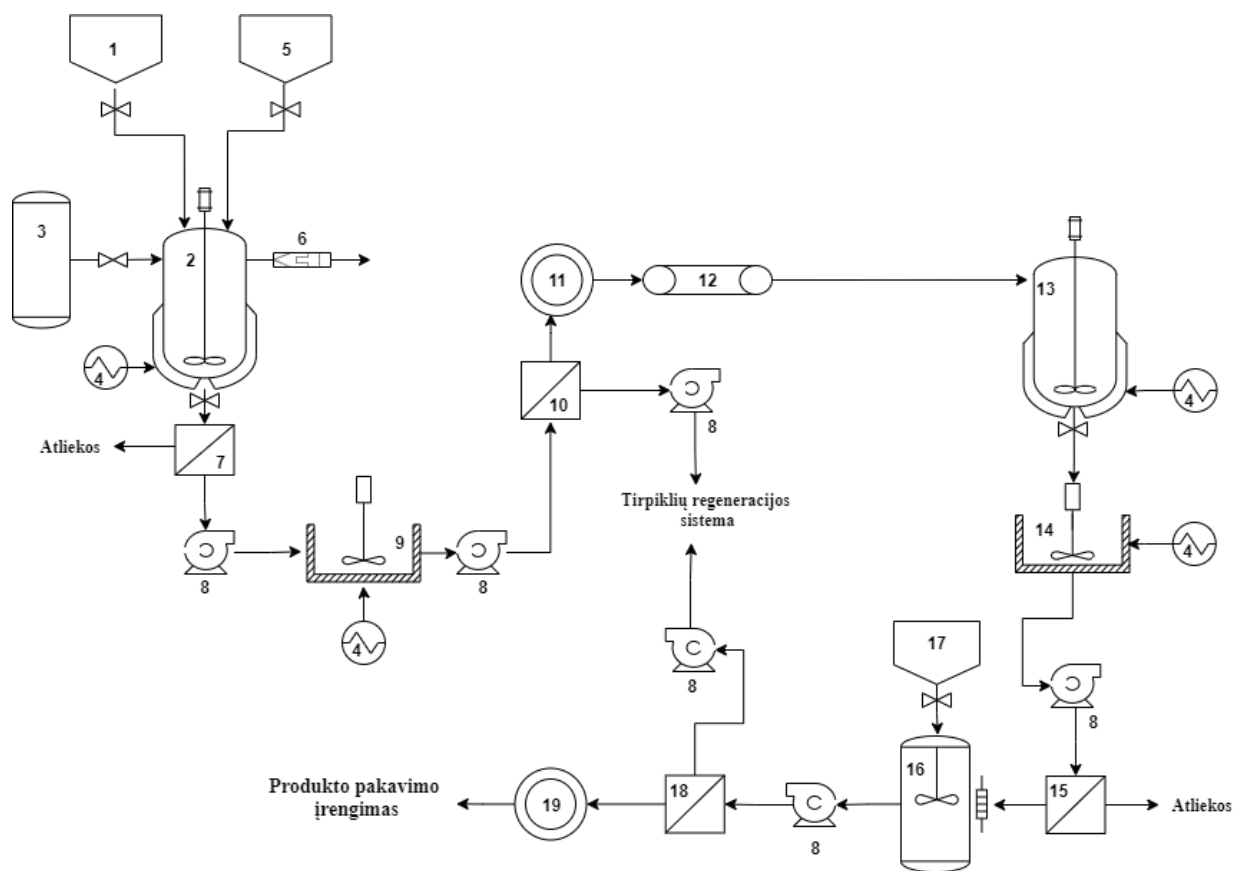
InhA fermento aktyviojo centro aminorūgšties likutis	Tiadiazolo 8a funkcinė grupė, dalyvaujanti vandenilinio ryšio sudaryme	Atstumas tarp sąveikaujančių grupių, Å
Arg177	N=C (triazolo fragmentas)	1,84
Arg177	N=C (triazolo fragmentas)	2,03
Arg177	C=O	2,37
Glu178	NH	2,11
Ala157	C-N (triazolo fragmentas)	2,30

Tiadiazolo **8a** 3D vizualizacijoje galima matyti ir realius atstumus, tarp vandenilinius ryšius sudarančių atomų (žr. 3.13 pav.). Kadangi dažnai, visas atstumų vertes sunku raškiai pateikti, „Discovery Studio 2021“ programos darbiniam lauke sugeneruota apibendrinta duomenų lentelė (žr. 3.6 lentelę).

4. Rekomendacijų dalis

Remiantis *in silico* tyrimų rezultatais, aktyviausiu poveikiu prieš *Mycobacterium tuberculosis* patogeno InhA fermentą pasižymėjo *N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (**8a**), todėl rekomendacijų skiltyje nuspręsta pateikti šio darinio aparatūrinę gamybos schemą (žr. 4.1 schemą, 4.1 lentelę).

Į reaktorių **2**, su patalpintu benzoilo chloridu, iš rezervuaro **1** tiekiamas kalio tiocianato tirpalas acetonitrile. Svarbu, kad KSCN tiekimo metu, reaktorių **2** būtų vėsinamas, veikiant aušintuvui **4**, o iš talpos **3** būtų paduodamas inertinių dujų (rekomenduojama azoto) srautas. Reakcija vykdoma, maišant reaktoriuje **2** esančius reagentus maišykle ir palaikant 0 °C temperatūrą. Po 4 val. trunkančio proceso, aušintuvas **4** išjungiamas, reaktoriuje **2** esančiam mišiniui leidžiama sušilti iki kambario temperatūros. Tuomet į reakcijos talpą **2** iš rezervuaro **5** paduodamas 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido (**4**) tirpalas acetonitrile. Prijungimo reakcija reaktoriuje **2** atliekama 24 val., tirpiklio virimo temperatūroje, palaikomoje kaitinimo elementu **4**. Procesui pasibaigus, mišiniui leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros, susidariusi neorganinė KCl frakcija, nufiltruojama filtre **7** ir tiekiamas į atliekų rezervuarą. Likęs tirpalas, su tiksliniu produktu, siurbliu **8** tiekiamas į nusodinimo talpą **9**, su maišykle, kurią aušinant, iškrenta tarpinio produkto kristalai. Gautas aciklinis tiosemikarbazidas (**7a**) toliau nufiltruojamas filtre **10** ir yra tiekiamas į džiovinimo skyrių, kuriame drėgmė pašalinama būgninėje džiovyklėje **11**, esant 90 °C temperatūrai. Filtravimo metu atskirtas acetonitrilas tiekiamas į tirpiklių regeneracijos sistemą.



4.1 schema. Tiadiazolo **8a** aparatūrinė gamybos schema. Įrengimų žymėjimas pateiktas 4.1 lentelėje (žr. 4.1 lentelę)

Džiovyklėje **11** išdžiovinti kristalai transporteriu **12** yra tiekiami į antro etapo reaktorių **13**, su jau iš anksto patalpinta 80 % sieros rūgštimi. Reaktorius **13** aušinamas, ciklizacijos procesas vykdomas 24 val., 0 °C temperatūroje. Po reakcijos, mišinys yra tiekiamas į nusodintuvą su pakrautu ledu, iškritę *N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamido (**8a**) kristalai dar 30 min maišomi nusodintuve, aušintuvu **4** palaikant 4 °C temperatūrą. Ledo kristalams ištirpus, mišinys filtruojamas filtru **15**, atskirta vandeninė terpė pašalinama į atliekas, o produkto kristalai siurbliu tiekiami į kristalizatorių **16**. Medžiaga kristalizatoriuje **16** ištirpinama, tiekiant etanolį, iš rezervuaro **17**. Gautas mišinys verdamas tirpiklio virimo temperatūroje 15 min, kol ištirpsta tikslinis junginys **8a**. Tuomet kaitinimas stabdomas, mišiniui leidžiama atvėsti iki kambario temperatūros, o produktui išsikristalinti. Gautas tiadiazolas **8a** atskiriamas nuo tirpiklio filtre **18** ir yra tiekiamas į džiovinimo įrenginį **19**. Likęs etanolis gali būti panaudotas pakartotinai, todėl yra nukreipiamas į regeneracijos sistemą.

4.1 lentelė. Tiadiazolo **8a** aparatūrinės gamybos schemos įrengimų žymėjimas

Žymėjimas	Įrenginys
1	Kalio tiocianto, ištirpinto acetonitrile, rezervuaras
2	Reaktorius, su išoriniu apvalkalu ir maišykle
3	Inertinių dujų talpa (rekomenduojamas azotas)
4	Aušinimo/kaitinimo elementas
5	Rūgšties hidrazido 4 , ištirpinto acetonitrile, rezervuaras
6	Išeinančio oro filtras
7	Filtras
8	Transportavimo siurblys
9	Nusodinimo rezervuaras, su maišykle
10	Filtras
11	Būgninė džiovyklė
12	Transportavimo įrenginys
13	Reaktorius, su išoriniu apvalkalu ir maišykle
14	Nusodinimo rezervuaras, su maišykle
15	Filtras
16	Kristalizatorius, su aušinimo/kaitinimo elementu
17	Etanolio rezervuaras
18	Filtras
19	Būgninė džiovyklė

Turimas sausas *N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (**8a**) toliau yra gabenamas į pakavimo skyrių, kuriame priklausomai nuo norimos vaisto formos, yra kapsuliuojamas, tabletuojamas arba elementariai supakuojamas miltelių pavidalu.

Išvados

1. Vykiant 4-[(3-hidrazinil-3-oksopropil)amino]benzensulfonamido (**4**) ir izotiocianatų **6a–6e** prijungimo reakcijas, susidaro ne tik tiosemikarbazidai **7a–7e**, bet vyksta ir jų ciklokondensacija į tiadiazolo darinius **8a–8e**.
2. Kaip tiosemikarbazidų analogai, susintetinti tiokarbamido dariniai, tačiau jų apskaičiuotas bioprieinamumas yra nežymiai blogesnis.
3. Nustatyta, kad kondensuojant 4-[[2-(4-amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidą (**18**) su aromatiniais aldehidais, panaudojant katalitinį koncentruotos druskos rūgšties kiekį, susidaro Šifo bazės.
4. Atlikus *in silico* skaičiavimus nustatyta, kad:
 - geriausiu bioprieinamumu, būti vartojamiems enteraliniu būdu, pasižymi tiadiazolų tipo dariniai **8a–8e**, o mažiausią tikimybę turėjo 4-[(2-{4-[(*E*)-(2-chlor-5-nitrobenzilideno)amino]-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il}etil)amino]benzensulfonamidas (**22**), neatitinkantis „Lipinski'o taisyklės“;
 - bioprieinamumą mažina CYP3A4 citochromo inhibicija, kuriai didžiausią potencialą turi tiokarbamido dariniai **11–13**, ir 4-[[2-(4-amino-5-sulfanil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)etil]amino]benzensulfonamidas (**18**);
 - didžiausiu giminingumu mikobakterijų InhA fermentui pasižymi *N*-(5-{2-[(4-sulfamoilfenil)amino]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzamidai (**8a**), o jo jungimosi energija lygi -5,19 kcal/mol.

Literatūros sąrašas

1. BALDWIN, S. L., et al. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. *Plos Neglected Tropical Diseases* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007083>
2. FUJIWARA, K., et al. Clinical risk factors related to treatment failure in Mycobacterium abscessus lung disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2021, 40, 247–254 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi:<https://doi.org/10.1007/s10096-020-04026-z>
3. BOGDANOVSKI, K., et al. Antibacterial activity of high-dose nitric oxide against pulmonary *Mycobacterium abscessus* disease. *Access Microbiology* [interaktyvus]. 2020, 2 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi: [10.1099/acmi.0.000154](https://doi.org/10.1099/acmi.0.000154)
4. DEGIACOMI, G., et al. *Mycobacterium abscessus*, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2019, 20(23), 5868 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi:[10.3390/ijms20235868](https://doi.org/10.3390/ijms20235868)
5. WANG, R., et al. Mutations of folC cause increased susceptibility to sulfamethoxazole in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2021, 11, 1352 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80213-4>
6. KAYUKOVA, L. A., E. A BERIKOVA. Modern Anti-Tuberculosis Drugs and Their Classification. Part I: First-Line Drugs. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [interaktyvus]. 2020, 54, 555–563 [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02239-2>
7. KRÁTKÝ, M., et al. Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Molecules* [interaktyvus]. 2017, 22, 1573 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi: [10.3390/molecules22091573](https://doi.org/10.3390/molecules22091573)
8. MULETA, F., T. ALANSI, R. ESWARAMOORTHY. A Review on Synthesis, Characterization Methods and Biological Activities of Semicarbazone, Thiosemi-Carbazone and Their Transition Metal Complexes. *Journal of Natural Sciences Research* [interaktyvus]. 2019, 9(17) [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 2225-0921. Prieiga per: doi:[10.7176/JNSR](https://doi.org/10.7176/JNSR)
9. BARBERIS, I., N. L. BRAGAZZI, L. GALLUZZO, M. MARTINI. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene* [interaktyvus]. 2017, 58(1) [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432783/>
10. FRANCO-PEREDES, C., et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2019, 32(1) [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi: [10.1128/CMR.00069-18](https://doi.org/10.1128/CMR.00069-18)
11. VAN INGEN, Jakko. *Mycobacteria*. In: COHEN J., et al. eds. *Infectious Diseases (Fourth Edition)* [interaktyvus]. Elsevier, 2017, pp. 1645–1659 [žiūrėta 2021-04-19]. ISBN 9780702062858. Prieiga per: doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00185-4>
12. FORBES, B. A., et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2018, 31(2) [žiūrėta 2021-04-18]. Prieiga per: doi:[10.1128/CMR.00038-17](https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17)
13. VILCHÈZE, C., L. KREMER. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *American Society for Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 5(2) [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga atvira:asmscience.org

14. ABRAHAM, K. A., G. S. BESRA. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology* [interaktyvus]. 2018, 145(2), 116–133 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi:[10.1017/S0031182016002377](https://doi.org/10.1017/S0031182016002377)
15. VILCHÈZE, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Applied Sciences* [interaktyvus]. 2020, 10(7), 2278 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/app10072278>
16. VINCENT, A. T., et al. The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 9, 2341 [žiūrėta 2021-04-19]. ISSN 1664-302X. Prieiga per: doi:[10.3389/fmicb.2018.02341](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341)
17. UNISSA, A. N., S. SUBBIAN, L. E. HANNA, N. SELVAKUMAR. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution* [interaktyvus]. 2016, 45, 474–492 [žiūrėta 2021-04-29]. ISSN 1567-1348. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>
18. MICHELLE, L. T., et al. EthA/R-Independent Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by Ethionamide. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 8, 710 [žiūrėta 2021-04-29]. ISSN=1664-302X . Prieiga per: doi:[10.3389/fmicb.2017.00710](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00710)
19. HALLOUM, I., et al. Resistance to Thiacezone Derivatives Active against *Mycobacterium abscessus* Involves Mutations in the MmpL5 Transcriptional Repressor MAB_4384. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2017, 61(4) 2509–2516 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi:[10.1128/AAC.02509-16](https://doi.org/10.1128/AAC.02509-16)
20. SINGHAL, S., et al. A review on potential biological activities of thiosemicarbazides. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2013, 2(6), 4661–4681 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga internetu: <https://www.researchgate.net>
21. TAHIR, M. N. et al. Facile synthesis, single crystal analysis, and computational studies of sulfanilamide derivatives. *Journal of Molecular Structure* [interaktyvus]. 2017, 1127, 766–776 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0022-2860. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.08.032>
22. SHARMA, D., Y. K. DHURIYA, N. DEO, D. BISHT. Repurposing and Revival of the Drugs: A New Approach to Combat the Drug Resistant Tuberculosis. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2017, 8, 2452 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi: [10.3389/fmicb.2017.02452](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02452)
23. CHEN, H., et al. The optimization and characterization of functionalized sulfonamides derived from sulfaphenazole against *Mycobacterium tuberculosis* with reduced CYP 2C9 inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2021, 40, 127924 [žiūrėta 2021-04-19]. ISSN 0960-894X. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127924>
24. VARIYA, H. H., V. PANCHAL, G. R. PATEL. Synthesis, anti-tuberculosis and anti-bacterial activities of sulfonamide bearing 4-((2-(5-bromo-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl)-2-oxoethyl)amino)-N-(various substitutions)benzenesulfonamide. *Indian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 59, 682–689 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga atvira: <http://nopr.niscair.res.in>
25. KRÁTKÝ M., J. STOLAŘÍKOVÁ, J. VINŠOVÁ. Novel Sulfamethoxazole Ureas and Oxalamide as Potential Antimycobacterial Agents. *Molecules* [interaktyvus]. 2017, 22(4), 535 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22040535>
26. KUMAR, A. S., et al. Synthesis, structural, biological and in silico studies of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as possible anticancer, antimicrobial and antitubercular agents. *New*

- Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 43, 1597 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi:[10.1039/c8nj03671c](https://doi.org/10.1039/c8nj03671c)
27. ANDRADE, E. L., et al. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [interaktyvus]. 2016, 49(11) 535 [žiūrėta 2021-05-11]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165644>
 28. HEMALATHA K., K. SUJATHA, P. PANNEERSELVAM, K. GIRIJA. *In Silico* studies of 4-Anilino Quinazoline derivatives as Anti-tubercular Agents. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2020, 11(4), 7468–7475 [žiūrėta 2021-04-26]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i4.3948>
 29. WENG, G., et al. Comprehensive Evaluation of Fourteen Docking Programs on Protein–Peptide Complexes. *Journal of Chemical Theory and Computation* [interaktyvus]. 2020, 16(6), 3959–3969. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b01208>
 30. BENET, L. Z., C. M. HOSEY, O. URSU, T. I. OPREA. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced drug delivery reviews* [interaktyvus]. 2016, 101, 89–98 [žiūrėta 2021-05-11]. Prieiga per: doi: [10.1016/j.addr.2016.05.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.007)
 31. BHUVA, N. H., et al. Synthesis and biological evaluation of pyrimidinyl sulphonamide derivatives as promising class of antitubercular agents. *Journal of Saudi Chemical Society* [interaktyvus]. 2017, 21(5), 517–527 [žiūrėta 2021-04-26]. ISSN 1319-6103. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.05.007>
 32. ERTAN-BOLELLI, T., İ. YILDIZ, S. OZGEN-OZGACAR. Synthesis, molecular docking and antimicrobial evaluation of novel benzoxazole derivatives. *Medicinal Chemistry Research* [interaktyvus]. 2016, 25, 553–567 [žiūrėta 2021-04-26]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1499-1>
 33. NAYEEM, N., D. GLADSY. Synthesis of some Mannich bases from sulphonamides and benzothiazole derivatives and evaluation of their anti tubercular activity and anti microbial activity. *Der Pharma Chemica* [interaktyvus]. 2012, 4(3), 1277–1282 [žiūrėta 2021-04-26]. Prieiga internetu: <http://derpharmachemica.com/archive.html>
 34. MARTÍNEZ, R., et al. Synthesis and antituberculosis activity of new acylthiosemicarbazides designed by structural modification. *Drug Development Research* [interaktyvus]. 2020, 81(3), 350-355 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.21626>
 35. PATEL, D. B., et al. Synthesis of novel quinoline-thiosemicarbazide hybrids and evaluation of their biological activities, molecular docking, molecular dynamics, pharmacophore model studies, and ADME-Tox properties. *Journal of Heterocyclic Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 57(3), 1183–1200 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1002/jhet.3855>
 36. PITUCHA, M., et al. Synthesis, In Vitro Screening and Docking Studies of New Thiosemicarbazide Derivatives as Antitubercular Agents. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24(2), 251 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24020251>
 37. ALAGARSAMY, V., et al. Design, Synthesis and Antimicrobial Activities of 1-(4-oxo-3-(4-fluorophenyl)-3H-quinazolin-2-yl)-4-(substituted) Thiosemicarbazide Derivatives. *Journal of the Chilean Chemical Society* [interaktyvus]. 2016, 61(2), 2856–2860 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072016000200002>

38. PATEL, S. R., et al. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR study of hydrazide, semicarbazide and thiosemicarbazide derivatives of 4-(adamantan-1-yl)quinoline as anti-tuberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 85, 255–267 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.100>
39. FARJALLAH, A., et al. A Coumarin-Based Analogue of Thiacetazone as Dual Covalent Inhibitor and Potential Fluorescent Label of HsdA in *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2021, 7(3), 552–565 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00325>
40. CORDEIRO, R., M. KACHROO. Synthesis and biological evaluation of anti-tubercular activity of Schiff bases of 2-Amino thiazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2020, 30(24), 127655 [žiūrėta 2021-04-19]. ISSN 0960-894X. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127655>
41. KARCZMARZYK, Z., et al. New Application of 1,2,4-Triazole Derivatives as Antitubercular Agents. Structure, In Vitro Screening and Docking Studies. *Molecules* [interaktyvus], 2020, 25(24), 6033 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25246033>
42. RISHIKESAN, R., et al. Synthesis of some novel piperidine fused 5-thioxo-1H-1,2,4-triazoles as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Journal of Chemical Sciences* [interaktyvus] 2021, 133(3) [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1007/s12039-020-01872-4>
43. SONAWANE, A. D., et al. Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole-3-thione and 1,3,4-oxadiazole-2-thione as antimycobacterial agents. *Chemical Biology and Drug Design* [interaktyvus]. 2017, 90(2), 200–209 [žiūrėta 2021-04-19]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1111/cbdd.12939>
44. COSTACURTA, G. F., et al. Synthesis and biological evaluation of 12 novel (-)-camphene-based 1,3,4-thiadiazoles against *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiology* [interaktyvus]. 2020, 15(9), 723–738 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per doi: [10.2217/fmb-2019-0258](https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0258)
45. PATEL, H., K. CHAUDHARI, P. JAIN, S. SURANA. Synthesis and *in vitro* antitubercular activity of pyridine analogues against the resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 102 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104099>
46. SEKHAR, D. C., et al. Design and Synthesis of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as Novel Anticancer and Antitubercular Agents. *Russian Journal of General Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 89(4), 770–779 [žiūrėta 2021-05-10]. ISSN 1070 3632. Prieiga per: doi: [10.1134/S1070363219040224](https://doi.org/10.1134/S1070363219040224)
47. JADHAV, S. A., et al. Comparative study of one pot synthetic methods of 2-amino-1,3,4-thiadiazole. *Der Pharma Chemica* [interaktyvus]. 2015, 7(2), 127–131 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga internetu: www.derpharmachemica.com
48. MOBNIKHALEDI, A., N. FOROUGHIFAR, A. RAFIEE. Synthesis of some novel bis-1,2,4-triazole and bis-1,3,4-thiadiazole derivatives from terephthaloyl and isophthaloyl chlorides. *Heterocyclic Communications* [interaktyvus]. 2013, 19(4), 265–269. [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1515/hc-2013-0035>
49. TATAR, E. Design, Synthesis, and Molecular Docking Studies of a Conjugated Thiadiazole–Thiourea Scaffold as Antituberculosis Agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [interaktyvus]. 2016, 39(4), 502–515. Prieiga per: doi: [10.1248/bpb.b15-00698](https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00698)

50. GOODWIN, R. J. A., et al. Mass Spectrometry Imaging in Oncology Drug Discovery. In R. R. Drake, et al. eds. *Advances in Cancer Research* [interaktyvus]. Academic Press, 2017, 134, pp. 133–171 [žiūrėta 2021-05-17]. ISBN 9780128052495. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.11.005>
51. ANDRIĆ, F., K. HÉBERGER. Towards better understanding of lipophilicity: Assessment of *in silico* and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2015, 115, 183–191 [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.006>
52. STOCKS, Michael. The small molecule drug discovery process – from target selection to candidate selection. In R. GANELLIN, et al., eds. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* [interaktyvus]. Elsevier, 2013, pp. 81–126 [žiūrėta 2021-05-17]. ISBN 9780123971760. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00003-0>
53. SHWETA, M., D. RASHMI. In-vitro ADME studies of TUG-891, a GPR-120 inhibitor using Swiss ADME predictor. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [interaktyvus]. 2019, 9(2), 266–369 [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga internetu: <http://jddtonline.info>
54. DA SILVA, M., et al. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Properties Predictions of Galloyl Derivatives. *Molecules* [interaktyvus]. 2015, 20, 5360–5373 [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules20045360>
55. POONGAVANAM, V., N. HAIDER, G. F. ECKER. Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2012, 20(18), 5388–5395 [žiūrėta 2021-05-17]. Prieiga per: doi: [10.1016/j.bmc.2012.03.045](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.045)
56. GURUSAMY, U., D. G. SHEWADE. Pharmacogenomics in India. In S. PADMANABHAN, eds. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* [interaktyvus]. Academic Press, 2014, pp. 1037–1059 [žiūrėta 2021-05-17]. ISBN 9780123868824. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386882-4.00046-3>
57. RUTKAUSKAS, K., et al. 4-Amino-substituted Benzenesulfonamides as Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases. *Molecules* [interaktyvus]. 2014, 19(11), 17356–17380 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules191117356>
58. MAHDAVI, M., et al. Synthesis, biological evaluation and docking study of 3-aryoyl-1-(4-sulfamoylphenyl)thiourea derivatives as 15-lipoxygenase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* [žiūrėta 2021-05-20]. 2014, 82, 308–313 [žiūrėta 2021-05-20]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.054>
59. XIONG, G., et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research* [interaktyvus]. 2021 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
60. DONG, J., et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *Journal of Cheminformatics* [interaktyvus]. 2018, 10(29), 1–11 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x>
61. ZADOROZHNI, P. V., et al. Vadym V. Kiselev. In silico toxicity evaluation of Salubrial and its analogues. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2020, 155, 105538, [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105538>

62. VIEIRA, T. F., S. F. SOUSA. Comparing AutoDock and Vina in Ligand/Decoy Discrimination for Virtual Screening. *Applied sciences* [interaktyvus]. 2019, 9, 4538 [žiūrėta 2021-05-25]. Prieiga per doi:[10.3390/app9214538](https://doi.org/10.3390/app9214538)
63. LUCKNER, S. R., et al. A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry* [interaktyvus]. 2010, 285(19). 14330–14337 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi:[10.1074/jbc.M109.090373](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090373)
64. MARDIANINGRUM, R., et al. Docking and molecular dynamic study of isoniazid derivatives as anti-tuberculosis drug candidate. *Chemical Data Collections* [interaktyvus]. 2021, 32, 100647 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100647>
65. ZHANG, T., et al. Para-aminosalicylic acid increases the susceptibility to isoniazid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist* [interaktyvus]. 2019, 12, 825–829 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi:[10.2147/IDR.S200697](https://doi.org/10.2147/IDR.S200697)
66. PLECH, T., et al. Structure–activity Relationship Studies of Microbiologically Active Thiosemicarbazides Derived from Hydroxybenzoic Acid Hydrazides. *Chemical Biology and Drug Design* [interaktyvus]. 2015, 85(3), 315–325 [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1111/cbdd.12392>
67. KERANTZAS, C. A., W. R. JR. JACOBS. Origins of Combination Therapy for Tuberculosis: Lessons for Future Antimicrobial Development and Application. *mBio* [interaktyvus]. 2017, 8(2) [žiūrėta 2021-05-14]. Prieiga per: doi: [10.1128/mBio.01586-16](https://doi.org/10.1128/mBio.01586-16)
68. SMIRNOV, A. S., et al. Conformational stabilization of isatin Schiff bases – biologically active chemical probes. *Royal Society of Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 7, 10070 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per: doi: [10.1039/c6ra26779](https://doi.org/10.1039/c6ra26779)
69. BROWN, L., J. M. WOLF, R. PRADOS-ROSALES, A. CASADEVALL. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* [interaktyvus]. 2015, 13, 620–630 [žiūrėta 2021-05-26]. Prieiga per: doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>

Priedai

1 priedas. Projekto metu susintetintų darinių 4–24 farmakokinetinių savybių analizės rezultatai

Junginio numeris	Farmakokinetiniai parametrai			
	HIA	BBBP	P-gp baltymo giminingumas	CYP3A4 inhibicija
4	0,057	0,403	0,018	0,222
8a	0,159	0,160	0,157	0,319
8b	0,028	0,137	0,248	0,459
8c	0,070	0,072	0,799	0,253
8d	0,029	0,204	0,455	0,203
8e	0,068	0,004	0,894	0,217
9	0,035	0,596	0,934	0,020
11	0,584	0,023	0,002	0,025
12	0,176	0,022	0,001	0,078
13	0,311	0,013	0,001	0,043
14	0,904	0,017	0,001	0,690
15	0,790	0,015	0,001	0,887
16	0,853	0,009	0,001	0,836
18	0,011	0,087	0,025	0,015
19	0,007	0,025	0,009	0,325
20	0,004	0,017	0,001	0,846
21	0,008	0,033	0,002	0,201
22	0,005	0,012	0,002	0,514
23	0,011	0,118	0,190	0,577
24	0,014	0,022	0,001	0,640

2 priedas. Molekulinio modeliavimo, atlikto „AutoDock Tools 1.5.7” programa, rezultatai

Junginys	Suformuotų vandenilinių ryšių kiekis, vnt.	Aminorūgštys, dalyvaujančios vandenilinių ryšių susidaryme	Jungimosi energija, kcal/mol
4	2	Glu178:OE2	-3,04
8a	3	Arg177:HE, Arg177:HH12, Glu178:OE2	-5,19
8b	2	Arg177:HH12, Arg177:O	-4,64
8c	1	Ala157:HN	-4,06
8d	2	Glu178:OE2, Phe108:HN	-4,62
8e	1	Lys181:HZ1	-3,97
9	2	Phe108:HN, Arg225:O	-3,87
11	2	Gly205:O, Asn106:HD21	-3,23
12	2	Gln224:O, Lys181:HZ1	-4,37
13	2	Met155:O, Lys181:HZ1	-4,48
14	1	Phe108:HN	-4,65
15	1	Lys181:HZ1	-4,22
16	3	Arg177:HE, Arg177:HH12, Glu178:OE2	-5,16
18	1	Glu178:OE2	-4,17
19	2	Glu178:OE2, Ala157:HN	-3,71
20	2	Met155:O, Asn159:OD1	-4,29
21	2	Ile105:HN, Glu178:OE2	-4,36
22	2	Arg177:HE, Phe108:HN	-4,30
23	2	Lys181:HZ1, Phe108:HN	-3,92
24	2	Lys181:HZ1, Phe108:HN	-3,90
Izoniazidas	2	Glu178:OE2, Ala157:HN	-4,34
Etionamidas	1	Ala157:HN	-4,20