

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KITANOVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA KITANOVIĆ

**SINTEZA ETILSEČNINSKIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE
B Z BENZOTIAZOL-2,6-DIAMINSKIM OGRODJEM**

**SYNTHESIS OF ETHYLUREAS AS DNA GYRASE B
INHIBITORS BASED ON BENZOTHIAZOLE-2,6-DIAMINE
SCAFFOLD**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Encimska testiranja so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, vrednotenje protibakterijske aktivnosti pa na Univerzi v Helsinkih.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vso strokovno pomoč, vloženi trud, nasvete, vzpodbudne besede in prijaznost.

Največja zahvala gre staršem, ki so mi omogočili študij, me pri tem podpirali, spodbujali, mi ves čas stali ob strani ter verjeli vame.

Posebna zahvala je namenjena sestri in fantu, ki sta me z optimizmom, dobro voljo in nasmehom spremljala ter podpirala na moji poti.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Tina Kitanović

VSEBINA

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
1.1 BAKTERIJE	1
1.2 DNA	3
1.3 BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE II	5
1.3.1 DNA-giraza	5
1.3.2 Topoizomeraza IV	7
1.3.3 ATP-vezavno mesto	8
1.4 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	9
1.5 ODPORNOST BAKTERIJ	10
1.6 ZAVIRALCI TOPOIZOMERAZ TIPA IIA	11
1.6.1 Zaviralci GyrA in ParC	12
1.6.2 Zaviralci GyrB in ParE	12
1.6.3 Razvoj zaviralcev z etilsečninsko stransko verigo	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 REAGENTI IN TOPILA	19
3.2 KROMATOGRFSKE METODE	19
3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)	19
3.2.2 Kolonska kromatografija	19
3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	19
3.3 SPEKTROSKOPSKE IN SPEKTROMETRIJSKE METODE	20

3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	20
3.3.2 Infrardeča spektroskopija (IR)	20
3.3.3 Masna spektrometrija (MS).....	20
3.4 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA	20
3.5 POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN	20
3.6 MOLEKULSKO SIDRANJE	20
3.7 BIOKEMIJSKA TESTIRANJA	21
4 EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1 Sinteza etil 2-(2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)acetata	22
4.2 Sinteza 1-(6-aminobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)-3-etilsečnine	23
4.3 Sinteza 2-(2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetne kisline.....	25
4.4 Sinteza <i>terc</i> -butil (4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata.....	26
4.5 Sinteza 2-(2-aminotiazol-4-il)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)acetamida	28
4.6 Sinteza etil (4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata	30
4.7 Sinteza 3,4-dikloro- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	31
4.8 Sinteza metil 3-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata	33
4.9 Sinteza etil 2-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetata.....	34
4.10 Sinteza 2-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-2-oksoocetne kisline	36
4.11 Sinteza 3-(((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)metil)benzojske kisline	37
4.12 Sinteza etil 2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata.....	39

4.13 Sinteza 2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline...	40
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	42
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	42
5.1.1 Uvedba karbamatne zaščitne skupine Boc	42
5.1.2 Reakcija alkalne hidrolize	43
5.1.3 Tvorba amidne vezi s sklopitvenim reagentom.....	44
5.1.4 Odstranitev karbamatne zaščitne skupine z acidolizo.....	45
5.1.5 <i>N</i> -aciliranje spojin	46
5.1.6 Reduktivno aminiranje	46
5.2 PREGLED KONČNIH SPOJIN	47
5.3 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ	48
5.3.1 Encimski testi	48
5.3.2 Protibakterijska aktivnost.....	50
6 SKLEP	53
7 LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij.	2
Slika 2: Zgradba bakterijske celice.	2
Slika 3: Dvojna vijačnica DNA.	3
Slika 4: Prikaz kemijske zgradbe: a) enojne verige DNA in b) dvojne vijačnice DNA.	4
Slika 5: Shematski prikaz sproščene ter dodatno zvite oblike DNA.	4
Slika 6: Uvajanje dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNA s pomočjo DNA-giraze..	5
Slika 7: Kristalna struktura: a) GyrB ₂ iz <i>E. coli</i> v kompleksu z ADPNP ter b) GyrA ₂ iz <i>E. coli</i> v kompleksu s simociklinonom D8.	6
Slika 8: Katalitična aktivnost DNA-giraze.	7
Slika 9: Prikaz struktur homolognih podenot DNA-giraze in topoizomeraze IV.	7
Slika 10: Vezava ADPNP, nehidrolizirajočega analoga ATP, v ATP-vezavno mesto DNA-giraze in tvorba vodikovih vezi.	8
Slika 11: Prikaz ATP-vezavnega mesta v DNA-girazi.	9
Slika 12: Tarče protibakterijskih učinkovin.	10
Slika 13: Shematski prikaz različnih mehanizmov nastanka odpornosti bakterijske celice proti protibakterijskim učinkovinam.	11
Slika 14: Predstavnik fluorokinolonov, ki se trenutno uporabljajo v protibakterijski terapiji.	12
Slika 15: Predstavnik aminokumarinov, novobiocin in klorobiocin.	13
Slika 16: Optimizacija spojine 1 do benzimidazol sečnine 2	14
Slika 17: Optimiziran benzimidazol sečninski derivat spojine 2	14
Slika 18: Etilsečninski derivati z benzotiazolnim ogrodjem.	15
Slika 19: Interakcije etilsečninskih derivatov pri vezavi v ATP-vezavno mesto.	15
Slika 20: Struktura oroidina in novih zaviralcev DNA-giraze.	16
Slika 21: Prikaz vodikovih vezi, ki jih tvori etilsečninski fragment v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze.	17
Slika 22: Vezava zaščitne skupine Boc na amsko skupino.	42
Slika 23: Sinteza spojine 3 z alkalno hidrolizo in nakisanjem s HCl.	43
Slika 24: Sinteza spojin 16 in 19 z alkalno hidrolizo in nakisanjem s smolo Amberlite IR120 [®]	43

Slika 25: Mehanizem nastanka amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta EDC ter pomožnega nukleofila HOBt.	44
Slika 26: Nukleofilna substitucija ter nastanek HCl.	45
Slika 27: Kislinsko katalizirana odstranitev zaščite Boc.	45
Slika 28: <i>N</i> -aciliranje spojin 5 in 12	46
Slika 29: Sintezna pot nastanka spojine 17	46

KAZALO SHEM IN PREGLEDNIC

Shema 1: Reagenti in pogoji za sintezo spojine 3	17
Shema 2: Reagenti in pogoji sinteznega načrta spojin.	18
Preglednica I: Struktura končnih spojin.	47
Preglednica II: Zaviranje DNA-giraze iz <i>E. coli</i>	48
Preglednica III: Protibakterijska aktivnost sintetiziranih spojin.	51
Preglednica IV: Zaviranje rasti mutiranih sevov <i>E. coli</i>	52

POVZETEK

Odpornost bakterij proti trenutno dostopnim protibakterijskim učinkovinam se vse bolj povečuje, kar predstavlja resno grožnjo za zdravje ljudi. Pojav odpornih bakterijskih sevov je zato sprožil val prizadevanj za odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin, ki imajo poleg širokega spektra delovanja tudi ciljano delovanje na najbolj odporne seve bakterij. Pomembno tarčo učinkovin predstavlja encim DNA-giraza, ki sodeluje v procesih podvojevanja bakterijske molekule DNA, tako da katalizira uvajanje dodatnih negativnih zavojev ter s tem regulira stopnjo njene zvitosti. Encim sestavljata dve podenoti, giraza A in giraza B, ki skupaj tvorita heterodimerno strukturo A₂B₂. Podenota A sodeluje pri cepitvi in ponovni povezavi verig molekule DNA, medtem ko je podenota B odgovorna za vezavo in hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotovi zadostno količino energije za uvajanje dodatnih negativnih zavojev v plazmid. ATP-vezavno mesto na podenoti B predstavlja potencialno novo tarčo in nov mehanizem delovanja protibakterijskih učinkovin.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove etilsečninske ATP-kompetitivne zaviralce DNA-giraze B. Izhajali smo iz strukturnega tipa zaviralcev DNA-giraze, ki so bili razviti na Fakulteti za farmacijo, pri čemer smo ohranili centralni 2-amino-benzo[1,2-*d*]tiazolni skelet, druge dele molekule pa spreminjali. Uvajali smo substituyente, ki tvorijo interakcije z Asp73, Arg76 in Arg136, kar je ključno za doseganje močne zaviralne aktivnosti spojin. Z novim strukturnim tipom smo skušali izboljšati tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin in s tem doseči protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam. Kandidate za sintezo smo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur encima v kompleksu z zaviralci. Predvideno vezavo načrtovanih spojin pa smo proučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije *Escherichia coli*.

Uspešno smo sintetizirali 10 končnih spojin (**7**, **10-12**, **14-19**) in ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na rekombinantni DNA-girazi, protibakterijsko delovanje pa na izbranih bakterijskih sevih. Najboljše rezultate smo dobili s spojino **11** (IC₅₀ = 3,9 ± 0,1 μM), ki je imela največji odstotek zaviranja rasti izbranih bakterijskih sevov.

Čeprav smo od sintetiziranih etilsečninskih spojin pričakovali več, te vseeno predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo tega novega strukturnega razreda zaviralcev DNA-giraze.

KLJUČNE BESEDE: ATP-vezavno mesto, DNA-giraza, etilsečninski zaviralci, protibakterijske učinkovine, sidranje

ABSTRACT

The bacterial resistance to currently available antibacterial drugs is increasing, which presents a serious threat to human health. The emergence of the resistant bacterial strains has therefore caused a wave of efforts to detect new antibacterial drugs, which have ability to target the most resistant bacterial strains besides their broad spectrum activity. Enzyme DNA gyrase presents an important target for the antibacterial drugs. It is involved in the processes of the bacterial DNA replication by catalyzing the introduction of negative supercoils and therefore in the regulation of the level of DNA supercoiling. It consists of two subunits, gyrase A and gyrase B, which together form the heterodimeric structure A₂B₂. Subunit A participates in the cleavage and reunion of the DNA chains, while subunit B is responsible for the binding and hydrolysis of the ATP molecule, providing a sufficient amount of energy for introducing negative supercoils into the plasmid. The ATP binding site of subunit B represents a potentially new target and a new mode of action of antibacterial agents.

In the framework of this master's thesis, we synthesized the new etylurea-based ATP competitive inhibitors of DNA gyrase B. We started from the structural type of DNA gyrase inhibitors that were developed at the Faculty of Pharmacy, preserving the central 2-amino-benzo[1,2-*d*]thiazole scaffold and modifying the other parts of the molecule. We introduced the substituents that could form interactions with Asp73, Arg76 in Arg136, which are crucial for achieving a potent enzyme inhibition of compounds. With the new structural type we also tried to improve the physico-chemical properties of compounds and thus achieve antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Candidates for synthesis were designed using structure-based design, relying on known crystal structures of enzyme in complex with inhibitors. The predicted binding of the designed compounds was studied by molecular docking of ligands into the ATP binding site of *Escherichia coli* DNA gyrase.

We successfully synthesized 10 final compounds (**7**, **10-12**, **14-19**), which were evaluated for their inhibitory activity on recombinant *E. coli* DNA gyrase and their antibacterial activity on selected bacterial strains. The best results were obtained with the compound **11** (IC₅₀ = 3.9 ± 0.1 μM), which had the highest percentage of growth inhibition of selected bacterial strains.

Although we expected more from these ethylurea compounds, they present an important starting point for the further optimization of this new structural class of DNA gyrase inhibitors.

KEYWORDS: ATP binding site, DNA gyrase, ethylurea inhibitors, antibacterial drugs, docking

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCl	acetilklorid
ADPNP	5'-adenilil- β,γ -imidodifosfat
AK	aminokislina, aminokislinski
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil-
Boc₂O	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat
DKM	diklorometan
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO-<i>d</i>₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	ionizacija z razprševanjem
Et₃N	triethylamin
EtOH	etanol
Eq	ekvivalent
G-, G+	po Gramu negativen, po Gramu pozitiven
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
HTS	reševanje visoke zmogljivosti
IC₅₀	koncentracija zaviralca, ki zavre delovanje encima za 50 %
IR	infrardeča spektroskopija
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NaCNBH₃	natrijev cianoborohidrid
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin

NMR	jedrska magnetna resonanca
RA	rezidualna aktivnost
R_f	retencijski faktor
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ParC	podenota C topoizomeraze IV
ParE	podenota E topoizomeraze IV
Pd/C	paladij na ogljiku
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija

1 UVOD

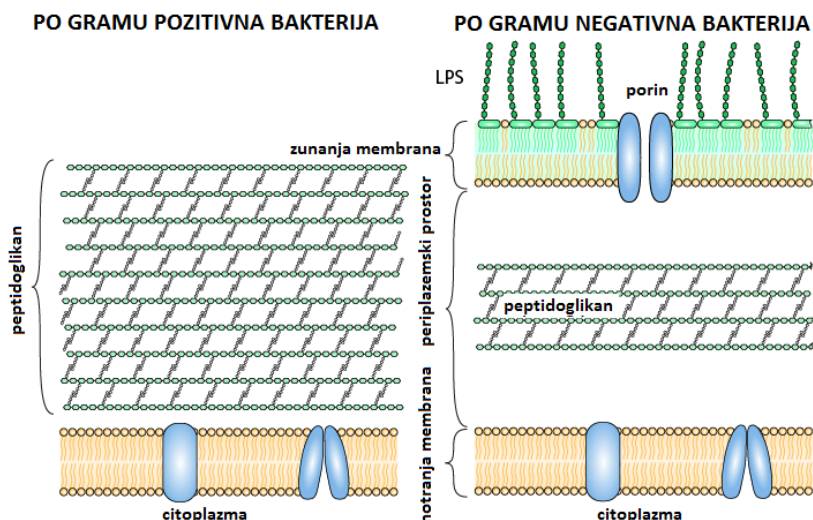
Mikroorganizmi so prisotni praktično vsepovsod. Najdemo jih v zraku, zemlji, vodi, hrani in na površinah ljudi, živali ter rastlin. Na milijarde mikroorganizmov je stalno prisotnih tudi v človeškem organizmu (1). Delimo jih na prokariotske in evkariotske mikrobe ter glive (2). Med prokariote, ki so nizko na evolucijskem deblu, a kljub temu najbolj razširjeni in pogosti organizmi na Zemlji, uvrščamo bakterije (2, 3). Bakterije so lahko za človeka zelo koristne, saj kot male biološke tovarne proizvajajo številne koristne produkte, hkrati pa ljudem, živalim in rastlinam lahko povzročajo tudi precejšnjo škodo in bolezni (1).

Pred bakterijami in pojavom bolezni nas velikokrat uspe ubraniti naš obrambni sistem. Kadar pa so bakterije preveč agresivne ali naše obrambne sposobnosti oslabijo, se pojavi bolezen. Bakterijske okužbe zdravimo s protibakterijskimi učinkovinami (4). Njihova poraba je močno povezana z odpornostjo bakterij nanje. Ta se vse bolj povečuje, zato jih moramo predpisovati preudarno (5). Odpornost bakterij predstavlja resno nevarnost za zdravje ljudi, saj številne med njimi postajajo multirezistentne proti trenutno razpoložljivim protibakterijskim učinkovinam (6, 7).

Da bi v prihodnosti uspešno premagali odporne bakterijske seve, moramo razvijati nove protibakterijske učinkovine z novimi mehanizmi oziroma novimi tarčami delovanja (8). To je vsekakor eden od največjih izzivov sodobne medicine (5).

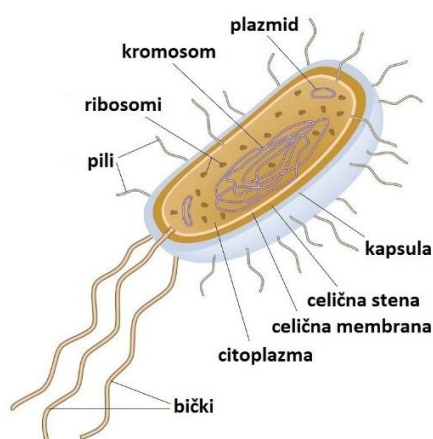
1.1 BAKTERIJE

Glede na zgradbo celične stene ter barvanje po Gramu bakterije razdelimo na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne (Slika 1), glede na njihove oblike pa na kroglaste (koki), paličaste (bacili) in spiralne (spirile) (2, 3).



Slika 1: Struktura celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij; prirejeno po (9). LPS – lipopolisaharid.

Celične sestavine bakterij obdajata celična membrana in precej toga celična stena, nekatere pa prekriva še bakterijska kapsula, ki jih ščiti pred neugodnim okoljem. Zunanja površina je večkrat prekrita z bički, ki so nujni za premikanje, ter pili, s katerimi se pritrjujejo na površine ali preko katerih si nekatere bakterije izmenjujejo DNA med spolnim razmnoževanjem. V notranjosti je citoplazma, kjer so ribosomi ter zvita DNA. Vsaka bakterijska celica ima samo en kromosom (3). Zgradba bakterijske celice je shematsko prikazana na Sliki 2.



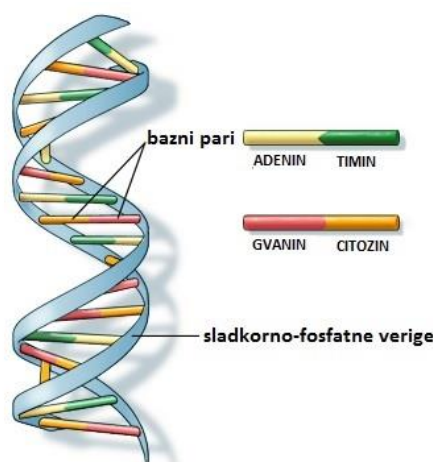
Slika 2: Zgradba bakterijske celice; prirejeno po (10).

Nekatere bakterije lahko oblikujejo tudi endospore, posebno obliko celic, ki so odporne na neugodne vplive iz okolja (2).

Za rast, razmnoževanje, biosintezo in druge procese, ki ohranjajo ravnovesje v bakterijski celici, je značilna konstantna poraba energije. Najpogostejši vir le-te predstavljajo visokoenergijske fosfatne vezi ATP, ki deluje kot univerzalni prenašalec kemične energije (2).

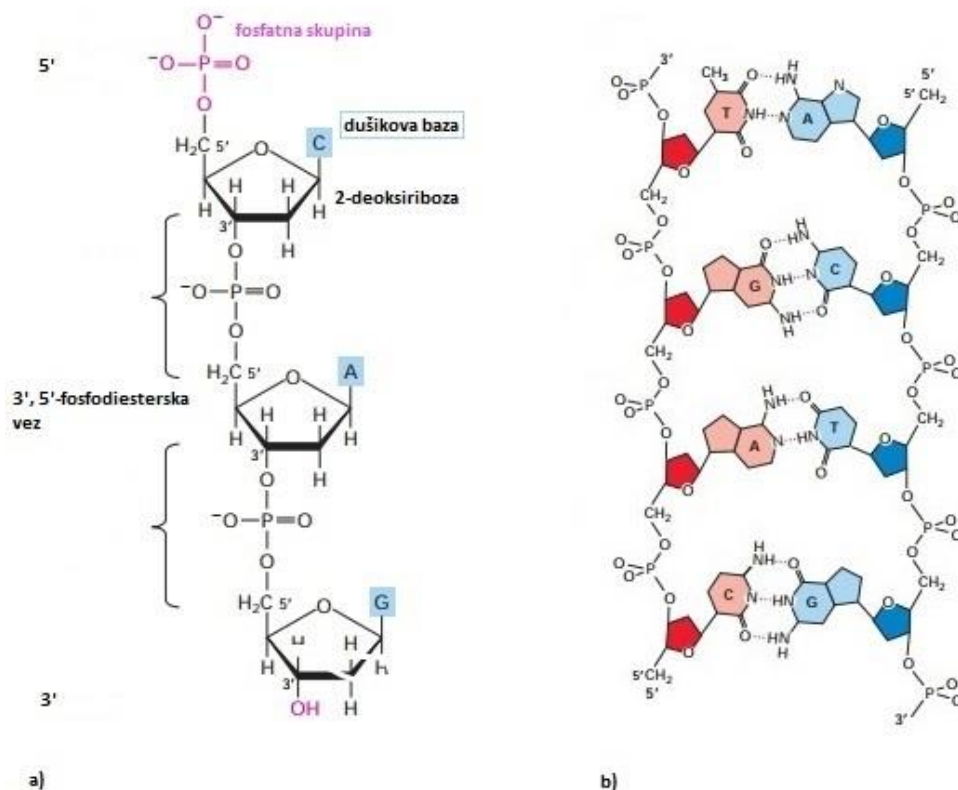
1.2 DNA

Prvič so molekulo DNA izolirali iz biološkega materiala leta 1868, a takrat še niso vedeli, da ta molekula sodeluje pri prenosu genetskih informacij. Kasneje so s pomočjo številnih raziskav ugotovili, kako pomembna je njena vloga v telesu ter določili njeno natančno 3D strukturo in zgradbo (Slika 3) (3).



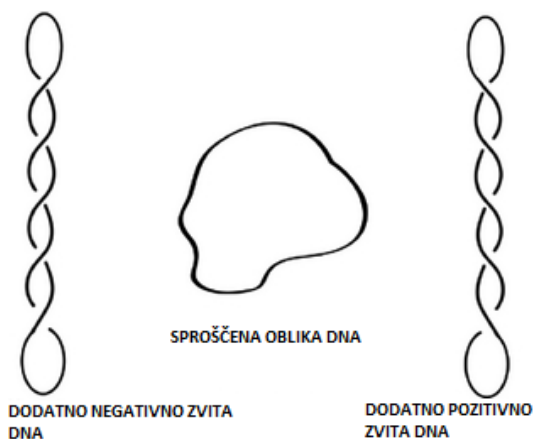
Slika 3: Dvojna vijačnica DNA; prirejeno po (11).

Molekula DNA je nukleinska kislina, zgrajena iz monomernih enot oz. nukleotidov (Slika 4). Posamezen nukleotid je sestavljen iz treh komponent, in sicer iz dušikove baze purina ali pirimidina, ogljikovega hidrata 2-deoksiriboze ter ene, dveh ali treh fosfatnih skupin. Nukleotidi so med seboj povezani s 3', 5'-fosfodiestersko vezjo, ki jo tvorita 5'-fosfatna skupina enega nukleotida in 3'-OH skupina naslednjega nukleotida in je ključna za nastanek kovalentnega ogrodja DNA. Molekulo sestavljata dve komplementarni polinukleotidni verigi, zviti v dvojno vijačnico. Verigi, ki sta oviti druga okoli druge, sta antiparalelni, kar pomeni, da njune 3', 5'-fosfodiesterske povezave tečejo v nasprotnih smereh (3, 12). Molekula DNA prokariontov je tesno zvita v klobčič, ki prosto plava v citoplazmi (2, 3).



Slika 4: Prikaz kemijske zgradbe: a) enojne verige DNA in b) dvojne vijačnice DNA; prirejeno po (12).

Ugotovili so, da obstajata dve različni obliki DNA, in sicer sproščena ter dodatno zvita, ki ni tako stabilna kot prva (Slika 5). Dodatno zvitje v pozitivno ali negativno smer omogoča molekuli, da postane bolj kompaktna in tako v celici zavzame manj prostora, vpliva pa tudi na samo podvojevanje in prepisovanje DNA. Pretvarjanje med obema oblikama oziroma spremembo topologije DNA katalizirajo encimi topoizomeraze (3, 12).



Slika 5: Shematski prikaz sproščene ter dodatno zvite oblike DNA; prirejeno po (13).

1.3 BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE II

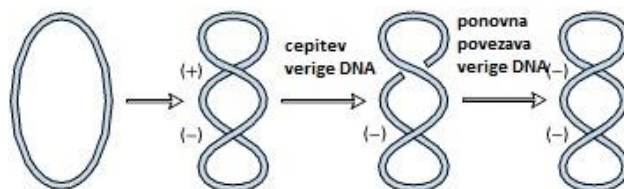
Topoizomeraze so encimi, ki uravnavajo stopnjo zvitja molekule DNA in so bistvenega pomena za preživetje celice (7, 8, 14). Ločimo topoizomeraze tipa I, ki katalizirajo prekinitev le ene verige molekule DNA, ter topoizomeraze tipa II, ki katalizirajo prekinitev obeh verig hkrati (8, 15).

Topoizomeraze tipa II so klinično uveljavljene tarče za odkrivanje in razvoj protibakterijskih učinkovin (7). V to skupino encimov uvrščamo DNA-girazo in topoizomerozo IV (7, 16). Gre za bakterijski topoizomerazi tipa IIA, ki sta vključeni v proces uravnavanja zvitja DNA med njenim podvojevanjem, prepisovanjem in popravljanjem (8, 14). Ker ju najdemo samo v bakterijskih celicah, ne pa tudi v človeških, predstavljata z vidika selektivne toksičnosti zelo dobro tarčo za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin (14).

1.3.1 DNA-giraza

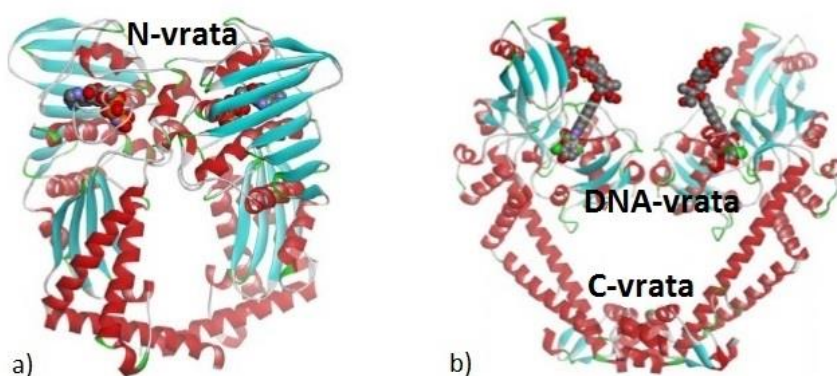
Encim DNA-giraza sodeluje v procesih podvojevanja krožne bakterijske molekule DNA, tako da katalizira uvajanje dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA, s tem pa zmanjšuje torzijsko napetost (8, 17, 18). Za svojo aktivnost potrebuje energijo, ki nastane pri hidrolizi molekule ATP (17, 18).

Sestavljena je iz dveh podenot, giraze A (GyrA) in giraze B (GyrB), ki skupaj tvorita heterodimerno strukturo A_2B_2 . Podenota GyrA sodeluje pri cepitvi in ponovni povezavi verig molekule DNA, medtem ko je podenota GyrB odgovorna za hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotavlja zadostno količino energije, ki je potrebna za uvajanje negativnih zavojev v krožno molekulo DNA (8, 14, 18). V enem ciklu reakcije se vpeljeta dva negativna zavoja (Slika 6).



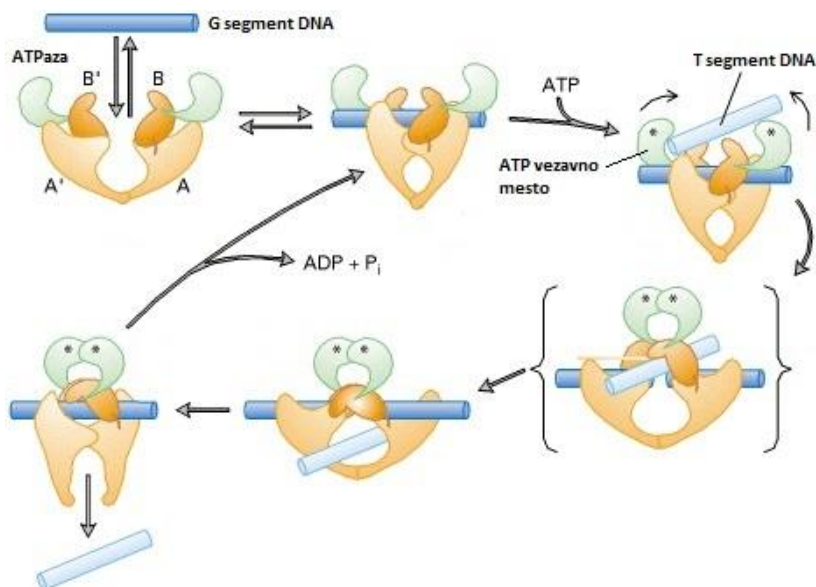
Slika 6: Uvajanje dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNA s pomočjo DNA-giraze. Nastane stabilna struktura DNA z dvema dodatnima negativnima zavojema; prirejeno po (19).

Kristalna struktura celotnega encima do danes še ni znana, so pa znane kristalne strukture njegovih posameznih fragmentov. S pomočjo teh in znane kristalne strukture homologne človeške topoizomeraze II so identificirali tri področja encimske molekule: N-vrata, DNA-vrata in C-vrata (Slika 7). N-vrata sodelujejo pri vezavi molekule ATP, DNA-vrata pri pretrganju in ponovni združitvi verig DNA, C-vrata pa pri odstranitvi DNA iz katalitičnega mesta encima. Omenjena vrata se zaporedno odpirajo in zapirajo ter tako omogočajo prehajanje dvojne vijačnice DNA med posameznimi fazami katalitičnega cikla (8, 20).



Slika 7: Kristalna struktura: a) GyrB₂ iz *E. coli* v kompleksu z ADPNP ter b) GyrA₂ iz *E. coli* v kompleksu s simociklinom D8; prirejeno po (8). Simociklinon D8 – zaviralec DNA-giraze.

V prvi fazi katalitičnega cikla se molekula DNA veže v katalitično mesto DNA-giraze, temu pa sledi vezava molekule ATP v ATP-vezavno mesto, kar spremeni in zapre konformacijo encima ter tako omogoči nadaljnje procese pretrganja in ponovne združitve verig DNA. Po uvedbi dodatnega negativnega zavoja v molekulo DNA, s pomočjo sproščene energije ob hidrolizi ATP, se v zadnji fazi katalitičnega cikla konformacija encima vrne v prvotno obliko in spremenjena molekula DNA se sprosti (18, 20, 21). Katalitični cikel DNA-giraze prikazuje Slika 8.

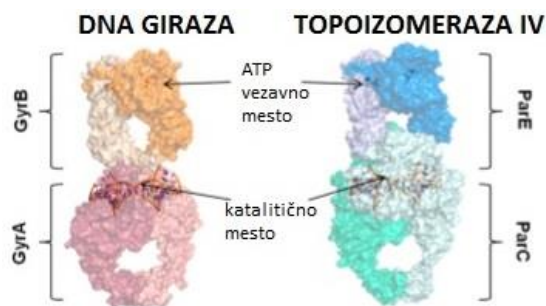


Slika 8: Katalitična aktivnost DNA-giraze; prirejeno po (19).

DNA-girazo najdemo samo v prokariotskih organizmih, zato predstavlja z vidika selektivne toksičnosti odlično tarčo za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin (17, 20).

1.3.2 Topoizomeraza IV

Encim topoizomeraza IV nadzoruje dodatno zvijanje molekule DNA ter razpletanje hčerinskih verig ob koncu podvojitve DNA (7, 8, 20). Sestavljena je iz dveh podenot C (ParC) in dveh podenot E (ParE), ki sta homologni podenotama GyrA in GyrB. Skupaj tvorita heterodimerno strukturo C_2E_2 (Slika 9). Podenota ParC sodeluje pri pretvarjanju DNA iz sproščene v dodatno zvito obliko, podenota ParE pa pri vezavi in hidrolizi ATP (7, 16).



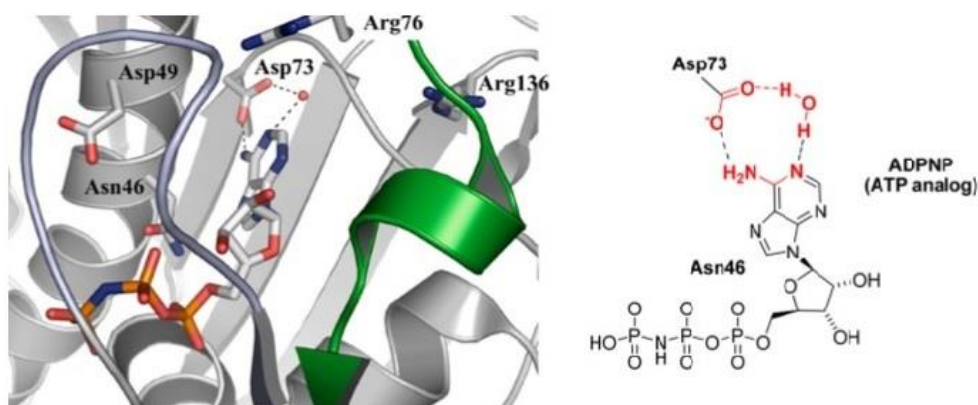
Slika 9: Prikaz struktur homolognih podenot DNA-giraze in topoizomeraze IV; prirejeno po (22).

1.3.3 ATP-vezavno mesto

Kot smo že omenili, celotni kristalni strukturi DNA-giraze in topoizomeraze IV še nista znani, so pa določili kar nekaj kristalnih struktur fragmentov njunih podenot v kompleksih z različnimi ligandi (8).

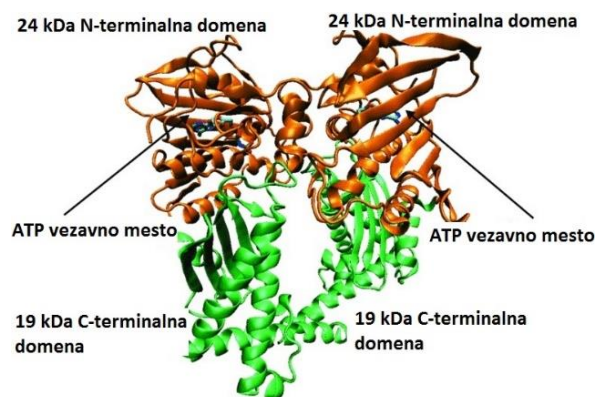
Tako so leta 1991 objavili prvo kristalno strukturo fragmenta GyrB, in sicer v kompleksu z ADPNP, nehidrolizirajočim analogom ATP. Natančneje, določili so kristalno strukturo 43 kDa velikega N-končnega fragmenta GyrB v omenjenem kompleksu. V naslednjih letih so določali kristalne strukture fragmentov GyrB v kompleksih z različnimi strukturnimi razredi zaviralcev DNA-giraze. Leta 1996 so uspeli določiti kristalno strukturo 24 kDa velikega N-končnega fragmenta GyrB v kompleksu z novobiocinom, leto kasneje pa še s klorobiocinom (22).

Na podlagi teh kristalnih struktur so lahko natančno raziskali ATP-vezavno mesto in ugotovili, katere interakcije med encimom in ligandom so pomembne za delovanje encima (8, 22). Povezava med strukturo in delovanjem kaže na to, da sta zelo pomembni vodikovi vezi, ki ju molekula ATP tvori z aminokislinskim ostankom Asp73, in sicer eno neposredno z adeninskim obročem, drugo pa posredno, preko molekule vode (Slika 10). Pomembne so tudi hidrofobne interakcije adenina in riboze z aminokislinskimi (AK) ostanki Ile78, Ile94 ter Val120. Zaviralci DNA-giraze običajno tvorijo še dodatno vodikovo vez z Arg136, ki njihovo vezavo z encimom še bolj stabilizira in ojača (7, 22).



Slika 10: Vezava ADPNP, nehidrolizirajočega analoga ATP, v ATP-vezavno mesto DNA-giraze in tvorba vodikovih vezi; prirejeno po (22).

ATP-vezavno mesto (Slika 11) predstavlja zanimivo tarčo za vezavo majhnih molekul, ki tvorijo tako polarne kot hidrofobne interakcije z AK ostanki v vezavnem mestu DNA-giraze, s tem pa tudi odlično izhodišče za odkrivanje in razvoj novih protibakterijskih učinkovin (22).



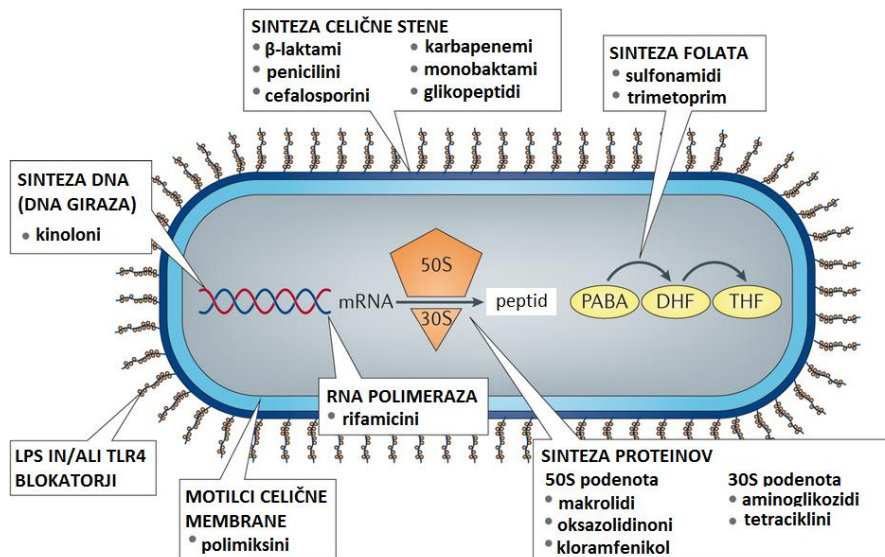
Slika 11: Prikaz ATP-vezavnega mesta v DNA-girazi; prirejeno po (23).

1.4 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Era antibiotikov se je začela v tridesetih letih 20. stoletja, ko so jih odkrivali enega za drugim. Čeprav se je zdravljenje bakterijskih okužb s plesnimi začelo že veliko prej, velja penicilin za prvi pravi antibiotik (24).

Antibiotiki so zdravila, ki vsebujejo protibakterijske učinkovine in se uporabljajo za zdravljenje bakterijskih okužb (4, 25). Glede na spekter njihovega delovanja jih delimo na antibiotike širokega spektra, ki delujejo na več različnih vrst bakterij, ter antibiotike ozkega spektra, ki delujejo samo na posamezno vrsto bakterij (4).

Protibakterijske učinkovine delujejo na bakterijske celice na različne načine (Slika 12). Prizadenejo lahko sintezne poti nukleinskih kislin, celičnih sten in znotrajceličnih proteinov, vplivajo pa lahko tudi na dejavnost celične membrane (4, 24). Delujejo lahko bakteriostatično, kar pomeni, da zavirajo bakterijsko rast in razmnoževanje, ali pa baktericidno, kadar povzročijo smrt bakterijske celice. Nekatere učinkovine izkazujejo oba načina delovanja, in sicer v nižjih koncentracijah delujejo bakteriostatično, v višjih pa baktericidno (26).



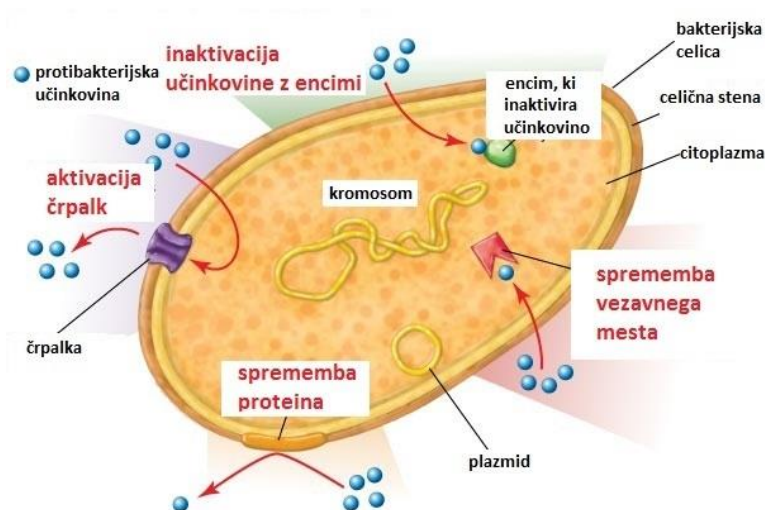
Slika 12: Tarče protibakterijskih učinkovin; prirejeno po (27).

Proti protibakterijskim učinkovinam pa lahko bakterije razvijejo odpornost, zato jih je nujno predpisovati previdno in jih pravilno uporabljati (24).

1.5 ODPORNOST BAKTERIJ

Odpornost bakterij proti protibakterijskim učinkovinam povzroči izgubo njihovih sposobnosti uničevanja bakterij, zaustavitve njihove rasti ali razmnoževanja. Nekatere bakterije so že naravno odporne proti določenim protibakterijskim učinkovinam, a težave nastanejo predvsem takrat, ko do odpornosti pride zaradi različnih mutacij genov bakterij, ki so sicer v normalnih okoliščinah na te protibakterijske učinkovine občutljive. Posledično se lahko podaljša trajanje bolezni, lahko pa pride celo do smrti, saj postane okužba neozdravljiva (25).

Tovrstno odpornost pridobijo bakterije preko različnih mehanizmov: sprememba vezavnega mesta; pojav črpalk, ki učinkovino odstranijo iz celice; pojav encimov, ki učinkovino razgradijo; sprememba presnovnih poti v bakterijski celici; zmanjšanje celične prepustnosti; itd. (Slika 13) (4, 18, 28).



Slika 13: Shematski prikaz različnih mehanizmov nastanka odpornosti bakterijske celice proti protibakterijskim učinkovinam; prirejeno po (28).

Pojav odpornih bakterijskih sevov proti trenutno dostopnim protibakterijskim učinkovinam je sprožil val prizadevanj za odkrivanje novih učinkovin (18). Obstaja namreč nevarnost, da povsem običajne, do danes ozdravljive okužbe, kmalu ne bodo več obvladljive. Brez učinkovitih protibakterijskih učinkovin bi se lahko vrnil v obdobje, ko so bile okužbe neozdravljive ter presaditve organov, kemoterapije in drugi zdravstveni postopki zato neizvedljivi (25).

Vpliva protibakterijskih učinkovin na razvoj odpornosti bakterij ne moremo v celoti preprečiti, a s pravilnim predpisovanjem in jemanjem protibakterijskih učinkovin lahko to možnost znatno zmanjšamo (4).

1.6 ZAVIRALCI TOPOIZOMERAZ TIPA IIA

Naraščanje odpornosti bakterij proti trenutno dostopnim protibakterijskim učinkovinam ter slabe fizikalno-kemijske lastnosti in toksičnost teh učinkovin omejujejo njihovo uporabo in terapevtsko učinkovitost. Zato je nujno potreben razvoj novih protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja na topoizomerase tipa IIA (7, 16).

Zaradi strukturne podobnosti DNA-giraze in topoizomerase IV zaviralci topoizomeras IIA običajno zavirajo oba encima, le z različno afiniteto, ki pa je odvisna od kemijskega razreda zaviralca in vrste bakterijskega seva (8, 16). Fluorokinoloni, ki so danes edini v terapiji

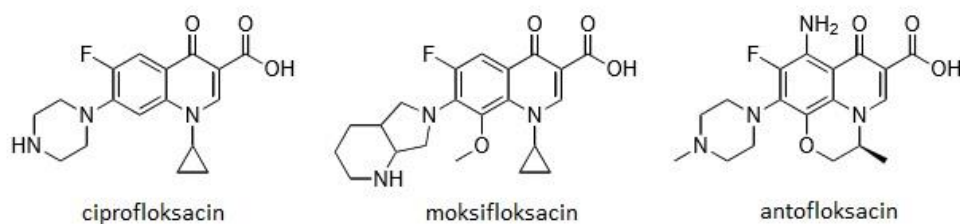
uporabljeni zaviralci teh dveh encimov, delujejo pri G- bakterijah predvsem na DNA-girazo, pri G+ bakterijah pa je njihova primarna tarča topoizomeraza IV (8, 22).

Dvojno ciljanje protibakterijskih učinkovin, ki ga omogoča strukturna podobnost topoizomeraz IIA, tako pripomore k zmanjševanju možnosti razvoja odpornosti bakterij (7, 29). Te namreč težje razvijejo odpornost, saj se morata spremeniti dva različna tarčna gena znotraj ene generacije bakterij. Strukturna podobnost obeh encimov med različnimi sevi bakterij pa omogoča razvoj zaviralcev s širokim spektrom delovanja (8).

1.6.1 Zaviralci GyrA in ParC

Zaviralci GyrA in ParC zavirajo DNA-girazo in topoizomerazo IV tako, da stabilizirajo nastali kompleks med podenoto GyrA oziroma ParC in molekulo DNA ter tako preprečijo ponovno združitev verig DNA in njihovo podvojevanje (8, 16).

Kot smo že omenili, so trenutno edini v terapiji uporabljeni zaviralci GyrA/ParC fluorokinoloni (ciprofloksacin, moksifloksacin, antofloksacin), ki imajo širok spekter uporabe (Slika 14). Uporabljajo se za zdravljenje urinarnih, respiratornih in sistemskih okužb. Delujejo tako bakteriostatično kot baktericidno. Poleg preprečevanja podvojevanja DNA namreč povzročajo tudi poškodbe DNA, sintezo nepopolnih proteinov ter oksidativne poškodbe. Resno težavo pa predstavlja pojav proti fluorokinolonom odpornih bakterijskih sevov, zato je nujno iskanje novih protibakterijskih učinkovin z novimi tarčami in mehanizmi delovanja (8, 18).



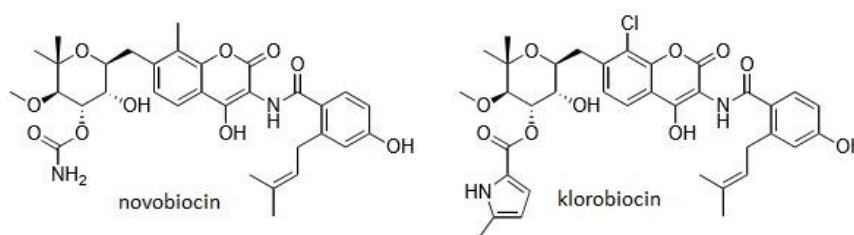
Slika 14: Predstavniki fluorokinolonov, ki se trenutno uporabljajo v protibakterijski terapiji; prirejeno po (8).

1.6.2 Zaviralci GyrB in ParE

Zaviralci GyrB in ParE zavirajo DNA-girazo in topoizomerazo IV tako, da tekmujejo z molekulo ATP za vezavo na podenoto GyrB oziroma ParE, s čimer preprečijo hidrolizo

molekule ATP in s tem funkcijo encima zaradi nezadostne količine energije, ki je nujna za spreminjanje topologije DNA (8, 16, 21).

Mednje uvrščamo aminokumarine, npr. klorobiocin in novobiocin, ki so zaviralci DNA-giraze naravnega izvora (Slika 15). Novobiocin ima močno protibakterijsko aktivnost proti G⁺ bakterijam, zato so ga nekaj časa uporabljali za zdravljenje okužb z MRSA. Zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti, toksičnosti in razvoja odpornosti bakterij pa ga danes v terapiji ne uporabljamo več (8, 16, 21).



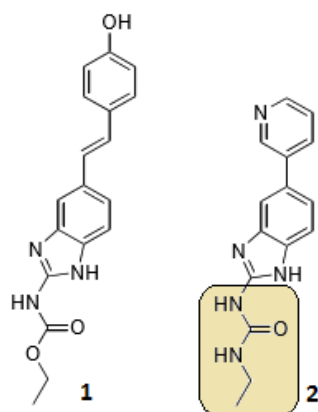
Slika 15: Predstavnik aminokumarinov, novobiocin in klorobiocin; prirejeno po (8).

Pojav proti aminokumarinom odpornih bakterijskih sevov vodi v načrtovanje in sintezo njihovih novih derivatov, s čimer želimo izboljšati njihovo protibakterijsko aktivnost ter fizikalno-kemijske lastnosti, hkrati pa se izogniti razvoju bakterijske odpornosti nanje (8, 21).

1.6.3 Razvoj zaviralcev z etilsečninsko stransko verigo

S pomočjo rešetanja visoke zmogljivosti (HTS) so odkrili nov strukturni razred ATP-kompetitivnih zaviralcev GyrB in ParE, in sicer spojine z etilsečninsko stransko verigo (8, 22). Razpoložljivost kristalnih struktur podenot GyrB in ParE v kompleksu z ADPNP in zaviralci ter natančna analiza pretežno hidrofobnega ATP-vezavnega žepa zagotavljata odlično izhodišče za optimizacijo tovrstnih spojin (8).

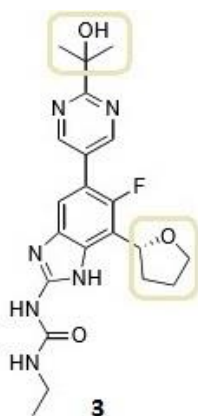
Spojino **1** (Slika 16), ki izkazuje zmerno afiniteto do DNA-giraze iz *Staphylococcus aureus* in *E. coli* in povzroča njeno zaviranje ter izkazuje šibko protibakterijsko aktivnost proti *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* in *Haemophilus influenzae*, so optimizirali z namenom izboljšanja njene zaviralne ter protibakterijske aktivnosti. Karbamatni del molekule so zamenjali z etilsečninskim ter na ta način dosegli boljše zaviranje DNA-giraze, šibko zaviranje topoizomeraze IV in boljšo protibakterijsko aktivnost. Spojina **2** (Slika 16) tako predstavlja prvo generacijo benzimidazol sečnin (8, 22).



Slika 16: Optimizacija spojine **1** do benzimidazol sečnine **2**; prirejeno po (8).

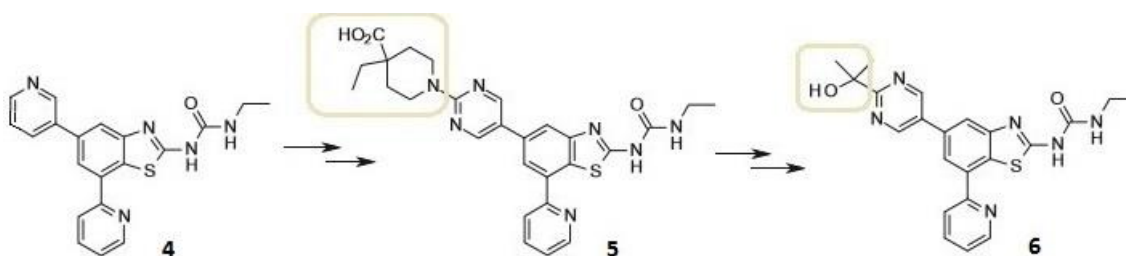
Vezavo spojine **2** oz. etilsečninskega fragmenta v ATP-vezavno mesto DNA-giraze so dokazali z rentgensko kristalografijo. Dokazali so tvorbo dveh vodikovih vezi etilsečninskih skupin NH z Asp73 in tvorbo dodatne vodikove vezi med benzimidazolnim atomom *N* in Asp73 preko molekule vode. Vodikova vez se tvori tudi med piridinskim obročem in stransko verigo Arg136. Poleg tega so ugotovili, da imajo pomembno vlogo tudi intramolekulske vezi, ki jih tvori imidazolni del molekule, saj poskrbijo za ustrezno usmerjenost etilsečninskega fragmenta v vezavnem mestu ter močnejšo vezavo (21, 22).

Naslednjo generacijo benzimidazol sečnin z dvojnimi tarčnim delovanjem predstavlja spojina **3** (Slika 17) (8, 22, 30). Z uvedbo alkoholnega fragmenta ter tetrahidrofuranske skupine so preusmerili metabolizem reaktivne etilsečninske skupine, s tem pa tvorbo reaktivnega metabolita na druga, manj reaktivna mesta v molekuli. Tako so izboljšali presnovni profil spojine in zmanjšali njeno vezavo na jetrne proteine (30). Spojina **3** izkazuje dobro zaviranje DNA-giraze in topoizomeraze IV iz *S. aureus* ter dobro protibakterijsko aktivnost proti G⁺ patogenom (8, 22, 30).



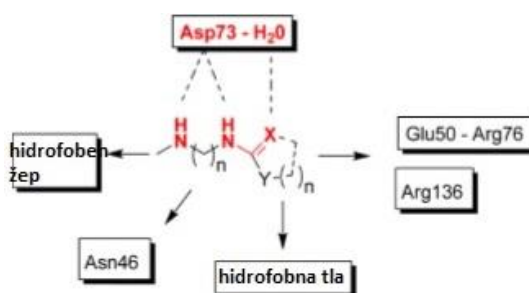
Slika 17: Optimiziran benzimidazol sečninski derivat spojine **2**; prirejeno po (8).

Sledili so še drugi poskusi optimizacije spojin z zamenjavo benzimidazolnega ogrodja. Tako so razvili nove strukturne tipe etilsečninskih derivatov s triazolpiridinskim, imidazolpiridinskim ter benzotiazolnim ogrodjem. Nov strukturni razred etilsečninskih derivatov z benzotiazolnim ogrodjem predstavlja spojina **4** (Slika 18), ki ima močno protibakterijsko aktivnost proti G⁺ bakterijam, a slabo topnost (22, 32). Slednjo so poskušali izboljšati z uvajanjem hidrofilne karboksilne skupine na mestu C⁵ (spojina **5**) (Slika 18), a je ta sprememba poleg boljše topnosti povzročila tudi neželjeno vezavo spojine na plazemske proteine (22). Kislinski del na mestu C⁵ so nato zamenjali z alkoholnim fragmentom (spojina **6**) (Slika 18), na mestu C⁷ pa uvedli hidrofilne substituentne. Na ta način so še izboljšali njeno protibakterijsko aktivnost proti G⁺ bakterijam, učinkovitost *in vivo* ter farmakokinetične lastnosti in dosegli manjšo vezavo na proteine. Ta strukturni razred etilsečninskih derivatov zato predstavlja odlično izhodišče za razvoj spojin, ki so kandidatke za klinična testiranja (32).



Slika 18: Etilsečninski derivati z benzotiazolnim ogrodjem; prirejeno po (32).

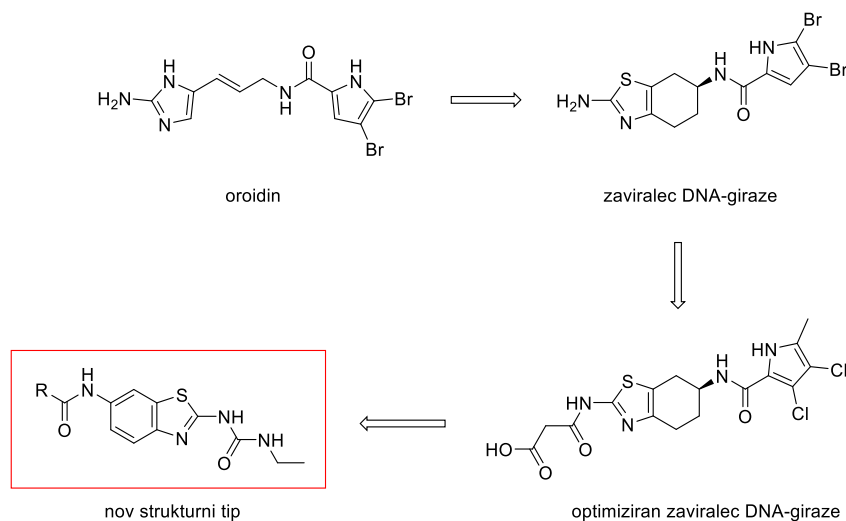
Heterociklične etilsečninske spojine torej izkazujejo močno dvojno tarčno delovanje na GyrB in ParE ter posledično močno protibakterijsko aktivnost (33). Pri vezavi v ATP-vezavno mesto oponašajo vezavo adeninskega obroča molekule ATP, dodatne hidrofobne interakcije pa tvorijo še z AK iz hidrofobnih tal ATP-vezavnega mesta ter s stranskimi verigami Arg76 in Arg136 (Slika 19) (21, 22).



Slika 19: Interakcije etilsečninskih derivatov pri vezavi v ATP-vezavno mesto; prirejeno po (22).

2 NAMEN DELA

Pri eksperimentalnem delu bomo načrtovali in sintetizirali nove potencialne etilsečninske ATP-kompetitivne zaviralce DNA-giraze B. Izhajali bomo iz novega strukturnega tipa zaviralcev tega encima, ki so jih nedavno odkrili in sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. Ohraniti nameravamo centralni 2-amino-benzo[1,2-*d*]tiazolni skelet, druge dele molekule pa bomo spreminjali (Slika 20).



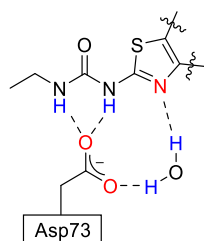
Slika 20: Struktura oroidina in novih zaviralcev DNA-giraze.

Kandidate za sintezo bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur encima v kompleksu z njegovimi zaviralci. Predvideno vezavo načrtovanih spojin bomo proučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP-vezavno mesto DNA-giraze.

Povezava med strukturo in delovanjem ter študije sidranja že znanih zaviralcev v ATP-vezavno mesto DNA-giraze kažejo na to, da je substituiran pirolamidni del zaviralca ključen za njegovo aktivnost, saj tvori dve vodikovi vezi z Asp73, in sicer eno neposredno, drugo pa preko molekule vode, ter dodatne hidrofobne interakcije. Substituenti na amski skupini na mestu 2 pa tvorijo interakcije z Arg136 (številčenje aminokislin v DNA-girazi iz *E. coli*).

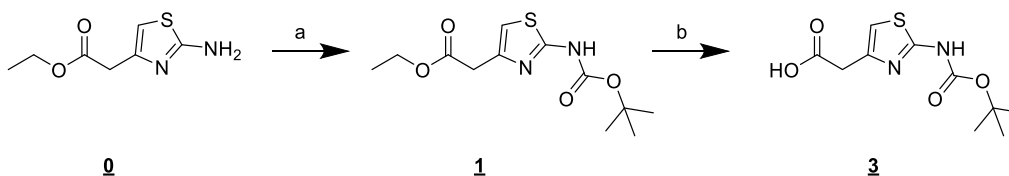
Nove potencialne zaviralce DNA-giraze bomo zato načrtovali tako, da bomo pirolamidni del molekule zamenjali z etilsečninskim, saj so vezavo tega fragmenta v ATP-vezavno mesto DNA-giraze in tvorbo vodikovih vezi z Asp73 (Slika 21) dokazali z rentgensko kristalografijo. Primerjava vezave pirolamidne in etilsečninske skupine kaže, da tvori slednja eno vodikovo vez več, kar bi lahko ugodno prispevalo k jakosti vezave. Na amsko skupino

na mestu 6 nameravamo uvajati substituentne za interakcijo z Arg76 in/ali Arg136, s čimer želimo izboljšati aktivnost spojin na encimu, z optimizacijo fizikalno-kemijskih lastnosti pa doseči protibakterijsko aktivnost tako proti G⁺ kot tudi G⁻ bakterijam. Končnim sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *E. coli*, jakost protibakterijskega delovanja pa na bakterijah *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ter *E. coli*.



Slika 21: Prikaz vodikovih vezi, ki jih tvori etilsečninski fragment v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze.

Sintezo pot bomo začeli s sintezo 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetne kisline (**3**) (Shema 1). Izhajali bomo iz etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetata (**0**), pri katerem bomo uvedli zaščito Boc na amsko skupino. Zaščiteno spojino **1** bomo nato hidrolizirali do kisline **3**.



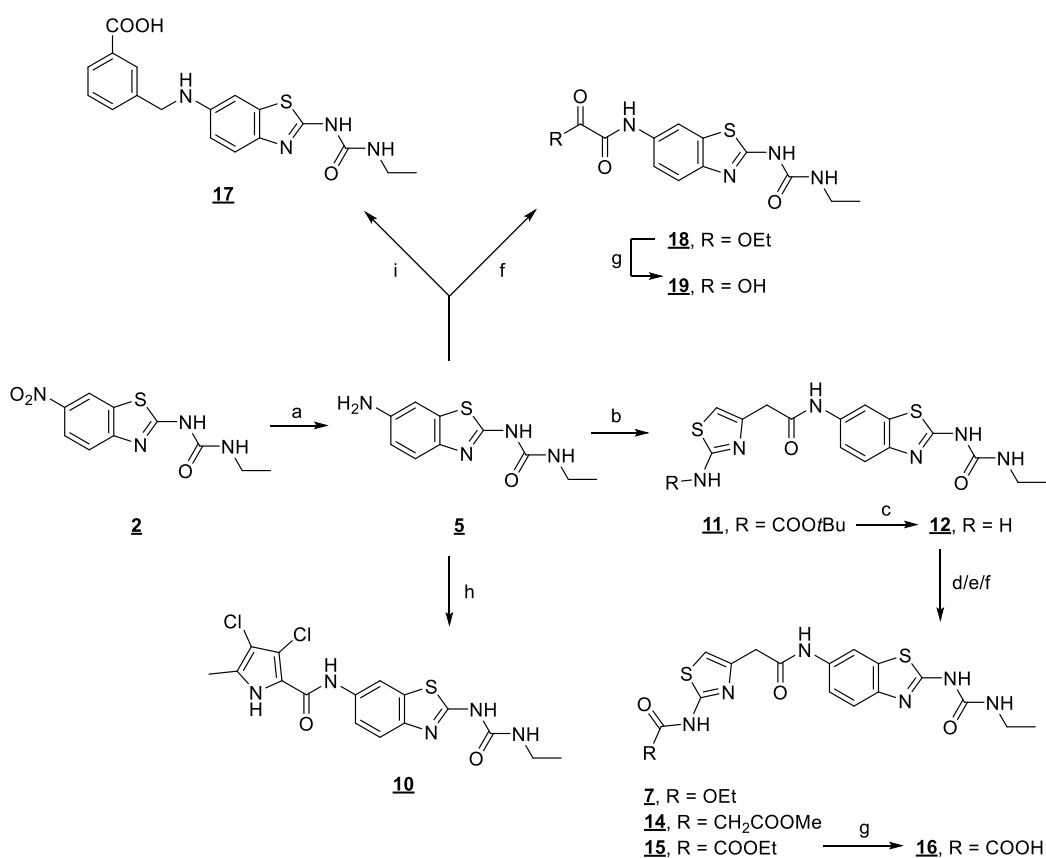
Shema 1: Reagenti in pogoji za sintezo spojine **3**: a) THF, Et₃N, Boc₂O, DMAP, sobna T, 24 h; b) MeOH, 2 M NaOH, sobna T, 24 h.

V naslednji stopnji (Shema 2) bomo s katalitskim hidrogeniranjem izvedli redukcijo spojine **2** do 1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etilsečnine (**5**). Z nadaljnjo reakcijo med amsko skupino spojine **5** in predhodno sintetizirano kislino **3** bomo s pomočjo sklopitvenih reagentov tvorili karbamat **11**. Nato bomo z acidolizo odstranili zaščito Boc in dobili 2-(2-aminotiazol-4-il)-*N*-(2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)acetamid (**12**).

Sledila bo sinteza končnih spojin **7**, **14**, **15** in **16** (Shema 2). Izhajali bomo iz predhodno sintetizirane spojine **12**, na katero bomo uvajali različne substituentne. S pripenjanjem etil formatnega fragmenta na amsko skupino spojine **12** nameravamo dobiti spojino **7**, s

pripenjanjem metil malonilnega fragmenta spojino **14**, s pripenjanjem etil oksalilnega fragmenta pa spojino **15**. Slednjo bomo nato z alkalno hidrolizo pretvorili še do njenega kislinskega derivata **16**.

V zadnji stopnji bomo iz spojine **5** sintetizirali še končne spojine **10**, **17**, **18** ter **19** (Shema 2). Spojino **10** bomo dobili s tvorbo amidne vezi ob uporabi sklopitvenih reagentov med aminom **5** ter ustrezno karboksilno kislino, spojino **17** pa z reduktivnim aminiranjem spojine **5** s 3-karboksibenzaldehidom. S pripenjanjem etil oksalilnega fragmenta na spojino **5** bomo sintetizirali še spojino **18**, ki jo bomo na koncu z alkalno hidrolizo pretvorili do njenega kislinskega derivata **19**.



Shema 2: Reagenti in pogoji sinteznega načrta spojin: a) H₂, Pd/C, EtOH/DMF, sobna T, 48 h; b) **3**, EDC, HOBT, NMM, DMF, sobna T, 18 h; c) acetilklorid, MeOH, 0 °C, 1 h, nato sobna T, 18 h; d) etil kloroformat, Et₃N, DKM, sobna T, 18 h; e) metil malonil klorid, Et₃N, 1,4-dioksan, sobna T, 18 h; f) etil oksalil klorid, Et₃N, 1,4-dioksan, sobna T, 18 h; g) 1 M NaOH, MeOH/H₂O, sobna T, 18 h; h) 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilna kislina, EDC, HOBT, NMM, DMF, sobna T, 18h; i) 3-formilbenzojska kislina, MeOH, oljna kopel 75 °C, 24 h, NaCNBH₃, sobna T, 24 h.

Sintetizirane spojine bomo identificirali s spektroskopskimi in spektrometrijskimi metodami NMR, IR ter MS.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 REAGENTI IN TOPILA

V laboratoriju smo pri eksperimentalnem delu uporabili reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Maybridge, Merck, TCI in Sigma Aldrich.

3.2 KROMATOGRFSKE METODE

3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Pri eksperimentalnem delu smo za identifikacijo spojin, spremljanje poteka reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij uporabljali tankoplastno kromatografijo. Uporabljali smo TLC plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, ki ga proizvaja nemško podjetje Merck. Kot mobilno fazo smo uporabili različna topila, ki so navedena pri vsakem postopku posebej. Spojine na TLC ploščah smo detektirali pod UV lučjo z valovno dolžino 254 nm. Z orositvenim reagentom ninhidrinom smo detektirali primarne in sekundarne amine.

3.2.2 Kolonska kromatografija

Produkte smo ločevali in čistili s kolonsko kromatografijo. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti, odvisno od količine spojine. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck), kot mobilno fazo pa različna topila. Sam potek kolonske kromatografije smo pospešili z zračnim nadtlakom.

3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC – high-performance liquid chromatography) uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vzorcev. HPLC analize so bile izvedene na aparaturi Agilent Technologies 1100 z uporabo G1365B UV-VIS detektorja, G1316A termostata in G1313A avtomatskega vzorčevalnika. Pri meritvah je bila uporabljena kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 × 150 mm) kot MF pa 0,1 % trifluoroocetna kislina v vodi. Gradientna elucija MF: 2 minuti 95 % A, 90 % A do 10 % A v 12-ih minutah, 10 % A do 5 % A v 1 minuti in nato 5 minut 5 % A; uporabljen pretok MF: 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL.

3.3 SPEKTROSKOPSKE IN SPEKTROMETRIJSKE METODE

3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topilo smo uporabljali devterirano topilo DMSO- d_6 in CDCl_3 . Spektre smo analizirali s programom MestReC proizvajalca Mestrelab Research.

3.3.2 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.3.3 Masna spektrometrija (MS)

MS spektre so posneli na masnem spektrometru VG Analytical Autospec Q z ESI metodo na Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.4 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

Temperaturo tališča spojin smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.5 POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemDraw Professional 15.1, proizvajalca Perkin Elmer.

3.6 MOLEKULSKO SIDRANJE

Molekulsko sidranje je izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm., s pomočjo programa LeadIT (BioSolveIT). Za grafični prikaz vezave spojin je uporabil program PyMOL (Delano Scientific LLC).

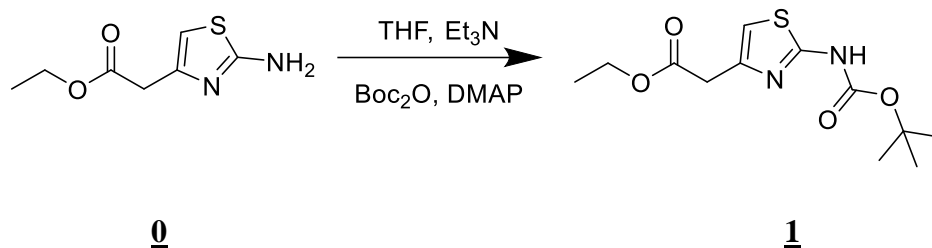
3.7 BIOKEMIJSKA TESTIRANJA

Zaviralno aktivnost spojin na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* je vrednotila doktorandka Michaela Barančoková, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Protibakterijsko delovanje spojin na izbranih bakterijskih sevih pa so določili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza etil 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)acetata



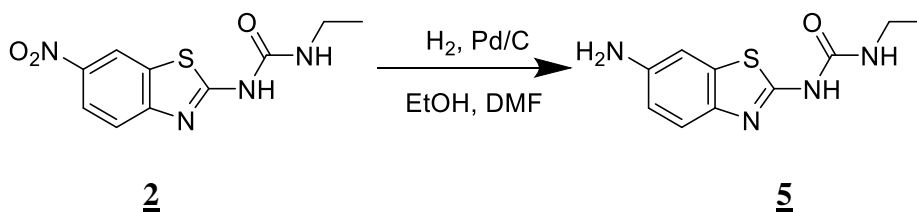
Spojino **0** (5,00 g; 26,88 mmol) smo raztopili v 100 mL tetrahidrofurana (THF), nato pa ob stalnem mešanju dodali trietilamin (7,45 mL; 53,76 mmol; 2 Eq), Boc₂O (6,453 g; 29,568 mmol; 1,1 Eq) in DMAP (0,328 g; 2,688 mmol; 0,1 Eq), ki služi kot katalizator. Bučko smo zaprli s septumom (zaradi izhajanja plina CO₂) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po 24-ih urah smo odparili topilo pod znižanim tlakom.

Za ekstrakcijo reakcijske zmesi smo uporabili etilacetat (100 mL) in organsko fazo spirali z 1 M HCl (50 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (50 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo nato sušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo nečist oljast produkt, zato smo dodali nekaj mL metanola in etra, izvedli kristalizacijo ter pustili stati čez vikend. Nastalo je le nekaj kristalov, zato smo produkt ponovno prekrizalizirali, tokrat iz etilacetata z dodatkom *n*-heksana. Kristale, ki so nastali čez noč pri znižani temperaturi (2-8 °C), smo vakuumsko odfiltrirali s presesavanjem. Matičnico smo uparili do suhega in dobili 5,895 g spojine **1**.

Elementna sestava	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
Izgled	rjav oljast produkt
Izkoristek	76,7 %
R_f	0,67 (diklorometan/metanol = 15:1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,18 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 1,48 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 3,64 (d, 2H, <i>J</i> = 0,7 Hz, CH ₂), 4,07 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, OCH ₂ CH ₃), 6,92 (s, 1H, Ar-H), 11,44 (br s, 1H, NHCO) ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3390, 3172, 2980, 1744, 1713, 1647, 1609, 1557, 1456, 1408, 1394, 1367, 1351, 1297, 1245, 1201, 1152, 1074, 1030, 983, 932, 868, 801, 758, 719, 667, 602, 572, 546, 505
MS (ESI⁻) m/z za C₁₂H₁₇N₂O₄S ([M-H]⁻)	285 (100)

4.2 Sinteza 1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etilsečnine



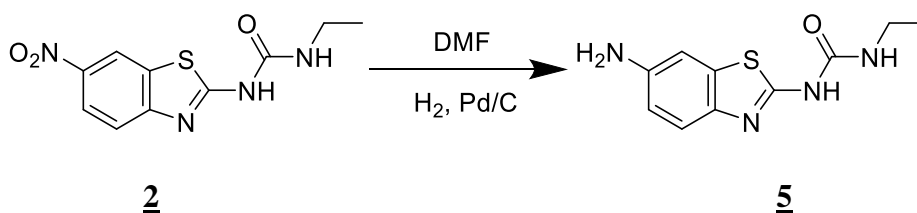
Spojino 2 (4,132 g; 15,534 mmol) smo raztopili v približno 100 mL absolutnega etanola in 100 mL DMF-a ter bučko postavili na magnetno mešalo in zaprli s septumom. Raztopino smo nato prepihali z argonom, ki je težji od zraka, da smo izgnali zrak iz reakcijske zmesi. To smo naredili tako, da smo na dolgo iglo, ki je bila potopljena v raztopino, namestili balon z argonom. Uporabili pa smo tudi krajšo iglo, ki ni bila potopljena v raztopino, in je služila izhajanju zraka iz bučke. Potem smo v raztopino dodali katalizator paladij na ogljiku (0,200 g; 5 % mase izhodne spojine, če je ta nad 2 g; 10 % mase izhodne spojine, če je ta pod 2 g). Reakcijsko zmes smo na isti način prepihali še z vodikom, da je iz zmesi izpodrinil argon. Po 5-ih minutah smo odstranili krajšo iglo iz bučke ter tako dobili zaprt sistem. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč v vodikovi atmosferi pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC kromatogram (MF: diklorometan/metanol = 9:1) ter preverili potek reakcije. V zmesi je bilo prisotne še veliko izhodne spojine, zato smo balon ponovno napolnili z vodikom ter pustili redukcijo potekati še naprej. Po 48-ih urah smo reakcijo ustavili, katalizator odfiltrirali z vakuumsko filtracijo, etanol pa odparili pod znižanim

tlakom. V reakcijsko zmes smo nato dodali približno 70 mL vode ter izvedli kristalizacijo in se tako znebili še DMF-a. Nastale kristale smo vakuumsko odfiltrirali, matičnico pa ekstrahirali z etilacetatom (7 x 50 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom.

Dobljeni produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20:1; diklorometan/metanol = 9:1). Dobili smo 0,340 g spojine 5.

Elementna sestava	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ OS
Izgled	rumen oljast produkt
Izkoristek	9,3 %
R_f	0,33 (diklorometan/metanol = 9:1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,07 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,13-3,20 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 5,03 (s, 2H, NH ₂), 6,63 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,2 Hz, Ar-H-5), 6,68 (t, 1H, <i>J</i> = 5,8 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 6,94 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H-7), 7,29 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 10,28 (s, 1H, NHCO) ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3400, 3241, 2976, 1648, 1606, 1527, 1465, 1416, 1385, 1355, 1222, 1095, 1058, 919, 851, 801, 734, 703, 647, 576, 519, 507
MS (ESI⁺) m/z za C₁₀H₁₂N₄OSNa ([M+Na]⁺)	259 (100)

Postopek redukcije smo še enkrat ponovili zaradi majhne količine dobljenega produkta.

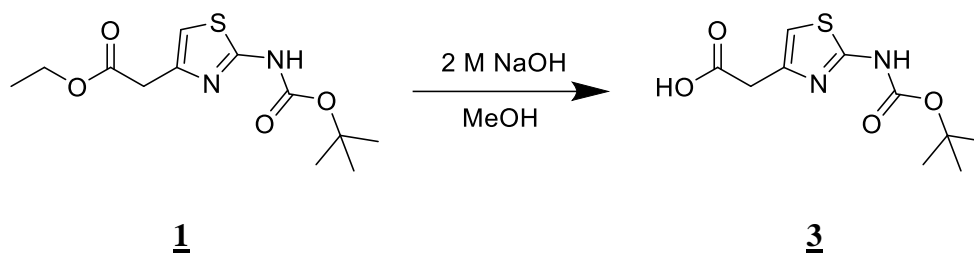


Spojino 2 (2,977 g; 11,192 mmol) smo tokrat raztopili samo v DMF-u (30 mL). Postopek prepihovanja smo ponovili ter reakcijsko zmes pustili mešati 6 dni v vodikovi atmosferi pri

sobni temperaturi. V reakcijski zmesi je bilo še vedno prisotne veliko izhodne spojine, zato smo redukcijo nastavili v hidrogenatorju z visokim tlakom (18 barov). Po treh dneh je redukcija potekla do konca. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom ter dobili 3,225 g čiste spojine **5**.

Izgled	temno rjav oljast produkt
Izkoristek	122,1 % Izkoristek je bil večji od 100 % verjetno zaradi zaostanka topila DMF.

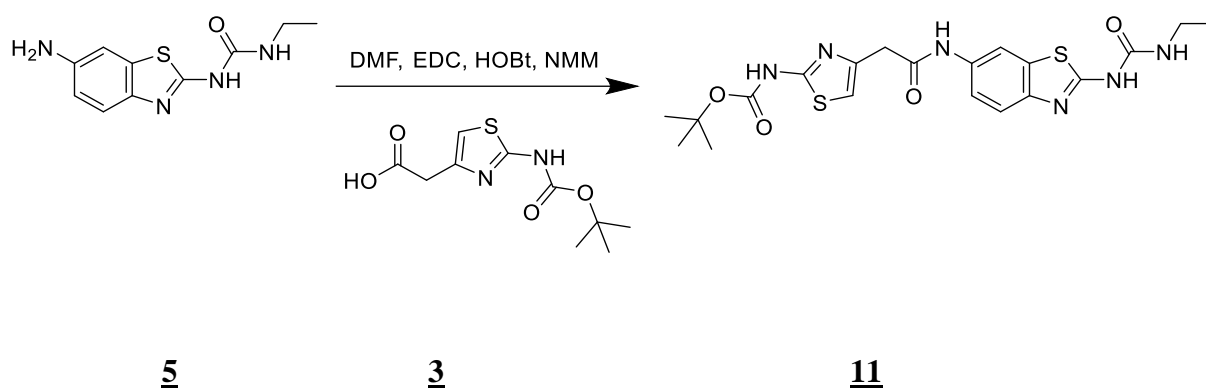
4.3 Sinteza 2-(2-((*tert*-butoksidikarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetne kisline



Spojino **1** (5,895 g; 20,486 mmol) smo raztopili v 30 mL MeOH in 30 mL 2 M NaOH ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po 24-ih urah smo razvili TLC (MF: diklorometan/metanol = 15:1) ter ugotovili, da je hidroliza estra potekla do konca. MeOH smo odparili pod znižanim tlakom, vodno raztopino pa ekstrahirali z etilacetatom (50 mL). Vodno fazo smo nato na ledeni kopeli nakisali s 6 M HCl do pH 2-3, nastalo oborino pa vakuumsko odfiltrirali. Oborino smo posušili v sušilniku, matičnico pa ekstrahirali z etilacetatom (2 x 50 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Produkt je bil prisoten tako v oborini kot v matičnici. Dobili smo 2,419 g spojine **3**.

Elementna sestava	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄ S
Izgled	bel prah
Izkoristek	45,5 %
R_f	0 (diklorometan/metanol = 15:1)
T_{tal}	128 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,48 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 3,55 (s, 2H, CH ₂), 6,89 (s, 1H, Ar-H), 11,42 (br s, 1H, NHCO), 12,35 (s, 1H, COOH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 28,4 (3C), 37,3, 81,5, 110,0, 144,9, 159,7, 159,8, 172,1 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3180, 2978, 1705, 1545, 1450, 1403, 1367, 1340, 1285, 1244, 1228, 1193, 1150, 1068, 1038, 977, 926, 859, 796, 769, 708, 661, 633
MS (ESI⁻) m/z za C₁₀H₁₃N₂O₄S ([M-H]⁻)	257 (100)

4.4 Sinteza *tert*-butil (4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata



Kislinski derivat 3 (2,014 g; 7,797 mmol; 1 Eq) smo raztopili v 20 mL DMF-a, nato pa med mešanjem na ledeni kopeli dodali EDC (1,794 g; 9,356 mmol; 1,2 Eq), HOBt (1,370 g; 10,136 mmol; 1,3 Eq) ter bazo NMM (1,72 mL; 15,594 mmol; 2 Eq). Počakali smo 20 min,

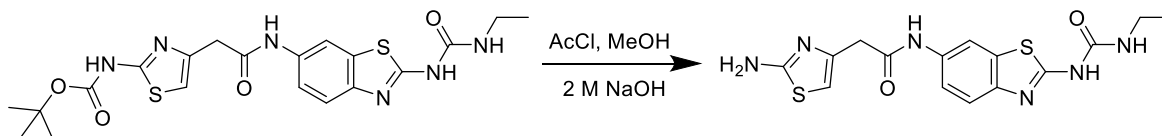
da je potekla aktivacija kisline, zatem pa reakcijski zmesi dodali še spojino **5** (1,840 g; 7,797 mmol; 1 Eq), ki smo jo predhodno raztopili v 5 mL DMF-a. Pustili smo mešati čez noč pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili DMF, v reakcijsko zmes dodali 50 mL etilacetata ter izvedli ekstrakcijo z 1-odstotno citronsko kislino (2 x 25 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom.

Dobljeni produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 30:1; diklorometan/metanol = 20:1). Dobili smo 1,073 g čiste spojine **11**.

Elementna sestava	C ₂₀ H ₂₄ N ₆ O ₄ S ₂
Izgled	oranžen prah
Izkoristek	28,9 %
R_f	0,30 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	140 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,09 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 1,48 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 3,15-3,22 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 3,66 (s, 2H, CH ₂), 6,73 (t, 1H, <i>J</i> = 4,7 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 6,92 (s, 1H, tiazol-H), 7,46 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,54 (d, 1H, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H-4), 8,20 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H-7), 10,21 (s, 1H, NHCO), 10,63 (s, 1H, NHCO), 11,44 (s, 1H, NHCO) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 15,1, 27,9 (3C), 34,2, 40,4, 80,9, 109,3, 111,3, 118,0, 119,5, 131,7, 134,4, 145,1, 145,2, 152,8, 153,7, 158,9, 159,3, 167,7 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3199, 2979, 1704, 1647, 1610, 1539, 1462, 1404, 1367, 1229, 1151, 1068, 1037, 977, 922, 860, 795, 706, 660, 507
HRMS (ESI⁻) m/z za C₂₀H₂₃N₆O₄S₂ ([M-H]⁻)	izračunana 475,1222 izmerjena 475,1213

4.5 Sinteza 2-(2-aminotiazol-4-il)-N-(2-(3-etilureido)benzo[1,2-d]tiazol-6-il)acetamida

**11****12**

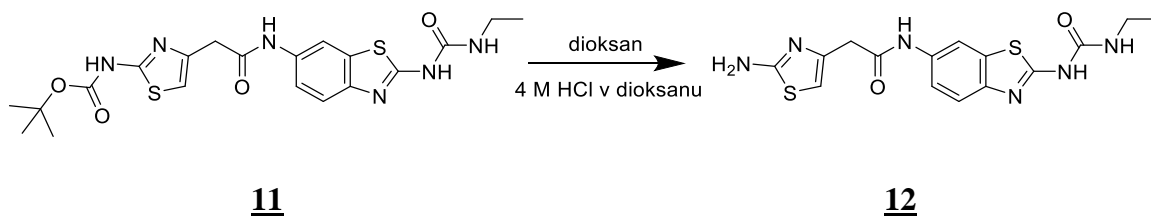
Metanolu (10 mL) smo med mešanjem na ledeni kopeli s pomočjo igle počasi dodali acetilklorid (0,86 mL; 12,09 mmol; 30 Eq) in počakali 30 min, da je potekla reakcija nastanka HCl. Nato smo dodali še spojino **11** (0,192 g; 0,403 mmol), ki smo jo predhodno raztopili v 8 mL MeOH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 20 min na ledeni kopeli, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili MeOH, v reakcijsko zmes pa dodali 5 mL destilirane vode ter izvedli ekstrakcijo z etilacetatom (2 x 10 mL). Vodno fazo smo nato naalkalili z 2 M NaOH do pH 12 ter tako dobili neprotonirano obliko, ki se je po ponovni ekstrakciji z etilacetatom (2 x 10 mL) oborila iz vodne faze. Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,065 g spojine **12**.

Elementna sestava	C ₁₅ H ₁₆ N ₆ O ₂ S ₂
Izgled	rumen prah
Izkoristek	42,9 %
R_f	0,30 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	135 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,08 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,13-3,20 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 3,60 (s, 2H, CH ₂), 5,03 (s, 2H, NH ₂), 6,63 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,2 Hz, Ar-H-5), 6,68 (t, 1H, <i>J</i> = 5,6 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 6,92 (s, 1H, tiazol-H), 6,94 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2

	Hz, Ar-H-7), 7,28 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H-4), 10,28 (s, 1H, NHCO) ppm; signal za NHCO v spektru ni viden
IR (ATR, cm^{-1})	3049, 1715, 1621, 1537, 1483, 1414, 1317, 1222, 1077, 999, 831, 711, 654, 609, 582, 568, 546, 522, 509
HRMS (ESI) m/z za $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$)	izračunana 375,0698 izmerjena 375,0691
HPLC	$t_r = 10,05$ min (98,2 % pri 254 nm)

Postopek odstranitve zaščitne skupine smo še enkrat ponovili zaradi majhne količine dobljenega produkta.

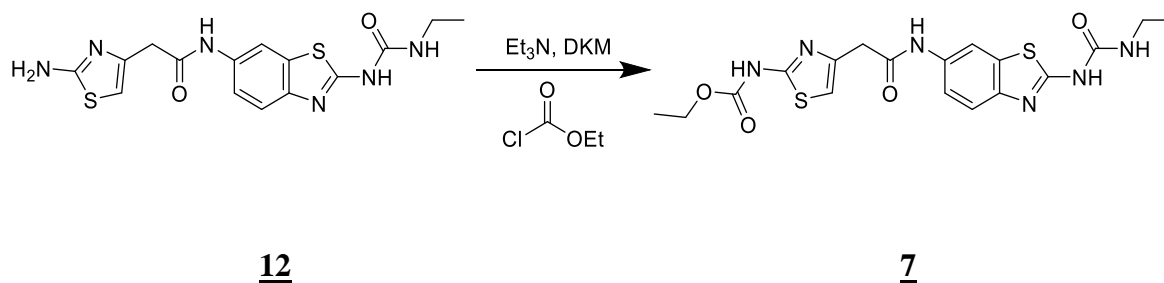


Spojino **11** (0,881 g; 1,851 mmol) smo tokrat raztopili v 15 mL dioksana, bučko zaprli s septumom ter jo postavili na ledeno kopel. Ob stalnem mešanju smo v raztopino s pomočjo igle dodali 4 M HCl v dioksanu (4,6 mL; 10 Eq). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 20 min na ledeni kopeli, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC (MF: diklorometan/metanol = 9:1) ter ugotovili, da reakcija ni potekla do konca, zato smo med mešanjem na ledeni kopeli dodali še 10 mL dioksana ter 2,3 mL 4 M HCl v dioksanu (5 Eq). Po 20-ih minutah smo reakcijsko zmes odstavili z ledene kopeli ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi.

Po 24-ih urah je reakcija potekla do konca, pod znižanim tlakom smo odparili dioksan ter dobili 0,839 g spojine **12**.

Izgled	rumen prah
Izkoristek	120,6 % Izkoristek je bil večji od 100 % verjetno zaradi zaostanka topila.

4.6 Sinteza etil (4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata



Spojino 12 (0,065 g; 0,173 mmol) smo raztopili v 5 mL DKM, bučko zaprli s septumom ter dali mešati na ledeno kopel. Raztopino smo prepihali z argonom ter nato ob stalnem mešanju dodali Et₃N (0,048 mL; 0,347 mmol; 2 Eq) in etil kloroformat (0,022 mL; 0,225 mmol; 1,3 Eq). Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali na ledeni kopeli približno 30 min, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC (MF: diklorometan/metanol = 9:1) in tako preverili potek reakcije. V reakcijski zmesi je bilo prisotne še veliko izhodne spojine, zato smo ponovno dodali enaki količini Et₃N in etil kloroformata kot prej. Postopek smo ponovili ter pustili mešati in prepihovati z argonom čez noč pri sobni temperaturi. Po 24-ih h je bila reakcija končana.

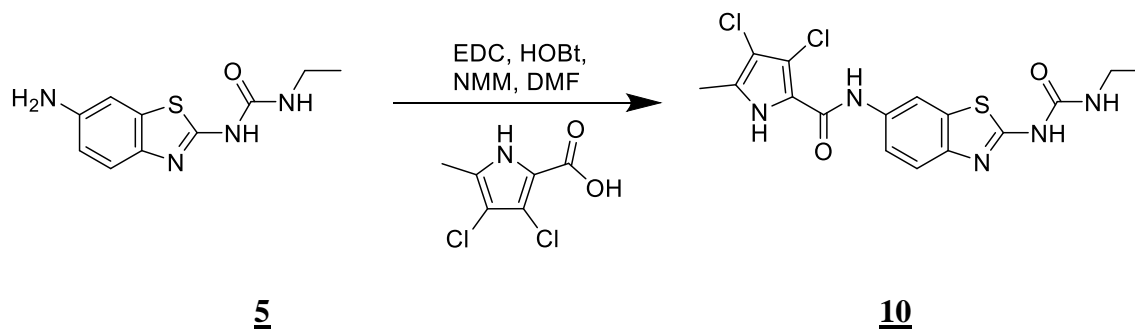
V reakcijsko zmes smo dodali 10 mL DKM, organsko fazo spirali z destilirano vodo (2 x 10 mL), nato pa jo posušili nad Na₂SO₄. DKM smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 0,013 g nečiste spojine 7.

Dobljeni produkt smo očistili s kristalizacijo iz MeOH. Kristale, ki so nastali po dveh tednih pri znižani temperaturi (2-8 °C), smo vakuumsko odfiltrirali. Oborino smo posušili v sušilniku in dobili 0,006 g čiste spojine 7.

Elementna sestava	C ₁₈ H ₂₀ N ₆ O ₄ S ₂
Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	7,8 %
R_f	0,40 (diklorometan/metanol = 9:1)

T_{tal}	razpada pri T > 250 °C
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ 1,29 (t, 3H, J = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 1,35 (t, 3H, J = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 3,42-3,49 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 3,82 (s, 2H, CH ₂), 4,27 (q, 2H, J = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 6,68 (s, 1H, NHCH ₂ CH ₃), 7,22 (dd, 1H, J ₁ = 8,6 Hz, J ₂ = 2,3 Hz, Ar-H-5), 7,26 (s, 1H, tiazol-H), 7,64 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H-4), 8,03 (s, 1H, Ar-H-7) ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3399, 3241, 3163, 2982, 1683, 1634, 1567, 1519, 1464, 1417, 1355, 1250, 1223, 1177, 1090, 1033, 920, 871, 802, 757, 703, 679, 640, 592, 548, 521, 506

4.7 Sinteza 3,4-dikloro-N-(2-(3-etilureido)benzo[1,2-d]tiazol-6-il)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamida



Kislinski derivat (0,100 g; 0,516 mmol; 1 Eq) smo raztopili v 10 mL DMF-a, nato pa med mešanjem na ledeni kopeli dodali EDC (0,119 g; 0,619 mmol; 1,2 Eq), HOBT (0,091 g; 0,67 mmol; 1,3 Eq) ter bazo NMM (0,11 mL; 1,031 mmol; 2 Eq). Počakali smo 30 min, da je potekla aktivacija kisline, zatem pa reakcijski zmesi dodali še spojino **5** (0,122 g; 0,516 mmol; 1 Eq), ki smo jo predhodno raztopili v 2 mL DMF-a. Pustili smo mešati čez noč pri sobni temperaturi.

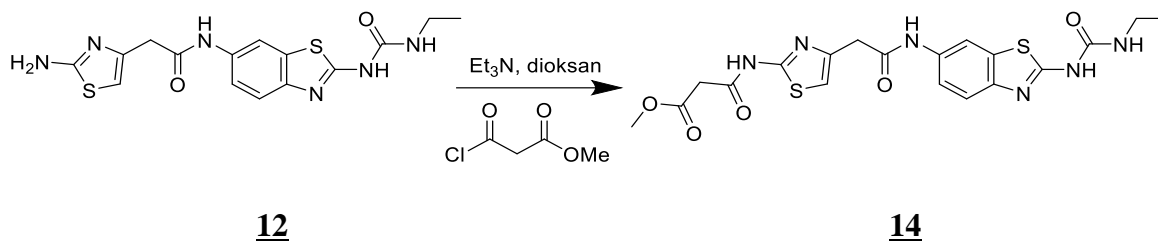
Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili DMF, v reakcijsko zmes dodali 50 mL etilacetata ter izvedli ekstrakcijo z 10-odstotno citronsko kislino (2 x 25 mL), nasičeno

raztopino NaHCO_3 (2 x 25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na_2SO_4 , topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,431 g nečiste spojine **10**.

Dobljeni produkt smo očistili s kristalizacijo iz MeOH in diklorometana (20:1). Kristale, ki so nastali na sobni temperaturi, smo vakuumsko odfiltrirali. Oborino smo posušili v sušilniku in dobili 0,040 g čiste spojine **10**.

Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$
Izgled	oranžni kristali
Izkoristek	18,8 %
R_f	0,55 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	nad 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,10 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, NHCH_2CH_3), 2,24 (s, 3H, pirol- CH_3), 3,16-3,22 (m, 2H, NHCH_2CH_3), 6,71 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, NHCH_2CH_3), 7,54-7,60 (m, 2H, Ar-H-4, Ar-H-5), 8,22 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H-7), 9,49 (s, 1H, NHCO), 10,64 (s, 1H, NHCO), 12,18 (s, 1H, NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 10,8, 15,1, 34,2, 108,3, 111,0, 112,4, 119,0, 119,5, 119,6, 127,9, 131,8, 133,6, 147,6, 153,6, 157,1, 159,1 ppm
IR (ATR, cm^{-1})	3400, 3241, 3165, 2981, 1683, 1635, 1573, 1519, 1466, 1417, 1377, 1355, 1316, 1278, 1250, 1224, 1177, 1090, 1044, 920, 870, 802, 757, 703, 679, 633, 594, 520, 507
HRMS (ESI⁺) m/z za $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2\text{SCL}_2$ ([M+H]⁺)	izračunana 412,0402 izmerjena 412,0413
HPLC	$t_r = 14,61$ min (100 % pri 254 nm)

4.8 Sinteza metil 3-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata



Spojino **12** (0,100 g; 0,267 mmol) smo raztopili v 10 mL dioksana, bučko zaprli s septumom ter dali mešati na ledeno kopel. Raztopino smo prepihali z argonom ter nato ob stalnem mešanju dodali Et₃N (0,092 mL; 0,667 mmol; 2,5 Eq) in metil malonil klorid (0,035 mL; 0,32 mmol; 1,2 Eq). Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali na ledeni kopeli približno 15 min, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC kromatogram (MF: diklorometan/metanol = 9:1) in tako preverili potek reakcije. V reakcijski zmesi je bilo prisotne še veliko izhodne spojine, zato smo dodali še 1 Eq kislinskega klorida (0,029 mL). Postopek smo ponovili ter pustili mešati in prepihovati z argonom čez noč pri sobni temperaturi. Po 24-ih h je bila reakcija končana.

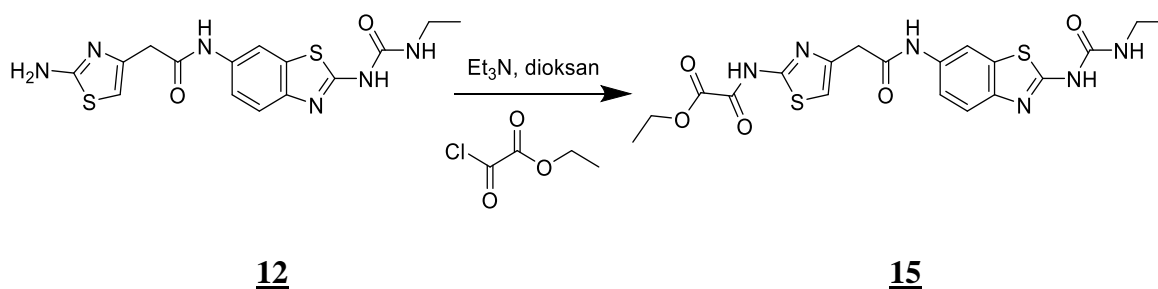
Pod znižanim tlakom smo odparili dioksan, v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter izvedli ekstrakcijo z 1-odstotno citronsko kislino (2 x 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 10 mL). Organsko fazo smo posušili nad Na₂SO₄, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,080 g nečiste spojine **14**.

Dobljeni produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20:1). Dobili smo 0,016 g čiste spojine **14**.

Elementna sestava	C ₁₉ H ₂₀ N ₆ O ₅ S ₂
Izgled	rumen prah
Izkoristek	12,6 %
R_f	0,30 (diklorometan/metanol = 9:1)

T_{tal}	129 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, MeOD-<i>d</i>₄)	δ 1,23 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,31-3,33 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃ ; signal deloma prekrit s signalom topila), 3,74 (s, 3H, CH ₃), 3,77 (s, 2H, CH ₂), 3,80 (s, 2H, CH ₂), 7,00 (s, 1H, tiazol-H), 7,45 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,1 Hz, Ar-H-5), 7,59 (d, 1H, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H-4), 7,28 (d, 1H, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H-7) ppm; signali za skupine NH v spektru niso vidni
IR (ATR, cm⁻¹)	3247, 2956, 1737, 1685, 1537, 1437, 1407, 1334, 1219, 1149, 1013, 905, 865, 812, 788, 739, 691, 595, 512
HRMS (ESI⁺) m/z za C₁₉H₂₁N₆O₅S₂ ([M+H]⁺)	izračunana 477,1015 izmerjena 477,1026
HPLC	t _r = 10,76 min (100 % pri 254 nm)

4.9 Sinteza etil 2-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetata

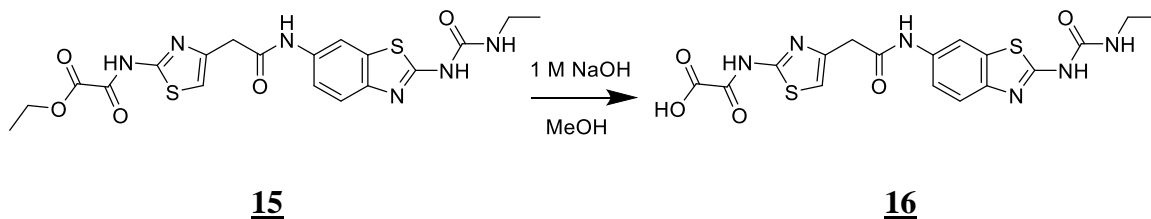


Spojino 12 (0,200 g; 0,533 mmol) smo raztopili v 20 mL dioksana, bučko zaprli s septumom ter dali mešati na ledeno kopel. Raztopino smo prepihali z argonom ter nato ob stalnem mešanju dodali Et₃N (0,185 mL; 1,333 mmol; 2,5 Eq) in etil oksalil klorid (0,0713 mL; 0,64 mmol; 1,2 Eq). Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali na ledeni kopeli približno 15 min, nato pa mešali še 24 h pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC kromatogram (MF: diklorometan/metanol = 9:1) in tako preverili potek reakcije. V reakcijski zmesi je bilo prisotne še veliko izhodne spojine, zato smo dodali še 0,5 Eq Et₃N

(0,037 mL) in 0,5 Eq kislinskega klorida (0,0297 mL). Postopek smo ponovili ter pustili mešati in preprihovati z argonom še 1 h pri sobni temperaturi, da je reakcija potekla do konca. Reakcijsko zmes smo nato vakuumsko prefiltrirali, odparili dioksan iz matičnice ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 30:1). Dobili smo 0,048 g čiste spojine **15**.

Elementna sestava	C ₁₉ H ₂₀ N ₆ O ₅ S ₂
Izgled	rumen prah
Izkoristek	19,0 %
R_f	0,33 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	141 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,09 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 1,31 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 3,15-3,22 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 3,77 (s, 2H, CH ₂), 4,30 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 6,70 (t, 1H, <i>J</i> = 4,9 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 7,16 (s, 1H, tiazol-H), 7,47 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,55 (d, 1H, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H-4), 7,28 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H-7), 10,25 (s, 1H, NHCO), 10,63 (s, 1H, NHCO), 12,99 (s, 1H, NHCO) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 13,7, 15,1, 34,2, 40,1, 62,5, 111,4, 111,7, 118,1, 119,5, 131,8, 134,3, 145,2, 145,7, 153,6, 158,9, 167,4, 167,5, 175,1, 179,6 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3389, 3187, 2981, 1736, 1686, 1647, 1610, 1539, 1465, 1407, 1366, 1262, 1237, 1161, 1014, 928, 860, 823, 700, 661, 612, 573, 509
HRMS (ESI⁺) m/z za C₁₉H₂₁N₆O₅S₂ ([M+H]⁺)	izračunana 477,1015 izmerjena 477,1009
HPLC	t _r = 11,25 min (95,1 % pri 254 nm)

4.10 Sinteza 2-((4-(2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)amino)-2-oksoocetne kisline



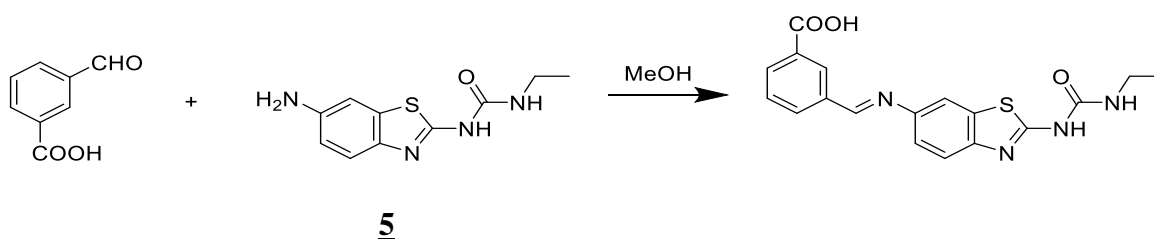
Spojino **15** (0,025 g; 0,0525 mmol) smo raztopili v 5 mL MeOH, dodali 1 M NaOH (0,11 mL; 0,105 mmol; 2 Eq) ter pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo v reakcijsko zmes dodali smolo Amberlite IR120[®], ki deluje kot ionski izmenjevalec, ter pustili mešati približno 20 min pri sobni temperaturi, dokler nismo dosegli pH = 6. Reakcijsko zmes smo nato vakuumsko filtrirali, matičnico uparili do suhega in dobili 0,017 g spojine **16**.

Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₆ N ₆ O ₅ S ₂
Izgled	oranžen prah
Izkoristek	72,3 %
R_f	0 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	nad 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,06 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,10-3,17 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 3,68 (s, 2H, CH ₂), 6,96 (s, 1H, tiazol-H), 7,19 (br s, 1H, NHCH ₂ CH ₃), 7,28-7,37 (m, 2H, Ar-H-4, Ar-H-5), 8,03 (s, 1H, Ar-H-7), 10,11 (s, 1H, NHCO) ppm; signali za skupine NH v spektru niso vidni
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 15,2, 34,2, 40,1, 109,8, 111,5, 118,0, 119,5, 131,8, 135,4, 145,1, 145,5, 152,8, 156,5, 159,8, 164,6, 167,6, 170,5 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3277, 1651, 1629, 1539, 1428, 1319, 1276, 930, 878, 836, 804, 780, 700, 594, 514

HRMS (ESI⁺) m/z za	izračunana 447,0545
C₁₇H₁₅N₆O₅S₂ ([M-H]⁻)	izmerjena 447,0532
HPLC	t _r = 9,64 min (95,2 % pri 254 nm)

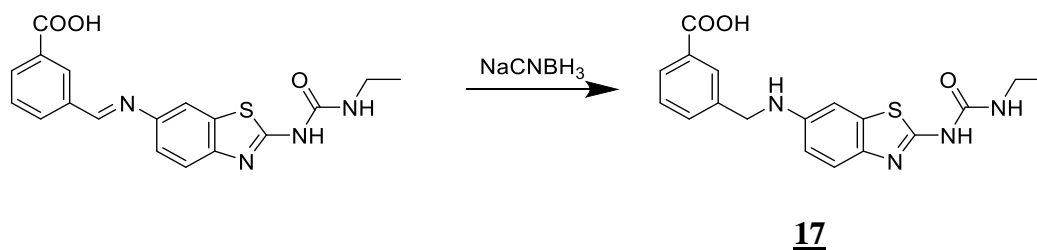
4.11 Sinteza 3-(((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)metil)benzojske kisline

a) 1. stopnja



Spojino **5** (0,100 g; 0,424 mmol) in 3-formilbenzojsko kislino (0,064 g; 0,424 mmol) smo raztopili v 10 mL MeOH in pustili mešati ter segreti na oljni kopeli (75 °C) čez noč.

b) 2. stopnja



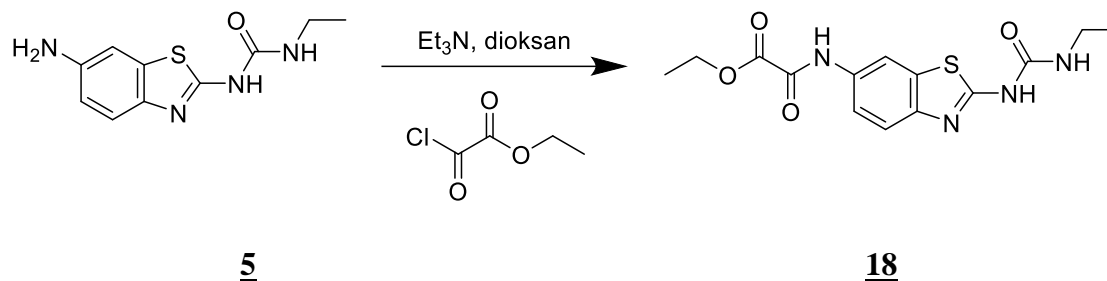
Reakcijsko zmes smo ohladili, dodali NaCNBH₃ (0,035 g; 0,551 mmol; 1,3 Eq) in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo pod znižanim tlakom odparili MeOH, v suh preostanek pa dodali destilirano vodo (5 mL), 1 M NaOH (1 mL) in etilacetat (2 x 10 mL) ter ekstrahirali. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M HCl do pH 2-3. Oborjen produkt smo vakuumsko odfiltrirali, oborino pa posušili v sušilniku.

Produkt smo najprej čistili s kristalizacijo iz metanola, nato pa še s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 9:1; diklorometan/metanol/ocetna kislina = 9:1:0,1) ter dobili 0,013 g čiste spojine **17**.

Elementna sestava	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃ S
Izgled	svetlo rjav prah
Izkoristek	8,2 %
R_f	0,34 (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 9:1:0,1)
T_{tal}	196 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,07 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,12-3,17 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 4,36 (s, 2H, CH ₂), 6,96 (s, 1H), 6,66-6,71 (m, 2H), 6,95 (s, 1H), 7,32 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz), 7,46 (t, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz), 7,64 (d, 1H, <i>J</i> = 7,0 Hz), 7,81 (d, 1H, <i>J</i> = 7,0 Hz), 7,98 (s, 1H), 10,03 (br s, 1H), 12,98 (br s, 1H) ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3241, 2958, 1738, 1684, 1610, 1539, 1439, 1408, 1366, 1336, 1235, 1152, 1075, 1013, 866, 819, 750, 688, 655, 592, 523

4.12 Sinteza etil 2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata



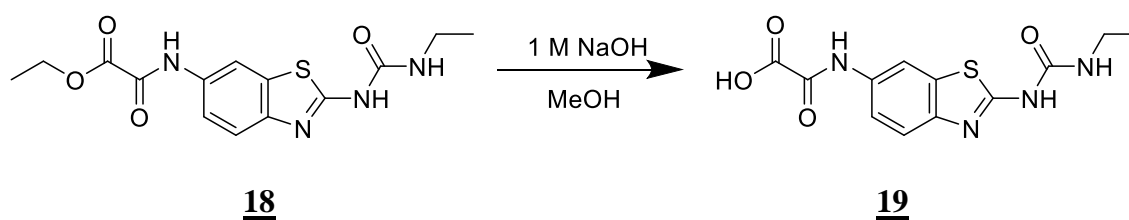
Spojino 5 (0,100 g; 0,424 mmol) smo raztopili v 20 mL dioksana, bučko zaprli s septumom ter dali mešati na ledeno kopel. Raztopino smo prepihali z argonom ter nato ob stalnem mešanju dodali Et₃N (0,147 mL; 1,059 mmol; 2,5 Eq) in etil oksalil klorid (0,0566 mL; 0,508 mmol; 1,2 Eq). Reakcijsko zmes smo mešali in prepihovali na ledeni kopeli približno 15 min, nato pa še 24 h pri sobni temperaturi.

Naslednji dan smo reakcijsko zmes vakuumsko filtrirali, odparili dioksan iz matičnice ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20:1). Dobili smo 0,015 g čiste spojine 18.

Elementna sestava	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄ S
Izgled	rumen prah
Izkoristek	10,5 %
R_f	0,22 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	253 ± 2 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,10 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 1,33 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 3,15-3,22 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 4,32 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, COOCH ₂ CH ₃), 6,71 (t, 1H, <i>J</i> = 6,0 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 7,59 (d, 1H, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H-4), 7,67 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,9 Hz, Ar-H-5), 8,21 (d, 1H, <i>J</i> = 1,9 Hz, Ar-H-7), 10,68 (s, 1H, NHCO), 10,88 (s, 1H, NHCO) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 13,8, 15,1, 34,2, 62,3, 113,0, 119,3, 119,5, 131,7, 132,5, 145,9, 155,3, 159,6, 160,7, 168,4 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3337, 2960, 1724, 1703, 1671, 1615, 1572, 1540, 1465, 1410, 1371, 1293, 1265, 1244, 1183, 1020, 915, 868, 834, 810, 696, 675, 612, 541, 522, 505
HRMS (ESI⁻) za C₁₄H₁₅N₄O₄S ([M-H]⁻)	izračunana 335,0814 izmerjena 335,0810
HPLC	t _r = 11,06 min (95,9 % pri 254 nm)

4.13 Sinteza 2-((2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline



Spojino **18** (0,010 g; 0,0298 mmol) smo raztopili v 3 mL MeOH, dodali 1 M NaOH (0,06 mL; 0,0595 mmol; 2 Eq) ter mešali pri sobni temperaturi nekaj ur. Nato smo dodali smolo Amberlite IR120[®], ki deluje kot ionski izmenjevalec, ter pustili mešati približno 20 min pri sobni temperaturi, dokler nismo dosegli pH = 6. Reakcijsko zmes smo vakuumsko filtrirali, matičnico uparili do suhega in dobili 0,009 g spojine **19**.

Elementna sestava	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₄ S
Izgled	svetlo rožnat prah
Izkoristek	100 %
R_f	0 (diklorometan/metanol = 9:1)
T_{tal}	nad 300 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 1,09 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 3,15-3,22 (m, 2H, NHCH ₂ CH ₃), 6,73 (t, 1H, <i>J</i> = 5,6 Hz, NHCH ₂ CH ₃), 7,57 (d, 1H, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H-4), 7,69 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,0 Hz, Ar-H-5), 8,31 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H-7), 10,67 (s, 1H, NHCO), 10,78 (s, 1H, NHCO) ppm; signal za COOH v spektru ni viden
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ 15,1, 34,2, 112,6, 116,5, 119,1, 119,4, 125,7, 131,6, 132,8, 159,5, 162,2, 163,3 ppm
IR (ATR, cm⁻¹)	3334, 2959, 1731, 1683, 1573, 1463, 1220, 1151, 1012, 692, 595, 536, 507
HRMS (ESI⁻) m/z za C₁₂H₁₁N₄O₄S ([M-H]⁻)	izračunana 307,0501 izmerjena 307,0499
HPLC	<i>t</i> _r = 9,36 min (100 % pri 254 nm)

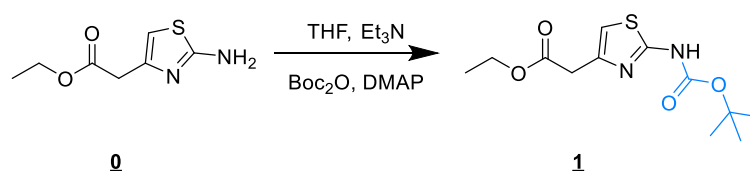
5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1 Uvedba karbamatne zaščitne skupine Boc

Amini so odlični nukleofili, zato jih moramo pretvoriti v manj reaktivno skupino, če ne želimo, da reagirajo v naslednjih stopnjah sinteze in tvorijo stranske produkte. Izhodnemu etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetatu (**0**) smo zato zaščitili aminske skupino z uvajanjem Boc₂O. V reakcijsko zmes smo dodali tudi bazo Et₃N ter katalizator DMAP. Z dodatkom baze smo izboljšali nukleofilnost aminske skupine, ki je tako ostala v neprotonirani obliki, z dodatkom DMAP pa smo povečali elektrofilitnost karbonylne skupine Boc₂O. Tako smo dobili spojino **1** (Slika 22).

Med reakcijo je izhajal plin CO₂, zato smo bučko zaprli s septumom ter nanj namestili balon. S tem smo omogočili izhajanje plina, obenem pa preprečili izhlapevanje topila THF, ki ima vrelišče sicer pri višji T, a lahko izhlapeva že pri sobni T.



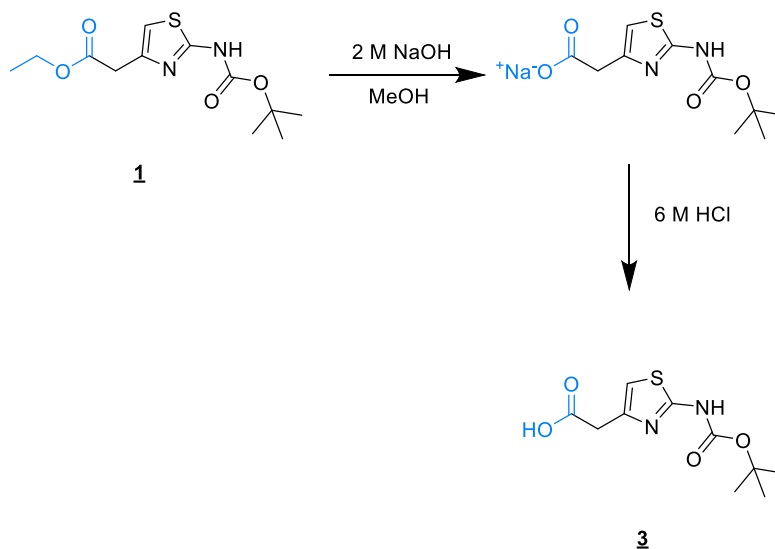
Slika 22: Vezava zaščitne skupine Boc na aminske skupino.

Nekaj težav smo imeli z izolacijo produkta. Pri odparevanju topila iz ekstrakcije smo namreč dobili oljast produkt, verjetno zaradi topila, ki je bilo ujeta v kristalih, ali pa zaradi drugih stranskih produktov, ki so nastali. Zato smo nadaljevali s prekristalizacijo iz etilacetata z dodatkom heksana. Metoda je bila uspešna, saj so nastali čisti kristali produkta.

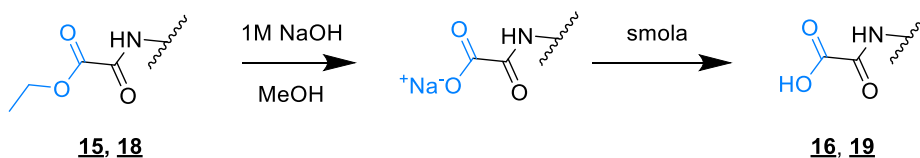
5.1.2 Reakcija alkalne hidrolize

Spojine **1**, **15** ter **18** smo hidrolizirali do njihovih kislinskih derivatov z bazo NaOH. Potek hidrolize estra smo spremljali s TLC. Reakcija hidrolize je potekla do konca, ko je lisa produkta na TLC kromatogramu ostala na začetku. Zaradi dodatka presežka NaOH v reakcijsko zmes se je namreč tvorila sol, ki v nepolarni mobilni fazi na normalno-faznem silikagelu ne potuje ($R_f = 0$).

Po končani hidrolizi smo spojino **3** v postopku izolacije dobili z nakisanjem vodne faze s 6 M HCl (Slika 23), spojini **16** in **19** pa z dodatkom smole Amberlite IR120[®] v reakcijsko zmes. Ta deluje kot ionski izmenjevalec in zniža vrednost pH do rahlo kislega (Slika 24).



Slika 23: Sinteza spojine **3** z alkalno hidrolizo in nakisanjem s HCl.

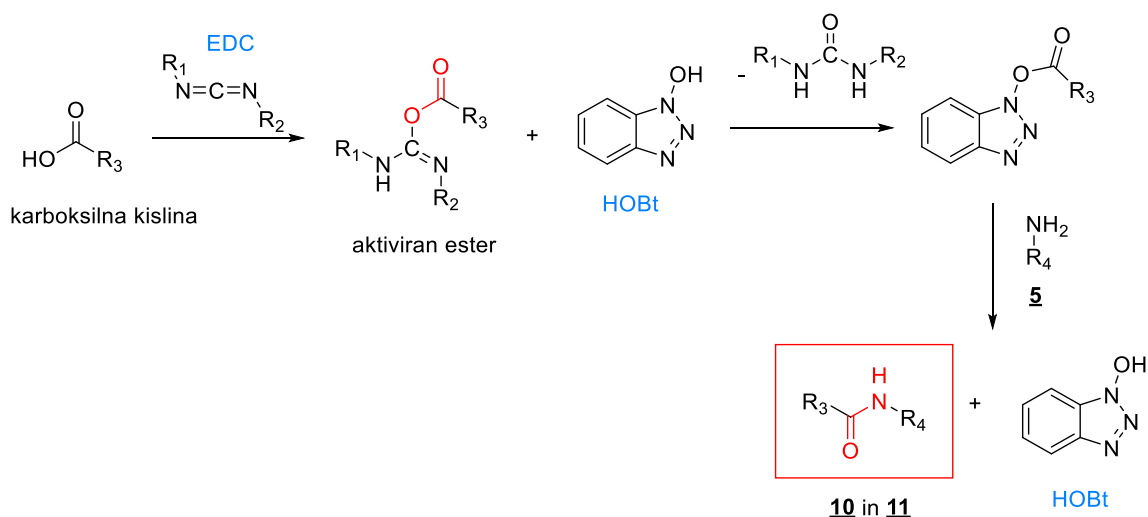


Slika 24: Sinteza spojin **16** in **19** z alkalno hidrolizo in nakisanjem s smolo Amberlite IR120[®].

5.1.3 Tvorba amidne vezi s sklopitvenim reagentom

Karboksilne kisline so veliko manj reaktivne kot kislinski kloridi, zato jih moramo pred reakcijo z aminom najprej aktivirati s sklopitvenim reagentom. Pri sintezi amidne vezi pa poleg slednjega potrebujemo tudi pomožni nukleofil, ki skrajša reakcijski čas, zmanjša racemizacijo izhodnih spojin ter nastanek stranskih produktov. Pri eksperimentalnem delu smo pri sintezi spojin **10** in **11** uporabili sklopitveni reagent EDC ter pomožni nukleofil HOBt. Dodali smo tudi bazo NMM, s katero smo dobili rahlo alkalen medij ter tako omogočili ionizacijo kisline za lažji potek reakcije.

Mehanizem nastanka amidne vezi je prikazan na Sliki 25. V prvi stopnji poteče aktivacija karboksilne kisline z metodo *N*-aciliranja z EDC. Nastane aktiviran ester, ki nato reagira s pomožnim nukleofilom HOBt, v zadnji stopnji pa z reakcijo nukleofilne substitucije še z aminom. Tako nastane amidna vez med aktivirano karboksilno kislino ter izbranim aminom.

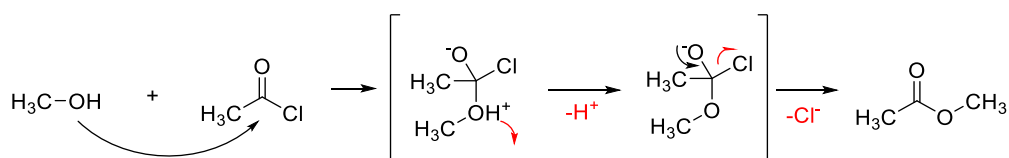


Slika 25: Mehanizem nastanka amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta EDC ter pomožnega nukleofila HOBt.

5.1.4 Odstranitev karbamatne zaščitne skupine z acidolizo

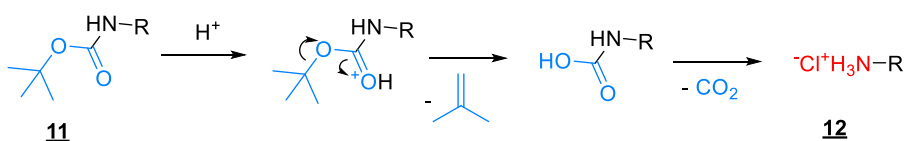
Zaščitna skupina se mora odstraniti pod specifičnimi reakcijskimi pogoji. Zaščitno skupino Boc odstranimo v kisljih pogojih acidolize, v katerih je neobstojna. Pri ekperimentalnem delu smo kisle pogoje zagotovili s tvorbo plinaste HCl *in situ*, in sicer z reakcijo med acetilkloridom ter metanolom na ledeni kopeli.

Mehanizem nukleofilne substitucije je prikazan na Sliki 26. Nukleofilna OH skupina metanola napade elektrofilno CO skupino acetilklorida in preko tetraedrskega intermedata nastane ester ter izstopi HCl.



Slika 26: Nukleofilna substitucija ter nastanek HCl.

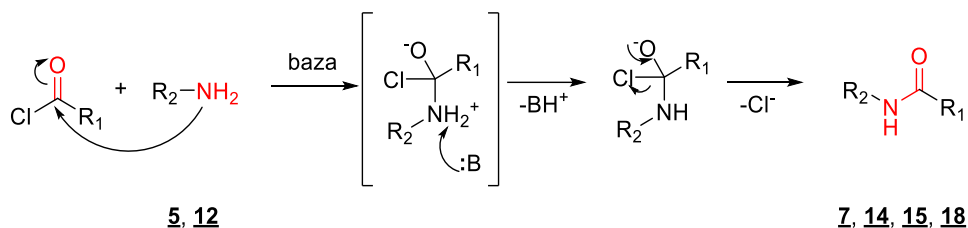
Po odstranitvi zaščite smo dobili spojino **12** v obliki soli, saj se je aminska skupina zaradi kisljih pogojev protonirala (Slika 27).



Slika 27: Kislinsko katalizirana odstranitev zaščite Boc.

5.1.5 N-aciliranje spojin

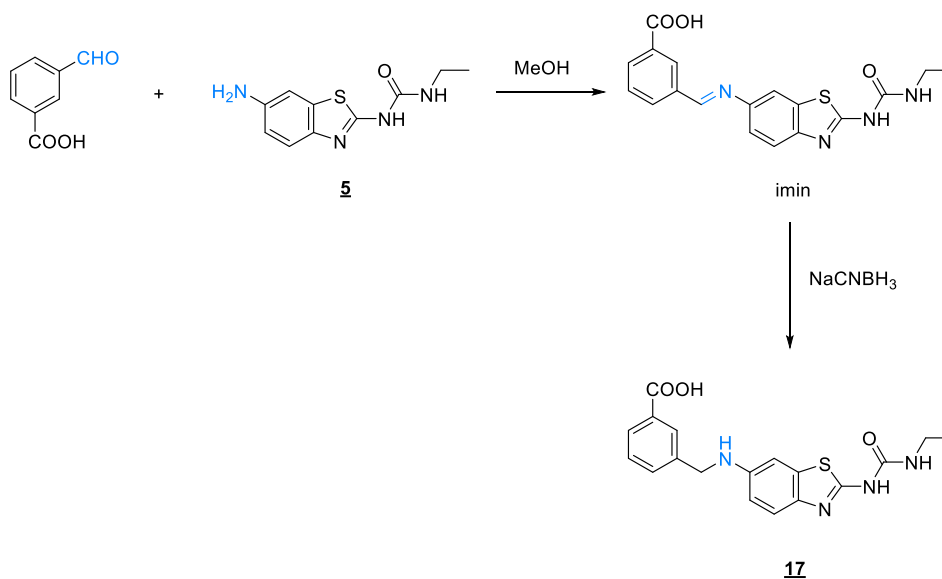
N-aciliranje (Slika 28) spojine **5** do spojine **18** ter spojine **12** do spojin **7**, **14** in **15** smo izvedli preko reakcije kislinskega klorida z aminom v prisotnosti šibke baze. V reakcijsko zmes smo dodali bazo Et₃N, ki je nevtralizirala sproščeno HCl, aminska skupina pa je tako ostala v neprotonirani obliki.



Slika 28: N-aciliranje spojin **5** in **12**.

5.1.6 Reduktivno aminiranje

Spojino **17**, ki je sekundarni amin, smo sintetizirali z reduktivnim aminiranjem. Reakcijo smo izvedli v dveh stopnjah (Slika 29). V prvi stopnji smo z reakcijo med spojino **5** in 3-formilbenzojsko kislino tvorili imin, ki smo ga nato v drugi stopnji z reducentom NaCNBH₃ pretvorili v sekundarni amin ter dobili spojino **17**.



Slika 29: Sintezna pot nastanka spojine **17**.

5.2 PREGLED KONČNIH SPOJIN

Uspešno smo sintetizirali 10 končnih spojin, ki so potencialni zaviralci DNA-giraze B. V Preglednici I so predstavljene njihove strukture.

Preglednica I: Struktura končnih spojin.

OZNAKA SPOJINE	STRUKTURNA FORMULA SPOJINE
<u>7</u>	
<u>10</u>	
<u>11</u>	
<u>12</u>	
<u>14</u>	
<u>15</u>	
<u>16</u>	
<u>17</u>	
<u>18</u>	
<u>19</u>	

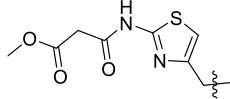
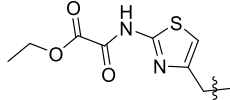
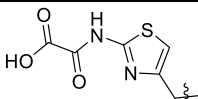
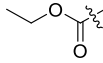

5.3 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

5.3.1 Encimski testi

Testiranje encimske aktivnosti sintetiziranih spojin je bilo izvedeno na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli* z uporabo testa dodatnega zvijanja (angl. supercoiling assay) encima *in vitro*. Zaviralno aktivnost spojin smo izrazili z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje aktivnosti encima v prisotnosti in odsotnosti zaviralca. Pove nam, kakšno aktivnost je encim ohranil po delovanju zaviralca. Manjši kot je odstotek RA, boljše so zaviralne lastnosti spojine ($\% \text{ zaviranja} = 100 \% - \text{RA}$). Rezidualno aktivnost smo določali pri dveh različnih koncentracijah vsake od testiranih spojin ($10 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$). Aktivnejšim spojinam, ki so imele vrednosti $\text{RA} < 50 \%$ pri $100 \mu\text{M}$, pa smo določili tudi vrednost IC_{50} oz. srednjo zaviralno koncentracijo. Rezultati so predstavljeni v Preglednici II.

Preglednica II: Zaviranje DNA-giraze iz *E. coli*.

OZNAKA SPOJINE	R	Zaviranje DNA-giraze iz <i>E. coli</i>	
		IC_{50} (μM)	Rezidualna aktivnost pri $10 \mu\text{M}$ (%)
<u>7</u> , <u>10</u> , <u>11</u> , <u>12</u> , <u>14</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>18</u> , <u>19</u>			
<u>17</u>			
<u>7</u>		-	77
<u>10</u>		41 ± 13	-
<u>11</u>		$3,9 \pm 0,1$	-
<u>12</u>		-	91

14		6,9 ± 0,2	-
15		8,3 ± 0,1	-
16		-	75
17	-	-	77
18		-	82
19		-	79

Na podlagi rezultatov sklepamo, da so spojine **10**, **11**, **14** in **15** dokaj šibki zaviralci DNA-giraze iz *E. coli*, saj delujejo zaviralno v mikromolarnem območju. K njihovi zaviralni aktivnosti poleg vodikovih vezi etilsečninskega fragmenta z Asp73 pomembno prispevajo tudi kation- π interakcije med fenilnim obročem zaviralca in stransko verigo Arg76. Jakost zaviranja smo želeli izboljšati z uvedbo različnih substituentov na mestu 6, ki bi lahko tvorili interakcije z Arg76 in/ali Arg136, vendar se ta pri navedenih spojinah ni bistveno razlikovala.

Spojina **10**, ki ima vezan 3,4-dikloro-5-metilpirolni fragment, ima šibko jakost zaviranja DNA-giraze ($IC_{50} = 41 \pm 13 \mu M$). V vezavnem mestu se verjetno obrne drugače kot ostale spojine, in sicer tako, da pirolamid interagira z Asp73. Na njeno hidrofobnost ter vezavo v hidrofobni žep ATP-vezavnega mesta encima pomembno vplivajo substituenti na pirolamidnem delu. Metilna skupina in kloridna atoma namreč tvorijo dodatne hidrofobne interakcije v hidrofobnem žepu ter tako izboljšajo zaviralno aktivnost spojine.

Med sintetiziranimi spojinami je največjo jakost zaviranja pokazala spojina **11** ($IC_{50} = 3,9 \pm 0,1 \mu M$), za kar je odgovoren *terc*-butiloksikarbonilni fragment. S *terc*-butilnim delom namreč spojina **11** tvori pomembne hidrofobne interakcije v hidrofobnem žepu ATP-vezavnega mesta encima, s karbonilnim kisikom pa dodatno vodikovo vez z Arg136. To vodi v močnejšo vezavo sintetizirane spojine v DNA-girazo ter posledično v izboljšanje njenega zaviranja. Spojina **12**, ki je njen odščiteni derivat, pa ravno zaradi odsotnosti teh interakcij ni pokazala zaviralne aktivnosti ($RA_{10 \mu M} = 91 \%$).

Spojini **14** ($IC_{50} = 6,9 \pm 0,2 \mu M$) in **15** ($IC_{50} = 8,3 \pm 0,1 \mu M$) imata primerljivo zaviralno delovanje, saj tako metil malonilni fragment spojine **14** kot etil oksalilni fragment spojine **15** tvorita dodatne vodikove vezi z gvanidinsko skupino Arg136 ter hidrofobne interakcije z AK ostanki v hidrofobnem žepu encima.

Hidroliza estra **15** do karboksilne kisline **16** je negativno vplivala na zaviralno aktivnost, saj se je spojina **16** izkazala kot neaktivna. Rezidualna aktivnost DNA-giraze pri $10 \mu M$ spojine **16** pa je bila 75 %.

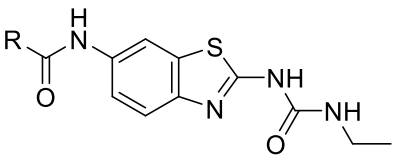
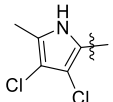
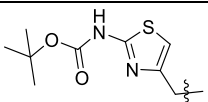
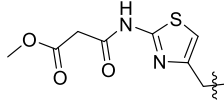
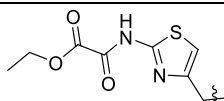
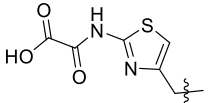
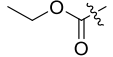

Kot neaktivne so se izkazale tudi spojine **7** ($RA_{10 \mu M} = 77 \%$), **17** ($RA_{10 \mu M} = 77 \%$), **18** ($RA_{10 \mu M} = 81 \%$) in **19** ($RA_{10 \mu M} = 79 \%$). Neposredna vezava etil oksalilnega fragmenta na osnovni skelet spojine **18** ter njena nadaljnja hidroliza do kislinskega derivata **19** žal nista privedli do želenega zaviranja DNA-giraze. Ravno nasprotno, kot močni zaviralci DNA-giraze, so se izkazali pirolamidni derivati, ki imajo vezane oksalilne substituentne na osnovnem skeletu in so jih pripravili drugi raziskovalci. Zaključimo lahko, da pirolamidni fragment tvori bolj ugodne interakcije z ATP-vezavnim mestom encima kot etilsečninski, saj tvori več hidrofobnih interakcij znotraj hidrofobnega žepa.

Naši rezultati torej kažejo na to, da zamenjava 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnega ogrodja z benzo[1,2-*d*]tiazolnim ugodno vpliva na zaviralno aktivnost spojin, saj so bile vrednosti IC_{50} spojin **10**, **11**, **14** ter **15** v nizkem mikromolarnem območju. Jakost zaviranja spojine **11** ($IC_{50} = 3,9 \pm 0,1 \mu M$), ki se je izkazala kot najboljši zaviralec DNA-giraze, pa je v primerjavi z njenim nasičenim analogom ($IC_{50} = 350 \pm 30 \mu M$) mnogo večja (34).

5.3.2 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko aktivnost sintetiziranih spojin so določali na klinično nadzorovanih sevih po G+ bakterij *S. aureus* in *E. faecalis* ter po G- bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa*. Rezultati testiranja so prikazani v Preglednici III.

Preglednica III: Protibakterijska aktivnost sintetiziranih spojin.

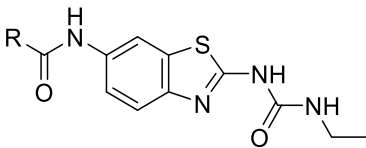
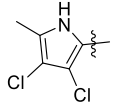
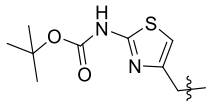
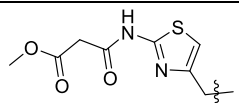
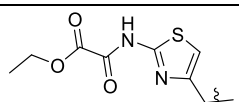
 <u>10, 11, 14, 15, 16, 18, 19</u>					
OZNAKA SPOJINE	R	Zaviranje rasti pri 50 μ M (%)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 25212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<u>10</u>		0	47	1	12
<u>11</u>		64	51	15	35
<u>14</u>		25	16	1	1
<u>15</u>		0	19	0	14
<u>16</u>		0	2	0	0
<u>18</u>		4	6	0	16
<u>19</u>		0	7	0	0

Vidimo, da so bile vse testirane spojine pri 50 μ M le šibko aktivne ali celo neaktivne proti sevom G+ bakterij *S. aureus* in *E. faecalis* ter G- bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa*. Eden izmed možnih razlogov za njihovo skromno protibakterijsko delovanje bi lahko bilo njihovo mikromolarno zaviranje DNA-giraze. Nekatere etilsečninske spojine drugih raziskovalcev so namreč izkazovale že nanomolarno zaviranje DNA-giraze ter s tem tudi dobro

protibakterijsko aktivnost proti G+ bakterijam. Slaba aktivnost teh spojin proti G- bakterijam pa je bila pogosto posledica njihovega izločanja iz bakterijske celice s pomočjo črpalk.

Protibakterijsko aktivnost spojin **10**, **11**, **14** in **15** so določili tudi na dveh mutiranih sevih *E. coli*, JW5503, ki ima okvarjeno črpalko, ter JD17464, ki ima okvarjeno zunanjo membrano zaradi motene sinteze lipidov A. Rezultati tega testiranja so podani v Preglednici IV.

Preglednica IV: Zaviranje rasti mutiranih sevov *E. coli*.

 10, 11, 14, 15					
OZNAKA SPOJINE	R	Zaviranje rasti			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> JW5503		<i>E. coli</i> JD17464
		% pri 50 μM	MIC ₉₀ (μM)	% pri 50 μM	% pri 50 μM
10		1	-	0	31
11		15	50	-	37
14		1	-	0	1
15		0	-	0	6

In vitro testi na mutiranem sevu *E. coli* JW5503 z okvarjeno črpalko kažejo na to, da so naše spojine substrati bakterijskih črpalk (zlasti spojina **11**), kar zmanjša njihovo koncentracijo v citoplazmi bakterijske celice ter s tem njihovo protibakterijsko aktivnost. Na podlagi rezultatov torej sklepamo, da je glavni razlog za odsotnost protibakterijske aktivnosti izločanje naših spojin iz bakterijskih celic skozi črpalke in ne njihova slaba penetracija skozi celično steno.

6 SKLEP

Bakterije postajajo v zadnjih letih čedalje bolj odporne proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam, kar predstavlja vedno večjo nevarnost za zdravje ljudi. Zato je nujno potrebno odkrivanje novih učinkovin z novimi tarčami in mehanizmi delovanja. Privlačno tarčo predstavlja encim DNA-giraza, ki je življenjskega pomena za bakterije. Ker je prisoten le v bakterijskih celicah, pa omogoča selektivno toksičnost protibakterijskih učinkovin.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove etilsečninske ATP-kompetitivne zaviralce DNA-giraze B z 2-amino-benzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom. Za tak strukturni tip smo se odločili na podlagi dokazane vezave etilsečninskega fragmenta v ATP-vezavno mesto DNA-giraze. Z uvajanjem različnih substituentov na aminske skupine na mestu 6 smo poskušali izboljšati aktivnost tovrstnih spojin na encimu ter doseči njihovo protibakterijsko delovanje. Tako smo sintetizirali 10 končnih spojin (**7**, **10-12**, **14-19**). Njihovo zaviralno aktivnost smo ovrednotili na DNA-girazi iz *E. coli*, določili pa smo tudi njihove protibakterijske aktivnosti na klinično nadzorovanih sevih bakterij *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* ter *P. aeruginosa*. Rezultati testiranj so potrdili zaviralno aktivnost spojin **10**, **11**, **14** in **15**, a le v mikromolarnem območju, ter njihovo skromno protibakterijsko delovanje proti omenjenim sevom G⁺ ter G⁻ bakterij. Nekatero spojino so bile pri posameznih sevih bakterij celo neaktivne. Najboljšo zaviralno in protibakterijsko aktivnost je pokazala spojina **11**, ki je imela najnižjo vrednost IC₅₀ in je povzročila največji odstotek zaviranja rasti izbranih bakterijskih sevov. Protibakterijske aktivnosti spojin **10**, **11**, **14** in **15** so bile določene tudi na dveh dodatnih, mutiranih sevih *E. coli*. Ugotovili smo, da je glavni razlog za odsotnost protibakterijske aktivnosti testiranih spojin pri G⁻ sevih njihovo izločanje iz bakterijskih celic skozi črpalke, ne pa njihova slaba penetracija skozi celično steno.

Kljub skromni zaviralni in protibakterijski aktivnosti sintetiziranih etilsečninskih spojin, pa povezava med njihovo strukturo in aktivnostjo predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo tega strukturnega razreda zaviralcev DNA-giraze. Možnosti za optimizacijo je sicer mnogo, smiselno pa bi se bilo osredotočiti zlasti na razvoj takih spojin, ki bi poleg dobrih fizikalno-kemijskih lastnosti imele tudi sposobnost premagovanja obrambnih mehanizmov odpornih bakterijskih sevov.

7 LITERATURA

1. Batagelj E: Splošna mikrobiologija, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, 1998: 2-5.
2. Jurca J: Splošna mikrobiologija, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1998: 14-17, 20-57.
3. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 13-18, 244-257.
4. Fidler N, Kus B: Kaj je dobro vedeti o zdravljenju z antibiotiki?, Lek, Ljubljana, 2009: 5-7, 12.
5. Fürst J: Poraba antibiotikov in antimikotikov. Farmacevtski vestnik 2017; 68 (št. 1): 3-5.
6. Tommasi R, Brown D G, Walkup G K, Manchester J I, Miller A A: ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. Nature Reviews Drug Discovery 2015; 14, 529-542.
7. Tomašič T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvao S, Tammela P, Banjanac M, Ergović G, Anderluh M, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. Journal of Medicinal Chemistry 2015; 58: 5501-5521.
8. Tomašič T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterial Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. Current Topics in Medicinal Chemistry 2014; 14: 130-151.
9. <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/bacteria/> (dostopano: 28.6.2017)
10. <http://www.news-medical.net/life-sciences/Eukaryotic-and-Prokaryotic-Cells-Similarities-and-Differences.aspx> (dostopano: 28.6.2017)
11. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/dna> (dostopano: 28.6.2017)
12. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C A, Krieger M, Scott M P, Zipursky L, Darnell J: Molecular cell biology, Fifth edition, W. H. Freeman, New York, 2004: 1-4, 101-107.
13. Travers A, Muskhelishvili G: DNA structure and function. The FEBS Journal 2015; 282: 2279-2295.

14. Champoux J J: DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 2001; 70: 369-413.
15. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 2033-2047.
16. Basarab G S, Manchester J I, Bist S, Boriack-Sjodin P A, Dangel B, Illingworth R, Sherer B A, Sriram S, Uria-Nickelsen M, Eakin A E: Fragment-to-Hit-to-Lead Discovery of a Novel Pyridylurea Scaffold of ATP Competitive Dual Targeting Type II Topoisomerase Inhibiting Antibacterial Agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56: 8712-8735.
17. Maxwell A: DNA gyrase as a drug target. *Trends in Microbiology* 1997; 5: 102-109.
18. Gross C H, Parsons J D, Trudy Grossman H, Charifson P S, Bellon S, Jernee J, Dwyer M, Chambers S P, Markland W, Botfield M, Raybuck S A: Active-Site Residues of *Escherichia coli* DNA Gyrase Required in Coupling ATP Hydrolysis to DNA Supercoiling and Amino Acid Substitutions Leading to Novobiocin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47: 1037-1046.
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/> (dostopano: 28.6.2017)
20. Gubaev A, Klostermeier D: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA repair* 2014; 16: 23-34.
21. Mayer C, Janin Y L: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chemical Reviews* 2014; 114: 2313-2342.
22. Bisacchi G S, Manchester J I: A New-Class Antibacterial - Almost. *Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV*. *ACS Infectious Diseases* 2015; 1: 4-14.
23. <https://www.ki.si/odseki/d01-odsek-za-racunsko-biokemijo-in-nacrtovanje-ucinkovin/dejavnosti/protibakterijska/> (dostopano: 28.6.2017)
24. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo: Mikrobi in antibiotiki 2001, Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD, Ljubljana, 2001: 18, 24.

25. <http://ecdc.europa.eu/sl/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/Pages/general-public.aspx> (dostopano: 8.6.2017)
26. Drogenik P: Prilaganje odmerkov protimikrobnih zdravil. Farmaceutski vestnik 2017; 68 (št. 1): 14-24.
27. Brown D: Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?. Nature Reviews Drug Discovery 2015; 14: 821-832.
28. Bbosa G S, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe D B, Ntale M: Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. Health 2014; 6: 410-425.
29. Silver L L: Challenges of antibacterial discovery. Clinical Microbiology Reviews 2011; 24: 71-109.
30. Grillot A L, Le Tiran A, Shannon D, Krueger E, Liao Y, O'Dowd H, Tang Q, Ronkin S, Wang T, Waal N, Li P, Lauffer D, Sizensky E, Tanoury J, Perola E, Grossman T H, Doyle T, Hanzelka B, Jones S, Dixit V, Ewing N, Liao S, Boucher B, Jacobs M, Bennani Y, Charifson P S: Second-Generation Antibacterial Benzimidazole Ureas: Discovery of a Preclinical Candidate with Reduced Metabolic Liability. Journal of Medicinal Chemistry 2014; 57: 8792-8816.
31. Kale M G, Raichurkar A, Hameed P S, Waterson D, McKinnley D, Manjunatha M R, Kranthi U, Koushik K, Jena L K, Shinde V, Rudrapatna S, Barde S, Humnabadkar V, Madhavapeddi P, Basavarajappa H, Ghosh A, Ramya VK, Gupta S, Sharma S, Vachaspati P, Kumar M, Giridhar J, Reddy J, Panduga V, Ganguly S, Ahuja V, Gaonkar S, Kumar N, Ogg D, Tucker J A, Boriack-Sjodin P A, Sousa S M, Sambandamurthy V K, Ghorpade S R: Thiazolopyridine Ureas as Novel Antitubercular Agents Acting through Inhibition of DNA Gyrase B. Journal of Medicinal Chemistry 2013; 56: 8834-8888.
32. Palmer JT, Axford L C, Barker S, Bennett J M, Blair M, Collins I, Davies D T, Ford L, Gannon C T, Lancett P, Logan A, Lunniss C J, Morton C J, Offermann D A, Pitt G R, Rao B N, Singh A K, Shukla T, Srivastava A, Stokes N R, Thomaidis-Brears H B, Yadav A, Haydon D J: Discovery and in vivo evaluation of alcohol-containing benzothiazoles as potent dual-targeting bacterial DNA supercoiling inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2014; 24: 4215-4222.

33. Yule I A, Czaplewski L G, Pommier S, Davies D T, Narramore S K, Fishwick C W: Pyridine-3-carboxamide-6-yl-ureas as novel inhibitors of bacterial DNA gyrase: structure based design, synthesis, SAR and antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 86: 31-38.
34. Klemenčič I: Sinteza etilsečninskih derivatov 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina kot zaviralcev DNA giraze. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2015: 48-49.