

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠ NARTNIK  
MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ALEŠ NARTNIK

**SINTEZA ETILSEČNINSKIH DERIVATOV 2-AMINOTIAZOLA KOT  
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE**

**SYNTHESIS OF ETHYLUREA DERIVATIVES OF 2-AMINOTHIAZOLE AS  
POTENTIAL INHIBITORS OF DNA-GYRASE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vso strokovnost, prijaznost, potrpežljivost in prijateljski odnos med nastajanjem magistrskega dela in tekom študija.

Največja zahvala gre mojima staršema, ki sta mi izbrani študij omogočila, me ves čas nesebično podpirala in neomajno spodbujala tudi, ko mi ni šlo – brez vaju mi ne bi uspelo.

Hvala tebi, Nina, za vso pomoč, spodbudo in ljubezen, ko sem jih potreboval. Tudi brez tebe mi ne bi uspelo.

Hvala tudi vsem ostalim prijateljem, s katerimi smo preživeli nepozabna študijska leta in ustvarili neprecenljive spomine.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Aleš Nartnik

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	IX
ABSTRACT .....	XI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 Bakterijska odpornost .....	2
1.2 Bakterijske topoizomeraze II .....	2
1.2.1 DNA-giraza .....	3
1.2.2 Topoizomeraza IV .....	3
1.3 Vezavno mesto za ATP.....	4
1.4 Zaviralci topoizomeraz II.....	7
1.4.1 Zaviralci GyrA/ParC .....	7
1.4.2 Zaviralci GyrB/ParE.....	8
1.5 Razvoj etilsečninskih derivatov .....	10
2 NAČRT ZA DELO.....	14
3 MATERIALI IN METODEDE .....	17
3.1. Reagenti in topila .....	17
3.2. Kromatografske metode.....	17
3.2.1 Tankoplastna kromatografija.....	17
3.2.2 Kolonska »flash« kromatografija .....	18
3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti .....	18
3.3 Spektroskopske metode .....	18
3.3.1 Jedrska magnetna resonanca ( <i>nuclear magnetic resonance</i> – NMR) .....	19
3.3.2 Masna spektrometrija (MS).....	19
3.4 Polarimetrija.....	19
3.5 IUPAC-nomenklatura in risanje spojin.....	20
3.6 Načrtovanje spojin – molekulsko sidranje.....	20
3.7 Določanje temperature tališča.....	20
3.8 Biološka testiranja.....	20
4 EKSPERIMENTALNO DELO .....	22
4.1 Splošni postopek sinteze amidne vezi .....	22

4.2	Sinteza	<i>terc</i> -butil	( <i>S</i> )-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)karbamata.....	22
4.3	Sinteza	<i>terc</i> -butil	( <i>S</i> )-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)karbamata.....	23
4.4	Sinteza	( <i>S</i> )-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)-3-etiluree.....		24
4.5	Sinteza	( <i>S</i> )-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....		25
4.6	Sinteza	metil	( <i>S</i> )-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)karbamoil)benzoata.....	26
4.7	Sinteza		( <i>S</i> )-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)karbamoil)benzojske kisline .....	27
4.8	Sinteza		( <i>S</i> )-2-acetoamido- <i>N</i> -(( <i>S</i> )-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)-3-fenilpropanamida.....	28
4.9	inteza	metil	( <i>S</i> )-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoata .....	29
4.10	Sinteza		( <i>S</i> )-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanojske kisline .....	30
4.11	Sinteza		( <i>S</i> )- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)-3-hidrazinil-3-oksopropanamida.....	31
4.12	Sinteza	etil	2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetata.....	32
4.13	Sinteza		2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)ocetne kisline.....	32
4.14	Sinteza		1-(6-aminobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)-3-etiluree .....	33
4.15	Sinteza		<i>N</i> -(2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)-2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamida .....	34
4.16	Sinteza	etil	2-(2-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)acetata .....	35
4.17	Sinteza	etil	2-(2-acetamidotiazol-4-il)acetata .....	35
4.18	Sinteza		2-(2-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)etanojske kisline .....	36
4.19	Sinteza		2-(2-acetamidotiazol-4-il)etanjoske kisline.....	37
4.20	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.....	38
4.21	Sinteza		2-(2-acetamidotiazol-4-il)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)benzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)acetamida .....	38
4.22	Sinteza	metil	4-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoata.....	39

4.23	Sinteza metil 3-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoata .....	40
4.24	Sinteza metil 3-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kisline .....	41
4.25	Sinteza 4-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kisline.....	42
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	44
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	44
5.1.1	Reakcija z di-terc-butildikarbonatom.....	44
5.1.2	Sinteza etilsečninske skupine .....	45
5.1.3	Odstranitev zaščitne skupine na amino skupini z acidolizo.....	46
5.1.4	Sinteza amidne vezi s pomočjo sklopitvenih reagentov.....	46
5.1.5	Alkalna hidroliza estrov .....	48
5.1.6	<i>N</i> -aciliranje s kislinskim kloridom .....	49
5.1.7	Hidrazinoliza .....	50
5.1.8	Katalitsko hidrogeniranje .....	50
5.2	REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ .....	51
6	SKLEP .....	58
7	VIRI IN LITERATURA.....	61

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b>	Heterotetramerna zgradba bakterijskih topoizomeraz tipa II: DNA-giraza (levo) in topoizomeraza IV (desno). S puščicami so označene približne lokacije vezavnih mest za ATP na podenotah GyrB in ParE ter lokacije aktivnih mest za cepitev in ponovno združitve verig DNA na podenotah GyrA in ParC (prirejeno po 11). ....	4
<b>Slika 2:</b>	Kristalna struktura 43 kDa velikega GyrB-homodimera v kompleksu s 5'-adenilil- $\beta,\gamma$ -imidodifosfatom (nehidrolizirajoči analog ATP – ADPNP)(na sliki prikazano z rdečo). N-končni poddomeni sta označeni s svetlo in temno rumeno barvo, C-končni poddomeni pa z roza oziroma modro barvo (prirejeno po 3).....	5
<b>Slika 3:</b>	Shematska ponazoritev interakcij med ATP in GyrB24 (prirejeno po 4). Ključne aminokisliline so označene s temno zelenim okvirjem, koordinacijske in vodikove vezi so prikazane z modro črtkano črto ter hidrofobne interakcije s krivuljo rdeče barve. ....	6
<b>Slika 4:</b>	Strukturne formule aminokumarinskih zaviralcev GyrB/ParE (prirejeno po 11): a) novobiocin, b) klorobiocin in c) kumermicin A1.....	9

<b>Slika 5:</b> Strukturna formula ciklotialidina (prirejeno po 11).....	10
<b>Slika 6:</b> Razvoj etilsečninskih zaviralcev GyrB/ParE. Z rdečo barvo so označene ključne interakcije z Asp73 in s strukturno ohranjeno molekulo vode ter z zeleno barvo substituiran 2-piridil na mestu 7, ki ugodno vpliva na vezavo zaviralca (prirejeno po 11).....	11
<b>Slika 7:</b> Struktura etilsečninskega zaviralca GyrB/ParE druge generacije. Na mestu 7 je vezan tetrahidrofuranski obroč, ki ugodno vpliva na metabolizem spojine. Z vpeljavo fosfatne skupine so oblikovali predzdravilo in močno izboljšali topnost (prirejeno po 11).....	11
<b>Slika 8:</b> Strukturno podobne formule zaviralcev GyrB/ParE. Spojina <b>4</b> spada med benzimidazol sečnine, spojina <b>5</b> med triazolopiridin sečnine in spojina <b>6</b> med imidazopiridin sečnine (prirejeno po 22, 23). .....	12
<b>Slika 9:</b> Načrt optimizacije nedavno odkritega 2-aminotiazolnega strukturnega tipa zaviralcev ( $IC_{50} = 49$ nM pri DNA-girazi iz <i>E. coli</i> ) (prirejeno po 18). Ohranili bomo svetlo modro označeni centralni 2-aminotiazolni skelet in sintetizirali etilsečninski fragment.....	14
<b>Slika 10:</b> Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a) $Boc_2O$ , THF, 0 °C, kasneje sobna T; b) $CH_3CH_2NCO$ , $CHCl_3$ , 0 °C, kasneje sobna T; c) $AcCl$ , MeOH, 0 °C, kasneje sobna T, 1 M NaOH; d) različni substituenti – d <sub>1</sub> ) metil malonil klorid, $Et_3N$ , dioksan, 0 °C, kasneje sobna T; d <sub>2</sub> ) karboksilna kislina, EDC, HOBT, <i>N</i> -metilmorfolin, DMF, 0 °C, kasneje sobna T. ....	15
<b>Slika 11:</b> Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a) Pd/C, $H_2$ , EtOH, DMF, sobna T; b) karboksilna kislina, EDC, HOBT, <i>N</i> -metilmorfolin, DMF, 0 °C, kasneje sobna T. ....	15
<b>Slika 12:</b> Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a) različni substituenti – a <sub>1</sub> ) $CH_3CH_2NCO$ , $CHCl_3$ , 0 °C, kasneje sobna T; b) 2 M NaOH, sobna T; c) primarni amin, EDC, HOBT, <i>N</i> -metilmorfolin, DMF, 0 °C, kasneje sobna T; d) različni substituenti – d <sub>1</sub> ) $Boc_2O$ , DMAP, DKM; d <sub>2</sub> ) $AcCl$ , $Et_3N$ , 0 °C, kasneje sobna T; e) 2 M NaOH, sobna T. ....	16
<b>Slika 13:</b> Prikaz nastanka neželenega dikarbamatnega produkta.....	44
<b>Slika 14:</b> Mehanizem tvorbe <i>terc</i> -butilkarbamata s pomočjo DMAP kot katalizatorja. Stranski produkt reakcije je <i>terc</i> -butil hidrogenkarbonat, ki razpade na <i>terc</i> -butilni alkohol in ogljikov dioksid (povzeto po 27). .....	45

<b>Slika 15:</b> Mehanizem tvorbe HCl med kislinskim kloridom in alkoholom (prirejeno po 29). .....	46
<b>Slika 16:</b> Mehanizem tvorbe amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov (prirejeno po 30).....	47
<b>Slika 17:</b> Rezultat TLC-analize reakcijske zmesi sinteze spojine <b>9</b> . Sintetizirana diastereomera imata zelo podoben retencijski faktor, zato smo ob večji količini racemata uspeli izolirati le manjši delež posameznega diastereomera.....	48
<b>Slika 18:</b> Mehanizem alkalne hidrolize estrov (prirejeno po 31).....	48
<b>Slika 19:</b> Mehanizem reakcije med primarnim aminom in kislinskim kloridom (prirejeno po 32).....	49
<b>Slika 20:</b> Mehanizem reakcije med hidrazinom in estrom (prirejeno po 33).....	50
<b>Slika 21:</b> Mehanizem katalitskega hidrogeniranja aromatske nitro skupine (prirejeno po 34).....	51
<b>Slika 22:</b> Predvidena vezava spojine <b>24</b> v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz <i>E. coli</i> . S temno modro so označeni atomi dušika, z rdečo atomi kisika in z oranžno atomi žvepla. Vodikove vezi so označene s prekinjenimi črnimi črtami. Molekulsko sidranje je delo doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. (povzeto po 35). .....	55

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Zaviralna aktivnost spojin <b>4</b> , <b>5</b> in <b>6</b> na encimih DNA-giraza in topozomeraza IV ter MIC-vrednosti teh spojin za <i>S. aureus</i> (prirejeno po 22, 23). .....	13
<b>Preglednica II:</b> Zaviralna aktivnost spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazolnim osrednjim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz <i>E. coli</i> . .....	54
<b>Preglednica III:</b> Zaviralna aktivnost spojin z benzo[1,2- <i>d</i> ]tiazolnim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz <i>E. coli</i> . .....	55
<b>Preglednica IV:</b> Zaviralna aktivnost spojin z 2-aminotiazolnim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz <i>E. coli</i> .....	56
<b>Preglednica V:</b> Zaviralna aktivnost rekombinantne DNA-giraze in protibakterijsko delovanje končnih spojin (povzeto po 35). .....	57



## POVZETEK

Pojav odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam se nezadržno širi in je že postal problem globalnih razsežnosti, zato farmacevtska industrija pospešeno raziskuje nove potencialne tarče in razvija nove protibakterijske učinkovine. Širjenje »superbakterij«, ki so razvile odpornost proti prav vsem terapevtsko uporabnim protibakterijskim učinkovinam, nas je prisililo v razvoj protibakterijskih učinkovin, ki imajo edinstven mehanizem delovanja. DNA-giraza ima v bakterijski celici pomembno biološko funkcijo, saj sodeluje pri podvajanju molekul DNA in ima edinstveno sposobnost uvajanja dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA. Strukturna podobnost s topoizomerozo IV, ki je prav tako udeležena v uravnavanju topologije in podvajanju molekul DNA, nam odpira možnost dvojnega tarčnega ciljanja. Zaradi njene biološke funkcije, možnosti dvojnega tarčnega ciljanja in dejstva, da DNA-girazo najdemo samo v prokariotskih organizmih, je zanimiva tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. V okviru magistrskega dela smo sintetizirali etilsečninske derivate 2-aminotiazola kot potencialne zaviralce DNA-giraze. Za etilsečninski fragment, vezan na amino skupino 2-aminotiazola, je dokazano, da je sposoben ključnih interakcij z Asp73 in s strukturno ohranjeno molekulo vode, zato smo z uvedbo različnih dodatnih substituentov skušali izboljšati fizikalno-kemijske lastnosti načrtovanih spojin. Izhajali smo iz treh različnih izhodnih spojin, zato smo sintetizirali tri različne serije potencialnih zaviralcev s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim, z benzo[1,2-*d*]tiazolnim in s tiazolnim skeletom. Najboljšo encimsko zaviralno aktivnost je imel derivat pirolamida **6** ( $IC_{50} = 1,4 \mu M$ ), pri katerem ključne interakcije z Asp73 tvori pirolamidni fragment, ki glede na kristalne strukture kompleksov DNA-giraze in zaviralcev tvori eno vodikovo vez manj od etilsečninskega fragmenta. Pri spojinah s tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim in s tiazolnim osrednjim skeletom je bil razlog za šibko encimsko zaviralno aktivnost najverjetneje odsotnost kation- $\pi$  interakcij z Glu50-Arg76 solnim mostom. Serija zaviralcev z nenasičenim benzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom, ki je teh interakcij sposobna, izkazuje do 90-krat boljšo encimsko aktivnost od nenasičenih analogov ( $IC_{50} = 3,9 \mu M$  proti  $350 \mu M$ ). Protibakterijsko testiranje spojin je pokazalo zelo šibko delovanje na po Gramu-pozitivne in neaktivnost na po Gramu-negativne bakterije. Razloga za slabo protibakterijsko delovanje sta verjetno prešibka encimska zaviralna aktivnost in to, da so spojine substrat za celične izlivne črpalke, ki znižujejo citoplazemsko koncentracijo v bakterijskih celicah, in ne slaba permeabilnost.

**Ključne besede:** etilsečnine, 2-aminotiazol, DNA-giraza, topoisomeraza IV, protibakterijsko delovanje

## ABSTRACT

The antibiotic resistance phenomenon which is uncontrollably spreading worldwide has already become a problem of global dimensions and as such gives pharmaceutical industry all the more reasons to investigate new potential antibacterial targets and develop new antibacterial agents. Emerging “superbugs” which have developed resistance against all known antibacterial agents has forced us into development of antibacterial agents with a unique mechanism of action. DNA gyrase has an important biological role in process of DNA replication and has unique ability of introducing negative supercoils into circular DNA. Structural similarity with topoisomerase IV, which is also involved in modulation of DNA topology and DNA replication, opens a possibility of dual targeting of both enzymes. Its biological role, possibility of dual targeting and the fact that it is only present in prokaryotes make DNA gyrase an interesting target for development of new antibacterial agents. Within this master’s thesis we synthesized ethylurea derivatives of 2-aminothiazole as potential inhibitors of DNA gyrase. Since it is proven that ethylurea moiety can form key interactions with Asp73 and a bound water molecule we have introduced different substituents to improve physical and chemical properties of designed compounds. We originated from three starting compounds and as a result we have synthesized three different series of potential inhibitors with 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole, benzo[1,2-*d*]thiazole and thiazole as a central rings. The best inhibitory activity displayed pyrrolamide **6** ( $IC_{50} = 1,4 \mu M$ ) of which, in spite of forming one hydrogen bond less than ethylurea moiety, it is pyrrolamide moiety that anchors the inhibitor in ATP binding site of DNA gyrase. The main reason for weak inhibitory activity of series with 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole and thiazole central rings was inability of forming cation- $\pi$  interactions between Glu50-Arg76 salt bridge and inhibitors. Series of inhibitors with unsaturated central rings which can form such interaction have shown 90-fold more potent inhibitory activity than their saturated analogs ( $IC_{50} = 3,9 \mu M$  against  $350 \mu M$ ). Antibacterial testing has shown weak antibacterial activity against Gram-positive bacteria and inactivity against Gram-negative bacteria. Additional testing indicated that these compounds are efflux pump substrates, thus reducing their cytoplasmic concentrations as the main reason for weak antibacterial activity or the lack of it, and not their penetration through cell wall.

**Key words:** ethylurea, 2-aminothiazole, DNA gyrase, topoisomerase IV, antibacterial

# SEZNAM OKRAJŠAV

<b>AcCl</b>	acetilklorid
<b>ADPNP</b>	5'-adenilil- $\beta,\gamma$ -imidodifosfat
<b>AK</b>	aminokislina, aminokislinski
<b>ATP</b>	adenozin-5'-trifosfat
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamid
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
<b>EtAc</b>	etilacetat
<b>EtOH</b>	etanol
<b>GyrA</b>	podenota A DNA-giraze
<b>GyrB</b>	podenota B DNA-giraze
<b>G-</b>	po Gramu negativen
<b>G+</b>	po Gramu pozitiven
<b>HOBT</b>	1-hidroksibenzotriazol
<b>HPLC</b>	<i>high-performance liquid chromatography</i> – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
<b>HRMS</b>	<i>high resolution mass spectrometry</i> – masna spektrometrija visoke ločljivosti
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija zaviralca, ki zavre encimsko aktivnost za 50 %
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MRSA</b>	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MS</b>	masna spektrometrija

<b>NMM</b>	<i>N</i> -metilmorfolin
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i> – jedrska magnetna resonanca
<b>ParC</b>	podenota C topoizomeraze IV
<b>ParE</b>	podenota E topoizomeraze IV
<b>Pd/C</b>	paladij, adsorbiran na ogljik
<b>RA</b>	rezidualna aktivnost
<b>R<sub>f</sub></b>	retencijski faktor
<b>SF</b>	stacionarna faza
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography</i> – tankoplastna kromatografija
<b>UV</b>	ultravijolično valovanje

# 1 UVOD

Odkritje antibiotikov predstavlja prelomno točko v človeški zgodovini, saj je v številnih pogledih povzročilo pravo revolucijo v medicini. Bolezni, ki so do tedaj veljale za neozdravljive, niso več pomenile smrtne grožnje, ker so postale obvladljive in ozdravljive. Zaradi tega velja, da je odkritje antibiotikov eden največjih dosežkov 20. stoletja, saj so le-ti rešili veliko življenj ter posledično podaljšali življenjsko dobo in dvignili kakovost življenja.

Protibakterijske učinkovine delujejo na dva načina. Bakterije lahko ubijejo in delujejo baktericidno ali pa samo zaustavijo njihovo rast in delujejo bakteriostatično. Ne glede na mehanizem delovanja protibakterijske učinkovine je pri njenem delovanju zaželeno selektivnost. Le tista, ki je selektivna ter sposobna razlikovati med človeškimi in bakterijskimi celicami, bo namreč primerna tudi za terapevtsko uporabo. Poznamo tri glavne tarče, na katere delujejo protibakterijske učinkovine:

- biosinteza bakterijske celične stene,
- sinteza bakterijskih proteinov ter
- podvajanje in popraviljanje bakterijske DNA (1).

Protibakterijske učinkovine imajo od njihovega odkritja naprej izreden vpliv na naše življenje in tudi dandanes njihov razvoj vedno bolj pridobiva na veljavi. Na žalost pa ta čudežna zdravila niso brez slabosti oziroma pomanjkljivosti. Leta pretirane in neprimerne uporabe so pripeljala do razvoja odpornosti bakterij. Širjenje in naraščanje števila odpornih bakterij potekata z veliko hitrostjo, kar bi nas lahko v najslabšem primeru ponovno pripeljalo v čas, ko protibakterijskih učinkovin še nismo poznali. Pomembnost in vrednost protibakterijskih učinkovin ne moreta biti nikoli precenjena, saj smo v zdravljenju infekcij popolnoma odvisni od njih. Za zaježitev omenjene grožnje je bilo podanih več ukrepov in eden takih je prav spodbujanje razvoja novih protibakterijskih učinkovin, proti katerim bakterije odpornosti še niso razvile. Ogromen interes po nadzoru uporabe protibakterijskih učinkovin priča, da je le malo dvomov o resnosti trenutne situacije. Mehanizmi odpornosti so pandemični ter povzročajo ogromno klinično in finančno breme za javnozdravstveni sistem po svetu. Ključno je, da se razvoj protibakterijskih učinkovin ne zaustavi, saj v

bakterijskih patogenih obstaja še ogromno neraziskanih potencialnih tarč za nove vrste protibakterijskih učinkovin (2).

## **1.1 Bakterijska odpornost**

Bakterijska odpornost proti protibakterijskim učinkovinam je neizbežen dogodek. Ko je za protibakterijsko učinkovino enkrat dokazano, da je učinkovita in registrirana za uporabo, se začne odštevanje do pojava odpornosti. Klinično pomembna odpornost se razvije v času od nekaj mesecev do nekaj let. Bakterije so proti protibakterijskim učinkovinam razvile več različnih mehanizmov obrambe, ki jih v širšem smislu razdelimo v štiri razrede:

- pojav t. i. celičnih izlivnih črpalk, ki protibakterijsko učinkovino črpajo iz celice,
- sprememba strukture oziroma inaktivacija protibakterijske učinkovine,
- sprememba tarčnega mesta in
- sprememba presnovne poti (1).

Zaradi zelo kratkega časa do pojava odpornosti in grožnje, ki jo le-ta predstavlja, so stalna prizadevanja za uveljavitev nadzora nad porabo protibakterijskih učinkovin pripeljala do različnih predlogov s strani strokovnjakov največjih zdravstvenih organizacij. Čeprav izsledki kažejo, da ima lahko strikten nadzor pri uporabi protibakterijskih učinkovin pri ljudeh (izdajanje le na recept, izogibanje predpisovanja pri virusnih obolenjih), živalih in v kmetijstvu pozitiven učinek na pojavnost odpornosti, izkoreninjenja odpornosti z njim skoraj zagotovo ne bomo dosegli (2).

## **1.2 Bakterijske topoizomeraze II**

Topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembo topološkega stanja molekule DNA v celici. Delimo jih v dva razreda: topoizomeraze tipa I, ki cepijo le eno verigo DNA, in topoizomeraze tipa II, ki cepijo obe verigi DNA. Pri cepitvi verige DNA s katerokoli izmed topoizomeraz nastane prehodna fosfodiestrška vez med tirozinskim ostankom encima in enim izmed koncev verige DNA. Topologija molekule DNA se lahko spreminja tekom življenjske dobe nastalega kovalentnega intermediata. Proces se zaključi s ponovno povezavo cepljenih koncev verige DNA in s sprostitvijo encima (3).



V bakterijski celici najdemo dve vrsti topoizomeraz tipa II – DNA-girazo in topoizomerazo IV. Oba encima imata podobno strukturo in aminokislinsko zaporedje, vendar se njuni funkciji v organizmih razlikujeta. DNA-giraza je potrebna pri začetku podvajanja in pri podaljševanju hčerinske verige, medtem ko je topoizomeraza IV udeležena pri razpletanju hčerinske verige po koncu podvajanja. Zaradi velike strukturne podobnosti med encimoma zaviralci topoizomeraz II običajno zavirajo oba encima hkrati. Dvojno tarčno ciljanje zmanjša možnost pojava odpornosti pri bakterijah zaradi mutacije tarče, saj se ta izrazi šele, ko pride do mutacij na obeh encimih. Kljub velikosti in zapletenosti reakcij, v katerih so udeležene topoizomeraze II, pa sta klinično uporabljeni samo dve vrsti njihovih zaviralcev – fluorokinoloni in aminokumarini. V sedanjosti se uporabljajo le še fluorokinoloni, vendar jim grozi vse večja odpornost bakterij (4, 5, 6).

### **1.2.1 DNA-giraza**

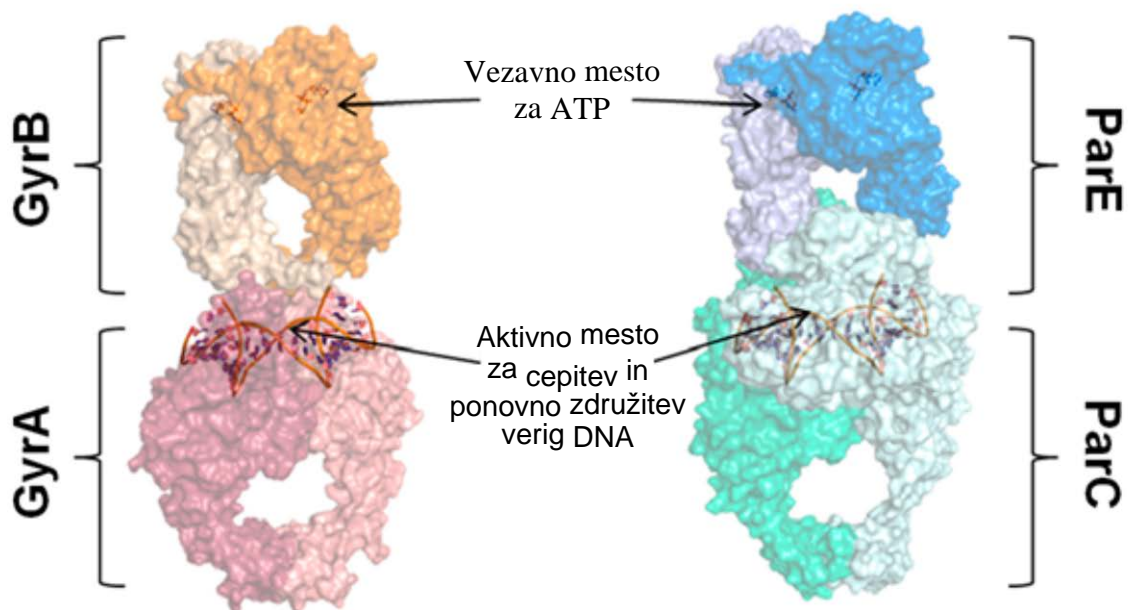
DNA-giraza spada med topoizomeraze tipa II in jo najdemo samo med prokariotskimi organizmi. Ima edinstveno sposobnost uvajanja dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA. Encim pri tem potrebuje energijo, ki jo zagotovi s hidrolizo ATP. Negativno zvita molekula DNA v celici zavzame manj prostora, poleg tega pa dodatna zvitost pozitivno vpliva na razčlenitev baznih parov in olajša prepisovanje (7, 8).

DNA-giraza je heterotetramerni encim, sestavljen iz dveh podenot A (GyrA) in dveh podenot B (GyrB) z molekulskima masama 97 kDa in 90 kDa, ki skupaj tvorita aktivni kompleks v obliki  $A_2B_2$  (sliki 1 in 2). GyrA je udeležena v interakciji z DNA in v aktivnem mestu vsebuje tirozin, ki je odgovoren za cepitev verige DNA. GyrB vsebuje vezavno mesto za ATP, kjer potekata vezava in cepitev molekul ATP (slika 1) (8, 9).

### **1.2.2 Topoizomeraza IV**

Topoizomeraza IV prav tako kot DNA-giraza spada med topoizomeraze tipa II. Udeležena je pri nadzoru topologije DNA in razpletanju hčerinske verige po koncu podvajanja. Ima podobno strukturo kot DNA-giraza, saj je sestavljena iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta homologni podenotama GyrA in GyrB. Podenoti GyrA in ParC sta namreč udeleženi v interakcijah z DNA, podenoti GyrB in ParE pa vsebujeta vezavno mesto za molekulo ATP (slika 1). Topoizomeraza IV in DNA-giraza se od evkariotskih topoizomeraz tipa II razlikujeta po zgradbi, saj so slednje sestavljene iz ene same podenote

in tvorijo homodimer. Oba encima sta tarči fluorokinolonov, ki se vežejo predvsem na podenoti GyrA/ParC, in aminokumarinov, ki se vežejo na podenoti GyrB/ParE (10).



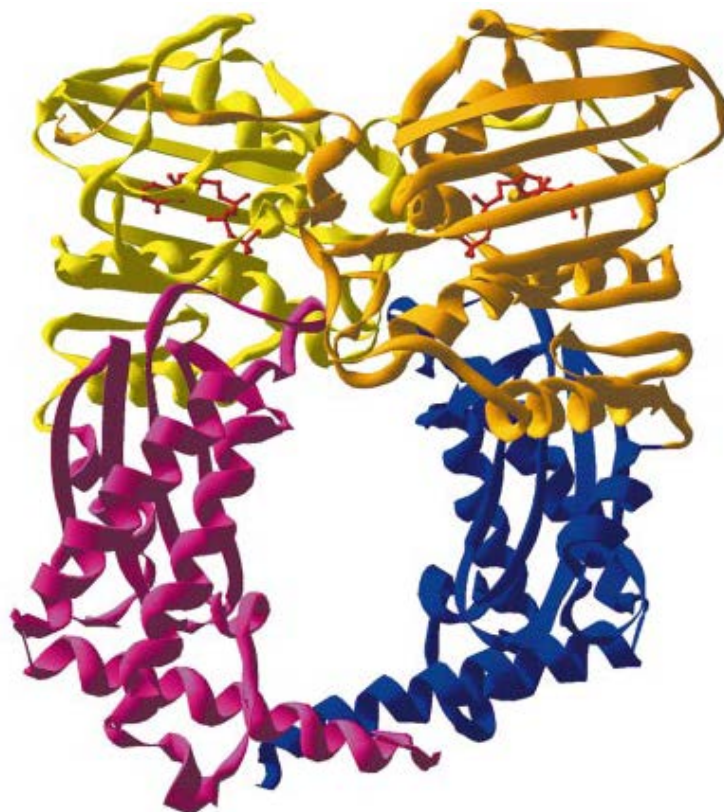
**Slika 1:** Heterotetramerna zgradba bakterijskih topoizomeraz tipa II: DNA-giraza (levo) in topoizomeraza IV (desno). S puščicami so označene približne lokacije vezavnih mest za ATP na podenotah GyrB in ParE ter lokacije aktivnih mest za cepitev in ponovno združitev verig DNA na podenotah GyrA in ParC (prirejeno po 11).

Zaviralci topoizomeraz tipa II običajno zavirajo oba encima hkrati, vendar z različnimi afinitetama, kar je odvisno od vrste zaviralca in mikroorganizma. Pri po Gramu-negativnih (G-) bakterijah je tako primarna tarča fluorokinolonov DNA-giraza, medtem ko je pri po Gramu-pozitivnih (G+) bakterijah primarna tarča topoizomeraza IV (10). Na drugi strani aminokumarini izkazujejo močno protimikrobno delovanje le na G+ bakterije, kjer je primarna tarča DNA-giraza, ki jo zavirajo od deset- do nekajtisočkrat močnejše kot topoizomerazo IV (12).

### 1.3 Vezavno mesto za ATP

Vezavno mesto za ATP se nahaja na podenoti GyrB (slika 1). Ta je sestavljena iz dveh domen – iz 43 kDa velike N-končne domene (aminokislinski ostanki (AK) 2–392), kjer se nahaja ATP-vezavno mesto, in iz 47 kDa velike C-končne domene (AK 393–804), ki služi

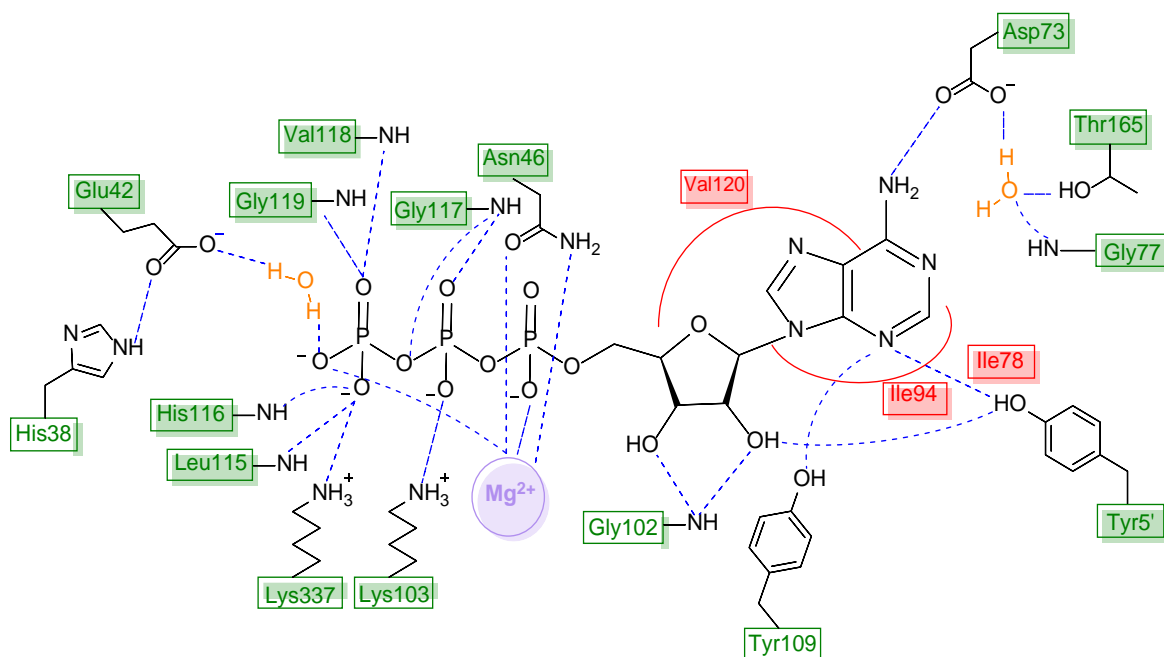
za interakcije s podenoto GyrA. N-končna domena je sestavljena še iz dveh poddomen; N-končne poddomene (AK 2–220) in C-končne poddomene (AK 221–392) (4, 13, 14).



**Slika 2:** Kristalna struktura 43 kDa velikega GyrB-homodimera v kompleksu s 5'-adenilil- $\beta$ , $\gamma$ -imidodifosfatom (nehidrolizirajoči analog ATP – ADPNP)(na sliki prikazano z rdečo). N-končni poddomeni sta označeni s svetlo in temno rumeno barvo, C-končni poddomeni pa z roza oziroma modro barvo (prirejeno po 3).

N-končna domena je ob odsotnosti ATP fleksibilna in prosto gibljiva, po vezavi nukleotida pa dimerizira in preide v zaprto obliko (slika 2). Dimerizacija je ključni korak med katalitičnim procesom DNA-giraze in omogoča ujetje molekule DNA med topoizomeraznim ciklom. Aminokisliline, ki so neposredno udeležene pri vezavi nukleotida, se v veliki meri nahajajo na N-končni poddomeni. Izsledki študij kažejo, da prvih 14 N-končnih AK-ostankov tvori »roko«, ki se ovije okoli drugega monomera, ki sestavlja dimer, in tako stabilizira vezavo nukleotida v vezavno mesto. Ključni del roke sta AK Tyr5, ki z ATP tvori vodikovo vez (slika 3), in Ile10, ki tvori hidrofobne vezi s sosednjo podenoto. Obe AK sta ključnega pomena za nastanek dimera. Po drugi strani pa zaprta

dimerna oblika encima omogoča, da C-končna monomera tvorita prostor z veliko pozitivno nabitimi argininskimi ostanki, ki je primerne velikosti za vstop DNA (13, 14).



**Slika 3:** Shematska ponazoritev interakcij med ATP in GyrB24 (prirejeno po 4). Ključne aminokislinske so označene s temno zelenim okvirjem, koordinacijske in vodikove vezi so prikazane z modro črtkano črto ter hidrofozne interakcije s krivuljo rdeče barve.

Podrobna analiza kristalne strukture kompleksa DNA-giraza-ADPNP kaže, da je poleg kationa  $Mg^{2+}$  konformacija nukleotida stabilizirana z vodikovimi vezmi, ki se tvorijo na AK-ostankih Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 na N-končni poddomeni. Dodatno stabilizacijo omogočajo tudi hidrofozne interakcije z adeninom in ribozo z Ile78, Ile94 in Val120 (slika 3). Del vezavnega mesta tvorita tudi AK-ostanka Gln335, ki posredno, preko molekule vode, tvori vodikovo vez z  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP, in Lys337, ki z isto fosfatno skupino neposredno tvori vodikovo vez (4, 13, 15).

S študijami usmerjene mutageneze so določili, kateri AK-ostanki so potrebni pri vezavi in hidrolizi molekule ATP. Za ključne so se izkazali AK-ostanki His38, Glu42, Asn46, Glu50, Asp73, Arg76, Gly77, Ile78, Thr165 in Lys103, saj so z mutacijami na teh mestih dosegli zmanjšano ali celo ničelno ATP-azno aktivnost mutiranih encimov. Lys103 tvori solni most z  $\beta$ -fosfatno skupino, zato mutacija na tem mestu močno zmanjša vezavo

nukleotida. Mutacija na mestu Lys337 nima bistvenega vpliva na vezavo, se pa zato močno zmanjša zmožnost hidrolize ATP (4, 13, 15).

Dokazano je bilo, da Glu42 predstavlja katalitični bazni center, ki preko sprejema protona, ki ga odcepi molekuli vode, le-to aktivira za nukleofilni napad na  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP. Katalitični glutamat je stabiliziran s His38 (slika 3), saj z nekaterimi mutacijami na tem mestu dobimo encim z zelo nizko aktivnostjo (4, 13, 14).

V kompleksu encim-ADPNP je razvidno, da nukleotidni adenin z encimom tvori tri vodikove vezi, in sicer z AK-ostanki Asp73, Gly77 in Thr165 (slika 3). Zaviralci se pogosto vežejo v adeninski žep, kjer z Asp73 tvorijo dve vodikovi vezi, eno neposredno in eno posredno preko strukturno ohranjene molekule vode. Če želimo doseči uspešno vezavo zaviralca v vezavno mesto, mora ta v svoji strukturi vsebovati en donor vodikove vezi, ki tvori ključne interakcije s karboksilatom na mestu Asp73, in sosednji akceptor vodikove vezi, ki se poveže z molekulo vode. Pri veliki večini zaviralcev se tvori še dodatna vodikova vez na stranski verigi Arg136. Ta AK-ostanek ne tvori interakcij z ATP in nudi dobro izhodišče za doseganje selektivnosti v primerjavi z drugimi encimi, ki za svoje delovanje potrebujejo ATP (10).

## **1.4 Zaviralci topoizomeraz II**

### **1.4.1 Zaviralci GyrA/ParC**

Fluorokinoloni so edine klinično uporabljene protibakterijske učinkovine, ki delujejo na topoizomeraze tipa II. Z nekovalentnimi povezavami se vežejo na kompleks encim-DNA in ga stabilizirajo. Tako preprečijo nadaljnje podvajanje molekule DNA, povzročijo poškodbe DNA in sintezo nepopolnih proteinov ter sprožijo mehanizme celične smrti (10, 16).

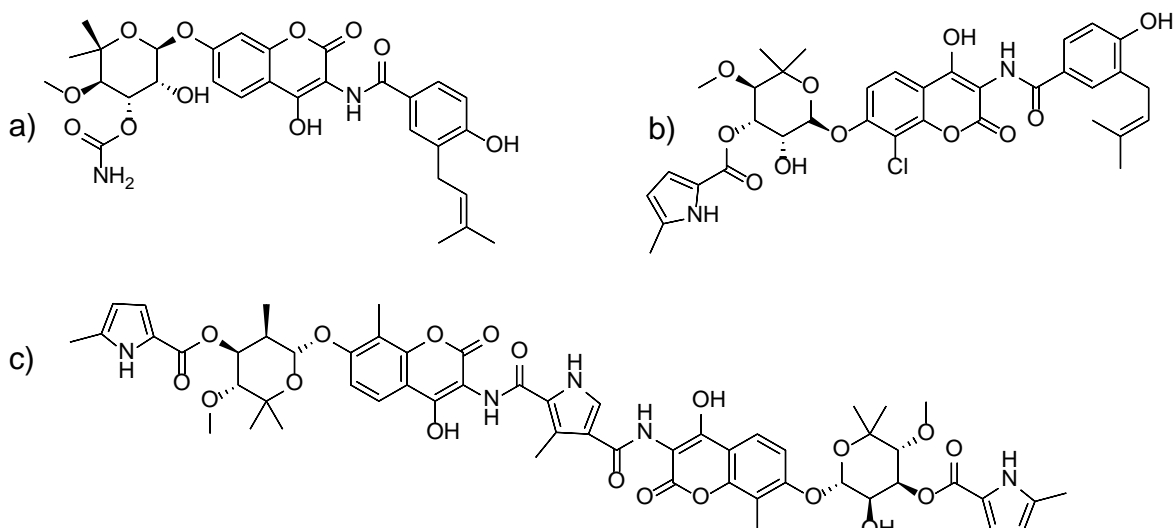
Uporaba fluorokinolonov se je znatno povečala šele z razvojem druge generacije teh učinkovin. Predstavniki te generacije (norfloksacin, ciprofloksacin in ofloksacin) so izkazovali močno izboljšano encimsko zaviralno aktivnost, večjo penetracijo v G<sup>+</sup> bakterije ter izboljšano farmakokinetiko in farmakodinamiko. Najpomembnejša strukturna

sprememba v primerjavi s prvo generacijo je vpeljava fluora na mesto C6 in večjega cikličnega substituenta na mestu C7 (16).

Povečana uporaba fluorokinolonov vodi v vse večji pojav odpornosti proti njim, kar sproža povečano zanimanje za sintezo novih inovativnih protibakterijskih učinkovin. Med njimi so najbolj aktualni ATP-azni zaviralci oziroma zaviralci GyrB/ParE (17).

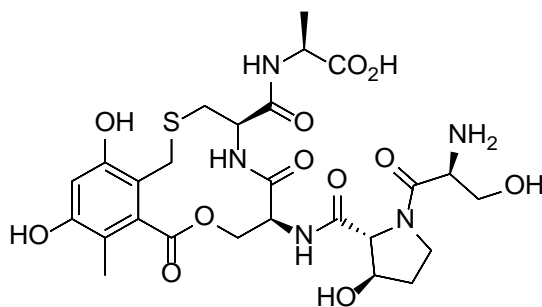
#### **1.4.2 Zaviralci GyrB/ParE**

Zaviralci GyrB/ParE imajo za svojo tarčo ATP-vezavno mesto na podenoti GyrB ali/in ParE ter običajno izkazujejo dobro selektivnost v primerjavi z evkariontskimi ATP-vezavnimi proteini (protein kinaze, človeške topoizomeraze II). Strukturna podobnost med DNA-girazo in topoizomerazo IV omogoča možnost dvojnega tarčnega delovanja pri veliki večini bakterij. Ti razlogi so vzrok za številne raziskave in programe razvoja teh vrst bakterijskih zaviralcev v farmacevtski industriji (11, 17). Prvi identificirani razred bakterijskih zaviralcev z delovanjem na ATP-vezavno mesto so bili aminokumarini. Prvi in tudi edini klinično uporabljeni predstavnik aminokumarinov je novobiocin (slika 4), ki je bil odkrit z metodo rešetanja med leti 1955 in 1956. Poleg njega velja pri aminokumarinih izpostaviti še klorobiocin in kumermicin A1 (slika 4), ki kljub močnejšemu protibakterijskemu delovanju nikoli nista prišla v klinično prakso. Novobiocin je bil zaradi svojega močnega delovanja na G<sup>+</sup> organizme uporabljan za zdravljenje infekcij s proti meticilinu odpornem *Staphylococcus aureus* (MRSA), a je bil kasneje umaknjen s trga zaradi toksičnosti, slabe topnosti, visoke vezave na plazemske proteine in pojava odpornosti (10, 18, 19).



**Slika 4:** Strukturne formule aminokumarinskih zaviralcev GyrB/ParE (prirejeno po 11): a) novobiocin, b) klorobiocin in c) kumermicin A1.

Po več desetletjih razvijanja in izboljševanja aminokumarinskih zaviralcev je bil leta 1993 z metodo rešetanja odkrit ciklotialidin (slika 5). Gre za naravni antibiotik, ki je bil izoliran iz fermentacijske brozge *Streptomyces filipinensis*. Navkljub številnim prednostim v primerjavi z aminokumarini in s fluorokinoloni je bil sprva obravnavan le kot spojina vodnica, saj je zaradi slabe penetracije skozi citoplazemsko membrano izkazoval šibko protibakterijsko delovanje le na nekaj G<sup>+</sup> organizmih. Njegovo močnejše zaviralno delovanje na DNA-girazo v primerjavi z novobiocinom (2-krat) in s fluorokinoloni (do 29-krat), širši spekter delovanja ter večja selektivnost med DNA-girazo in človeškimi topoizomerazami II (približno 10-krat bolj kot novobiocin in 900-krat bolj kot ciprofloksacin) so bile obetavne popotnice za nadaljnje raziskave in razvoj ciklotialidinov (11, 15, 20). Strukturne spremembe, ki so izboljšale protibakterijsko delovanje, pa rezultatov niso prenesle v *in vivo* učinkovitost zaradi kombinacije različnih faktorjev, npr. visoka vezava na plazemske proteine in obsežna glukuronidacija, ki je pomenila visok očistek spojin iz telesa. Nadaljnje raziskave so identificirale več vrst strukturno različnih zaviralcev GyrB/ParE, katerih razvoj je bil slej ko prej prekinjen zaradi večinoma enakih razlogov – slaba topnost, visoka vezava na plazemske proteine, toksičnost ali neučinkovitost (11). Poleg že znanih (aminokumarini, ciklotialidini) med zaviralce GyrB/ParE spada več strukturno različnih spojin. Mednje prištevamo 5-(3-pirazolil)thiazole, azaindole, pirolo[2,3-*d*]pirimidine, imidazo[1,2-*a*]piridin sečnine, benzimidazol sečnine in pirolamide (18, 11).



**Slika 5:** Strukturna formula ciklotialidina (prirejeno po 11).

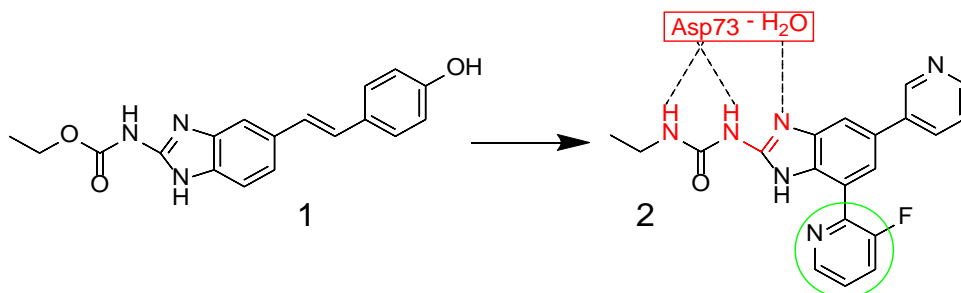
Kljub vsemu trudu, ki je bil vložen v nadaljnji razvoj zaviralcev GyrB/ParE, do danes še ni bilo nobene spojine, ki bi napredovala v klinične študije. Večina teh zaviralcev ima namreč močno protibakterijsko delovanje na G<sup>+</sup> bakterije, a pri razvoju molekul z uravnoteženim dvojnimi tarčnim delovanjem in s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki so potrebne za protibakterijsko delovanje tudi na G<sup>-</sup> organizme, ostaja veliko izzivov (18).

## 1.5 Razvoj etilsečninskih derivatov

Začetek razvoja etilsečninskih derivatov kot zaviralcev GyrB/ParE sega v sredino prvega desetletja tega tisočletja. Prva spojina vodnica je bil etil karbamatni derivat 2-aminobenzimidazola (slika 6, spojina **1**), ki je bil rezultat metode rešetanja visoke zmogljivosti. Najpomembnejše modifikacije prve generacije so vključevale zamenjavo karbamatnega kisika z dušikom, ki omogoča ključne interakcije z Asp73, s Thr165 in strukturno ohranjeno molekulo vode, vpeljavo heterocikla, največkrat 3-piridila, na mestu 5, ki omogoča sprejem vodikove vezi preko Arg136, ter dodatne hidrofobne interakcije z lipofilnim dnem z vezavo aromatskih obročev na mestu 7 (slika 6, spojina **2**). Izkazalo se je, da je za vezavo zaviralca z encimom na mestu 7 najbolj ugoden substituent, ki omogoča koplanarnost. Temu kriteriju je najbolj ustrezala vezava 2-piridila, saj intramolekularna vodikova vez med dušikom piridila in imidazolno NH-skupino še dodatno stabilizira strukturo ter optimizira tvorbo ključne vodikove vezi med preostalim imidazolnim dušikom in strukturno ohranjeno molekulo vode. Optimizirani analogi so izkazovali večjo moč delovanja, odlično protibakterijsko delovanje in nižjo stopnjo pojavnosti odpornosti v primerjavi z novobiocinom. Kljub visoki vezavi na plazemske proteine je bila ta še vedno nižja od nekaterih poročanih vrednosti za novobiocin. Drugačnim pričakovanjem navkljub pa optimizirani analogi nikoli niso vstopili v klinično fazo preizkušanja, najverjetneje

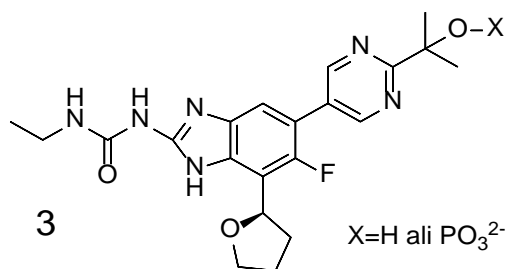


zaradi slabe topnosti, pomislekov glede varnosti zaradi tvorbe reaktivnih metabolitov in zaviranja encima CYP3A4 (11, 21).



**Slika 6:** Razvoj etilsečninskih zaviralcev GyrB/ParE. Z rdečo barvo so označene ključne interakcije z Asp73 in s strukturno ohranjeno molekulo vode ter z zeleno barvo substituiran 2-piridil na mestu 7, ki ugodno vpliva na vezavo zaviralca (prirejeno po 11).

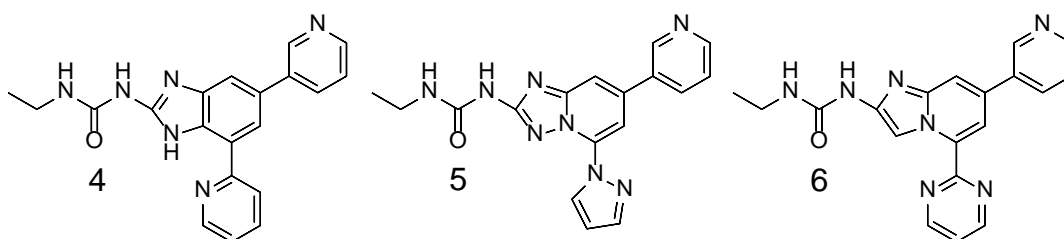
V drugi generaciji etilsečninskih zaviralcev so z zamenjavo spodnjih aromatskih obročev s tetrahidrofuranskim (slika 7, spojina **3**) preusmerili metabolizem iz etilsečninskega dela, kar je pripeljalo do nastanka nereaktivnih metabolitov. Z vpeljavo fosfatne skupine in oblikovanjem predzdravila so močno popravili tudi topnost. Študije na živalih so potrdile varnost, dobro farmakokinetiko, dobro biološko uporabnost tudi po peroralni aplikaciji ter primerno količino proste frakcije za fosfatno predzdravilo in bioaktivni terciarni alkohol (slika 7) (10, 11).



**Slika 7:** Struktura etilsečninskega zaviralca GyrB/ParE druge generacije. Na mestu 7 je vezan tetrahidrofuranski obroč, ki ugodno vpliva na metabolizem spojine. Z vpeljavo fosfatne skupine so oblikovali predzdravilo in močno izboljšali topnost (prirejeno po 11).

Nadaljevanje razvijanja etilsečninskih zaviralcev sta predstavljala zamenjava benzimidazolnega skeleta ter odkritje imidazopiridin sečnin in triazolopiridin sečnin. S strukturnega vidika sta obe spojini zelo podobni benzimidazol sečninam (slika 8), vendar je razlika v njunem delovanju v primerjavi z njimi zelo velika. Triazolopiridini izkazujejo

veliko boljše delovanje na GyrB kot na ParE in imajo le zmerno protibakterijsko delovanje na G<sup>+</sup> organizme (preglednica I), imidazopiridini imajo dobro zaviralno aktivnost DNA-giraze, zmerno delovanje na topoizomerozo IV in izkazujejo zmerno delovanje na G<sup>+</sup> mikroorganizme (preglednica I), medtem ko benzimidazol sečnine izkazujejo močnejše in bolj uravnoteženo zaviranje obeh tarčnih encimov ter močno delovanje na G<sup>+</sup> mikroorganizme (preglednica I) (10, 11, 22, 23).



**Slika 8:** Strukturno podobne formule zaviralcev GyrB/ParE. Spojina **4** spada med benzimidazol sečnine, spojina **5** med triazolopiridin sečnine in spojina **6** med imidazopiridin sečnine (prirejeno po 22, 23).

Podatki kažejo na veliko strukturno podobnost v katalitičnem aktivnem mestu pri DNA-girazi in topoizomerazi IV, kar služi kot osnova za razvoj selektivnega zaviralca z dvojnimi tarčnim delovanjem s širokospektralnim delovanjem. Uporaba takega zaviralca bi bistveno otežila razvoj odpornosti, saj bi se morala mutacija pojaviti na dveh tarčnih genih znotraj ene same generacije. Glede na strukturne podatke ni težko načrtovati močnega dvojnega zaviralca, vendar je treba upoštevati strukturne podobnosti ATP-azne domene GyrB z nekaterimi drugimi človeškimi encimi in pripraviti čim bolj selektiven zaviralec (10). Prednost pri razvoju takega zaviralca je velika toleranca ATP-vezavnega mesta, ki dopušča vezavo strukturno zelo različnih zaviralcev GyrB/ParE, po drugi strani pa ima lahko že najmanjša strukturna sprememba zelo velik vpliv na učinkovitost zaviralca, kar prikazuje zgornji primer benzimidazol sečnin, triazolopiridinov in imidazopiridinov (11, 21, 23).

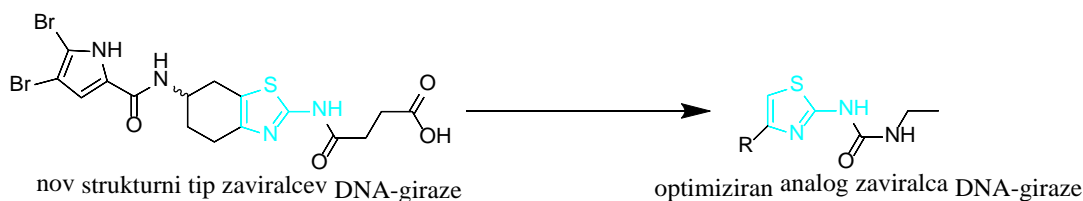
**Preglednica I:** Zaviralna aktivnost spojin **4**, **5** in **6** na encimih DNA-giraza in topoizomeraza IV ter MIC-vrednosti teh spojin za *S. aureus* (prirejeno po 22, 23).

<b>Spojina</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>GyrB [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	< 0,004	0,054	0,048
<b>ParE [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	0,014	25	0,447
<b>MIC (<i>S. aureus</i>) [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>	0,031	2	0,5

Kljub številnim dolgoletnim prizadevanjem farmacevtskih družb na področju zaviralcev GyrB/ParE in dostopnosti kristalnih struktur obeh encimov so fluorokinoloni za zdaj še vedno edine klinično uporabljene učinkovine, ki delujejo na DNA-girazo in topoizomerazo IV (11).

## 2 NAČRT ZA DELO

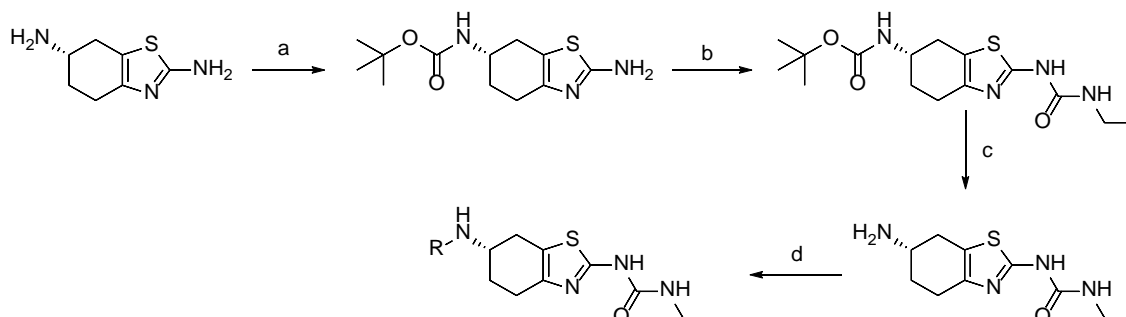
V eksperimentalnem delu magistrskega dela bomo načrtovali in sintetizirali nove potencialne ATP-kompetitivne zaviralce DNA-giraze B, ki v svoji strukturi vsebujejo etilsečninski fragment. Izhajali bomo iz 2-aminotiazolnega strukturnega tipa zaviralcev DNA-giraze, pri čemer bomo ohranili 2-aminotiazolni skelet, medtem ko bomo ostale dele molekule spremenili (slika 9). Kandidate, primerne za sintezo, bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur DNA-giraze iz *Escherichia coli* v kompleksu z zaviralci. Sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Cilj magistrskega dela bo sintetizirati spojino s čim boljšo zaviralno aktivnostjo (po možnosti v nanomolarnem območju) ter s potencialnim dvojnimi tarčnim delovanjem na DNA-girazo in topozomerazo IV.



**Slika 9:** Načrt optimizacije nedavno odkritega 2-aminotiazolnega strukturnega tipa zaviralcev ( $IC_{50} = 49$  nM pri DNA-girazi iz *E. coli*) (prirejeno po 18). Ohranili bomo svetlo modro označeni osrednji 2-aminotiazolni skelet in sintetizirali etilsečninski fragment.

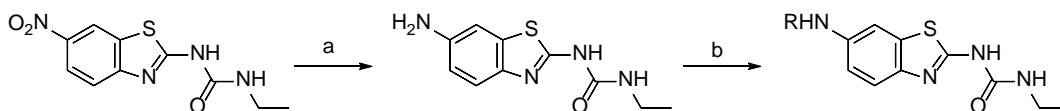
Pri sintezni poti bomo izhajali iz treh različnih osnovnih skeletov: (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina, 1-(6-nitrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree in etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetata. Pri (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu bomo najprej izvedli reakcijo zaščite alifatske aminske skupine z di-*tert*-butildikarbonatom (slika 10), saj se bomo s tem izognili neselektivnemu poteku reakcije v drugi stopnji sintezne poti. Tukaj bomo namreč z dodatkom etilizocianata izvedli reakcijo na prosti aaminski skupini na mestu 2 in tako dobili načrtovani etilsečninski fragment, ki bo pripet na osrednji 2-aminotiazolni skelet. Študije so pokazale, da je etilsečninski fragment sposoben tvorbe interakcij z DNA-girazo z aminokislinskim ostankom Asp73, ki so ključne za ugodno vezavo zaviralca v vezavno mesto. Sledila bo reakcija odstranjevanja zaščite z alifatske aminske skupine z acidolizo in ponovna tvorba proste aminske skupine. Nanjo bomo nato preko tvorbe amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenih reagentov pripenjali

različne substituentne in poskušali doseči čim boljše interakcije z ostalimi deli ATP-vezavnega mesta DNA-giraze.



**Slika 10:** Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T; b)  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCO}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T; c)  $\text{AcCl}$ , MeOH,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T, 1-M NaOH; d) različni substituenti – d<sub>1</sub>) metil malonil klorid,  $\text{Et}_3\text{N}$ , dioksan,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T; d<sub>2</sub>) karboksilna kislina, EDC, HOBT, *N*-metilmorfolin, DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T.

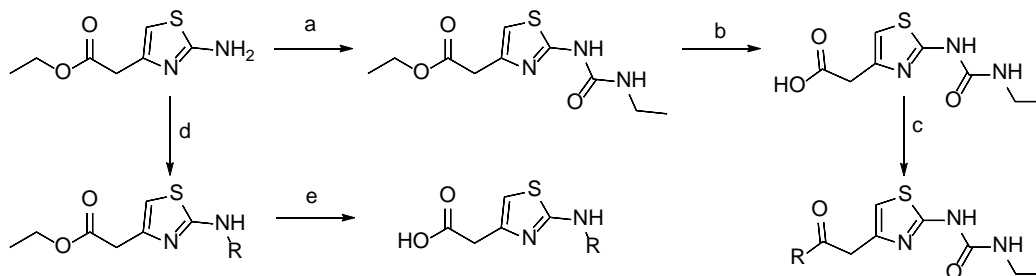
V primeru 1-(6-nitrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree bomo izvedli katalitsko hidrogeniranje aromatske nitro skupine s paladijem na ogljiku kot katalizatorjem (slika 11). Na nastalo prosto amsko skupino bomo nato preko tvorbe amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenih reagentov pripenjali različne substituentne in poskušali doseči čim boljše vezavo v ATP-vezavno mesto.



**Slika 11:** Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a) Pd/C,  $\text{H}_2$ , EtOH, DMF, sobna T; b) karboksilna kislina, EDC, HOBT, *N*-metilmorfolin, DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , kasneje sobna T.

Sintezna pot na etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetatu bo razdeljena na dva dela (slika 12). Na enem delu spojine bomo najprej uvedli etilsečninski fragment na enak način kot v drugi stopnji reakcije pri (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu. Sledila bo alkalna hidroliza estra do karboksilne kisline. Nanjo bomo nato preko tvorbe amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenih reagentov pripenjali različne substituentne in poskušali doseči čim boljše vezavo v ATP-vezavno mesto. Na drugi del spojine bomo najprej pripeli različne substituentne na prosto amsko skupino na mestu 2 z namenom doseči dodatne interakcije z aminokislinami v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze. Sledila bosta alkalna hidroliza

estra in tvorba karboksilne kisline, preko katere bomo nato tvorili amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenih reagentov z že prehodno sintetiziranimi etilsečninskimi derivati 2-aminotiazola s prosto aaminsko skupino.



**Slika 12:** Shema sintezne poti z reagenti in pogoji. a) različni substituenti – a<sub>1</sub>) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NCO, CHCl<sub>3</sub>, 0 °C, kasneje sobna T; b) 2-M NaOH, sobna T; c) primarni amin, EDC, HOBT, *N*-metilmorfolin, DMF, 0 °C, kasneje sobna T; d) različni substituenti – d<sub>1</sub>) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, DKM; d<sub>2</sub>) AcCl, Et<sub>3</sub>N, 0 °C, kasneje sobna T; e) 2-M NaOH, sobna T.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1. Reagenti in topila

V okviru eksperimentalnega dela magistrskega dela smo pri laboratorijskem delu uporabili reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Sigma Aldrich, Merck, TCI, Apollo Scientific, Alfa Aesar in Maybridge).

### 3.2. Kromatografske metode

Izraz kromatografija se nanaša na družino analitskih tehnik, ki se uporabljajo za ločbo zmesi kemijskih spojin. Pri kromatografiji vzorec, raztopljen v mobilni fazi (MF), potuje po stacionarni fazi (SF), ki z različnimi komponentami vzorca tvori različno močne interakcije. Razlika v interakcijah med posameznimi komponentami vzorca in SF se odraža v času, ki ga posamezna komponenta potrebuje, da prepotuje določeno razdaljo oziroma doseže detektor (24).

#### 3.2.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija (*thin-layer chromatography* – TLC) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločbo nehlapnih vzorcev. Izvaja se na stekleni, plastični ali aluminijski plošči, prevlečeni s tanko plastjo adsorbenta (največkrat silikagel, aluminijev oksid ali celuloza), ki predstavlja SF. Po nanosu vzorca le-ta potuje skupaj z MF, dokler ta ne pripotuje do zastavljene točke na SF (24). Pri našem eksperimentalnem delu smo TLC uporabili kot metodo prve identifikacije: z njo smo sledili poteku naše reakcije, preverjali čistoto našega sintetiziranega produkta in izbirali primerno MF za izvajanje kolonske »flash« kromatografije. Naši sintetizirani produkti so absorbirali UV-svetlobo pri valovni dolžini 254 nm – močnejša kot je bila lisa, večja količina produkta je nastala. Dokler je bila v reakcijski zmesi še vedno prisotna lisa izhodne spojine, smo sklepali, da reakcija še ni potekla v celoti. V izolacijo produkta smo se torej podali šele, ko smo opazili, da je lisa izhodne spojine izginila ali pa se intenziteta lise izhodne spojine ali produkta ni več spreminjala s časom.

### 3.2.2 Kolonska »flash« kromatografija

Kolonska »flash« kromatografija je vrsta kromatografije, pri kateri za potovanje MF izkoriščamo gravitacijo in nadtlak. Hitrost potovanja MF smo pospešili z uvajanjem nadtlaka v koloni. Uporabili smo steklene kolone različnih velikosti in jih v pokončni legi napolnili s silikagelom z manjšimi delci (Silica gel 60: 0,040–0,063 mm) in MF. Velikost steklene kolone smo določili glede na maso našega vzorca, saj smo uporabili od 40- do 100-kratnik mase silikagela glede na maso vzorca, iz katerega smo želeli izolirati sintetizirano spojino. Primerno MF smo izbrali s pomočjo TLC, saj smo izbrali tisto, pri kateri je imela naša spojina retencijski faktor ( $R_f$ ) okoli 0,3. Tak  $R_f$  namreč omogoča, da spojina po SF potuje dovolj počasi, da je ločba med posameznimi komponentami vzorca dobra in lahko v posameznih frakcijah izoliramo željeno spojino (24).

### 3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vzorcev. Princip ločevanja vzorcev je enak kot pri kolonski kromatografiji, le da pri HPLC MF pošljemo skozi kolono pod visokim pritiskom. 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  $\mu$ m, 4,6  $\times$  150 mm) kot MF pa 0,1-% trifluoroocetna kislina v vodi (metoda A) in acetonitril (metoda B). 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  $\mu$ L.

## 3.3 Spektroskopske metode

Dejstvo, da pod UV-svetlobo absorbira samo ena lisa, še ne pomeni, da je naša spojina čista, saj vse možne primesi in nečistote ne absorbirajo svetlobe pri isti valovni dolžini kot naša spojina. Ker lahko le sklepamo, da je lisa, ki absorbira UV-svetlobo, naša sintetizirana spojina, o njeni strukturi in čistoti pa ne vemo ničesar, se za identifikacijo spojine poslužujemo drugih metod, ki nam prikažejo celotno sliko izolirane spojine. Spektroskopske metode nam podajo končni odgovor o strukturi zgradbi in stopnji čistote izolirane spojine.



### 3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (*nuclear magnetic resonance* – NMR)

Jedrska magnetna resonanca je učinkovita spektroskopska metoda, ki jo uporabljamo za določevanje kemijske strukture organskih spojin. Z njo posnamemo protonski  $^1\text{H}$ -spekter, iz katerega razberemo število vodikovih atomov, poleg tega pa nam poda tudi bolj natančno sliko o kemijski naravi teh vodikovih atomov (položaj v molekuli, prisotnost funkcionalnih skupin v bližini vodikovega atoma, razvejanost verige) (25). Za dodatno potrditev smo določenim spojinam posneli še  $^{13}\text{C}$ -spekter. Poleg določanja strukture organskih spojin smo z NMR ocenili tudi čistoto spojin in predvideli uspešnost reakcije. Za snemanje NMR-spektra sicer potrebujemo večje količine vzorca kot pri drugih metodah za določevanje kemijskih struktur (masna spektrometrija), a je sama metoda nedestruktivna, zato nam omogoča povrnitev vzorca, ki smo ga uporabili za snemanje.

NMR-spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Bruker AVANCE III 400 spektrometru (Bruker Corporation, Billerica, MA, ZDA). Kot topilo smo uporabili devterirano topilo  $\text{DMSO-}d_6$ .

### 3.3.2 Masna spektrometrija (MS)

Masna spektrometrija je zelo učinkovita tehnika za določevanje kemijske strukture spojin na osnovi analize ionov, ki so nastali iz osnovne molekule. Metoda temelji na merjenju razmerja med maso in nabojem s pomočjo električnega ali magnetnega polja (26). V primerjavi z NMR je prednost MS ta, da za določitev kemijske strukture potrebujemo minimalno količino vzorca, sama metoda pa nam poda relativno molekulsko maso, elementno sestavo spojine (bruto formulo), preko fragmentacije molekule pa tudi prisotnost točno določenih funkcionalnih skupin/elementov v molekuli. Masni spektri naših spojin so bili posneti v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan na VG Analytical Autospec Q masnem spektrometru (Fisons, VG Analytical, Manchester, Velika Britanija).

## 3.4 Polarimetrija

Polarimetrija je metoda, pri kateri merimo zasuk linearne polarizirane svetlobe. Značilnost kiralnih spojin je namreč ta, da pri prehodu polarizirane svetlobe skozi spojino ali njeno raztopino pride do zasuka ravnine polarizirane svetlobe. Če en enantiomer povzroči zasuk

polarizirane svetlobe za  $+10^\circ$ , bo drug enantiomer povzročil enak zasuk, vendar z nasprotnim predznakom, torej za  $-10^\circ$ . Zato za take spojine pravimo, da so optično aktivne. Seveda pa kiralne spojine niso vedno optično aktivne: če sta oba enantiomera zastopana v ekvimolarnem razmerju 1 : 1, potem je takšna racemna zmes optično neaktivna. S pomočjo polarimetrije lahko torej določimo, ali je naša spojina zmes dveh enantiomerov (racemat) ali pa imamo posamezen enantiomer. Optična sučnost je bila izmerjena na polarimetru PerkinElmer 241 MC. Poročana vrednost optične sučnosti je enaka povprečni vrednosti petih uspešnih meritev z uporabo integracijskega časa 5 s.

### **3.5 IUPAC-nomenklatura in risanje spojin**

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 15.0 podjetja CambridgeSoft.

### **3.6 Načrtovanje spojin – molekulsko sidranje**

Molekulsko sidranje je izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm., s pomočjo programa LeadIT podjetja BioSolveIT.

### **3.7 Določanje temperature tališča**

Sintetiziranim spojinam smo temperaturo tališča določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

### **3.8 Biološka testiranja**

Končnim spojinam smo ovrednotili zaviralno aktivnost in protibakterijsko delovanje. Zaviralno aktivnost spojin na rekombinantnem encimu DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli* je določila raziskovalka Michaela Barančoková, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Testiranje je bilo izvedeno v skladu z objavljenim postopkom v poglavju Literatura, pod zaporedno številko 18.

Protibakterijsko delovanje zaviralcev DNA-giraze na izbranih bakterijskih sevih (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia*

*coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) so določili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem.

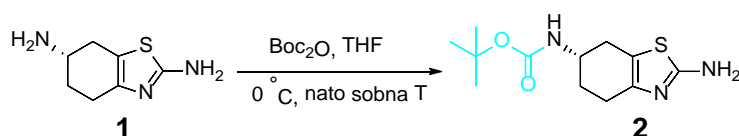
## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Splošni postopek sinteze amidne vezi

Karboksilno kislino (1,0 mmol) smo raztopili v manjšem volumnu *N,N*-dimetilformamida (DMF). Med mešanjem na ledeni kopeli smo v bučko dodali 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC – 1,2 mmol), hidroksibenzotriazol (HOBT – 1,3 mmol) in *N*-metilmorfolin (NMM – 2,0 mmol). Vse skupaj smo mešali na ledeni kopeli približno 30 min in nato v bučko dodali izhodni amin (1,0 mmol). Ledeno kopel smo odstavili in pustili mešati na sobni temperaturi preko noči.

### 4.2 Sinteza *tert*-butil (*S*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

Izhodni (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin (2,805 g, 16,6 mmol) smo raztopili v tetrahidrofuranu (THF; 100 mL), ohladili na 0 °C na ledeni kopeli in mešali z magnetnim mešalom. S kapalnikom smo v bučko po kapljicah dodali v THF (30 mL) raztopljeni Boc<sub>2</sub>O (di-*tert*-butil dikarbonat; 3,798 g, 17,4 mmol). Reakcijo smo pustili potekati na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo topilo uparili pod znižanim tlakom.



\* **Izkoristek reakcije:** 99,9 %; m (produkt) = 4,460 g

\* **Izgled produkta:** bela oborina

\* **T<sub>tališča</sub>:** 135 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,27 (DKM/MeOH = 20 : 1)

\* **Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub> = -40,3 (c = 0,26; MeOH)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

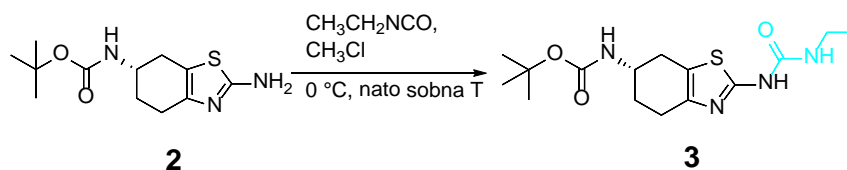
δ 1,38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,54–1,65 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,80–1,86 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,31–2,47 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 2,68 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 14,8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5,5 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3,57–3,69 (m, 1H, CHNH), 6,64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,94 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, NH) ppm.

\* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  24,9, 28,2 (3C), 28,87, 28,94, 46,8, 77,6, 112,4, 144,1, 154,9, 166,1 ppm.

### 4.3 Sinteza *tert*-butil (*S*)-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

*Tert*-butil (*S*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata (4,460 g, 16,6 mmol) smo najprej raztopili v kloroformu (100 mL), raztopino prepihali z argonom in nato po kapljicah dodali etilizocianat (1,44 mL, 18,2 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na ledeni kopeli preko noči v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Poskusili smo izvesti prekrizalizacijo produkta iz etil acetata z dodatkom heksana. Zaradi slabega izkoristka prekrizalizacije smo se odločili, da produkt očistimo s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 30 : 1.



\* **Izkoristek:** 40,7 %; m (produkt) = 2,292 g

\* **Izgled produkta:** bela oborina

\* **T<sub>tališča</sub>:** 183 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,24 (DKM/MeOH = 20 : 1)

\* **Optična sučnost:**  $[\alpha]_D = -15,6$  (c = 0,22; MeOH)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  1,05 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,40 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub>), 1,61–1,71 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,86–1,94 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,38–2,47 (m, 1H, H<sub>A</sub>-5), 2,55–2,71 (m, 2H, H<sub>B</sub>-5, H<sub>A</sub>-4), 2,81 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15,7 Hz, J<sub>2</sub> = 5,0 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3,09–3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,58–3,76 (m, 1H, CHNH), 6,50 (t, 1H, J = 5,0 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,99 (d, 1H, J = 7,9 Hz, NHCH), 10,11 (s, 1H, NHCO) ppm.

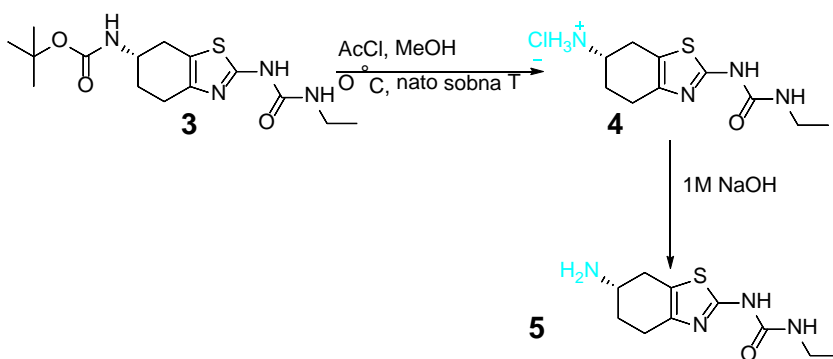
\* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  15,2, 24,8, 28,2 (3C), 28,5, 28,9, 34,1, 46,4, 77,6, 117,4, 144,8, 153,6, 155,0, 157,6 ppm.

\* **HRMS** (ESI<sup>+</sup>) m/z za C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>): izračunana masa 341,1647; izmerjena masa 341,1652.

#### 4.4 Sinteza (S)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)-3-etiluree

Metanolu (30 mL) smo med mešanjem na ledeni kopeli po kapljicah dodali acetilklorid (4,79 mL, 67,4 mmol) in počakali 30 min, da je potekla reakcija nastanka HCl. Po 30 min smo raztopini po kapljicah dodali še *tert*-butil (S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbammat, ki smo ga predhodno raztopili v metanolu (20 mL). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Topilo smo nato uparili pod znižanim tlakom in suh preostanek naalkalili z 1-M NaOH. Vodno fazo smo ekstrahirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Izpadli produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem, organsko fazo pa smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom.



- \* **Izkoristek:** 99,8 %; m (produkt) = 1,615 g
- \* **Izgled produkta:** sivo-bela oborina
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 121 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0 (DKM/MeOH = 10 : 1)
- \* **Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub> = -34,5 (c = 0,24; MeOH)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,05 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,48–1,59 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,82–1,89 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,25–2,32 (m, 1H, H<sub>A</sub>-5), 2,44–2,60 (m, 2H, H<sub>A</sub>-4, H<sub>B</sub>-5, signal se delno prekriva z DMSO-*d*<sub>5</sub>), 2,77 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 15,6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4,8 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3,01–3,07 (m, 1H, CHNH), 3,10–3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,58 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm; v spektru nista vidna signala za NH in NH<sub>2</sub>.

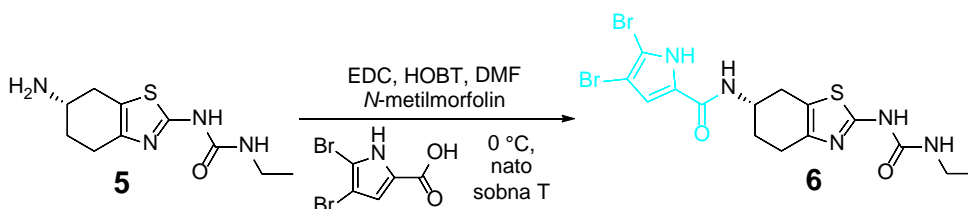
- \* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 15,7, 25,1, 32,2, 32,5, 34,5, 47,9, 118,3, 143,3, 154,3, 158,0 ppm.

\* **HRMS** (ESI<sup>+</sup>) m/z za C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OS ([M+H]<sup>+</sup>): izračunana masa 241,1123; izmerjena masa 241,1117.

#### 4.5 Sinteza (S)-4,5-dibromo-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (S)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,089 g, 0,037 mmol) in 4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilne kisline (0,100 g, 0,037 mmol). Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL etil acetata in zaporedoma spirali z 10-% citronske kisline (2 x 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo za mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1.



- \* **Izkoristek:** 99,8 %; m (produkt) = 1,615 g
- \* **Izgled produkta:** rumenkasto bela oborina
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 190 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0,39 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub> = -3,0 (c = 0,21, MeOH)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,06 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,76–1,88 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,92–2,02 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,56–2,64 (m, 3H, H<sub>A</sub>-5, H-4), 2,91 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 15,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5,3 Hz, H<sub>B</sub>-5), 3,09–3,20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,06–4,24 (m, 1H, CHNH), 6,51 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,00 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz, Ar-H), 8,08 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, CONHCH), 10,13 (s, 1H, NH), 12,70 (s, 1H, NH) ppm.

- \* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

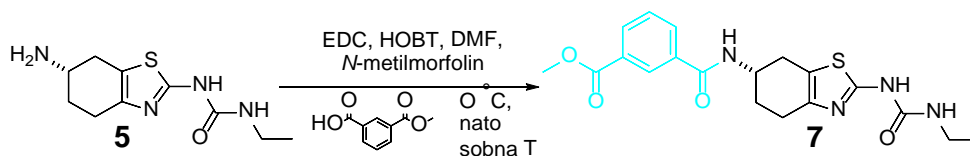
δ 15,2, 24,7, 28,4, 28,6, 34,1, 45,3, 97,8, 104,5, 112,9, 117,3, 128,1, 153,6, 157,6, 157,7, 158,3 ppm.

\* **HRMS** (ESI)  $m/z$  za  $C_{15}H_{16}N_5O_2SBr_2$  ( $[M-H]^-$ ): izračunana masa 487,9391; izmerjena masa 487,9396.

\* **HPLC**: metoda A,  $t_r$  11,73 min (100-% čistota pri 254 nm).

#### 4.6 Sinteza metil (*S*)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamoil)benzoata

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (*S*)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,195 g, 0,81 mmol) in 3-(metoksikarbonil)benzojske kisline (0,146 g, 0,81 mmol). Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL etil acetata in zaporedoma spirali z 10-% citronsko kislino (2 x 10 mL), nasičeno raztopino  $NaHCO_3$  (2 x 10 mL) in nasičeno raztopino  $NaCl$  (2 x 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad  $Na_2SO_4$ , jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo za mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1.



\* **Izkoristek**: 42,2 %;  $m$  (produkt) = 0,138 g

\* **Izgled produkta**: rumenkasto bela voskasta oborina

\*  **$T_{tališča}$** :  $174 \pm 2$  °C

\*  **$R_f$** : 0,42 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **Optična sučnost**:  $[\alpha]_D = -12,6$  ( $c = 0,30$ , DMF)

\*  **$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):

$\delta$  1,06 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1,86–1,91 (m, 1H,  $H_A-7$ ), 2,00–2,03 (m, 1H,  $H_B-7$ ), 2,63–2,70 (m, 3H,  $H_A-5$ ,  $H-4$ ), 2,95 (dd, 1H,  $J_1 = 15,3$  Hz,  $J_2 = 5,2$  Hz,  $H_B-5$ ), 3,12–3,18 (m, 2H,  $CH_2CH_3$ ), 3,90 (s, 3H,  $COOCH_3$ ), 4,20–4,29 (m, 1H,  $CHNH$ ), 6,52 (t, 1H,  $J = 5,6$  Hz,  $NHCH_2CH_3$ ), 7,64 (t, 1H,  $J = 7,8$  Hz, Ar-H-5), 8,10–8,15 (m, 2H, Ar-H-4, Ar-H-6), 8,46 (t, 1H,  $J = 1,6$  Hz, Ar-H-2), 8,73 (d, 1H,  $J = 7,7$  Hz,  $CONHCH$ ), 10,14 (s, 1H,  $NHCO$ ) ppm.

\*  **$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  15,2, 24,9, 28,2, 28,6, 34,1, 46,2, 52,3, 117,4, 128,0, 128,9, 129,7, 131,6, 132,1, 135,1, 142,9, 153,7, 157,5, 164,9, 165,8 ppm.

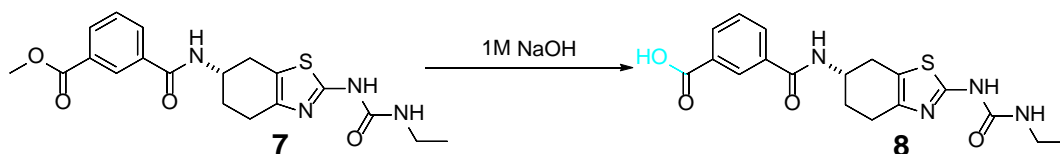


\* **HRMS** (ESI)  $m/z$  za  $C_{19}H_{21}N_4O_4S$  ( $[M-H]^-$ ): izračunana masa 401,1284; izmerjena masa 401,1286.

\* **HPLC**: metoda A,  $t_r$  10,89 min (98,7-% čistota pri 254 nm).

#### 4.7 Sinteza (*S*)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamoil)benzojske kisline

Metil (*S*)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamoil)benzoat (0,138 g, 0,34 mmol) smo raztopili v metanolu (5 mL) in dodali 1-M NaOH (1,02 mL, 1,02 mmol). Pustili smo mešati na sobni temperaturi preko noči. Vodno fazo smo spirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad  $Na_2SO_4$ , jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom.



\* **Izkoristek**: 99,1 %;  $m$  (produkt) = 0,132 g

\* **Izgled produkta**: svetlo roza oborina

\*  **$T_{\text{taljšča}}$** :  $220 \pm 2$  °C

\*  **$R_f$** : 0 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **Optična sučnost**:  $[\alpha]_D = -163$  ( $c = 0,29$ , MeOH)

\*  **$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):

$\delta$  1,07 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1,85–1,93 (m, 1H,  $H_A-7$ ), 1,99–2,05 (m, 1H,  $H_B-7$ ), 2,61–2,73 (m, 3H,  $H_A-5$ ,  $H-4$ ), 2,97 (dd, 1H,  $J_1 = 15,5$  Hz,  $J_2 = 4,9$  Hz,  $H_B-5$ ), 3,14–3,18 (m, 2H,  $CH_2CH_3$ ), 4,22–4,30 (m, 1H,  $CHNH$ ), 7,14 (razširjen s, 1H,  $NHCH_2CH_3$ ), 7,61 (t, 1H,  $J = 7,7$  Hz, Ar-H-5), 8,08–8,12 (m, 2H, Ar-H-4, Ar-H-6), 8,44 (s, 1H, Ar-H-2), 8,74 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $CONHCH$ ), 10,99 (razširjen s, 1H,  $NHCO$ ) ppm; v spektru ni viden signal za COOH.

\*  **$^{13}C$  NMR** (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):

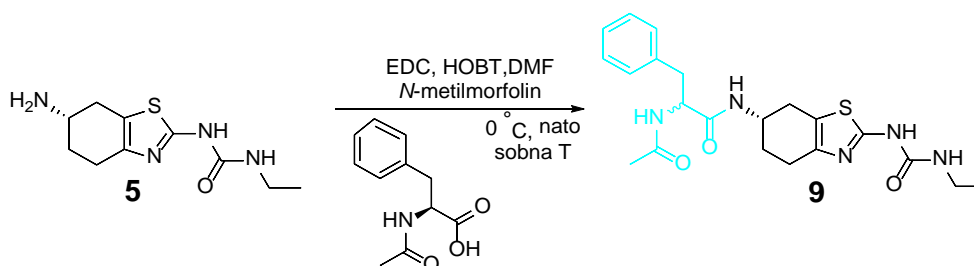
$\delta$  14,9, 22,7, 27,5, 27,9, 34,3, 45,4, 118,3, 128,1, 128,7, 130,8, 131,7, 131,8, 134,8, 137,0, 152,7, 159,9, 165,2, 166,9 ppm.

\* **HRMS** (ESI)  $m/z$  za  $C_{18}H_{19}N_4O_4S$  ( $[M-H]^-$ ): izračunana masa 387,1127; izmerjena masa 387,1118.

\* **HPLC:** metoda A,  $t_r$  9,95 min (98,4-% čistota pri 254 nm).

#### 4.8 Sinteza (S)-2-acetoamido-N-((S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-3-fenilpropanamida

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (S)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,100 g, 0,41 mmol) in N-acetilfenilalanina (0,087 g, 0,41 mmol). Reakcijski zmesi smo dodali 20 mL etil acetata in zaporedoma spirali z 10-% citronske kisline (2 x 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo za mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1.



\* **Izkoristek:** **(-)****9**: 8,0 %; m (produkt) = 0,014 g; **(+)****9**: 9,7 %; m (produkt) = 0,017 g

\* **Izgled produkta:** sivo bel prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** **(-)****9** = 151 ± 2 °C; **(+)****9** = 154 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** **(-)****9** = 0,30 (DKM/MeOH = 9 : 1); **(+)****9** = 0,25 (DKM/MeOH = 9 : 1)

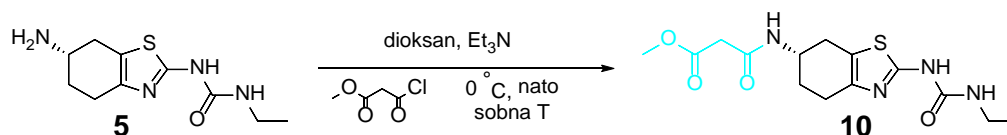
\* **Optična sučnost:**  $[\alpha]_D$  (**(-)****9**) = -20 (c = 0,07, MeOH);  $[\alpha]_D$  (**(+)****9**) = +26 (c = 0,18, MeOH)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  1,05 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,66–1,75 (m, 1H, H<sub>A</sub>-5), 1,77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,82–1,89 (m, 1H, H<sub>B</sub>-5), 2,33–2,35 (m, 1H, H<sub>A</sub>-4), 2,55–2,59 (m, 2H, H<sub>B</sub>-4, H<sub>A</sub>-7), 2,67–2,71 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,75–2,90 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3,10–3,17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,93–3,98 (m, 1H, CHNH), 4,47–4,52 (m, 1H, CHCO), 6,50 (t, 1H, J = 5,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7,17–7,29 (m, 5H, 5 x Ar-H), 8,09–8,13 (m, 2H, 2 x NHCH), 10,13 (s, 1H, NHCO) ppm.

#### 4.9 Sinteza metil (S)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoata

Izhodno (S)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)-3-etilureo (0,159 g, 0,66 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (30 mL) in ji dodali trietilamin (Et<sub>3</sub>N; 0,138 mL, 0,99 mmol). Zmes smo prepihali z argonom, mešali 10 min na ledeni kopeli in nato po kapljicah dodali metil malonil klorid (0,092 mL, 0,86 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in suh preostanek raztopili v etil acetatu. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, filtratu pa uparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo za mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 40 : 1. Tekom kolonske kromatografije smo polarnost mobilne faze povečali (razmerje 20 : 1).



\* **Izkoristek:** 57,7 %; m (produkt) = 0,130 g

\* **Izgled produkta:** sivo-bel prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 198 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,33 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub> = -10,1 (c = 0,21, MeOH)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

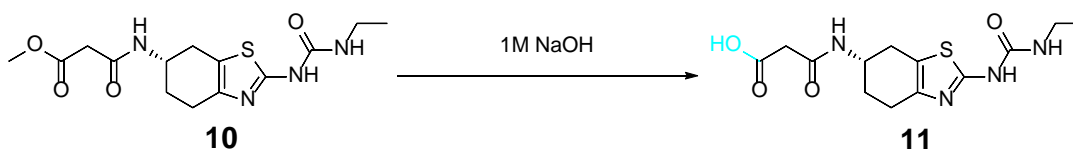
δ 1,05 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,71–1,80 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,84–1,92 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,42–2,46 (m, 1H, H<sub>A</sub>-4), 2,56–2,63 (m, 2H, H<sub>A</sub>-5, H<sub>B</sub>-4), 2,87 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 16,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5,5 Hz, H<sub>B</sub>-5), 3,09–3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,25 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>CO), 3,62 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,99–4,06 (m, 1H, CHNH), 6,76 (razširjen s, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 8,18 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, CONHCH), 10,14 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

\* **HRMS** (ESI) *m/z* za C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 339,1127; izmerjena masa 339,1121.

\* **HPLC:** metoda A, *t<sub>r</sub>* 9,07 min (100-% čistota pri 254 nm).

#### 4.10 Sinteza (S)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanojske kisline

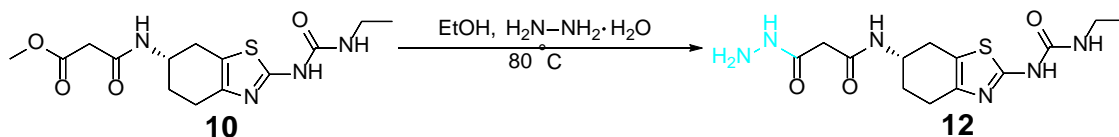
Metil (S)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoat (0,037 g, 0,11 mmol) smo raztopili v metanolu (10 mL), dodali 1-M NaOH (0,44 mL, 0,44 mmol) in pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Ker reakcija ni potekla v celoti, smo naslednji dan dodali še 1-M NaOH (0,44 mL, 0,44 mmol) in pustili mešati na sobni temperaturi še 3 ure. Metanol smo uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo ekstrahirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Zaradi nizkega izkoristka ekstrakcije smo topilo uparili pod znižanim tlakom in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico diklorometana, metanola in očetne kisline v razmerju 5 : 1 : 0,1.



- \* **Izkoristek:** 59,2 %; m (produkt) = 0,021 g
- \* **Izgled produkta:** rjavkasta voskasta oborina
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 130 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **Optična sučnost:**  $[\alpha]_D = -12,6$  (c = 0,23, MeOH)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  
δ 1,05 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,70–1,80 (m, 1H, H<sub>A-7</sub>), 1,84–1,90 (m, 1H, H<sub>B-7</sub>), 2,41–2,45 (m, 1H, H<sub>A-4</sub>), 2,56–2,68 (m, 2H, H<sub>A-5</sub>, H<sub>B-4</sub>), 2,87 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 15,9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4,9 Hz, H<sub>B-5</sub>), 3,09–3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,22 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>CO), 3,99–4,12 (m, 1H, CHNH), 6,54 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 8,20 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, CONHCH), 10,17 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm; v spektru ni viden signal za COOH.
- \* **HRMS** (ESI) m/z za C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 325,0971, izmerjena masa 325,0977.
- \* **HPLC:** metoda A, t<sub>r</sub> 8,59 min (95,1-% čistota pri 254 nm).

#### 4.11 Sinteza (*S*)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanamida

Metil (*S*)-3-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoat (0,080 g, 0,24 mmol) smo raztopili v etanolu (4 mL), prepihali z argonom, dodali 80-% raztopino hidazin monohidrata (0,143 mL, 2,40 mmol) in pustili mešati na oljni kopeli s povratnim hladilnikom pri 80 °C preko noči v argonovi atmosferi. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in suh preostanek poskusili raztopiti v nekaj mL mešanice diklorometana in metanola v razmerju 9 : 1. Neraztopljeni produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem, filtrat pa uporabili za čiščenje s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 9 : 1.



\* **Izkoristek:** 93,8 %; m (produkt) = 0,075 g

\* **Izgled produkta:** siva oborina

\* **T<sub>tališča</sub>:** 241 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,26 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **Optična sučnost:**  $[\alpha]_D = -16,3$  (c = 0,20, MeOH)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

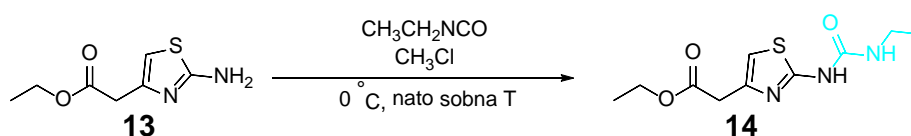
δ 1,05 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,70–1,80 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,83–1,90 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,40–2,45 (m, 1H, H<sub>A</sub>-4), 2,58–2,63 (m, 2H, H<sub>A</sub>-5, H<sub>B</sub>-4), 2,87 (dd, 1H,  $J_1 = 15,4$  Hz,  $J_2 = 4,5$  Hz, H<sub>B</sub>-5), 2,98 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>CO), 3,09–3,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,97–4,06 (m, 1H, CHNH), 4,24 (razširjen s, 2H, NHNH<sub>2</sub>), 6,52 (t, 1H,  $J = 4,7$  Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 8,12 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz, CONHCH), 9,08 (s, 1H, NHNH<sub>2</sub>), 10,17 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

\* **HRMS** (ESI) m/z za C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 339,1239, izmerjena masa 339,1234.

\* **HPLC:** metoda A, t<sub>r</sub> 7,99 min (100-% čistota pri 254 nm).

## 4.12 Sinteza etil 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetata

Izhodni etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetat (4,214 g, 22,65 mmol) smo raztopili v kloroformu (100 mL), raztopino prepihali z argonom in ob mešanju na ledeni kopeli po kapljicah dodajali etilizocianat (2,87 mL, 24,92 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo reakcijsko zmes segreli na oljni kopeli na 50 °C in pustili mešati preko noči. Po dveh dneh smo v reakcijsko zmes ponovno dodali še etilizocianat (1,31 mL, 11,33 mmol) in segreli na 60 °C za 2 uri. Reakcijsko zmes smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili mešanico etil acetata in heksana v razmerju 1 : 6. Tekom kolonske kromatografije smo povečali polarnost mobilne faze (razmerje 1 : 2).



\* **Izkoristek:** 45,8 %; m (produkt) = 2,665 g

\* **Izgled produkta:** bel prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 152 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,11 (EtAc/heksan = 1 : 1)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,06 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,18 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,09–3,17 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,08 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,45 (razširjen s, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,76 (s, 1H, Ar-H), 10,44 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

\* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

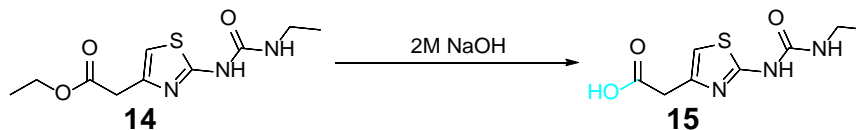
δ 14,5, 15,7, 34,6, 37,2, 60,7, 109,0, 143,6, 154,2, 160,3, 170,6 ppm.

\* **MS** (ESI) *m/z* za C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izmerjena masa 256 (100).

## 4.13 Sinteza 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)ocetne kisline

Etil 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetat (2,645 g, 10,29 mmol) smo raztopili v etanolu (20 mL) in dodali 2-M NaOH (20,6 mL, 41,2 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Etanol smo uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo spirali z etil

acetatom (2 x 25 mL). Vodno fazo smo nato nakisali s 37-% HCl in nastalo oborino odfiltrirali z odsesavanjem.



\* **Izkoristek:** 97,9 %; m (produkt) = 2,308 g

\* **Izgled produkta:** bel prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 173 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,06 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,10–3,17 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,51 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,45 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,74 (s, 1H, Ar-H), 10,41 (razširjen s, 1H, NHCO), 12,29 (s, 1H, COOH) ppm.

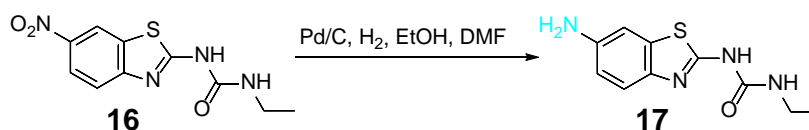
\* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 15,2, 34,0, 36,6, 108,4, 142,9, 153,8, 159,6, 171,5 ppm.

\* **MS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z* for C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SNa ([M+Na]<sup>+</sup>): izmerjena masa 252 (100).

#### 4.14 Sinteza 1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree

Izhodno 1-(6-nitrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etilureo (1,512 g, 5,68 mmol) smo raztopili v mešanici etanola in *N,N*-dimetilformamida (100 mL + 30 mL). Raztopino smo prepihali z argonom, dodali paladij na ogljiku (0,150 g) in vse skupaj zaprli s septumom. V naslednjem koraku smo dodali balon, napolnjen z vodikom, in reakcijsko zmes mešali v vodikovi atmosferi 48 ur pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in suhemu preostanku dodali manjšo količino etanola. Vse skupaj smo segreli do vrenja in vroče filtrirali. Oborino smo zavrgli, filtratu pa smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1.

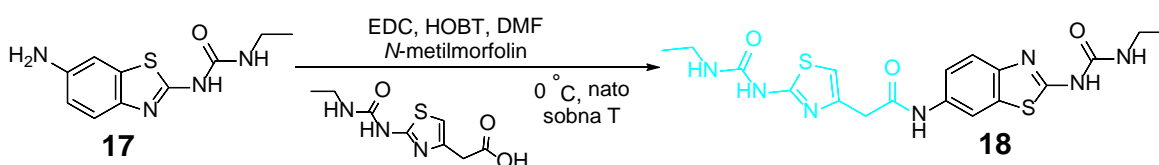


- \* **Izkoristek:** 30,6 %; m (produkt) = 0,411 g
- \* **Izgled produkta:** zeleno-rjav prašek
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 198 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0,48 (DKM / MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,07 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,13–3,20 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5,03 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,63 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,2 Hz, Ar-H-5), 6,68 (t, 1H, *J* = 5,8 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,94 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz, Ar-H-7), 7,29 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, Ar-H-4), 10,28 (s, 1H, NHCO) ppm.

#### 4.15 Sinteza *N*-(2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamida

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (*S*)-1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,100 g, 0,42 mmol) in 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)ocetne kisline (0,097 g, 0,042 mmol). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL etil acetata in spirali z 10-% citronsko kislino (2 x 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Suhemu preostanku smo dodali nekaj mešanice diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1 ter neraztopljeni produkt odfiltrirali z odsesavanjem.



- \* **Izkoristek:** 34,7 %; m (produkt) = 0,066 g
- \* **Izgled produkta:** zeleno-rjav prašek
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 250 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0,24 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

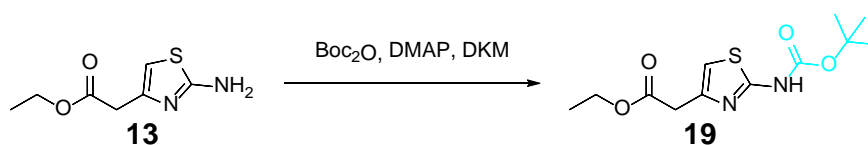
δ 1,05 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,09 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,10–3,21 (m, 4H, 2 × NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,45 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,71 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,77 (s, 1H, tiazol-H), 7,46 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,9 Hz,



Ar-H-5), 7,54 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, Ar-H-4), 8,21 (d, 1H,  $J = 1,9$  Hz, Ar-H-7), 10,20 (s, 1H, NHCO), 10,41 (s, 1H, NHCO), 10,61 (s, 1H, NHCO) ppm.

#### 4.16 Sinteza etil 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)thiazol-4-il)acetata

Izhodni etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetat (1,077 g, 5,78 mmol) smo raztopili v diklorometanu (50 mL), dodali 2 kristala spojine DMAP (4-(dimetilamino)piridin) in  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1,640 g, 7,52 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi 48 ur. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom.



\* **Izkoristek:** 100 %; m (produkt) = 1,655 g

\* **Izgled produkta:** blede rumen prašek

\*  **$T_{\text{taliska}}$ :**  $128 \pm 2$  °C

\*  **$R_f$ :** 0,77 (DKM/MeOH = 9 : 1)

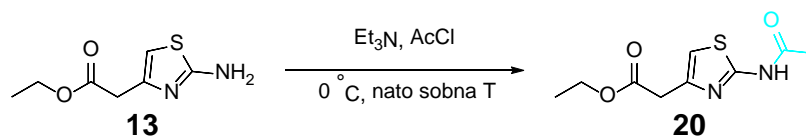
\*  **$^1\text{H-NMR}$ :**

$\delta$  1,18 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,48 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3,64 (d, 2H,  $J = 0,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4,07 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,92 (s, 1H, Ar-H), 11,44 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

\* **MS (ESI)** m/z za  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  ( $[\text{M-H}]^-$ ): izmerjena masa 285 (100).

#### 4.17 Sinteza etil 2-(2-acetamidotiazol-4-il)acetata

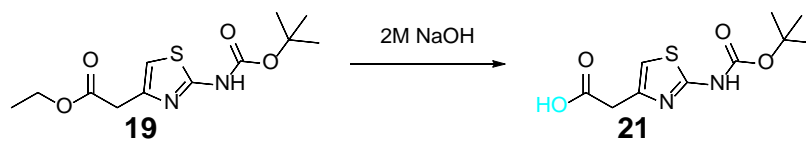
Izhodni etil 2-(2-aminotiazol-4-il)acetat (1,066 g, 5,73 mmol) smo raztopili v diklorometanu (50 mL), ohladili na ledeni kopeli in v čašo dodali še  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,04 mL, 7,45 mmol). Nato smo začeli po kapljicah dodajati acetil klorid (0,450 mL, 6,30 mmol) in vse skupaj mešali 4 ure na sobni temperaturi. Organsko fazo smo spirali z 10-% raztopino citronske kisline (2 x 20 mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Suhemu preostanku smo dodali nekaj mL mešanice etil acetata in heksana v razmerju 1 : 2. Neraztopljeni produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem, filtrat pa zavrgli.



- \* **Izkoristek:** 45,3 %; m (produkt) = 0,591 g
- \* **Izgled produkta:** rumeno-rjava oborina
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 112 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0,64 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  
 $\delta$  1,18 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,12 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,08 (q, 2H,  $J = 7,1$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,95 (s, 1H, Ar-H), 12,14 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.
- \* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  
 $\delta$  14,6, 22,9, 37,1, 60,8, 110,6, 144,0, 158,1, 168,8, 170,5 ppm.
- \* **MS** (ESI) m/z za C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izmerjena masa 227 (100).

#### 4.18 Sinteza 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)etanojske kisline

Etil 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)acetat (1,655 g, 5,76 mmol) smo raztopili v metanolu (20 mL) in dodali 2-M NaOH (11,6 mL, 23,04 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo ponovno dodali 2-M NaOH (5,8 mL, 11,52 mmol) in mešali še nadaljnji 2 uri pri sobni temperaturi. Metanol smo uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo spirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Vodno fazo smo nakisali s 37-% HCl in nastalo oborino odfiltrirali z odsesavanjem.



- \* **Izkoristek:** 55,1 %; m (produkt) = 0,822 g
- \* **Izgled produkta:** rumenkast prašek
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 160 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  1,48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,89 (s, 1H, Ar-H), 11,42 (razširjen s, 1H, NHCO), 12,35 (s, 1H, COOH) ppm.

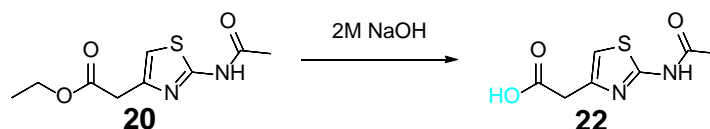
\* <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  28,4 (3C), 37,3, 81,5, 110,0, 144,9, 159,7, 159,8, 172,1 ppm.

\* MS (ESI) m/z za C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izmerjena masa 257 (100).

#### 4.19 Sinteza 2-(2-acetamidotiazol-4-il)etanjoske kisline

Etil 2-(2-acetamidotiazol-4-il)acetat (0,591 g, 2,59 mmol) smo raztopili v etanolu (50 mL), dodali 2-M NaOH (5,2 mL, 10,4 mmol) in vse skupaj pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo dvignili temperaturo na 50 °C in pustili mešati še nadaljnji 2 uri. Etanol smo uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo spirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali, topilo uparili in suh preostanek raztopili v metanolu (50 mL). V bučko smo dodali 2-M NaOH (1,3 mL, 2,6 mmol) in pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Metanol smo uparili pod znižanim tlakom, vodno fazo pa nakisali s 37-% HCl do pH = 1. Ker se naš produkt ni oboril, smo vodno fazo ekstrahirali z etil acetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom.



\* **Izkoristek:** 26,6 %; m (produkt) = 0,138 g

\* **Izgled produkta:** rumenkast prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 211 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  2,12 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,92 (s, 1H, Ar-H), 12,12 (razširjen s, 1H, NHCO), 12,36 (razširjen s, 1H, COOH) ppm.

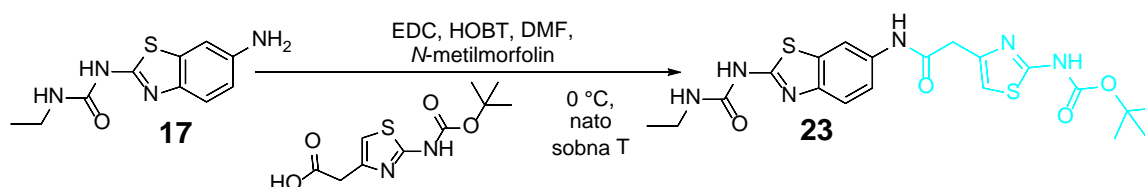
\* <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  22,9, 37,3, 110,3, 144,6, 157,9, 168,8, 172,1 ppm.

\* MS (ESI<sup>+</sup>) m/z za C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SNa ([M+Na]<sup>+</sup>): izmerjena masa 223 (100).

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

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (*S*)-1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,100 g, 0,42 mmol) in 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)etanojske kisline (0,108 g, 0,42 mmol). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL etil acetata in spirali z 10-% raztopino citronske kisline (2 x 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Suhemu preostanku smo dodali nekaj mL mešanice diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1 ter neraztopljeni produkt odfiltrirali z odsesavanjem.



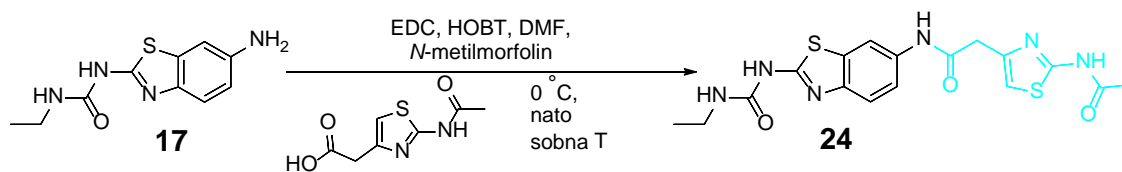
- \* **Izkoristek:** 42,1 %; m (produkt) = 0,085g
- \* **Izgled produkta:** rumen prašek
- \* **T<sub>tališča</sub>:** 172 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>:** 0,13 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,48 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3,15–3,22 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,73 (t, 1H, *J* = 4,7 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,92 (s, 1H, tiazol-H), 7,46 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,54 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, Ar-H-4), 8,20 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H-7), 10,21 (s, 1H, NHCO), 10,63 (s, 1H, NHCO), 11,44 (s, 1H, NHCO) ppm.

#### 4.21 Sinteza 2-(2-acetamidotiazol-4-il)-*N*-(2-(3-etilureido)benzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)acetamida

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz (*S*)-1-(6-aminobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-3-etiluree (0,091 g, 0,39 mmol) in 2-(2-acetamidotiazol-4-il)ocetne kisline (0,077 g, 0,39 mmol). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL etil acetata in spirali z 10-% raztopino citronske kisline (2 x 20 mL), nasičeno

raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Suhemu preostanku smo dodali nekaj mL mešanice diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1 ter neraztopljeni produkt odfiltrirali z odsesavanjem.



\* **Izkoristek:** 26,7 %; m (produkt) = 0,043 g

\* **Izgled produkta:** rumen prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 263 ± 2 °C

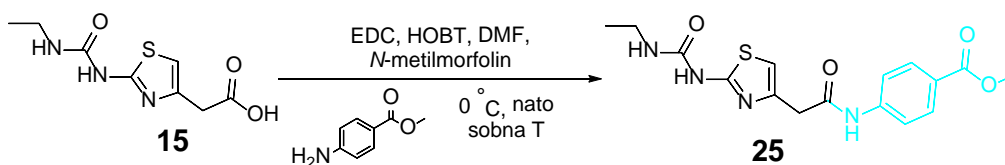
\* **R<sub>f</sub>:** 0,16 (DKM/MeOH = 9 : 1)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,09 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,11 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3,15–3,21 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,70 (t, 1H, *J* = 5,0 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,95 (s, 1H, tiazol-H), 7,46 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,54 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, Ar-H-4), 8,20 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H-7), 10,23 (s, 1H, NHCO), 10,63 (s, 1H, NHCO), 12,11 (s, 1H, NHCO) ppm.

#### 4.22 Sinteza metil 4-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoata

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz metil 4-aminobenzoata (0,132 g, 0,87 mmol) in 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)ocetne kisline (0,200 g, 0,87 mmol). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL etil acetata in spirali z 10-% raztopino citronske kisline (2 x 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 20 : 1.



\* **Izkoristek:** 20,9 %; m (produkt) = 0,066 g

\* **Izgled produkta:** rumeno-oranžen prašek

\* **T<sub>tališča</sub>:** 122 ± 2 °C

\* **R<sub>f</sub>:** 0,13 (DKM/MeOH = 20 : 1)

\* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,04 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,10–3,16 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,83 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 6,43 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,78 (s, 1H, tiazol-H), 7,75 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,92 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 10,42 (s, 1H, NHCO), 10,48 (s, 1H, NHCO) ppm.

\* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

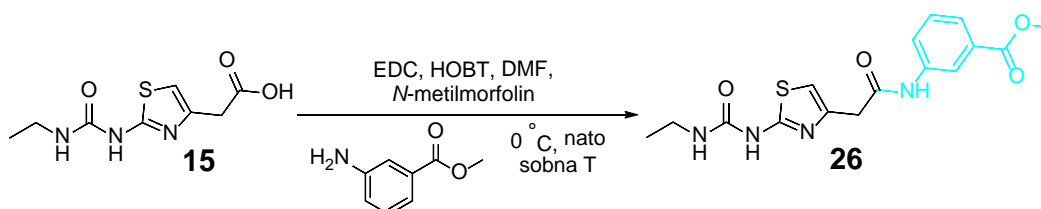
δ 15,2, 34,1, 51,9, 108,3, 118,4 (2C), 123,8, 130,3 (2C), 143,6, 144,2, 153,7, 159,7 (2C), 165,8, 168,6 ppm.

\* **HRMS** (ESI) *m/z* za C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 361,0971, izmerjena masa 361,0977.

\* **HPLC:** metoda A, *t<sub>r</sub>* 11,19 min (100-% čistota pri 254 nm).

#### 4.23 Sinteza metil 3-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoata

Sintezo smo izpeljali po splošnem postopku za sintezo amidne vezi. Spojino smo sintetizirali iz metil 3-aminobenzoata (0,050 g, 0,33 mmol) in 2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)ocetne kisline (0,076 g, 0,33 mmol). V reakcijsko zmes smo dodali 40 mL etil acetata in spirali z 10-% raztopino citronske kisline (2 x 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jo filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot mobilno fazo uporabili mešanico diklorometana in metanola v razmerju 40 : 1.



\* **Izkoristek:** 25,0 %; m (produkt) = 0,030 g

\* **Izgled produkta:** rumeno-rjav prašek

- \* **T<sub>tališča</sub>**: 140 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>**: 0,52 (DKM/MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 1,05 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,10–3,17 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,85 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 6,44 (t, 1H, *J* = 5,2 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6,78 (s, 1H, tiazol-H), 7,46 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H-5), 7,64 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1,1 Hz, Ar-H-4/6), 7,85 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1,1 Hz, Ar-H-4/6), 8,29 (t, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H-2), 10,35 (s, 1H, NHCO), 10,40 (s, 1H, NHCO) ppm.

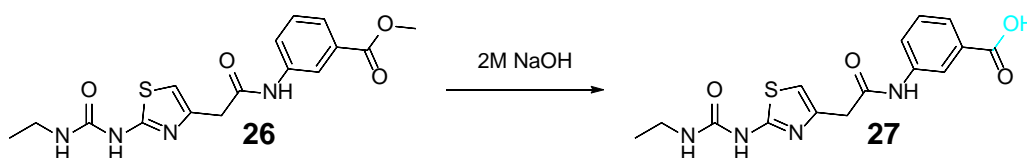
- \* **<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

δ 15,2, 34,1, 52,2, 108,2, 119,5, 123,5, 123,8, 129,2, 130,1, 139,5, 144,4, 153,7, 159,7, 159,8, 166,1, 168,3 ppm.

- \* **HRMS** (ESI) *m/z* for C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 361,0971, izmerjena masa 361,0975.
- \* **HPLC**: metoda A, *t<sub>r</sub>* 11,16 min (100-% čistota pri 254 nm).

#### 4.24 Sinteza metil 3-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kisline

Izhodni metil 3-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoat (0,015 g, 0,041 mmol) smo raztopili v metanolu (3 mL) in dodali 2-M NaOH (0,062 mL, 0,12 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Metanol smo uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo nakisali s 37-% HCl. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem.



- \* **Izkoristek**: 83,2 %; *m* (produkt) = 0,012 g
- \* **Izgled produkta**: rjava oborina
- \* **T<sub>tališča</sub>**: 154 ± 2 °C
- \* **R<sub>f</sub>**: 0 (DKM / MeOH = 9 : 1)
- \* **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  1,04 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,10–3,16 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,63 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,56 (t, 1H,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,78 (s, 1H, tiazol-H), 7,43 (t, 1H,  $J = 7,9$  Hz, Ar-H-5), 7,62 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz, Ar-H-4/6), 7,84 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz, Ar-H-4/6), 8,25 (s, 1H, Ar-H-2), 10,35 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 10,48 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 12,97 (razširjen s, 1H,  $\text{COOH}$ ) ppm.

\*  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):

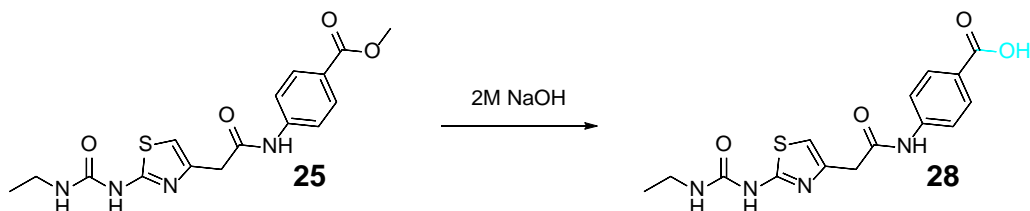
$\delta$  15,2, 34,1, 108,2, 119,7, 123,1, 124,0, 129,0, 131,2, 137,9, 139,4, 144,0, 153,6, 159,8, 167,1, 168,2 ppm

\* **HRMS** (ESI)  $m/z$  za  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ): izračunana masa 347,0814, izmerjena masa 347,0818.

\* **HPLC**: metoda A,  $t_r$  9,99 min (100-% čistota pri 254 nm).

#### 4.25 Sinteza 4-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kisline

Izhodni metil 4-(2-(2-(3-etilureido)tiazol-4-il)acetamido)benzoat (0,039 g, 0,11 mmol) smo raztopili v metanolu (5 mL) in dodali 2-M NaOH (0,16 mL, 0,33 mmol). Vse skupaj smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo v reakcijsko zmes dodali še 2-M NaOH (0,05 mL, 0,11 mmol). Po 1 uri smo metanol uparili pod znižanim tlakom in vodno fazo nakisali s 37-% HCl. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem.



\* **Izkoristek**: 74,7 %;  $m$  (produkt) = 0,028 g

\* **Izgled produkta**: blede rumena oborina

\*  **$T_{\text{tališča}}$** :  $248 \pm 2$  °C

\*  **$R_f$** : 0 (DKM /MeOH = 9 : 1)

\*  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):

$\delta$  1,05 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,11–3,17 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,68 (t, 1H,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 6,81 (s, 1H, tiazol-H), 7,73 (d, 2H,  $J = 8,9$  Hz, Ar-H), 7,89 (d, 2H,  $J = 8,9$  Hz, Ar-H), 10,51 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 10,61 (razširjen s, 1H,  $\text{NHCO}$ ) ppm; v spektru ni viden signal za  $\text{COOH}$ .

\*  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):



δ 15,1, 34,2, 108,8, 118,3 (2C), 125,1, 130,4 (2C), 142,2, 143,2, 153,4, 160,3, 166,9, 168,2 ppm.

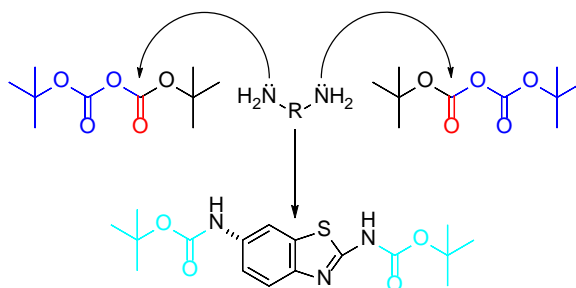
- \* **HRMS** (ESI) m/z za C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa 347,0814, izmerjena masa 347,0804.
- \* **HPLC**: metoda A, t<sub>r</sub> 9,91 min (100-% čistota pri 254 nm).

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1 Reakcija z di-*tert*-butildikarbonatom (spojini **2** in **19**)

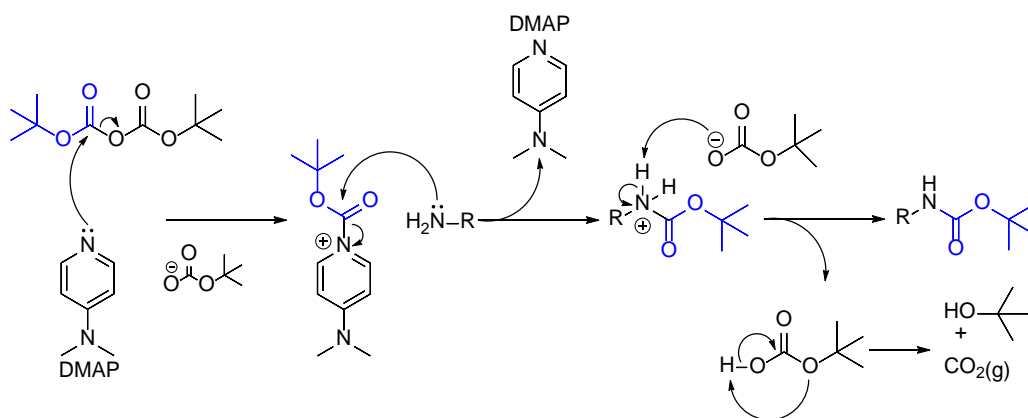
Pri sintezi spojine **2** smo na izhodnem (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu (spojina **1**) izvedli reakcijo zaščite alifatske aminske skupine na mestu 6. Ta skupina je močan nukleofil in jo je treba zaščititi, saj bi lahko drugače v drugi stopnji reakcija potekla na njej namesto na želeni aromatski amski skupini, ki je sicer slabši nukleofil. Reakcija poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije, saj nukleofilna alifatska aminska skupina napade elektrofilno karbonilno skupino di-*tert*-butildikarbonata (slika 13; prikazano s puščicami – elektrofilna karbonilna skupina je označena z rdečo barvo in izstopajoča skupina s temno modro barvo). Za visoko selektivnost reakcije smo poskrbeli z nizko temperaturo, pri kateri je reakcija potekala (mešanje na ledeni kopeli), in s počasnim dodajanjem reagenta ter s tem reakcijo striktno usmerjali le na bolj reaktivno alifatsko amsko skupino. Tako smo preprečili nastanek neželenega dikarbamatnega stranskega produkta (slika 13; prikazano s svetlo modro barvo). Kot stranski produkt reakcije je nastal *tert*-butil hidrogenkarbonat, ki je razpadel na *tert*-butanol in CO<sub>2</sub> (slika 14), zato smo na bučko namestili septum z balonom in omogočili izhajanje nastalega plina ter hkrati zagotovili zaprto okolje za izvedbo naše reakcije.



**Slika 13:** Prikaz nastanka neželenega dikarbamatnega produkta.

Sinteza spojine **19** je prav tako potekla z reakcijo med amsko skupino in di-*tert*-butildikarbonatom, vendar po malenkost modificiranem postopku. V reakcijsko zmes smo poleg izhodne spojine in di-*tert*-butildikarbonata dodali še 4-dimetilaminopiridin (DMAP) kot katalizator. Ta najprej napade karbonilno skupino di-*tert*-butildikarbonata in jo še dodatno aktivira za nukleofilni napad aminske skupine (slika 14) (27). Zaradi dodatka

katalizatorja bi pričakovali, da bo reakcija potekla hitreje kot pri sintezi spojine **2**, vendar ni bilo tako, saj je reakcija v celoti potekla šele po petih dneh. Razlog za to je najverjetneje bistveno slabša nukleofilnost aromatske amino skupine v primerjavi z alifatsko.



**Slika 14:** Mehanizem tvorbe *tert*-butilkarbamata s pomočjo DMAP kot katalizatorja. Stranski produkt reakcije je *tert*-butil hidrogenkarbonat, ki razpade na *tert*-butilni alkohol in ogljikov dioksid (povzeto po 27).

### 5.1.2 Sinteza etilsečninske skupine (spojini **3** in **14**)

Ker etilizocianat močno draži dihala, oči in kožo, smo reakcijo striktno izvajali le v digestoriju. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, saj je etilizocianat zelo reaktiven in bi lahko reagiral z vlago v zraku. Zaradi tega je pomembno, da pred njegovim dodatkom iz bučke odstranimo ves zrak in ga nadomestimo z inertnim argonom. S sintezo spojine **3** nismo imeli težav, so se pa te pojavile pri poskusu izolacije nastalega produkta. Tako smo pri prvem poskusu izolacije reakcijsko zmes najprej spirali z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$ , s katero smo se znebili prebitnega izocianata in nato še z nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$ , s katero smo iz organske faze odtegnili vodo. Organsko fazo smo nato še sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in filtrirali. Kljub ekstrakciji smo v organski fazi še vedno zasledili nečistote, zato smo topilo odstranili pod znižanim tlakom in surov produkt čistili s prekrizalizacijo iz mešanice etil acetata in heksana. Ker nam izolacija ni uspela, smo postopek ponovili z  $\text{MeOH}$ . Tokrat je postopek uspel, saj smo se nečistot znebili, a je bil izkoristek postopka preslab. V tretjem poskusu izolacije smo se odločili za izolacijo s kolonsko kromatografijo. Ta se je izkazala za bistveno uspešnejšo, saj smo produkt izolirali z visokim izkoristkom reakcije.

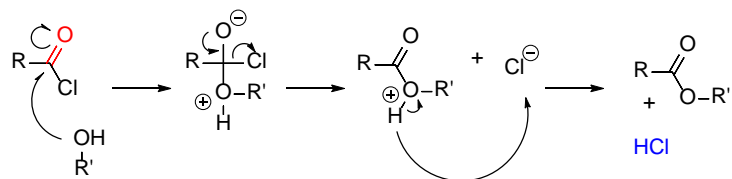
Med sintezo spojine **14** smo se zaradi počasnega poteka reakcije namesto uporabe ledene kopeli odločili dvigniti temperaturo, pri kateri je reakcija potekala, na  $50\text{ }^\circ\text{C}$  in dodati še

0,5 ekvivalenta etil izocianata glede na izhodno spojino. Tudi tu smo se na podlagi preteklih izkušenj odločili za izolacijo produkta s kolonsko kromatografijo.

### 5.1.3 Odstranitev zaščitne skupine na amino skupini z acidolizo (spojina **4**)

Odstranitev *tert*-butil karbamatne zaščitne skupine lahko dosežemo zelo selektivno, in sicer z uporabo kislega medija, v katerem reakcija poteka (t. i. acidoliza). V našem primeru smo za izvedbo acidolize pri sintezi spojine **4** uporabili klorovodikovo kislino, ki smo jo pripravili z reakcijo med acetyl kloridom in metanolom. Kislini kloridi (ali halogenidi) so dobro reaktivne spojine, saj imajo halogeni visoko elektronegativnost, kar še dodatno poveča elektronski primanjkljaj na karbonilnem ogljiku (slika 15; označeno z rdečo). Ta je zaradi tega zelo primeren za nukleofilni napad s strani metanola (28).

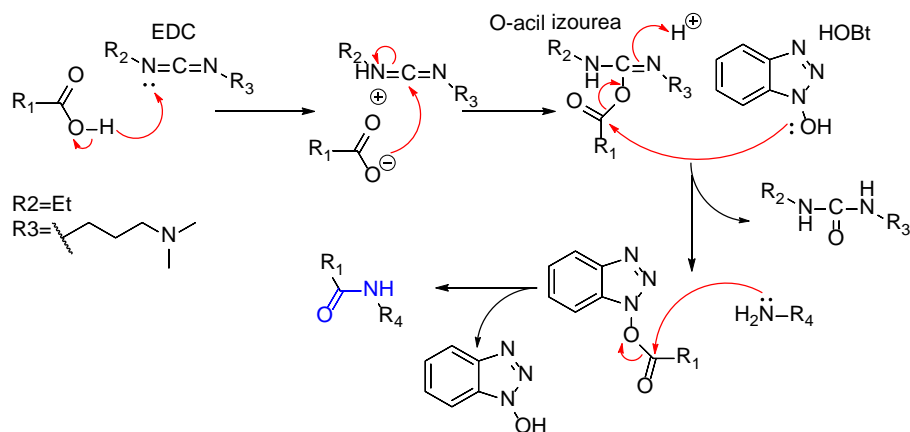
Reakcija poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije, pri kateri nastane plinast HCl (slika 15). Zaradi kislega medija je bil naš produkt v obliki amonijeve soli, zato smo ga za nastanek proste aminske skupine izpostavili bazičnim pogojem in tvorili spojino **5**.



**Slika 15:** Mehanizem tvorbe HCl med kislinim kloridom in alkoholom (prirejeno po 29).

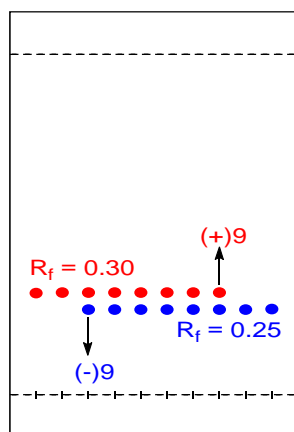
### 5.1.4 Sinteza amidne vezi s pomočjo sklopitvenih reagentov (spojine **6**, **7**, **9**, **18**, **23**, **24**, **25**, **26**)

Največji delež reakcij je predstavljala t. i. sklopitev (ang. *coupling*). Sklopitvene reagente uporabljamo za sintezo amidne vezi, pri čemer povežemo spojino s prosto aaminsko skupino s spojino, ki ima prosto karboksilno skupino. Reakcija poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji pride do aktivacije karboksilne kisline z 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidom (EDC) do bolj reaktivne *O*-acil izouree. Le-ta nato reagira s 1-hidroksibenzotriazolom (HOBt), ki deluje kot pomožni nukleofil in se v zadnji stopnji poveže s prosto aaminsko skupino (slika 16) (30).



**Slika 16:** Mehanizem tvorbe amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov (prirejeno po 30).

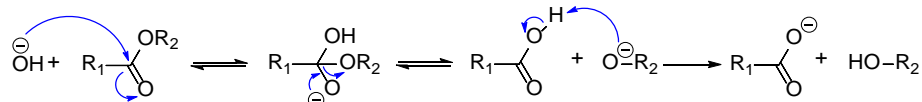
Vse spojine, sintetizirane po postopku sklopitve, smo po končanih reakcijah poskusili izolirati na enak način. Najprej smo iz reakcijske zmesi ekstrahirali našo sintetizirano spojino z etil acetatom. Organsko fazo smo nato spirali z 10-% raztopino citronske kisline, nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl. Če se z ekstrakcijo nismo znebili nečistot, smo izvedli kolonsko kromatografijo. Tako smo spojine **6**, **7**, **9**, **25** in **26** izolirali s pomočjo kolonske kromatografije, kjer smo za mobilno fazo uporabili mešanico DKM in MeOH v razmerju 20 : 1. Pri spojini **26** smo postopek izolacije s kolonsko kromatografijo morali ponoviti z uporabo bolj lipofilne mobilne faze (DKM : MeOH = 40 : 1), saj je analiza z NMR po prvotni izolaciji pokazala prisotnost nečistot. Rezultat izolacije spojine **9** je bil malenkost presenetljiv, saj smo sprva mislili, da imamo v reakcijski zmesi nečistoto, ki ima zelo podoben retencijski faktor kot naša sintetizirana spojina (slika 17). NMR-analiza obeh spojin je namreč pokazala, da imata enako kemijsko strukturo, zato smo sklepali, da je med reakcijo prišlo do racemizacije. Kasnejša analiza je našo domnevo potrdila in tako smo namesto ene sintetizirali dve spojini, ki smo ju glede na njuno optično aktivnost označili z **(-)****9** in **(+)****9**. Spojine **18**, **23** in **24** smo po neuspeli ekstrakciji želeli izolirati s kolonsko kromatografijo. Po pripravi mobilne faze smo je nekaj mililitrov uporabili za raztapljanje našega vzorca in ugotovili, da se tudi po segrevanju do vrenja ni raztopil v celoti. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem ter opravili TLC matičnice in oborine. Pri vseh treh spojinah se je izkazalo, da so se nečistote raztopile v mobilni fazi, medtem ko je naša spojina ostala neraztopljena. Tako smo se na preprost način znebili primesi in dobili čiste spojine.



**Slika 17:** Rezultat TLC-analize reakcijske zmesi sinteze spojine **9**. Sintetizirana diastereomera imata zelo podoben retencijski faktor, zato smo ob večji količini racemata uspeli izolirati le manjši delež posameznega diastereomera.

### 5.1.5 Alkalna hidroliza estrov (spojine **8**, **11**, **15**, **21**, **22**, **27** in **28**)

Hidroliza estrov je reakcija, pri kateri iz estra nastaneta karboksilna kislina in alkohol. Izvedemo jo lahko s pomočjo kisline ali baze, ki katalizira potek reakcije. V našem primeru smo se odločili za izvajanje alkalne hidrolize. V alkalnem mediju hidroksidni ion napade elektrofilno karbonilno skupino estra, prekine  $\pi$ -vez in tvori tetraedrični intermediat. V naslednji stopnji pride do izstopa alkoksidnega aniona in tvorbe karboksilne kisline. Le-ta se nadalje hitro deprotonira, saj je alkoksidni anion zelo reaktiven in odcepi kislinski proton. Tako nastaneta alkohol in karboksilat (slika 18) (31).



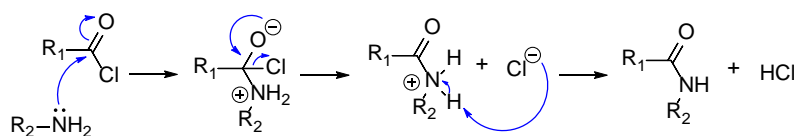
**Slika 18:** Mehanizem alkalne hidrolize estrov (prirejeno po 31).

Ko je hidrolizirala vsa izhodna spojina, smo postopek izolacije nadaljevali z ekstrakcijo v organsko fazo, kar je bil v našem primeru etil acetat. Ekstrakcija spojine **8** je potekla brez težav, saj smo skoraj ves produkt ekstrahirali v organsko fazo. Karboksilne kisline so bolj polarne od estrov, zato ne preseneča slab izkoristek ekstrakcije v primeru spojin **11**, **15** in **21**. Ker je naša sintetizirana spojina tudi po ekstrakciji ostala v vodni fazi, smo se pri izolaciji spojine **11** odločili za kolonsko kromatografijo, kjer smo v primerjavi z drugimi kolonskimi kromatografijami izbrali zelo polarno mobilno fazo (DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 5 : 1 : 0,1). Naša spojina bi v nasprotnem primeru lahko ostala adsorbirana

na stacionarni fazi – silikagelu. Zaradi nizkega izkoristka izolacije s kolonsko kromatografijo (60 % v primerjavi s skoraj 100-% izkupičkom pri ekstrakciji spojine **8**), smo se pri spojinah **15**, **21**, **27** in **28** po neuspeli ekstrakciji odločili za enostavnejšo pot. Organsko fazo smo uparili pri znižanem tlaku in vodno fazo nakisali s 37-% HCl ter s tem nižali topnost sintetizirane karboksilne kisline, ki je iz vodne faze izpadla kot oborina, ki smo jo enostavno odfiltrirali z odsesavanjem. Pri sintezi spojine **22** smo zaradi počasnega poteka reakcije dvignili temperaturo na 50 °C. Po ekstrakciji je NMR-analiza produkta pokazala, da sintetizirana spojina nima zelene strukture (nastanek etilnega estra namesto karboksilne kisline), zato smo namesto EtOH kot topilo uporabili MeOH in reakcijo ponovili. Obarjanje našega produkta se v tem primeru ni izkazalo za uspešno. Spojina se namreč ni oborila kljub zelo nizki pH vrednosti (pH = 1), zato smo jo ekstrahirali z etil acetatom.

### 5.1.6 *N*-aciliranje s kislinskim kloridom (spojini **10** in **20**)

Kislinski kloridi so derivati karboksilnih kislin in so zelo reaktivne spojine. Kloridni atom je močno elektronegativen, kar še dodatno poveča primanjkljaj elektronske gostote na karbonilnem ogljiku, ki zato postane zelo dovzeten za napad s strani nukleofila (28). Aminska skupina z neveznim elektronskim parom tako napade karbonilni ogljik, kar ima za posledico nastanek tetraedričnega intermedata. Temu sledi izstop kloridnega iona in ponovna vzpostavitev dvojne vezi med kisikom in karbonilnim ogljikom. V zadnji stopnji kloridni ion odcepi proton in tvori se HCl (slika 19). Ker so kislinski kloridi zelo reaktivni in pri reakciji kot stranski produkt nastaja klorovodikova kislina, smo reakcijo izvajali v digestoriju s popolno zaščitno opremo (očala, rokavice). Zaradi reaktivne narave metil malonil klorida smo reakcijo izvajali v argonovi atmosferi, da smo preprečili stik z zračno vlago.



**Slika 19:** Mehanizem reakcije med primarnim aminom in kislinskim kloridom (prirejeno po 32).

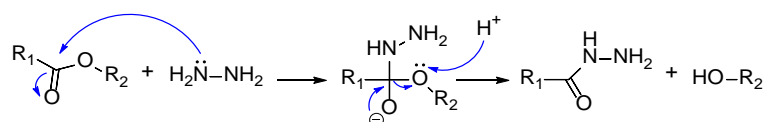
Kontinuirana ekstrakcija preko noči z večjim volumnom etil acetata pri izolaciji spojine **10** se ni izkazala za uspešno, saj je naša spojina tvorila adukte s citronsko kislino v razmerju 1 : 1. Poleg teh je bila naša spojina onesnažena še s trietilamonijevo soljo, ki nastane kot

stranski produkt reakcije. Slab izkoristek kasnejšega čiščenja produkta s kolonsko kromatografijo nas je prisilil k ponovitvi reakcije. H končnemu uspehu izolacije je pripomoglo čiščenje našega vzorca s kolonsko kromatografijo, med katerim smo po določenem času povečali polarnost mobilne faze, katere razmerje med DKM in MeOH smo iz 40 : 1 spremenili na 20 : 1.

### 5.1.7 Hidrazinoliza (spojina 12)

Pri reakciji s hidrazinom smo izvedli hidrazinolizo estra in tvorili hidrazid. Gre za reakcijo, ki poteče v dveh glavnih stopnjah, saj najprej pride do nukleofilne adicije, ki ji nato sledi eliminacija. V prvem delu reakcije nevezni elektronski par hidrazina napade elektrofilni karbonilni ogljik estra in poteče nukleofilna adicija hidrazina. Temu sledi stopnja eliminacije. Vodikov atom se najprej veže na alkoholni del estra in tako tvori dobro izstopajočo skupino. Sledi ponovna vzpostavitev dvojne vezi med kisikovim atomom in karbonilnim ogljikom, kar ima za posledico izstop alkohola iz molekule (slika 20) (33).

Hidrazin monohidrat je brezbarvna oljnata tekočina, ki ima vonj po amonijaku. Je strupen in zelo dobro reaktiven, zato se največkrat uporablja v obliki vodnih raztopin. Zaradi njegove toksičnosti in reaktivnosti smo reakcijsko mešanico naprej prepihali z argonom, nato pa ga v zaprt sistem počasi dodajali z injekcijsko iglo. Reakcijo smo izvajali pod refluksom na oljni kopeli (80 °C).



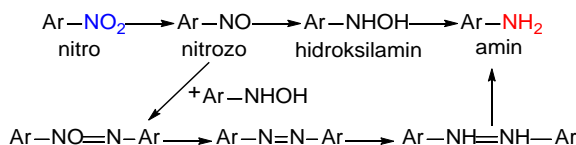
**Slika 20:** Mehanizem reakcije med hidrazinom in estrom (prirejeno po 33).

### 5.1.8 Katalitsko hidrogeniranje (spojina 17)

Selektivno hidrogeniranje spojin, ki v svoji strukturi vsebujejo nitro skupino, je široko uporabljen postopek za pridobivanje aminov. Zraven spojine z nitro skupino in vodika potrebujemo za izvedbo hidrogeniranja tudi katalizator. Reakcija je izjemno eksotermna in zelo hitro poteka pri uporabi mnogih kovin kot katalizatorjev. Eden najprimernejših katalizatorjev za hidrogeniranje je paladij, ki je adsorbiran na ogljik (Pd/C). Glede na dejstvo, da je stranski produkt hidrogeniranja nitro skupine tudi voda, je uporaba hidrofobnega ogljika kot nosilca za paladij zelo smotrna. Reakcija poteka preko redukcije



nitro skupine do nitrozo skupine, hidroksilaminske skupine in nazadnje do primarnega amina. Poleg glavnega poteka reakcije je možen nastanek stranskih produktov, ki izvirajo iz nitroznega intermediata (slika 21) (34).



**Slika 21:** Mehanizem katalitskega hidrogeniranja aromatske nitro skupine (prirejeno po 34).

Redukcijo aromatske nitro skupine spojine **16** v spojino **17**, ki ima prosto aminsko skupino, smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem z uporabo H<sub>2</sub> in katalizatorja Pd/C. Bučko z reakcijsko zmesjo smo najprej preprihivali z argonom, da smo iz nje odstranili kisik in s tem preprečili vžig, saj je Pd/C na zraku zelo reaktiven. Po dodatku uprašene kovine, adsorbirane na inertni ogljik, smo reakcijsko zmes 48 ur mešali še v vodikovi atmosferi. Izolacije spojine **17** smo se lotili s kolonsko kromatografijo, saj smo na TLC-ploščici zasledili prisotnost vsaj štirih stranskih produktov.

## 5.2 REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ

Biološka testiranja določanja zaviralne aktivnosti končnim spojinam **5**, **6**, **7**, **8**, **9a**, **9b**, **10**, **11**, **12**, **18**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27** in **28** so izvedli na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *E. coli* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Rezultati v preglednicah so podani kot rezidualne aktivnosti (RA). RA nam pove, kakšno aktivnost je encim ohranil po tem, ko se je nanj vezal zaviralec, in predstavlja razliko vrednosti, ko ima encim ohranjeno 100-% aktivnost in ko encimu dodamo določeno koncentracijo zaviralca. Vrednost RA izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{RA}[\%]_{\text{spojine}} = 100 \% - \text{zaviranje encima pri določeni koncentraciji} [\%]$$

V našem interesu je, da je vrednost RA čim bližje vrednosti 0, saj to pomeni, da je zaviralec popolnoma zavrl delovanje encima. Testiranja so bila izvedena pri dveh različnih koncentracijah (10 μM in 100 μM) potencialnega zaviralca in smiselno je bilo pričakovati, da bo višja koncentracija zaviralca prinesla tudi boljše zaviranje encima ter posledično nižjo vrednost RA. Nepravilnost pri rezultatih se je pokazala pri spojinah **6**, **12** in **26**, ki so

imele nižjo vrednost RA pri nižji koncentraciji zaviralca, kar je lahko posledica slabše topnosti pri višji koncentraciji. Glede na rezultate, ki so predstavljeni v preglednicah 2, 3 in 4, lahko sklepamo, da so le spojine **6**, **18**, **23** in **24** razmeroma močni zaviralci DNA-giraze *E. coli* (RA vrednosti < 50 % pri nižji koncentraciji), saj vse zavirajo encim v  $\mu\text{M}$ -območju. Najvišjo jakost zaviranja DNA-giraze izkazujejo spojine, ki imajo za osnovni skelet nenasičeno biciklično strukturo in imajo na mestu 6 osrednjega ogrodja preko amidne vezi vezan pirol ali tiazol. Namen vpeljave aromatskega substituenta na mesto 6 osrednjega ogrodja je bil povečati lipofilnost spojin in s tem izboljšati prehod skozi bakterijsko celično steno, vendar se je zamenjava dušikovega heterocikla z benzenovim obročem izkazala za neugodno, saj so take spojine (z izjemo spojine **(+9)**) neaktivne. Spojini **(-9)** in **(+9)** sta diastereoizomera, kar nakazuje, da je vezava na encim odvisna tudi od stereokemije, saj je spojina **(+9)** vsaj pri višji koncentraciji bistveno bolj aktivna od spojine **(-9)**, ki je povsem neaktivna pri obeh koncentracijah. Dobro zaviranje DNA-giraze v tem primeru je presenetljivo, ker ima spojina **(+9)** v svoji stranski verigi benzenov obroč, ki se je pri ostalih spojinah izkazal za neugodnega. Razlog je lahko v stereokemiji, saj položaj molekule v prostoru omogoča vezavo benzenovega obroča v hidrofobni žep vezavnega mesta za ATP, medtem ko drug stereoizomer zaradi svoje prostorske orientiranosti tega mogoče ni sposoben. Spojina **7**, ki je metilni ester spojine **8**, izkazuje večjo aktivnost pri višji koncentraciji, kar lahko prav tako razložimo z ugodnejšo vezavo v vezavno mesto. Metilna skupina namreč omogoča interakcije s hidrofobnim žepom. Izmed spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom najmočnejše delovanje izkazuje spojina **6** (preglednica II). Analiza vezave te spojine v vezavno mesto z molekulskim sidranjem kaže, da je molekula orientirana tako, da pirolamidni fragment (in ne etilsečninski) tvori ključne vodikove vezi z Asp73 in strukturno ohranjeno vodo ter hidrofobne interakcije s sosednjimi AK-ostanki. Ta spojina je tudi edina, ki ima v svoji strukturi pirolamidni fragment, kar nakazuje, da le-ta tvori močnejše interakcije s hidrofobnim adeninskim žepom od etilsečninskega fragmenta. Iz tega lahko sklepamo, da imajo hidrofobne interakcije velik vpliv na vezavo, saj je etilsečninski del sposoben tvorbe ene vodikove vezi več od pirolamidnega, je pa le-ta sposoben tvoriti več hidrofobnih interakcij z encimom. Pri spojinah **5** in **7-12**, pri katerih etilsečninski fragment zasidra vezavo v ATP-vezavno mesto DNA-giraze, se 4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazolni obroč nahaja točno pod Glu50-Arg76 solnim mostom, kar ima za posledico slabšo zaviralno aktivnost teh spojin, saj ne morejo tvoriti kation- $\pi$  interakcij z Arg76.

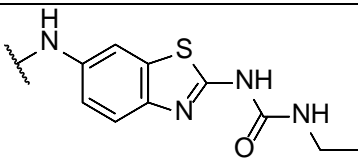
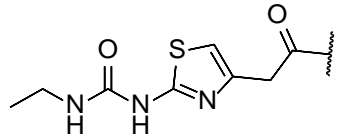
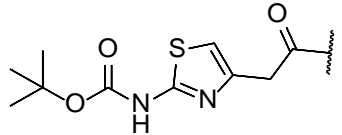
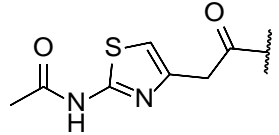
Da bi potrdili našo domnevo, smo pripravili serijo potencialnih zaviralcev z nenasičenim benzo[1,2-*d*]tiazolnim osrednjim skeletom. Iz preglednice III je razvidno, da so vse tri spojine pri višji koncentraciji delovanje encima v celoti zavrle. Odlično aktivnost pri nižji koncentraciji izkazuje spojina **23**. Poleg že omenjene vpeljave tiazola na mestu 6 osrednjega ogrodja molekule k visoki aktivnosti tudi pri nižji koncentraciji pripomore *terc*-butilkarbamatna skupina, ki tvori še dodatne hidrofobne interakcije v ATP-vezavnem mestu. Spojini **18** in **24** imata za tiazolom vezano bolj polarno etilsečninsko oziroma acetamidno skupino, kar se pozna v slabši aktivnosti v primerjavi s spojino **23**. Izkazalo se je, da vse tri spojine izkazujejo tudi do 90-krat močnejše zaviralno delovanje od svojega nasičenega analoga ( $IC_{50} = 350 \mu\text{M}$  (35) proti  $3,9 \mu\text{M}$  za spojino **23**, preglednica V). To je potrdilo našo domnevo o kation- $\pi$  interakcijah, saj se benzo[1,2-*d*]tiazolni obroč nahaja točno pod Glu50-Arg76 solnim mostom, kar omogoča tvorbo teh interakcij (slika 22).

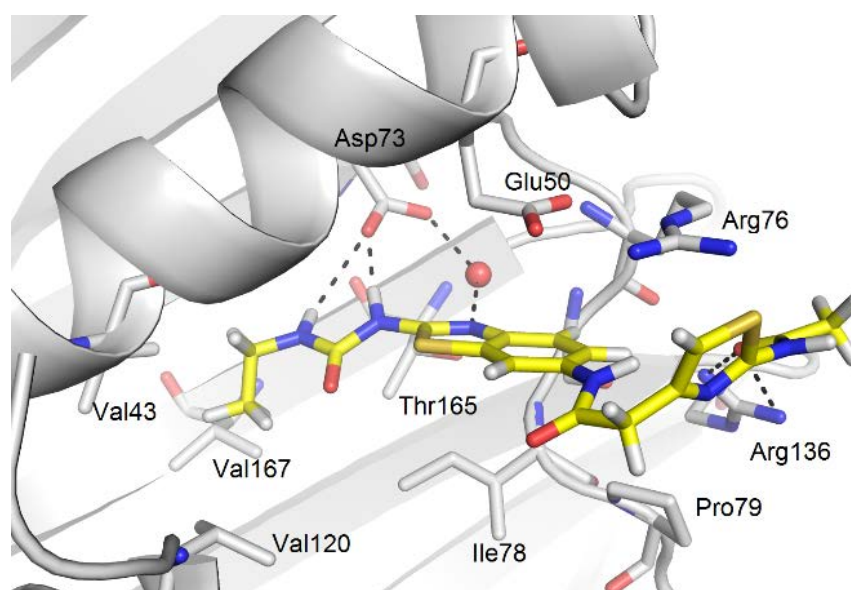
Spojine **25**, **26**, **27** in **28** so zelo šibki zaviralci DNA-giraze. Glavni razlog za njihovo neaktivnost je najbrž v nezmožnosti tvorbe kation- $\pi$  interakcij. Vsem je namreč skupno, da imajo le tiazolni osnovni skelet in ne nenasičenega benzo[1,2-*d*]tiazolnega, ki bi omogočil nastanek teh interakcij. Spojina **25** je ester karboksilne kisline **28** in spojina **26** ester karboksilne kisline **27**. V obeh primerih karboksilni kislini izkazujeta boljše delovanje od njunih estrskih analogov, a so praktično vse spojine neaktivne. Opazna je anomalija pri spojini **26**, saj le-ta kaže boljše delovanje pri nižji koncentraciji, kar ni v skladu z našimi pričakovanji in predvidevanji.

**Preglednica II:** Zaviralna aktivnost spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim osrednjim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli*.

SPOJINA	STRUKTURA SPOJINE	RA [%]	
		10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<u>5</u>		129	107
<u>6</u>		-1	3
<u>7</u>		124	69
<u>8</u>		113	99
<u>(-)</u> 9		120	102
<u>(+)</u> 9		87	20
<u>10</u>		115	114
<u>11</u>		124	115
<u>12</u>		113	125

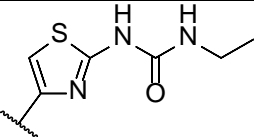
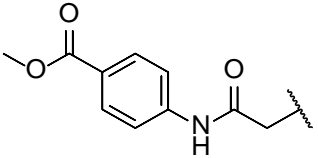
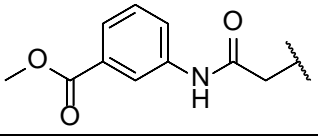
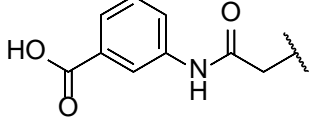
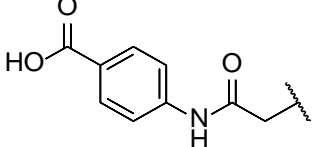
**Preglednica III:** Zaviralna aktivnost spojin z benzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli*.

SPOJINA	STRUKTURA SPOJINE	RA [%]	
		10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
			
<b><u>18</u></b>		49	-1
<b><u>23</u></b>		4	0
<b><u>24</u></b>		54	-1



**Slika 22:** Predvidena vezava spojine **24** v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz *E. coli*. S temno modro so označeni atomi dušika, z rdečo atomi kisika in z oranžno atomi žvepla. Vodikove vezi so označene s prekinjenimi črnimi črtami. Molekulsko sidranje je delo doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. (povzeto po 35).

Preglednica IV: Zaviralna aktivnost spojin z 2-aminotiazolnim skeletom na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli*.

SPOJINA	STRUKTURA SPOJINE	RA [%]	
		10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
			
<u>25</u>		101	91
<u>26</u>		95	98
<u>27</u>		95	74
<u>28</u>		96	83

Protibakterijsko delovanje sintetiziranih končnih spojin potencialnih zaviralcev DNA-giraze so določili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem. Testiranja so potekala na dveh G+ bakterijskih sevih (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) in dveh G- bakterijskih sevih (*Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Rezultati testov so pokazali zelo šibko protibakterijsko delovanje vseh spojin pri 50- $\mu$ M koncentraciji zaviralca, saj izkazujejo manj kot 50-% zaviranje rasti bakterij. Izjema je spojina 23, ki na G+ bakterije izkazuje rahlo boljše protibakterijsko delovanje. Prvi izmed razlogov za slabo protibakterijsko delovanje je nizka encimska aktivnost ( $IC_{50}$  vrednosti med 1,4  $\mu$ M in 7,0  $\mu$ M), ki je pri vseh spojinah v mikromolarnem območju namesto v zaželenem nanomolarnem. Drugi razlog pa je, da so testi na mutiranem sevu *E. coli*, ki ima okvarjeno izlivno črpalko, pokazali, da so sintetizirane spojine substrati izlivnih membranskih črpalk,

kar vodi v zmanjšano citoplazemsko koncentracijo zaviralca v bakteriji in posledično do slabšega protibakterijskega delovanja.

**Preglednica V:** Zaviralna aktivnost rekombinantne DNA-giraze in protibakterijsko delovanje končnih spojin (povzeto po 35).

SPOJINA	IC <sub>50</sub> [μM]	Zaviranje rasti pri 50 μM [%]			
		<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>6</u>	1,4 ± 0,2	47	47	20	26
<u>18</u>	7,0 ± 0,5	15	27	10	17
<u>23</u>	3,9 ± 0,1	64	51	15	35
<u>24</u>	5,6 ± 0,2	12	30	5	20

## 6 SKLEP

Bakterije so mikroorganizmi z neverjetno sposobnostjo prilagajanja različnim vplivom okolja. Mednje zagotovo spada pojav odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam, ki je naravni biološki fenomen. Protibakterijske učinkovine so edino orožje, ki ga človeštvo premore v boju s temi mikroorganizmi, zato smo v primeru infekcij absolutno odvisni od njih. Pandemični razvoj mehanizmov odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam postaja vedno večje klinično in finančno breme za javnozdravstveni sistem, zato je sinteza novih protibakterijskih učinkovin ključna za zajezitev širjenja t. i. superbakterij, ki so razvile odpornost proti prav vsem protibakterijskim učinkovinam. DNA-giraza zaradi svoje biološke vloge v bakterijah predstavlja primerno tarčo za razvoj novih protibakterijskih učinkovin z edinstvenim mehanizmom delovanja, saj je samo taka učinkovina lahko učinkovita v boju z odpornimi bakterijami.

V okviru magistrskega dela smo sintetizirali nove potencialne zaviralce DNA-giraze, ki so etilsečninski derivati 2-aminotiazola. Za etilsečninski fragment je dokazano, da je sposoben tvorbe interakcij z Asp73, ki so ključnega pomena za močno vezavo v vezavno mesto za ATP. Z uvajanjem različnih substituentov smo želeli doseči višjo zaviralno aktivnost na encimu in izboljšanje fizikalno-kemijskih lastnosti, ki bi prinesle boljše protibakterijsko delovanje. Pri sintezni poti smo izhajali iz treh različnih izhodnih spojin (spojine **1**, **13** in **16**), ki smo jim najprej sintetizirali etilsečninski fragment, čemur je sledilo uvajanje različnih substituentov. Zaradi treh različnih izhodnih spojin smo dobili tri serije potencialnih zaviralcev z različnimi osnovnimi skeleti, vsem pa je bil skupni 2-aminotiazolni skelet. Spojine od **5** do **12** imajo tako 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolni, spojine **18**, **23** in **24** benzo[1,2-*d*]tiazolni in spojine od **25** do **28** 2-aminotiazolni osnovni skelet. Na koncu smo uspešno sintetizirali 16 končnih spojin (spojine **5**, **6**, **7**, **8**, **(-)****9**, **(+)****9**, **10**, **11**, **12**, **18**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27** in **28**) in jim določili strukture z metodama NMR in MS.

Sinteze so potekale uspešno, saj večjih težav z njimi nismo imeli. Izpostaviti je treba sintezo spojine **9**, kjer smo namesto ene spojine uspeli izolirati dva čista diastereomera, kar ni bilo v načrtu dela. Za razliko od sinteznega dela pa so se težave večkrat pojavile pri izolaciji sintetiziranih spojin. Kar nekajkrat smo namreč šele po več poskusih izolirali naš produkt ali pa smo morali poizkusiti več različnih poti izolacije. To je bilo najbolj opazno



pri izolaciji karboksilnih kislin, ki smo jih sintetizirali pri alkalni hidrolizi estrov. Najzahtevnejša je bila izolacija spojine **10**, ki je nismo uspeli ekstrahirati v organsko fazo. Spojina je v vodni fazi tvorila adukte s citronsko kislino, poleg tega pa je bila onesnažena še s trietilamonijevo soljo, ki je nastala kot stranski produkt. Neuspeli poizkusi izolacije so nas prisilili, da smo reakcijo ponovili in v drugem poskusu spojino izolirali s pomočjo kolonske kromatografije.

Najboljše vrednosti rezidualne aktivnosti encima pri 100  $\mu\text{M}$  so dosegle spojina **6** in serija spojin z benzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom, kjer so spojine **18**, **23** in **24** pri višji koncentraciji popolnoma zavrle delovanje encima. Spojina **23** je tudi pri nižji koncentraciji (10  $\mu\text{M}$ ) skoraj povsem zavrila delovanje encima (RA = 4 %), medtem ko imata ostali spojini vrednosti RA okoli 50 %. Poleg te serije je treba izpostaviti še spojini **6** in **(+)**9 iz serije potencialnih zaviralcev s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim osnovnim skeletom, ki imata neprimerljivo boljšo zaviralno aktivnost od ostalih spojin iz te serije. Spojina **6** je izkazala najboljše zaviralno delovanje od vseh sintetiziranih spojin, medtem ko je spojina **(+)**9 veliko bolj aktivna od svojega diastereomera, kar nakazuje vpliv stereokemije na vezavo v vezavno mesto za ATP DNA-giraze. Spojine od **25** do **28** so neaktivne, saj nobena niti pri višji koncentraciji signifikantno ne zavira delovanja encima. Izkazalo se je, da pirolamidni fragment tvori močnejše interakcije od etilsečninskega, saj je navkljub eni vodikovi vezi z Asp73 in strukturno ohranjeno molekulo vode manj sposoben tvorbe močnejših dodatnih hidrofobnih interakcij. Pomanjkanje kation- $\pi$  interakcij med nasičenim osrednjim skeletom in Glu50-Arg76 solnim mostom je bil najverjetneje glavni vzrok slabe zaviralne aktivnosti spojin **5**, **7–12** in **25–28**. Nenasičeni analogi z benzo[1,2-*d*]tiazolnim skeletom prav zaradi sposobnosti tvorbe teh interakcij izkazujejo mnogo boljšo zaviralno aktivnost. Protibakterijska testiranja so pokazala, da imajo sintetizirane spojine šibko protibakterijsko delovanje, kar je posledica slabe encimske aktivnosti v kombinaciji z dejstvom, da so nadaljnji testi dokazali, da sta vsaj spojini **6** in **23** substrata celičnih izlivnih črpalk.

Zaviralna aktivnost na rekombinantnem encimu in rezultati protibakterijskih testiranj naših spojin so dobra podlaga za prihodnost. Dajejo nam orientacijo za nadaljnji razvoj potencialnih zaviralcev, kljub temu pa tudi najboljša aktivnost še ne pomeni končnega uspeha v odkrivanju nove protibakterijske učinkovine. Vsaka spojina mora namreč na svoji

poti do encima premagati kar nekaj ovir. Imeti mora namreč dobre fizikalno-kemijske lastnosti za prehod bakterijske celične stene, izogniti se mora mehanizmu bakterijske obrambe (encimi, črpalke) in ne sme biti toksična človeškim celicam.

## 7 VIRI IN LITERATURA

1. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406: 775–81.
2. Davies J, Davies D: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol* 2010; 74: 417–33.
3. Champoux J J: *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 369–413.
4. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2033–47.
5. Ehmann D, Lahiri S: Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. *Curr Opin Pharmacol* 2014; 18: 76–83.
6. Gautam S, Doig P: Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7: 327–39.
7. Reece R, Maxwell A: DNA Gyrase: Structure and Function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26: 335–75.
8. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92: 479–97.
9. Boehm H J, Boehringer M, Bur D, Gmuender H, Huber W, Klaus W, Kostrewa D, Kuehne H, Luebbers T, Meunier-Keller N, Mueller F: Novel Inhibitors of DNA Gyrase: 3D Structure Based Biased Needle Screening, Hit Validation by Biophysical Methods, and 3D Guided Optimization. A Promising Alternative to Random Screening. *J Med Chem* 2000; 43: 2664–74.
10. Tomašič T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerase. *Curr Top Med Chem* 2014; 14: 130–51.
11. Bisacchi S G, Manchester I J: 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 Infect Dis* 2015; 1: 4–41.
12. Heide L: New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *Int J Med Microbiol* 2014; 304: 31–36.
13. Maxwell A, Lawson M D: The ATP-Binding Site of Type II Topoisomerases as a Target for Antibacterial Drugs. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 283–303.

14. Brino L, Urzhumtsev A, Mousli M, Bronner C, Mitschler A, Oudet P, Moras D: Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B Provides a Structural Mechanism for Activating the ATPase Catalytic Center. *J Biol Chem* 2000; 275: 9468–75.
15. Mayer C, Janin L Y: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chem Rev* 2014; 114: 2313–42.
16. Aldred J K, Kerns J R, Osheroff N: Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 2014; 53: 1565–74.
17. Jacoby G: Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 120–6.
18. Tomašič T, Katsamakos 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. *J Med Chem* 2015; 58: 5501–21.
19. Flatman H R, Eustaquio A, Li S M, Heide L, Maxwell A: Structure-Activity Relationships of Aminocoumarin-Type Gyrase and Topoisomerase IV Inhibitors Obtained by Combinatorial Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1136–42.
20. Goetschi E, Angehrn P, Gmuender H, Hebeisen P, Link H, Masciadri R, Nielsen J: Cyclothialidine and its congeners: A new class of DNA gyrase inhibitors. *Pharmac Ther* 1993; 60: 367–80.
21. Charifson S P, Grillot A L, Grossman H T, Parsons D J, Badia M, Bellon S, Deininger D D, Drumm E J, Gross H C, LeTiran A, Liao Y, Mani N, Nicolau P D, Perola E: Novel Dual-Targeting Benzimidazole Urea Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV Possessing Potent Antibacterial Activity: Intelligent Design and Evolution through the Judicious Use of Structure-Guided Design and Structure-Activity Relationships. *J Med Chem* 2008; 51: 5243–63.
22. East P S, Bantry-White C, Barker O, Barker S, Bennett J, Brown D, Boyd A E, Brennan C, Chowdhury C, Collins I, Convers-Reignier E, Dymock W B, Fletcher R, Haydon J D, Gardiner M, Hatcher S, Ingram P, Lancett P, Mortenson P: DNA gyrase (GyrB)/topoisomerase IV (ParE) inhibitors: Synthesis and antibacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 894–99.
23. Starr T J, Sciotti J R, Hanna L D, Huband D M, Mullins M L, Cai H, Gage W J, Lockard M, Rauckhorst R M, Owen M R, Lall S M, Tomilo M, Chen H, McCurdy P S, Barbachyn R M: 5-(2-Pyrimidinyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridines are antibacterial agents

- targeting the ATPase domains of DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5302–5306.
24. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmacevtska kemija III Vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
25. <https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>, dostopano dne 2. 2. 2017.
26. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/nmr/nmr1.htm>, dostopano dne 2. 2. 2017.
27. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_Boc2O\\_DMAP\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_DMAP_Mech.htm), dostopano dne 18. 2. 2017.
28. Tišler M: *Organska kemija*, 2. Izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1988: 239-243.
29. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/alcohol.html>, dostopano dne 18. 2. 2017.
30. [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling/Amine\\_to\\_Amide\\_Coupling\\_HOBt\\_EDC\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm), dostopano dne 9. 3. 2017.
31. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch20/ch20-3-3-1.html>, dostopano dne 12. 3. 2017.
32. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/amines.html>, dostopano dne 15. 3. 2017.
33. <http://chemistry2.csudh.edu/rpendarvis/aminrxn.html>, dostopano dne 15. 3. 2017.
34. Figueras F, Coq B: Hydrogenation and hydrogenolysis of nitro-, nitroso-, azo-, azoxy and other nitrogen-containing compounds on palladium. *J Mol Catal A Chem* 2001; 173: 223–230.
35. Klemenčič I: *Sinteza etilsečninskih derivatov 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina kot zaviralcev dna giraze*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.