

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AMADEJA ZGAGA

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA BENZOTIAZOLNIH ZAVIRALCEV HSP90 IN
DNA-GIRAZE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AMADEJA ZGAGA

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA BENZOTIAZOLNIH ZAVIRALCEV HSP90 IN
DNA-GIRAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF BENZOTHIAZOLE INHIBITORS OF HSP90 AND
DNA-GYRASE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

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

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. *In vitro* testiranja so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Center for Drug Research, Fakultete za farmacijo Univerze v Helsinki, Finska in na Rega Institut Leuven, Belgija.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za strokovno pomoč, nasvete in posvečen čas pri izdelavi te naloge.

Zahvaljujem se tudi mami in očetu, sestrama ter prijateljem za vso podporo ter spodbujanje med študijem in pripravi magistrske naloge.

Izjava

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

Amadeja Zgaga

Ljubljana, 2017

VSEBINA

1 UVOD.....	1
1.1 Okužbe – pereč zdravstveni problem	1
1.1.1 Odpornost bakterij in virusov na protimikrobne učinkovine	1
1.2 Virus gripe	3
1.2.1 Zdravljenje gripe.....	4
1.2.2 Življenjski cikel virusa influence A	4
1.2.3 Vpliv Hsp90 na virus influence	6
1.3 Hsp90 – protein toplotnega šoka	7
1.3.1 ATP-vezavno mesto	8
1.3.2 Regulacija Hsp90.....	8
1.3.3 Vpliv Hsp90 na virusno razmnoževanje.....	9
1.3.4 Potencialno zdravljenje z zaviralci Hsp90.....	9
1.4 ATP-vezavno mesto naddružine GHKL.....	10
1.5 TOPOIZOMERAZE TIPA II	11
1.5.1 Zvijanje relaksirane oblike DNA po mehanizmu dveh vrat	12
1.5.2 DNA-giraza in topoizomeraza IV kot tarči pri zdravljenju bakterijskih okužb .	13
2 NAČRT ZA DELO.....	16
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 Materiali	19
3.2 Poimenovanje in risanje spojin.....	19
3.3 Kromatografske metode	19
3.3.1 Tankoplastna kromatografija.....	19
3.3.2 »Flash« kolonska kromatografija	19
3.4 Spektroskopske metode	19

3.4.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	19
3.4.2 Masna spektrometrija (MS).....	20
3.4.3 Infrardeča spektroskopija (IR).....	20
3.5 Določevanje temperature tališča.....	20
3.6 Biokemijske metode	20
3.6.1 Testiranje encimske zaviralne aktivnosti na DNA-girazi in topoizomerazi IV..	20
3.6.2 Protibakterijska aktivnost	20
3.6.3 Protivirusno delovanje.....	21
3.7 Molekularno sidranje	21
4 EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1 Sinteza metil 2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilata.....	22
4.2 Sinteza 2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilne kisline	23
4.3 Sinteza metil (2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karbonil)glicinata.....	24
4.4 Sinteza (2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karbonil)glicina	25
4.5 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona	26
4.6 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona.....	27
4.7 Sinteza metil 2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-	28
karboksilata.....	28
4.8 Sinteza 2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilne kisline	29
4.9 Sinteza metil (2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karbonil)glicinata.....	30
4.10 Sinteza (2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-	31
karbonil)glicina.....	31

4.11 Sinteza 4,5-dikloro- <i>N</i> -(5-nitrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-	32
karboksamida.....	32
4.12 Sinteza <i>N</i> -(5-aminobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	32
4.13 Sinteza etil 2-((2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata	33
4.14 Sinteza 2-((2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline	34
4.15 Sinteza 5-nitrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-amina	35
4.16 Sinteza <i>N</i> -(5-aminobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	36
4.17 Sinteza <i>N</i> -(5-aminobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ...	37
4.18 Sinteza 2-metil-6-nitrobenzo[<i>d</i>]tiazola.....	38
4.19 Neuspešen poskus sinteze metil 2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilata	39
4.20 Neuspešen poskus sinteze 6-nitrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-karboksilne kisline.....	39
4.21 Neuspešen poskus sinteze benzo[<i>d</i>]tiazol-2,5-diamina	40
4.22 Neuspešen poskus sinteze benzo[<i>d</i>]tiazol-2,5-diamina	40
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	42
5.1 Komentar sinteznih reakcij	42
5.1.1 Tvorba amidne vezi na mestu 2 benzotiazolnega obroča	42
5.1.2 Alkalna hidroliza estrov.....	43
5.2.3 Tvorba amidnih vezi z uporabo sklopitvenih reagentov	43
5.1.4 Sinteza 4,5-dikloropirolamidnega dela spojin	44
5.1.5 Katalitsko hidrogeniranje – redukcija nitro skupine do amino skupine	46
5.1.6 Sinteza 5-substituiranega benzotiazolnega derivata	46
5.1.7 Nitiranje benzotiazolnega obroča.....	47
5.1.8 Komentar neuspešnih sintez	48
5.2 Rezultati biokemijskih testiranj	49

5.2.1 Zaviralna jakost končnih spojin na DNA-girazi in topoizomerazi IV	49
5.2.2 Protibakterijsko delovanje	53
5.2.3 Protivirusno delovanje	56
6 SKLEP	60
7 LITERATURA	62

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavni mehanizmi odpornosti pri bakterijah. Prirejeno po (7).	2
Slika 2: Življenjski cikel virusa gripe tipa A. Prirejeno po (10).....	5
Slika 3: Transport podenot vRNP v jedro preko Hsp90. Prirejeno po (14).	6
Slika 4: Konformacijske spremembe Hsp90 ob vezavi molekule ATP. Prirejeno po (16)...	8
Slika 5: Zaviralci Hsp90. Prirejeno po (22).....	10
Slika 6: Shema Bergeratovega zvitja pri proteinih iz naddružine GHKL ATP-az/kinaz. Prirejeno po (23).....	11
Slika 7: Mehanizem zvijanja relaksirane vijačnice DNA. Prirejeno po (24).	13
Slika 8: Ponovitev sinteze izhodiščne spojine. Reagenti in pogoji. (a) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-on, DMF, Na ₂ CO ₃ , 80 °C, 48 ur; (b) H ₂ , 10 % Pd/C, EtOH, sobna temperatura, 6 ur; (c) etil oksalil klorid, Et ₃ N, 1,4-dioksan, sobna temperatura, 12 ur; (d) 1 M NaOH, MeOH, sobna temperatura.	16
Slika 9: Načrt sprememb izhodiščne spojine do novih derivatov s ciljno vezavo v vezavnem mestu Hsp90 (modro obarvane aminokisline) oz. DNA-giraze (vijolično obarvane aminokisline).....	17
Slika 10: Sinteza osnovnega fragmenta končnih spojin. Reagenti in pogoji. (a) ClCOCCL ₃ , NEt ₃ , CHCl ₃ , sobna temperatura, 3 ure; (b) SO ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , sobna temperatura, 1,5 ure; (c) Na ₂ CO ₃ , DMF, 80 °C.	18
Slika 11: Končne spojine. Podobne derivate bomo pripravili še z 4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirolom.	18
Slika 12: Mehanizem N-aciliranja benzotiazolnega obroča na mestu 2. Prirejeno po (28). 42	
Slika 13: Mehanizem alkalne hidrolize. Prirejeno po (28).....	43
Slika 14: Mehanizem tvorbe amidne vezi preko sklopitvenih reagentov. Prirejeno po (28).	44
Slika 16: Mehanizem elektrofilne substitucije na pirolu. Prirejeno po (28).....	45
Slika 17: Mehanizem ciklizacije spojine 23. Prirejeno po (28).....	47
Slika 18: Mehanizem nitriranja aromatskega obroča. Prirejeno po (29).	47
Slika 19: Vezava spojine 4 v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije <i>E. coli</i> (vodikove vezi so predstavljene s prekinjeno črto).	52

POVZETEK

Zaradi mobilnosti in globalizacije sveta je nevarnost širjenja okužb vse večji javnozdravstveni problem, ki ga pogloblja še množičen pojav odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim učinkovinam. Tako sta iskanje novih tarč in razvoj novih protimikrobnih učinkovin nadvse pomembna. Človeški protein toplotnega šoka 90 (Hsp90) je šaperon, ki omogoča virulentnost različnih virusov, tudi virusov gripe, ki hitro mutirajo in ogrožajo veliko populacijo ljudi. Hsp90 pripomore k infektivnosti virusov gripe preko stabilizacije RNA-polimeraze in spodbujene sinteze molekule RNA. Zaradi strukturne podobnosti ATP-vezavnega mesta Hsp90 in bakterijske DNA-giraze ju uvrščamo v naddružino GHKL ATP-az/kinaz. Tudi terapevtska učinkovitost fluorokinolonov, zaviralcev DNA-giraze, se manjša zaradi razvoja odpornih bakterij, zato je veliko raziskav usmerjenih v razvoj zaviralcev, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto na DNA-girazi in imajo tako drugačen mehanizem delovanja.

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo ponovili sintezo končne spojine 2-((2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline in sintetizirali še deset novih končnih spojin, derivatov *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida. Z različnimi substituenti na mestu 6 smo poskušali okrepiti vezavo v ATP-vezavnem mestu z aminokislinskima ostankoma Arg76 in Arg136 pri DNA-girazi ter Asp102 in His54 pri Hsp90. Spojinam smo določili zaviralno aktivnost na rekombinantni DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* ter protibakterijsko in protivirusno delovanje na različnih bakterijskih oz. virusnih sevih. Večina spojin je izkazala zaviralno aktivnost zoper omenjenih encimov v nanomolarnih oz. nizkih mikromolarnih koncentracijah. Najboljše protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnih bakterijah sta imeli spojini **4** in **13** s prosto aromatsko karboksilno kislino na mestu 6 benzotiazolnega obroča. Protivirusno aktivne spojine so bili benzotiazolni derivati z estrsko skupino na mestu 6, ki so delovali proti virusom gripe tipa A (seva H1N11 in H3N2) in tipa B. Zaradi hkratne protibakterijske in protivirusne aktivnosti so sintetizirane spojine odlično izhodišče za optimizacijo zaviralcev DNA-giraze kot tudi spojin z delovanjem proti virusom gripe. Test vezave spojin na Hsp90 je v postopku.

Ključne besede: DNA-giraza, Hsp90, protibakterijsko delovanje, protivirusno delovanje

ABSTRACT

Infectious diseases have again become a public health problem due to worldwide globalisation and mobility, which causes widespread of multidrug-resistant microorganisms. Identification of new targets and development of new antimicrobial compounds is therefore incredibly important. Heat shock protein 90 (Hsp90) is a chaperone that enables virulence of many viruses, including fast-mutating influenza virus that annually infects a very large number of people. Hsp90 facilitates viral infectivity of the influenza virus by stabilization of RNA and promotion of RNA synthesis. Because of the structural similarity of the ATP binding sites of human Hsp90 and bacterial DNA gyrase, they belong to the same GHKL ATP-ase/kinase superfamily. DNA gyrase inhibitors fluoroquinolones are becoming less effective because of bacterial resistance. Therefore, research is focused on development of new potent inhibitors of DNA gyrase that act via different mechanism of action by binding to the ATP-binding pocket of the enzyme.

During the experimental work of this Master's thesis we resynthesized the 2-((2-(4,5-dichloro-1*H*-pyrrole-2-carboxamido)benzo[*d*]thiazol-6-yl)amino)-2-oxoacetic acid and in addition prepared ten new final compounds, which are derivatives of the *N*-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide. With different substituents at position 6 of the benzothiazole scaffold, we tried to improve the binding by additional interactions with amino acids Arg76 and Arg136 in the case of DNA gyrase and His54 in the case of Hsp90 ATP-binding sites. Newly synthesized compounds were tested for their inhibitory activities on recombinant DNA gyrase and topoisomerase IV from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and for their antibacterial and antiviral activity on different bacterial and viral strains. Most of the tested compounds were active in nanomolar or lower micromolar range. The most potent antibacterial activity against Gram-positive bacteria displayed compounds **4** and **13** with carboxylic acid at position 6. Compounds with ester group at position 6 were shown to possess antiviral activity against influenza virus A H1N1 and H3N2 strains and influenza virus B. The observed antibacterial and antiviral activities of the tested compounds represent an excellent basis for their further optimisation. Hsp90 assay is still on-going.

Key words: DNA gyrase, Hsp90, antibacterial activity, antiviral activity

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin-5'-difosfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
CC ₅₀	srednja citotoksična koncentracija
CPE	citopatski učinek
cRNA	komplementarna ribonukleinska kislina
CTD	C-končna domena
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO- <i>d</i> ₆	devterirani DMSO
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EA	etilacetat
EC ₅₀	srednja učinkovita koncentracija
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
GHKL	naddružina proteinov, ki vključuje DNA-girazo, Hsp90, histidin kinazo, MutL
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HA	hemaglutinin
HEX	heksan
HIV	humani imunodeficientni virus
HOBt	1-hidroksibenzotiazol
Hsp90	protein toplotnega šoka 90
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija, koncentracija zaviralca, ki za polovico zmanjša aktivnost encima
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K _d	disociacijska konstanta
MCC	minimalna citotoksična koncentracija
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIC	minimalna zaviralna koncentracija

M _w	molekulska masa
MS	masna spektrometrija
NA	nevraminidaza
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
NP	nukleoprotein
NTD	N-končna do _m ena
PA	polimerazni kisli protein
ParC	podenota A topoizomeraze IV
ParE	podenota B topoizomeraze IV
PB1	polimerazni bazični protein 1
PB2	polimerazni bazični protein 2
ppm	delcev na milijon
RA	rezidualna aktivnost
R _f	retencijski faktor
RNA	ribonukleinska kislina
SARS	virus akutnega sindroma oteženega dihanja
t	triplet
TLC	tankoplastna kromatografija
vRNA	virusna ribonukleinska kislina
vRNP	virusni ribonukleoproteinski kompleks

1 UVOD

1.1 Okužbe – pereč zdravstveni problem

Okužbe so en najpogostejših globalnih javnozdravstvenih problemov. Predstavljajo vzrok slabše kakovosti življenja, večje morbidnosti, umrljivosti in ekonomskega bremena zdravstvenega sistema (daljše hospitalizacije, višji stroški zdravljenja). Že v zgodovini so se širile epidemije in pandemije kolere, kuge, rumene mrzlice, tifusa, koz idr. Z odkritjem salvarzana, prve protimikrobne učinkovine, je Paul Ehrlich v začetku 20. stoletja pričel z novo dobo zdravljenja okužb. Sledilo je naključno odkritje penicilina leta 1929, sinteza sulfonamidov in uvedba cepiv, kar je zožilo nabor pretečih okužb in sprožilo optimizem v boju z do takrat neozdravljivimi okužbami. Oblikovali so se tudi eradikacijski programi Svetovne zdravstvene organizacije WHO zoper okužbam (1–3).

Kljub temu se je učinkovitost novo sintetiziranih učinkovin hitro prikazala za vprašljivo. Z razvojem protimikrobnih učinkovin je bil opazen tudi razvoj odpornosti nanje. Povečana poraba protimikrobnih učinkovin v terapiji in živilski industriji ter njihovo nekontrolirano spuščanje v okolje so ta pojav še spodbudile. Porast ogrožajočih okužb se je ponovno pričela v 40. letih in dosegla višek v 80. letih s pandemijo virusa HIV. Pojavile so se še druge okužbe, ki se še hitreje prenašajo zaradi mobilnosti in globalizacije današnjega sveta (epidemija ptičje gripe H5N1, pandemija gripe H1N1, sindrom akutnega oteženega dihanja SARS, virus ebole, virus Zika). Kot glavni vzrok smrti v modernem svetu se jim pridružujejo že prej pereče okužbe, kot so tuberkuloza, malarija, kandida, HIV in pljučnica (1–7).

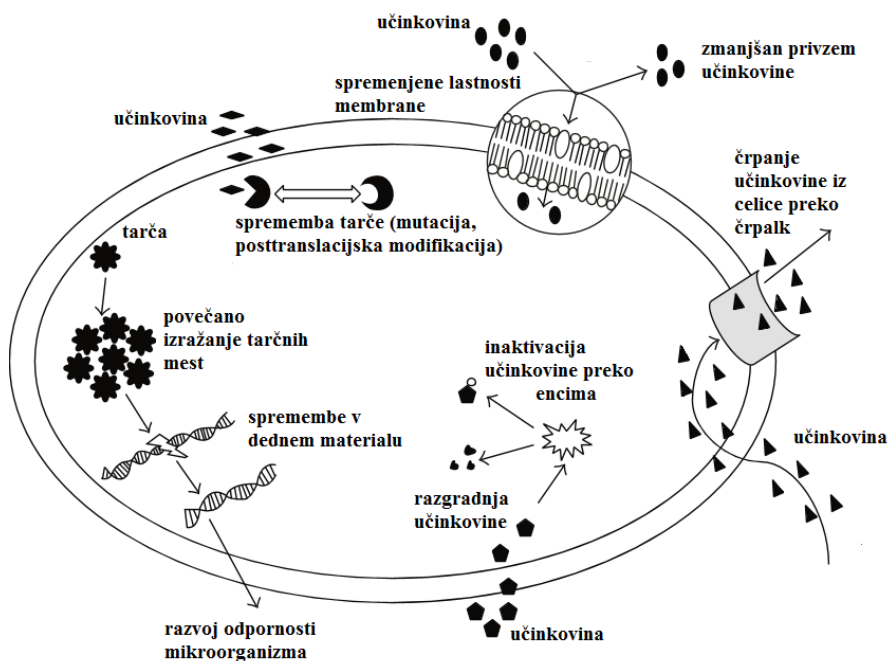
1.1.1 Odpornost bakterij in virusov na protimikrobne učinkovine

Odpornost mikroorganizmov je lahko lastnost vrste bakterije (intrinzična odpornost), ali pa je posledica sprememb njihovega dednega materiala zaradi evolucijskega pritiska, ki ga protimikrobne učinkovine še povečujejo (pridobljena odpornost). Vzrok zanje najdemo v spontanah mutacijah dednega materiala med celično delitvijo. Mutacije so skupne vsem živim bitjem, vendar pri mikroorganizmih potekajo hitreje zaradi velikih populacij, genske raznolikosti in kratkega generacijskega časa (3, 4).

Bakterije lahko prenašajo dedni material med seboj na hitrejši način, preko horizontalnega

prenosa genov, tudi večkrat v enem generacijskem času. Uporabijo namreč plazmide, krožni dedni material, ki preko pilusa preide v drugo bakterijo (proces konjugacije) in tako še poveča prilagodljivost bakterije na okolje (3, 4).

Odpornost bakterij proti učinkovinam v razvoju se pojavlja že v zgodnjih fazah testiranja učinkovin, kar vodi v počasnejši in omejen razvoj učinkovitih zdravil. Na sliki 1 so povzeti glavni mehanizmi odpornosti pri bakterijah. Razvijajo se modifikacije že znanih protimikrobnih in novih učinkovin, ki so usmerjene proti že poznanim mehanizmom odpornosti, vendar je poleg tega lahko prisotna tudi navzkrižna odpornost, pri kateri so sevi odporni tudi na strukturno podobne učinkovine. Zaviralci, ki ne izkoreninijo ciljanih mikroorganizmov v celoti, spodbujajo frekvenco odpornosti v populaciji patogena. V terapiji je tako vedno manj razpoložljivih protimikrobnih učinkovin, zato je nujno skrbno upravljanje z njimi in iskanje novih tarč ter razvoj in sinteza novih spojin, ki ne izkazujejo niti navzkrižne odpornosti (1–5).



Slika 1: Glavni mehanizmi odpornosti pri bakterijah. Prirejeno po (7).

Virusi kot intracelularni paraziti izkoriščajo gostiteljeve celične proteine in biokemijske poti za uspešno in hitro razmnoževanje nove velike populacije virusov. Njihov majhen genom omogoča sintezo strukturno kompleksnih in večfunkcionalnih proteinov. V krajšem času lahko proizvedejo povečano število proteinov, kar predstavlja večjo verjetnost pojava mutacij. Predvsem RNA virusi imajo visoko frekvenco zamenjave nukleotidov in slab

popravljalni mehanizem mutacij, kar poveča tako prilagodljivost virusov na evolucijski pritisk kot tudi na protivirusne učinkovine. Razvoj odpornosti proti učinkovinam, ki ciljajo virusne proteine, je ogromen, saj je tarča pod kontrolo virusa in so mutacije virusnega genoma hitro pojavljajo. Hkrati pa se odpornost proti protivirusnim učinkovinam, ki ciljajo celične proteine, odgovorne za razmnoževanje virusov, težje (a še vedno možno) razvije. Virus mora najti drugo celično pot ali pa opustiti funkcijo, ki jo prizadene učinkovina (6,8).

1.2 Virus gripe

Gripa ali influenza je ena najpogostejših bolezni pri človeku. Je visoko infektivna, saj povzroča sezonske okužbe, periodične epidemije in pandemije. Največja pandemija gripe, t. i. španska gripa je v obdobju 1918–1919 zahtevala več kot 40 milijonov smrtnih žrtev. Gripa je akutna bolezen, ki se širi kapljično in prizadene dihalo. Kaže se kot oslabelost, bolečine v mišicah, težave v dihalih in povišana telesna temperatura, lahko pa preide v pljučnico. Virusu gripe se pridružujejo tudi bakterijske okužbe, npr. s pnevmokoki, ki še bolj spodbudijo gostiteljev imunski odziv in spodbudijo patogenezo. (1) Med najbolj ogroženo populacijo spadajo otroci, starejši in ljudje s pridruženimi boleznimi dihal in srca (9–11).

Virusi gripe so negativno zviti enovijačni RNA virusi in spadajo v družino ortomiksovirusov. Sestavljeni so iz sedem ali osem segmentov RNA¹, ki omogočajo hitro in pogosto mutiranje virusa, kar se kaže v spremenjenih površinskih proteinih virusov gripe oz. kot antigeni odmiki (npr. antigeni odmiki hemagultinina in nevraminidaze). Viruse gripe delimo na tipe A, B in C na podlagi antigenih razlik v nukleoproteinih in proteinih matriksa. Posamezne podvrste virusa napadejo običajno le specifično vrsto gostitelja, saj so nanjo prilagojene. Najnevarnejši in najpogostejši vzrok epidemij je virus influence tipa A, pri katerem največkrat pride do antigenih odmkov in ki lahko okuži sesalce in ptiče. Pri okužbi z različnimi podtipi virusa influence tipa A hkrati lahko pride do prerazporeditve genomskih segmentov, kar privede do sestave novega dednega materiala ter posledično novih virulentnih virusov². Večje takšne spremembe imenujemo antigeni premiki in predstavljajo nevarnost pandemij (9, 10).

¹ Virus gripe tipa A in B imata osem segmentov RNA, medtem ko jih ima virus tipa C le sedem.

² Redko je pridružen virus influence tipa B.

Genom virusa influence A kodira proteine, kot so hemaglutinin (HA), nevraminidaza (NA), protein matriksa 1 (M1), protonski kanal M2, nukleoprotein (NP), nestrukturni protein 1 (NS1), jedrni eksportni protein (NEP ali NS2), polimerazni kisli protein (PA), polimerazna bazična proteina (PB1 in PB2) in protein PB1-F2. PB1, PB2 in PA tvorijo RNA polimerazo, HA in NA pa sta površinska glikoproteina z različnimi antigenskimi lastnostmi, kar omogoča delitev virusa influence A na podtipe. Trenutno lahko ločimo 16 podtipov virusa A glede na HA (H1–H16) in 9 podtipov glede na NA (N1–N9). Znotraj posameznega podtipa najdemo še različne seve. Zadnje sezonske epidemije gripe so bile posledice v večini podtipov H3N2 in H1N1 skupaj z virusom influence tipa B. Virusi influence tipa B niso tako virulentni kot virusi influence tipa A (redkejši antigenski odmiki) in prizadenejo le ljudi. Virus influence C je antigensko stabilen virus in izzove le blage oblike respiratornih bolezni (3,11).

1.2.1 Zdravljenje gripe

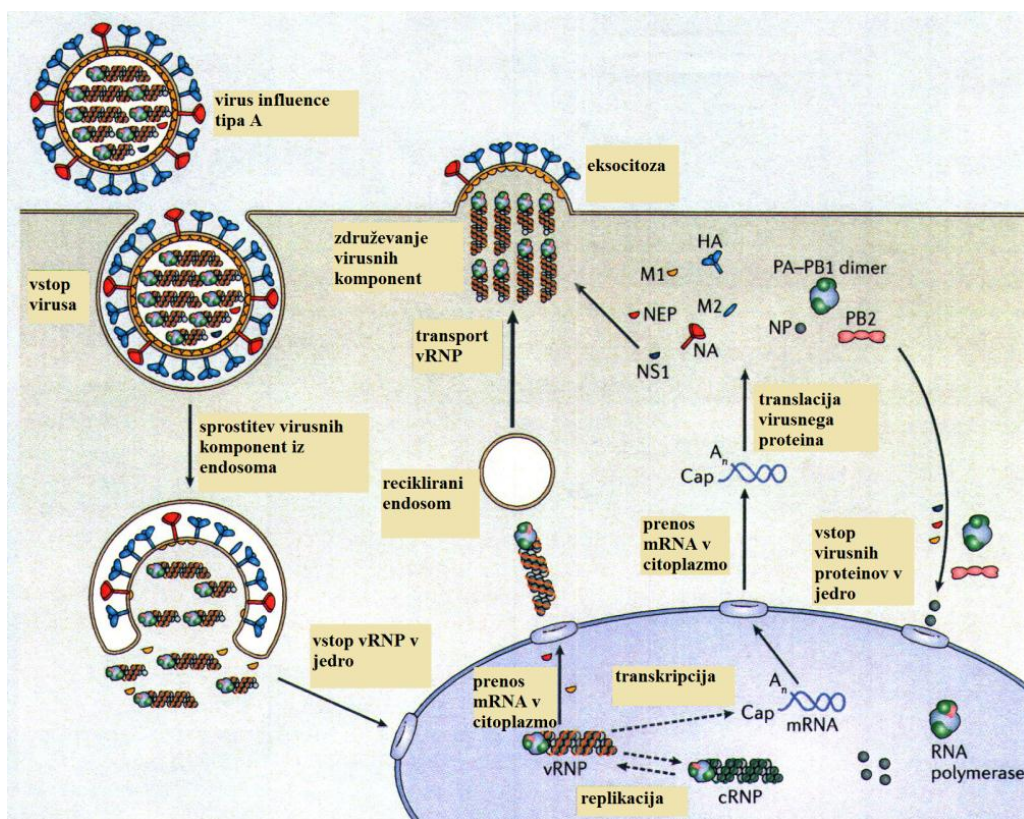
Potencialne tarče zdravljenja virusa gripe so virusni proteini. Primarna zaščita proti gripi so cepiva, ki pa niso rešitev za hitro širjenje pandemij gripe. Kljub letnim spremembam komponent cepiv so antigenske spremembe hemaglutinina pri pandemiji nenadne in težko napovedljive. V terapiji se uporablja tudi zaviralce nevraminidaze (zanamivir in oseltamivir) in protonskih kanalov M2 (amantadin in rimantadin). Zaradi visoke pojavnosti mutacij blizu aktivnih mest proteinov pri sezonski in pandemski influenci ter pojava neželenih učinkov³ je omejena uporaba omenjenih protivirusnih učinkovin. Poleg analogov že znanih učinkovin se raziskuje tudi druge proteine, predvsem nukleoprotein in RNA-polimerazo. Najučinkovitejša bi bila uporaba kombinacije protivirusnih učinkovin, ki ciljajo različne virusne proteine, kar bi preprečilo kompenzacijo funkcij virusnih proteinov ob mutacijah virusne RNA (vRNA) (11).

1.2.2 Življenjski cikel virusa influence A

Virusna infekcija se prične, ko se virion preko hemaglutinina veže na sialično kislino, ki predstavlja del receptorja na površini epitelijskih celic. To sproži endocitozo virusa. Virusna RNA (vRNA) se veže s 5' in 3' koncem na od RNA odvisno RNA-polimerazo in s preostalim delom na oligomerni nukleoprotein (NP) ter skupaj kot virusni nukleoproteinski kompleks (vRNP) potuje v jedro gostiteljeve celice. Virusna RNA-polimeraza poskrbi za razmnoževanje in transkripcijo vRNA. Virusna od RNA odvisna RNA-polimeraza podvoji

³ Zaviralci protonskega kanala M2 imajo vpliv na centralno živčevje.

negativno zvito vijačnico RNA v komplementarno, pozitivno zvito cRNA, ki tvori komplementarni nukleoproteinski kompleks (cRNP) in predstavlja matrico za nadaljnjo sintezo negativno zvite vRNA. Virusi gripe izkoriščajo gostiteljeve mehanizme za pridobivanje 5'-metilirane RNA, ki je po cepitvi z endonukleazno domeno PA⁴ v metilirane segmente RNA primeren začetnik za transkripcijo vRNA⁵. Proces transkripcije se konča s pripenjanjem poliadenilatnega repa na 3'-koncu novo nastale mRNA, ki je pripravljena na translacijo ter sintezo virusnih proteinov. Novonastale polimerazne podenote PB1, PB2 in PA ter nukleoprotein se premestijo nazaj v jedro, v katerem s segmenti vRNA in cRNA tvorijo nove nukleoproteinske komplekse, ti pa preko endosomov potujejo do celične membrane. Združeni virioni zapustijo celico s cepitvijo od membrane. Nov virion se s hemaglutininom veže na sialično kislino že okužene celice, nevraminidaza pa odcepi to sialično kislino in omogoči odcepitev od okužene celice ter mobilnost virusa po respiratornem traktu. Slika 2 ponazarja življenjski cikel virusa gripe tipa A (10).



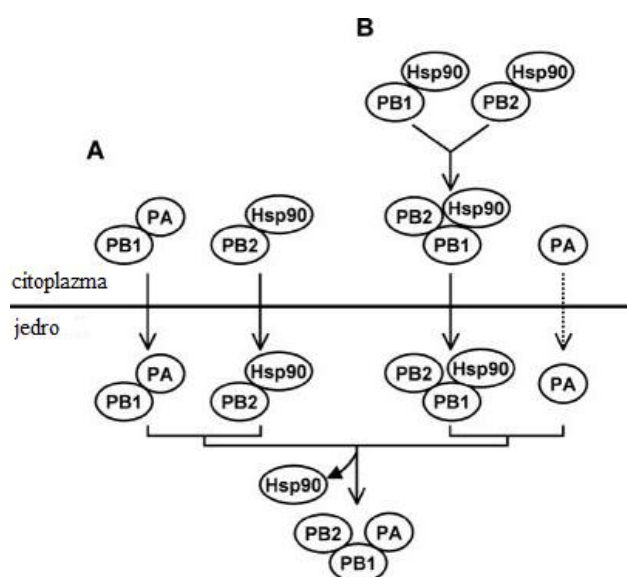
Slika 2: Življenjski cikel virusa gripe tipa A. Prirejeno po (10).

⁴ Za cepitev 5'-metilirane RNA na začetnike pri virusu influence tipa C je odgovorna podenota P3.

⁵ Virusna polimeraza ne more tvoriti začetnikov za transkripcijo vRNA.

1.2.3 Vpliv Hsp90 na virus influence

Na življenjski cikel virusa influence vplivajo poleg virusnih tudi gostiteljevi proteini. Eden izmed njih je šaperon protein toplotnega šoka 90 (Hsp90), ki z vezavo na novo sintetizirane podenote vRNA stabilizira njihov transport v jedro gostiteljeve celice in funkcionalno združevanje ter tako spodbudi sintezo vRNA. Proces prenosa podenot v jedro poteka na dva načina (Slika 3). Hsp90 se veže na PB2, medtem ko se PA in PB1 v citoplazmi združita v kompleks in posebej potujeta v jedro, kjer se združita s PB2 v trimerni kompleks s sledečo cepitvijo Hsp90. Drugi način je, da se v citoplazmi tvori kompleks PB1-PB2-Hsp90, ki se prenese v jedro. Najpogosteje se Hsp90 veže s PB2, medtem ko s PB1 tvori šibkejšo vez. Zadostna akumulacija PB1 v jedru je odvisna od vezave na PB2. V zgodnji fazi okužbe se PB1 in PB2 nahajata v jedru, medtem ko je PA v citoplazmi, s poslabšanjem okužbe se PA premesti v jedro⁶, kjer se združi v trimerni kompleks s PB1 in PB2, Hsp90 pa se odcepi proč. Tako je njegov vpliv znatnejši v začetnih fazah okužbe. Stabilna RNA-polimeraza je torej sestavljena iz PB1, na katero sta vezani PB2 in PA, ki pa nista medsebojno povezani. Kompleks PB1-PB2 spodbuja transkripcijo RNA, medtem ko PB1-PA omogoča replikacijo (14, 15).



Slika 3: Transport podenot vRNP v jedro preko Hsp90. Prirejeno po (14).

Hsp90 se veže preko N-končne hidrofobne in srednje kisle domene na podenote RNA-polimeraze. Srednja kislota domena s podobnimi značilnostmi kot nukleinske kisline

⁶ PA se premesti v jedro sama ali pa s pomočjo gostiteljevih transportnih proteinov, npr. RanBP5 (Ran binding protein 5).

preprečuje agregacijo in inaktivacijo bazičnih proteinov ter omogoča asociacijo oz. disociacijo teh proteinov na kisle nukleinske kisline oz. od njih (10, 12, 15).

1.3 Hsp90 – protein toplotnega šoka

Protein toplotnega šoka Hsp90 je celični molekularni šaperon, splošno razširjen pri evkariontih. Pri sesalcih poznamo štiri izoforme tega proteina: inducibilno izraženi Hsp90 α in konstitutivno izraženi Hsp90 β v citoplazmi, TRAP1 v mitohondriju in Grp94 homolog (gp96) v endoplazemskem retikulumu. Ta šaperon je ATP-aza, ki preko hidrolize molekule ATP dovaja energijo za svoje delovanje. Hsp90 je homodimerni kompleks, pri katerem ima vsak monomer značilno strukturo. Zgrajen je iz C-končne dimerizacijske domene, ki vsebuje tudi MEEVD zaporedje⁷, odločilno pri interakcijah s košaperoni, srednje kisle domene, ki omogoča specifično vezavo substratov oz. proteinov klientov, košaperonov in γ -fosfata molekule ATP, ter N-končne hidrofobne domene z vezavnim mestom za molekulo ATP. Drugo vezavno mesto za ATP je na C-končni domeni, ki pa alosterično prilagaja vezavo molekule ATP na N-končni domeni (8, 16–18).

Odgovorni so za ohranjanje homeostaze proteinov: za pravilno zvijanje, aktivacijo in združevanje različnih proteinov ter njihovih kompleksov pri normalnih in stresnih pogojih⁸. Tako stabilizira proteine oz. podenote kompleksov, s spremembo konformacije pa spodbudi zorenje proteinov ter posledično omogoča vezavo proteinov klientov na ligande, interakcijo s kofaktorji in ohranitev njihove biološke funkcije⁹. Hsp90 je tako vključen v mnoge celične funkcije: vpliva na proteine, udeležene v prenosu signalov, progresiji celičnega cikla¹⁰ in apoptozo celice. Vključen je tudi v sekretijske poti in se povezuje z različnimi proteinskimi kompleksi, ki so pomembni pri transmembranskem transportu. Hkrati je povezan z degradacijskim mehanizmom ubikvitin-proteasom, ki uničuje nepravilno zvite in nefunkcionalne proteine ter tako uravnava različne celične poti. Sodeluje pa tudi v prirojenem in pridobljenem imunskem odzivu (8, 14, 16, 17).

⁷ Pentapeptidno zaporedje MEEVD (Met-Glu-Glu-Val-Asp) je specifično vezavno mesto za tetratrikopeptidno (TRP) zaporedje različnih košaperonov.

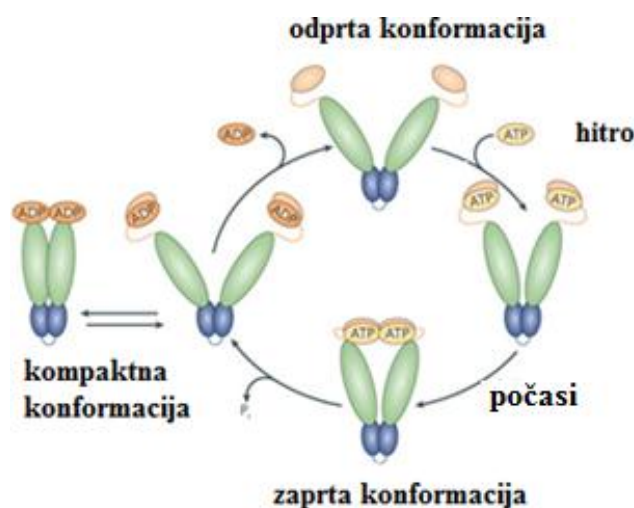
⁸ Pri normalnih pogojih Hsp90 zastopa 1–2 % celokupnih celičnih proteinov, medtem ko v stresnih pogojih, npr. povišana telesna temperatura, koncentracija Hsp90 naraste do 10-krat.

⁹ Odklonski proteini z manjšim številom sprememb v aminokislinskem zaporedju so bolj odvisni od Hsp90 kot nativni proteini.

¹⁰ Vključen je v procese transkripcije in translacije dednega materiala, mitohondrijske funkcije in proces ločitve kromosomov z delitvenim vretenom.

1.3.1 ATP-vezavno mesto

ATP-vezavno mesto Hsp90 se nahaja v globokem hidrofobnem žepu N-končne domene. Vezava ATP povzroči zaprtje t. i. ATP-pokrova in ujetje molekule ATP v vezavni žep, čemur sledi izpostavitve aminokislinskih ostankov, potrebnih za dimerizacijo N-končne domene. Vezava molekule ATP sproži počasno spremembo konformacije proteina v zaprto, napeto obliko, medtem ko se po hidrolizi molekule ATP konformacija spremeni v bolj kompaktno obliko Hsp90 (Slika 4). ADP disocira proč in Hsp90 se povrne v odprto konformacijo. Te konformacijske spremembe določajo hitrost ATP-aznega cikla, saj so počasnejše od same hidrolize ATP. Dinamičnost proteina je bistvena, da Hsp90 prepozna širši spekter proteinov klientov (16, 19, 20).



Slika 4: Konformacijske spremembe Hsp90 ob vezavi molekule ATP. Prirejeno po (16).

1.3.2 Regulacija Hsp90

Delovanje Hsp90 je regulirano preko drugih šaperonskih sistemov, proteinov klientov, okoljskih pogojev (npr. pH) in postranslacijskih modifikacij (fosforilacija, acetilacija Hsp90, pripenjanje nitro skupine). Več košaperonov uravnava ATP-azni cikel¹¹, vpliva na interakcijo z drugimi šaperonskimi sistemi¹² in posreduje specifične kliente. Med najbolj znanimi proteini klienti so transkripcijski dejavniki, receptorji za steroidne hormone in proteinske kinaze (8, 14, 16).

¹¹ ATP-azni cikel zavirajo košaperoni HOP, Cdc37, p23, medtem ko ga AHA1, Cpr6 spodbujajo.

¹² HOP oz. TRP vsebujoči košaperoni vplivajo na sodelovanje s Hsp70.

1.3.3 Vpliv Hsp90 na virusno razmnoževanje

Šaperoni uravnavajo tako pravilno zvijanje, združevanje in delovanje celičnih kot tudi virusnih proteinov. Hsp90 omogoča razmnoževanje DNA in RNA virusov. Obstaja več vzrokov za občutljivost virusov na zaviranje proteina Hsp90. Zaradi majhnega virusnega genoma nastajajo večfunkcionalni proteini s kompleksno strukturo,¹³ ki zahteva pravilno zvijanje za funkcionalnost proteina. Virusi proizvedejo veliko populacijo novih virusov v kratkem času in izkoristijo šaperone za ustrezno zvijanje virusnih proteinov. Predvsem RNA virusi izkazujejo tesno sodelovanje s šaperonskimi sistemi. Visoka verjetnost pojava mutacij med infekcijo jim omogoča prilagodljivost na zunanje vplive, hkrati pa za tvorbo funkcionalnih proteinov potrebujejo šaperone (8, 13).

Hsp90 vpliva na nestrukturne in strukturne proteine. Med najbolj množične predstavnike proteinov klientov, ki so nestrukturni proteini, spadajo polimeraze – od RNA odvisne RNA-polimeraze (npr. virus influence A), od DNA odvisne DNA-polimeraze (npr. virusi herpes) in reverzne transkriptaze (npr. virus hepatitisa B). Primer strukturnih proteinov so proteini virusne kapside, ki virusni genom ščitijo pred zunanjimi pogoji, hkrati pa so pripravljeni hitro sprostiti genom v gostiteljevo celico. Na zorenje kapsidnih proteinov ima Hsp90 vpliv tudi pri pikorna virusih (poliovirusi, rinovirusi, virusi kokseki), reovirusih in virusu vakcinija. Hsp90 vpliva tudi na zgodnjo fazo okužbe pri vstopanju virusov v celico (8).

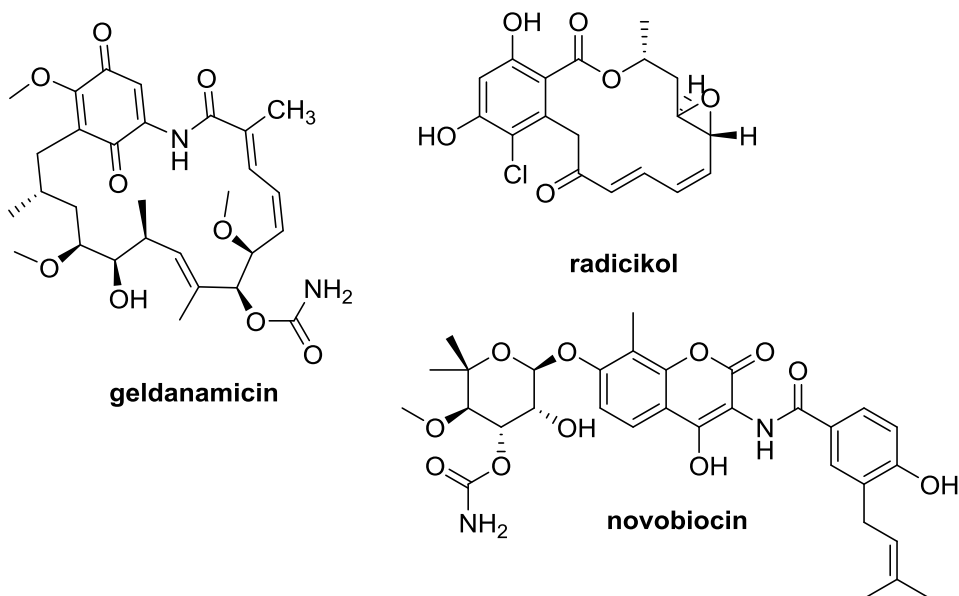
1.3.4 Potencialno zdravljenje z zaviralci Hsp90

Zaviralci Hsp90 z visoko specifičnostjo preprečijo vezavo molekule ATP na njeno vezavno mesto, kar onemogoči pravilno zvijanje proteinov, preusmeri proteine kliente v degradacijo z ubikvitin-proteasomskim sistemom in prekine signalno pot z drugimi šaperonskimi sistemi. Večina zaviralcev Hsp90 se veže na N-končno domeno blizu ATP-vezavnega mesta, kar slednjega prekrije in onemogoči vezavo molekule ATP. Na to vezavno mesto se kompetitivno vežeta tudi naravna produkta geldanamicin in radicikol (Slika 5), iz katerih so razvili derivate (npr. derivata geldanamicina 17-AAG, 17-DMAG) z boljšimi farmacevtskimi lastnostmi. Manj učinkovin se veže na C-končno domeno, npr. zaviralec DNA-giraze novobiocin (Slika 5), vendar je afiniteta njegove vezave šibka.

¹³ Primer kompleksne strukture virusne komponente je virusna kapsida, ki predstavlja infektivnost virusa navkljub termičnim in kemičnim pogojem.

Možna je tudi vezava na srednjo domeno (npr. sansalvamid A), kar alosterično zavira stabilizacijo proteinov klientov (17, 22).

Hsp90 vpliva tudi na prenos signalov in celično delitev proteinov, vključenih v tumorogenezo oz. onkogenov. V različnih stopnjah kliničnih študij se kaže selektivna občutljivost rakavih celic na zaviranje Hsp90 z novimi potencialnimi protitumornimi učinkovinami. Nobena spojina še ni prešla na trg zaradi slabše učinkovitosti in pojava neželenih učinkov. Razvijajo se tudi zaviralci Hsp90 kot nove protivirusne učinkovine zoper širšemu spektru virusov: pikornavirusom, virusom influence, paramiksovirusom, virusu hepatitisa C, virusu ebola, virusu La Cross, SARS, HIV, FHV, virusu vakcinija in virusom herpes (8). Replikacija virusov je občutljiva na zaviralce Hsp90 v območju koncentracij, ki ne vplivajo na funkcionalnost gostiteljeve celice, hkrati pa ni izkazan razvoj odpornosti proti takšnim zaviralcem, saj niso pod neposredno kontrolo virusov. Zaviralci Hsp90 predstavljajo tudi nove potencialne učinkovine za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (Alzheimerjeva, Huntingova in Parkinsonova bolezen) (8, 16, 18, 20).

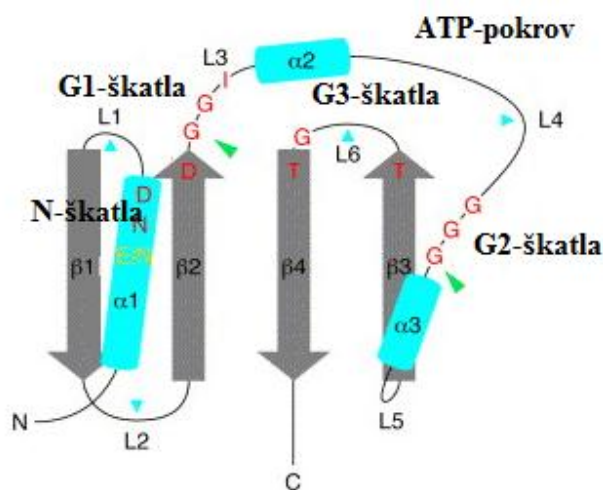


Slika 5: Zaviralci Hsp90. Prirejeno po (22).

1.4 ATP-vezavno mesto naddružine GHKL

Hsp90 uvrščamo v naddružino GHKL-ATP-az/kinaz skupaj z DNA-girazo, proteini skupine MutL, ki skrbijo za popravilo napak med podvajanjem DNA, in histidin kinazami, ki omogočajo delovanje transkripcijskih dejavnikov preko avtofosforilacije histidina. Kljub

različnim funkcijam v celicah in homologiji primarnih sekvenc, nižji od 15 %, je prisotna visoka topološka podobnost v ATP-vezavnem mestu omenjenih proteinov. Unikaten element teh ATP-vezavnih mest imenujemo Bergeratovo zvitje, ki ga sestavljajo tri α -vijačnice in štiri β -ravnine, povezane z zankami, na katerih se nahajajo aminokislinski ostanki, ki so ključni za vezavo ATP (Slika 6). Bergeratovo zvitje definirajo 4 motivi. Motiv 1 (N-škatla) leži na α -vijačnici in preko asparaginskega ostanka omogoči vezavo Mg^{2+} iona, ki interagira z vsemi fosfatnimi skupinami molekule ATP. Motiv 2 (G1-škatla) je odgovoren za vodikovo vez z adeninom molekule ATP, kar poveča specifičnost vezave Bergeratovega zvitja za ATP. Motiv 2 skupaj z motivom 3 (G2-škatla) omogoča prilagodljivost zanke L4 ATP-pokrova, ki se razlikuje v sestavi in konformaciji med različnimi proteini ter odloča o vkleščenosti ATP v vezavnem žepu. Zaradi podobnosti ATP-vezavnega mesta Hsp90 in DNA-giraze lahko uporabimo že poznane zaviralce DNA-giraze pri razvoju novih zaviralcev Hsp90 (24).



Slika 6: Shema Bergeratovega zvitja pri proteinih iz naddružine GHKL ATP-az/kinaz. Prirejeno po (23).

1.5 TOPOIZOMERAZE TIPA II

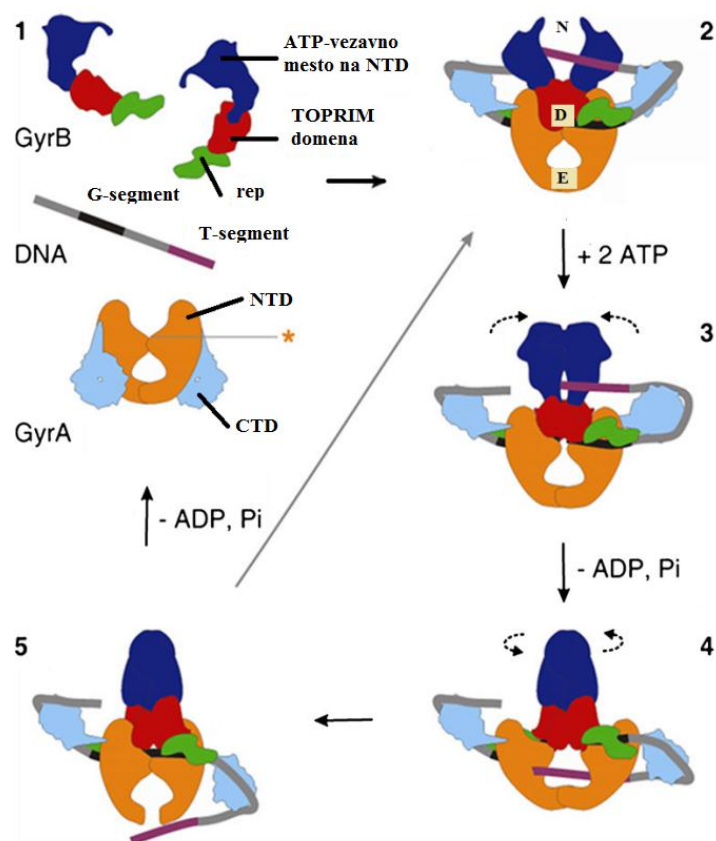
Bakterijske DNA-topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo topološke spremembe DNA. Pretvarjajo namreč dodatno zvito obliko DNA v sproščeno obliko s cepitvijo ene (topoizomeraza tipa I) ali obeh verig (topoizomeraze tipa II) dvojne vijačnice DNA. Med slednje spadata hetrotetramerna proteina DNA-giraza in topoizomeraza IV. DNA-giraza edina katalizira zvitje DNA v negativno dodatno zvito obliko, ki ima manjšo torzijsko

napetost pred podvajanjem. Topoizomeraza IV nadzoruje dodatno zvijanje DNA in je vključena v razpletanje hčerinskih verig po podvajanju dednega materiala. Njuno delovanje omogoča energija, pridobljena iz hidrolize ATP (24, 26).

Evkariontske topoizomeraze tipa II so encimi z eno večjo podenoto (so homodimerni), medtem ko so prokariontske sestavljene iz dveh podenot (heterotetramerni). DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB, medtem ko je topoizomeraza IV iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta analogni GyrA in GyrB. GyrA in ParC sta vključeni v cepitev dvojne vijačnice DNA, medtem ko na GyrB in ParE podenotah najdemo ATP-vezavno mesto (24, 26).

1.5.1 Zvijanje relaksirane oblike DNA po mehanizmu dveh vrat

Strukturo topoizomeraz tipa II lahko definiramo s tremi vrati: N-vrata, sestavljena iz dveh N-končnih domen (NTD) GyrB, DNA-vrata ob stičišču NTD GyrA in domene TOPRIM GyrB in C-vrata, zgrajena iz dveh NTD, GyrA (Slika 7). Spremembe konformacije so tako kot pri Hsp90 prisotne tudi pri topoizomerazah tipa II in omogočajo cepitev DNA. DNA se s T-segmentom (sekundarni ali transportni segment) ovije okoli C-končne domene, kar vodi do zožanja N-vrat. Zbližanje in dimerizacija dveh podenot GyrB vodi do nastanka ATP-vezavnega mesta. Po vezavi molekule ATP se N-vrata popolnoma zaprejo. T-segment je tako ujet v položaj nad G-segmentom iste DNA. Encim ga razcepi in tvori z njim kovaletno vez preko fosforiliranega tirozinskega ostanka pri DNA-vratih. Hidroliza molekule ATP in nastali ADP omogočata odprtje N-vrat (rotacija GyrB in razširitev GyrA) in transport T-segmenta preko razcepljenega G-segmenta in C-vrat. Encim je tako pripravljen za naslednji cikel zvijanja. Topoizomeraze tipa II omogočajo zvitje dveh negativno dodatno zvityh verig v DNA s pomočjo hidrolize dveh molekul ATP. Hidroliza molekule ATP določa hitrost celotnega procesa zvijanja DNA. Sprostitev negativne dodatno zvite DNA poteka brez ATP. Topoizomeraze hidrolizirajo ATP tudi v odsotnosti DNA (24).



Slika 7: Mehanizem zvijanja relaksirane vijačnice DNA. Prirejeno po (24).

Odpiranje vrat je strogo nadzorovano – vsaka vrata se lahko odprejo, le ko so preostala zaprta (flip-flop mehanizem odpiranja vrat)¹⁴. Zožena N-vrata tvorijo napeto konformacijo; zaprejo se z vezavo ATP, hkrati pa se ob vezani DNA odprejo DNA-vrata. Zaprtje DNA-vrat omogoča sprostitev T-segmenta skozi odprta C-vrata (24, 27).

1.5.2 DNA-giraza in topoizomeraza IV kot tarči pri zdravljenju bakterijskih okužb

Zaradi podobnosti aktivnih mest DNA-giraze in topoizomeraze IV lahko z zaviralci ciljamo oba encima, kar zmanjša verjetnost pojava razvoja odpornosti na učinkovino¹⁵. Podobnost teh dveh encimov med različnimi bakterijami zagotavlja širokospektralnost njihovih zaviralcev. Razlike med evkariontskimi in prokariontskimi topoizomerazami tipa II omogočajo selektivno delovanje njihovih zaviralcev. Zaradi kompleksnosti kataliziranih reakcij med podvajanjem DNA je na voljo več tarčnih mest protibakterijskih učinkovin. To uveljavlja zaviralce topoizomeraz II kot pomembnejše protibakterijske učinkovine (24, 25).

¹⁴ »Double-lock« je uravnan preko C-končne domene podenote GyrA.

¹⁵ Verjetnost pojava mutacij dveh različnih genov za pojav odpornosti pri bakteriji je nizka.

V terapiji so prisotni fluorokinoloni, zaviralci GyrA in/ali ParC, ki stabilizirajo kompleks DNA–DNA-giraza¹⁶, kar vodi do napačnega podvajanja DNA, sinteze napačnih proteinov, pričetka oksidativnega stresa in apoptoze celice. Na voljo imamo štiri generacije fluorokinolonov. So širokospektralni bakteriostatiki in bakteriocidi. DNA-giraza je tarča pri po Gramu negativnih bakterijah, medtem ko je topoizomeraza IV tarča pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Bakterije so že razvile odpornost proti fluorokinolonom zaradi točkovnih mutacij na QRDR-regiji (regija, ki določa odpornost proti fluorokinolonom) na GyrA in/ali ParC, kar zmanjšuje njihovo klinično uporabnost. Zato je razvoj novih spojin usmerjen tudi na druga tarčna mesta v teh dveh encimih (24, 25).

Topoizomeraze tipa II lahko zaviramo tudi na podenotah GyrB in/ali ParE. Aminokumarini so kompetitivni zaviralci, ki se vežejo na ATP-vezavno mesto na podenotah GyrB in ParE. Z vezavo v svoje vezavno mesto prekrijejo ATP-vezavno mesto in tako zavirajo aktivnost encima. Najbolj znana zaviralca sta naravna produkta *Streptomyces*, novobiocin in klorobiocin. Čeprav se močno vežeta na DNA-girazo in imata dobre farmakokinetične lastnosti, nista dosegla klinične učinkovitosti zaradi toksičnosti in razvijajoče odpornosti nanje, sta pa osnovi za nadaljnji razvoj novih zaviralcev GyrB in ParE. Pri razvoju novih učinkovin je potrebno upoštevati, da je ATP-vezavno mesto GyrB podobno ATP-vezavnemu mestu človeške piruvat dehidrogenaze-kinaze in človeške topoizomeraze tipa II. Potencialni zaviralci ATP-vezavnega mesta tvorijo dve vodikovi vezi s karboksilno skupino Asp73, ena izmed njiju je vzpostavljena preko ujete molekule vode. Zaviralci potrebujejo donor vodikove vezi, ki interagira s karboksilno skupino Asp73 in akceptor vodikove vezi za posredno tvorbo vodikove vezi z Asp73 preko omenjene molekule vode. Pri vezavi zaviralcev sodeluje tudi Arg136, ki pa ni prisoten pri vezavi molekule ATP, zato je interakcija zaviralcev s to aminokislino način za doseganje selektivnosti proti podobnim človeškim proteinom. Pomemben je tudi vidik fizikalno-kemijskih lastnosti spojin za zadostno permeabilnost in izogibanje ostalih preprek (npr. izlivne črpalke) za doseganje tarčnih proteinov in ustrezen širši spekter protibakterijskega delovanja¹⁷. (24, 25, 26)

¹⁶ Kinoloni stabilizirajo razcepljeno DNA, ki je kovalentno vezana na tirozinski preostanek na aktivnem mestu GyrA.

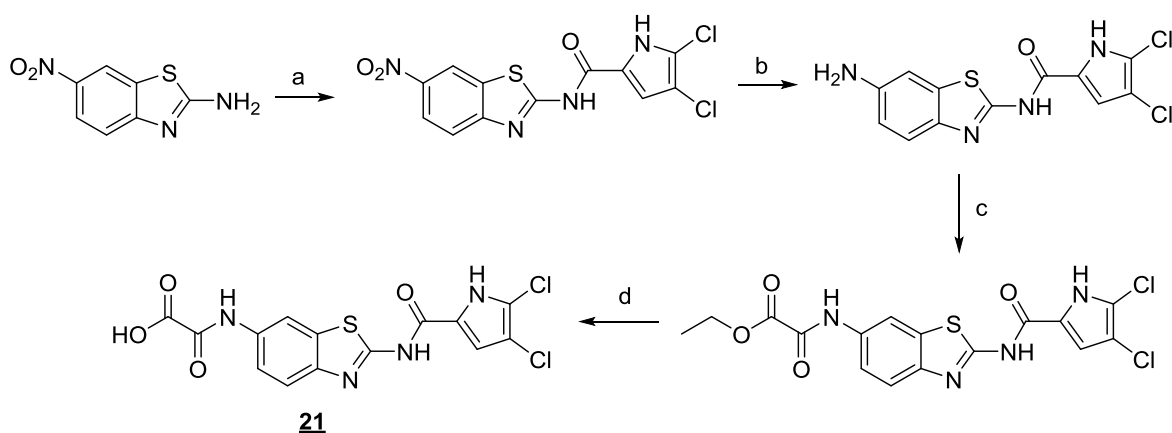
¹⁷ Pri zaviralcih po Gramu negativnih bakterij so učinkovitejše polarnejše spojine z nižjo lipofilnostjo, povečano površino in molekulsko maso, nižjo od 600 kDa. Zaviralci po Gramu pozitivnih bakterij nasprotno posedujejo večje molekulske mase.

Raziskujejo se tudi t. i. hibridne protibakterijske učinkovine, ki poleg DNA-giraze oz. topoizomerase IV ciljajo tudi na DNA- oz. RNA-polimerazo. Svojo učinkovitost kažejo proti že odpornim sevom po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij.

2 NAČRT ZA DELO

V sklopu eksperimentalnega dela bomo načrtovali in sintetizirali nove potencialne ATP kompetitivne zaviralce Hsp90 in DNA-giraze z benzotiazolnim skeletom kot potencialne protibakterijske in protivirusne učinkovine. Vezavno mesto za molekulo ATP proteina Hsp90 je strukturno in arhitekturno podobno ATP-vezavnemu mestu bakterijske DNA-giraze in topoizomerase IV, zato jih uvrščamo v naddružino GHKL ATP-az/kinaz.

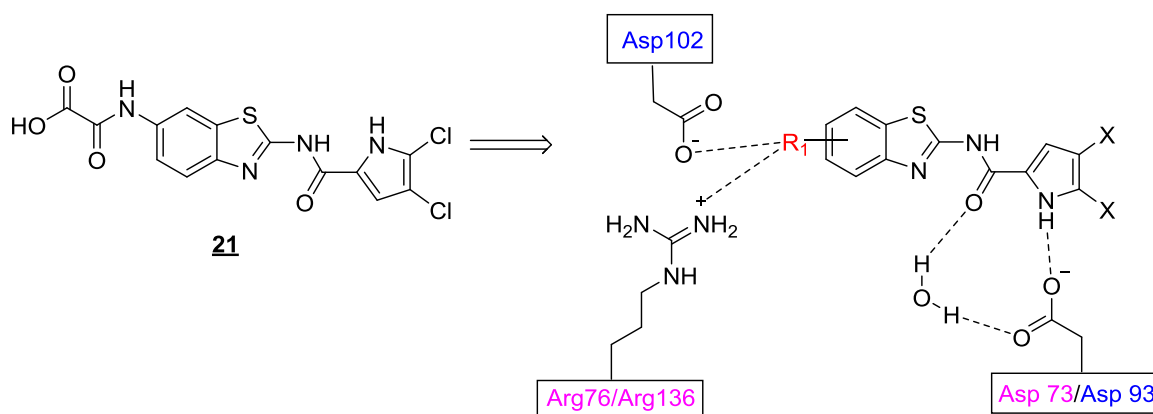
Izhajali bomo iz spojine 2-((2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline (**21**) (Slika 8), nedavno odkrite in sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo, ki se učinkovito veže v ATP-vezavno mesto DNA-giraze. Hkrati ta spojina izkazuje protivirusno delovanje na celičnih modelih virusa influence, najverjetneje preko zaviranja Hsp90 (EC_{50} (virus influence A) = 1,8 μ M, K_d (Hsp90 β) = 0,26 μ M).



Slika 8: Ponovitev sinteze izhodiščne spojine. Reagenti in pogoji. (a) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on, DMF, Na₂CO₃, 80 °C, 48 ur; (b) H₂, 10 % Pd/C, EtOH, sobna temperatura, 6 ur; (c) etil oksalil klorid, Et₃N, 1,4-dioksan, sobna temperatura, 12 ur; (d) 1 M NaOH, MeOH, sobna temperatura.

Nove derivate te spojine bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur Hsp90 v kompleksu z zaviralci, predvideno vezavo načrtovanih spojin pa bomo preučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP-vezavno mesto omenjenih proteinov.

Glede na predvideno vezavo spojine **21** v vezavnem mestu za ATP Hsp90 in DNA-giraze bomo načrtovali nove potencialne zaviralce Hsp90 in DNA-giraze. Pirolamidni del načrtovanih spojin tvori z aktivnim mestom dve vodikovi vezi s stransko verigo asparaginske kisline (pri DNA-girazi v *E. coli* z Asp73 oz. pri Hsp90 z Asp93). Planaren benzotiazolni obroč tvori kation- π interakcije z argininskim (pri DNA-girazi v *E. coli* z Arg76 preko solnega mostu Glu50-Arg76) oz. histidinskim aminokislinskim ostankom (pri Hsp90 preko His54). Preostali del spojin z načrtovanimi substituenti na mestu 6 benzotiazolnega obroča lahko utrdi vezavo v ATP-vezavno mesto preko dodatnih interakcij z aminokislinskima ostankoma Arg76 in/ali Arg136 pri DNA-girazi oz. Asp102 in His54 pri Hsp90. Predvidena tvorba vodikovih vezi je prikazana na sliki 9.



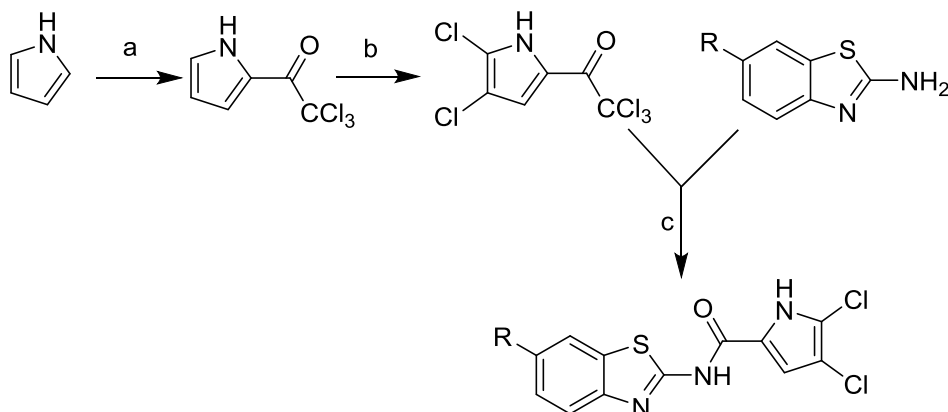
$R_1 = -\text{COOCH}_3, -\text{COOH}, -\text{CONHCH}_2\text{COCH}_3, -\text{CONHCH}_2\text{COOH}, -\text{NH}_2$

$X = \text{Cl}, \text{Br}$

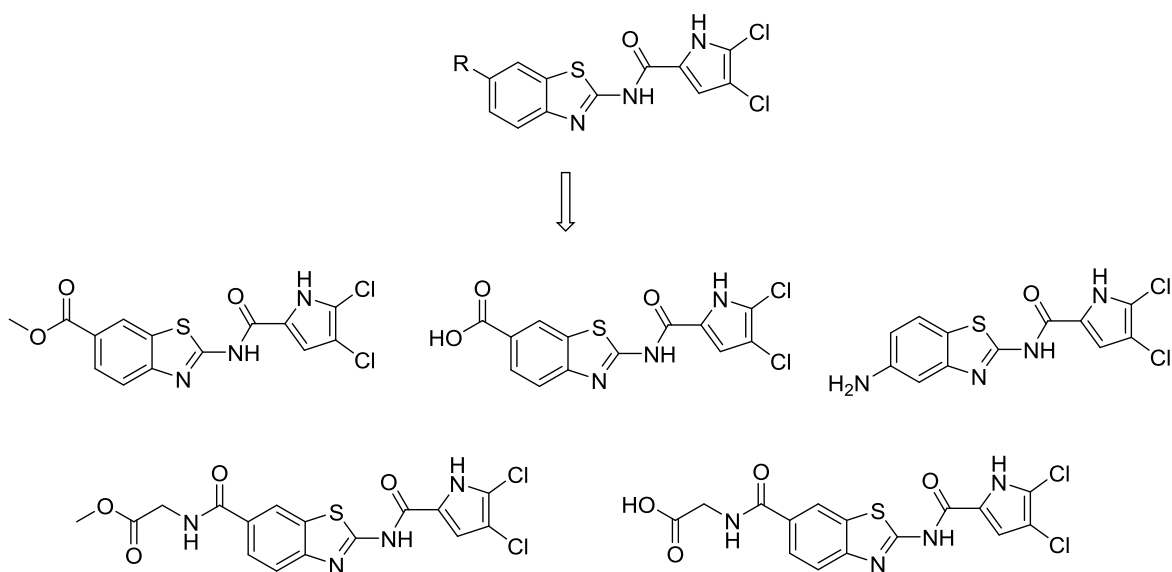
Slika 9: Načrt sprememb izhodiščne spojine do novih derivatov s ciljno vezavo v vezavnem mestu Hsp90 (modro obarvane aminokisline) oz. DNA-giraze (vijolično obarvane aminokisline).

Sintetizirali bomo derivate (4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazola in (4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazola. To bomo dosegli s tvorbo amidne vezi med amino skupino na mestu 2 benzotiazolnega derivata in halogeniranim derivatom 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona (Slika 10). Na mestu 6 pa bomo ugotavljali vpliv različnih funkcionalnih skupin in dolžine verige na vezavo v ATP-vezavno mesto Hsp90 in DNA-giraze (Slika 11). Preizkušali bomo tudi vpliv substituentov na mestu 5. Cilj uvažanja različnih substituentov je doseči dodatne interakcije v vezavnem mestu za ATP Hsp90 in DNA-giraze in dodatno raziskati povezavo med strukturo in delovanjem (SAR).

Sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na Hsp90 in DNA-girazi ter protibakterijsko in protivirusno delovanje.



Slika 10: Sinteza osnovnega fragmenta končnih spojin. Reagenti in pogoji. (a) ClCOCCL₃, NEt₃, CHCl₃, sobna temperatura, 3 ure; (b) SO₂Cl₂, CHCl₃, sobna temperatura, 1,5 ure; (c) Na₂CO₃, DMF, 80 °C.



Slika 11: Končne spojine. Podobne derivate bomo pripravili še z 4,5-dibromo-1H-pirolom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Za izvedbo praktičnega dela magistrske naloge smo uporabljali topila in reagente proizvajalcev Across Organics, Apollo Scientific, Fluka, Merck, Sigma-Aldrich in TCI.

3.2 Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi, risanje strukturnih formul spojin in sinteznih shem smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 15.1 programskega paketa CambridgeSoft.

3.3 Kromatografske metode

3.3.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastno kromatografijo smo uporabili pri sledenju poteka reakcij in uspešnosti izolacij produktov ter izbiranju mobilne faze pri »flash« kolonski kromatografiji. Za stacionarno fazo smo vzeli plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljene mobilne faze so bile zmesi diklorometana (DKM) in metanola (MeOH) z dodatkom očetne kisline ali etilacetata (EA) in heksana (HEX) v različnih razmerjih. Pri detekciji spojin na silikagelskih ploščah smo si pomagali z UV-svetilko z valovnimi dolžinama 254 nm in 366 nm ter orositvenim reagentom ninhidrin.

3.3.2 »Flash« kolonska kromatografija

Za čiščenje produktov smo uporabili t. i. »flash« kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm, pri mobilnih fazah pa smo uporabljali zmesi DKM in MeOH ali EA in HEX v različnih razmerjih. Velikost kolon se je razlikovala glede na maso vzorca, ki smo ga hoteli očistiti. Hitrejši pretok mobilne faze smo omogočili z zračnim nadtlakom.

3.4 Spektroskopske metode

3.4.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Za identifikacijo spojin nam je predvsem služila metoda jedrske magnetne resonance. ^1H NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topila smo uporabili predvsem DMSO- d_6 ali CDCl_3 ,

za interni standard pa tetrametilsilan (TMS). Za procesiranje spektrov smo uporabili program MestRe-C proizvajalca Mastrelab Research.

3.4.2 Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q z ESI tehniko ionizacije v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Za hitro ugotavljanje bruto formul produktov iz TLC-plošč smo uporabili masni spektrometer Expression[®] CMS Advion na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.4.3 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR-spektre smo posneli z ATR-tehniko na spektrometru Nicolet Nexus 470 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.5 Določevanje temperature tališča

Temperature tališč spojin smo določevali na Kofflerjem talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.6 Biokemijske metode

3.6.1 Testiranje encimske zaviralne aktivnosti na DNA-girazi in topoizomerazi IV

Test encimske zaviralne aktivnosti na DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* je izvedla doktorandka Michaela Barančoková na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. Pridobljeni rezultati so podani v obliki rezidualne aktivnosti encima (RA) oz. vrednosti srednje zaviralne koncentracije (IC₅₀).

3.6.2 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko aktivnost končnih spojin so preverjali na Center for Drug Research, Fakultete za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem v raziskovalni skupini prof. dr. Päivi Tammela. Preverjali so zaviranje rasti treh po Gramu pozitivnih (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*) in petih po Gramu negativnih sevov (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*) pri različnih koncentracijah. Za pozitivno kontrolo testiranja so uporabili ciprofloksacin. Z negativno kontrolo so preverili rast preučevanih bakterij ob dodanem DMSO brez zaviralca DNA-giraze. S slepo raztopino, raztopino zaviralca DNA-giraze brez testiranih bakterij, so uporabili za določitev ozadja. Rezultati so podani kot odstotek zaviranja rasti pri koncentraciji 50 µM 24 ur po izpostavitvi bakterije

testirani spojini in kot minimalna zaviralna koncentracija (MIC) pri najaktivnejših spojinah.

3.6.3 Protivirusno delovanje

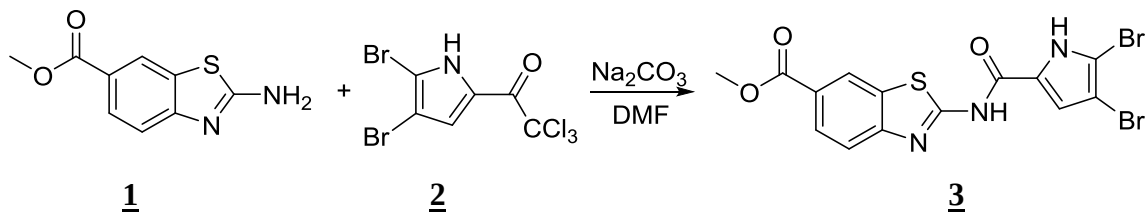
Testiranje za protivirusno aktivnost spojin je izvedla prof. dr. Sara Liekens na Rega Institut Leuven v Belgiji. Testiranje je potekalo na celičnih linijah HEL, HeLa, VERO in MDCK inkubiranih pri 35 °C. Celice so bile okužene s slednjimi virusi: virusi herpes (virus herpes simplex-1, virus herpes simplex-2, virus vakcinija, adenovirus, humani koronavirus), vezikularni stomatitis virus, kokseki virus B4, virus SARS, virus parainfluenca-3, reovirus, virus sindbis, virus Punta Toro, virus rumene mrzlice, virusi influenza A (H1N1, H3N2) in B. Sintetizirane spojine so raztopili v DMSO in jih skupaj z virusi dodali celičnim linijam. Pod mikroskopom so spremljali citopatski učinek (CPE) virusov na celice. Opazovali so morfološke spremembe celic, kot so nabrekanje celic in združevanje v skupke, fuzija celic do večje, mnogojedrne oblike t. i. sincicija, pojav večjih oz. številčnejših vakuol (vakuolizacija) in inkluzijskih telesc v jedru ter citoplazmi in apoptozo celic. Tvorbo sincicijev, vakuolizacijo in inkluzijska telesa so natančneje spremljali s pomočjo barvanja po Giemsi pod elektronskim mikroskopom. Protivirusna aktivnost spojin je izražena kot koncentracija spojine, pri kateri je CPE 50 %. (EC_{50}). EC_{50} so določili tudi preko kolorimetričnega MTS-testa celične metabolične aktivnosti. Dodano tetrazolno barvilo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) ob neokrnjeni funkciji celičnih dehidrogenaz reducira do vijoličasto obarvanega formazana. Preko upada absorbance formazana pri $\lambda = 570$ nm zaradi citopatskih učinkov virusa so izračunali EC_{50} . Kot pozitivno kontrolo so uporabili ribavirin in pri virusih influenza še oseltamivir karboksilat, amantadin in rimantadin. Negativno kontrolo je predstavljal DMSO z dodanim virusom brez potencialne protivirusne učinkovine. Spojinam so preverili tudi citotoksičnost na teh celičnih linijah, ki je podana kot srednja citotoksična koncentracija (CC_{50}) oz. minimalna citotoksična koncentracija (MCC). S tem so se izognili lažno pozitivnim rezultatom (30).

3.7 Molekulsko sidranje

Vezavo končnih spojin v ATP-vezavno mesto DNA-giraze bakterije *E. coli* smo preučevali s programom molekulskega sidranja FRED (OpenEye Software Inc). Molekulsko sidranje je izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

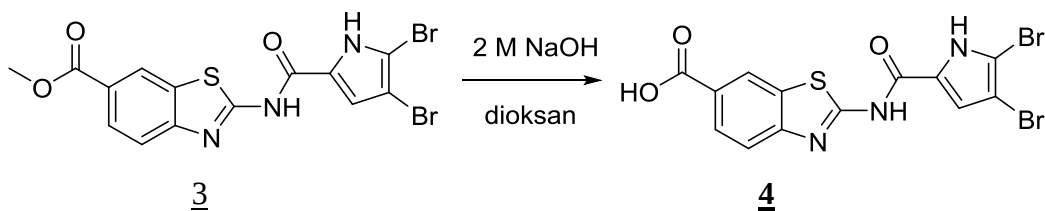
4.1 Sinteza metil 2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-karboksilata



V bučki smo raztopili spojino **2** (391 mg, 1,06 mmol, 1,1 ekv.) v 5 mL DMF, dodali spojino **1** (200 mg, 0,960 mmol, 1 ekv.) in Na₂CO₃ (126 mg, 0,960 mmol, 1 ekv.) ter segrevali na oljni kopeli pri 80 °C. Po 72 urah mešanja smo reakcijski zmesi dodali 30 mL EA in spirali z 10 % citronsko kislino (2 × 20 mL). Nastala je rjava oborina v organski fazi, ki smo jo po ločitvi faz odfiltrirali s presesavanjem in sušili do konstantne mase – 294 mg (60 °C, 24 ur).

metil 2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karboksilat (<u>3</u>)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₉ Br ₂ N ₃ O ₃ S	M _w : 459,11 g/mol
Izgled: sivo-rjava oborina	Izkoristek: 67,0 %
T _{tal} : / (pri 228 °C razpad)	R _f : 0,65 (DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,89 (s, 3H, -COOCH ₃), 7,55 (s, 1H, pirol-CH), 7,84 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 8,04 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, Ar-H-5), 8,68 (d, 1H, <i>J</i> = 1,7 Hz, Ar-H-7), 12,84 (s, 1H, -NH-), 13,30 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3401, 3238, 2952, 1705, 1767, 1608, 1523, 1431, 1393, 1288, 1249, 1227, 1177, 1127, 970, 918, 900, 828, 764, 742, 707, 648, 616, 552, 527
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 455,8663; izračunana masa: 455,8653

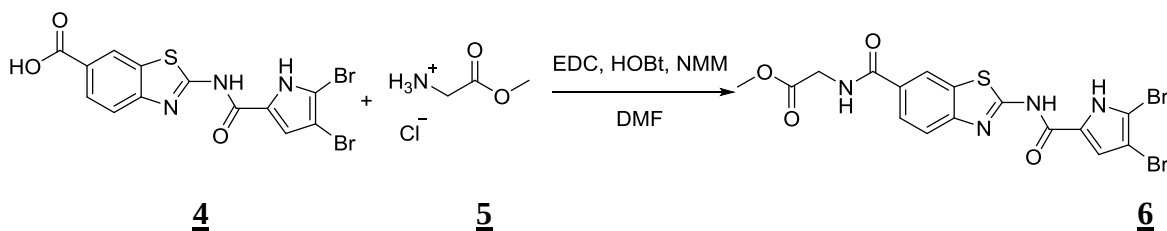
4.2 Sinteza 2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilne kisline



Spojino **3** (240 mg, 0,525 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL dioksana in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (788 μ L, 1,58 mmol, 3 ekv.). Po 2 urah mešanja smo reakcijsko zmes skoncentrirali pod znižanim tlakom, dodali 5 mL vode in nakisali reakcijsko zmes z 1 M vodno raztopino HCl do pH = 1. Oborino smo prefiltrirali s presesavanjem in jo posušili (60 °C, 24 ur). NMR in masni spekter sta potrdila, da reakcija ni popolnoma potekla. Zato smo oborino (192 mg, 0,431 mmol, 1 ekv.) ponovno raztopili v 10 mL dioksana in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (1 mL, 2,10 mmol, 5 ekv.) ter segrevali na oljni kopeli pri 80 °C. Po 24 urah smo uparili dioksan pod znižanim tlakom, dodali 5 mL vode in ponovno nakisali reakcijsko zmes do pH = 1. Oborino smo prefiltrirali s presesavanjem in sušili (60 °C, 24 ur). Dobili smo 207 mg produkta.

2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilna kislina (4)	
Molekulska formula: C ₁₃ H ₇ Br ₂ N ₃ O ₃ S	M _w : 445,09 g/mol
Izgled: rjava oborina	Izkoristek: 89,2 %
T _{tal} : > 300 °C	R _f : 0,84 (DKM : MeOH + CH ₃ COOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 7,40 (s, 1H, pirol-CH), 7,78 (d, 1H, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H-4), 8,00 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, Ar-H-5), 8,60 (d, 1H, <i>J</i> = 1,6 Hz, Ar-H-7), 12,97 (br s, 3H, Ar-COOH in pirol-CO-NH-ter pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3124, 1701, 1662, 1541, 1375, 1330, 1274, 1235, 1179, 1120, 976, 862, 834, 768, 7224, 617, 587, 508
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 441,8501; izračunana masa: 441,8497

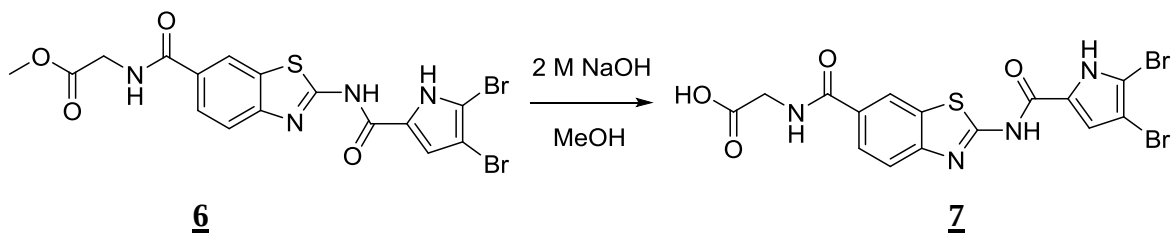
4.3 Sinteza metil (2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-karbonil)glicinata



V bučki smo raztopili spojino **4** (160 mg, 0,359 mmol, 1 ekv.) v 5 mL DMF, jo postavili na ledeno kopel in dodali EDC (83 mg, 0,431 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (72 mg, 0,467 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (79 μ L, 0,719 mmol, 2 ekv.). Po 20 minutah mešanja smo dodali spojino **5** (50 mg, 0,395 mmol, 1,1 ekv.) in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 30 mL EA in spirali z 10 % citronsko kislino (2 $\times$ 20 mL). Nastala je oborina v organski fazi, ki smo jo po ločitvi faz prefiltrirali s presesavanjem in sušili (60 $^{\circ}$ C, 24 ur). NMR spekter je potrdil nastanek 105 mg produkta. Organsko fazo smo nato še spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 $\times$ 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom ter dobili še 54 mg produkta; skupno smo dobili 159 mg produkta.

metil (2-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karbonil)glicinat (6)	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₁₂ Br ₂ N ₄ O ₄ S	M _w : 516,16 g/mol
Izgled: umazano bela oborina	Izkoristek: 85,5 %
T _{tal} : 273–276 $^{\circ}$ C	R _f : 0,81 (DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,67 (s, 3H, -COOCH ₃), 4,05 (d, 2H, <i>J</i> = 5,7 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -CO-O-CH ₃), 7,55 (s, 1H, pirol-CH), 7,83 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 7,97 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, Ar-H-5), 8,52 (d, 1H, <i>J</i> = 1,6 Hz, Ar-H-7), 9,03 (t, 1H, <i>J</i> = 5,7 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -CO-O-CH ₃), 12,75 (s, 1, -NH-), 13,28 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3222, 3122, 2949, 1728, 1640, 1601, 1544, 1385, 1334, 1281, 1222, 1184, 1052, 1018, 975, 860, 827, 768, 752, 723, 702, 616, 568, 517
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 512,8862; izračunana masa: 512,8868

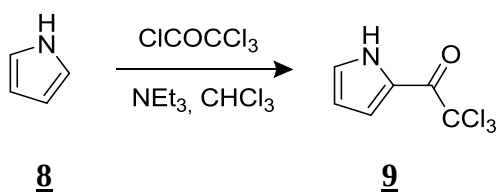
4.4 Sinteza (2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karbonil)glicina



Spojino **6** (70 mg, 0,136 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL MeOH in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (339 μ L, 0,678 mmol, 5 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 60 °C. Po 24 urah so v reakcijski zmesi prisotni oborjeni delci, zato smo dodali 1 mL vode, ki je raztopila nastalo sol. MeOH smo uparili pod znižanim tlakom. Na kromatogramu so bile opazne še nečistote, zato smo izolirali produkt z metodo ekstrakcije. Suhemu preostanku smo dodali 20 mL DKM ter 5 mL vode, vodno fazo nakisali z 1 M vodno raztopino HCl do pH = 1 in nastalo oborino prefiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 41 mg suhega produkta.

(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karbonil)glicin (<u>7</u>)	
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₀ Br ₂ N ₄ O ₄ S	M _w : 502,14 g/mol
Izgled: rumena oborina	Izkoristek: 60,3 %
T _{tal} : 201–204 °C	R _f : 0,73 (DKM : MeOH + CH ₃ COOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3,96 (d, 2H, J = 5,8 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH), 7,54 (d, 1H, J = 2,6 Hz, pirol-CH), 7,83 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar-H-4), 7,97 (dd, 1H, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 1,7 Hz, Ar-H-5), 8,53 (d, 1H, J = 1,7 Hz, Ar-H-7), 8,92 (t, 1H, J = 5,8 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH), 12,80 (s, 1H, pirol-CO-NH-), 13,29 (d, 1H, J = 2,6 Hz, pirol-NH); na NMR spektru ne vidimo signala Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3166, 2269, 2171, 1675, 1606, 1533, 1457, 1432, 1378, 1322, 1275, 1227, 1167, 1126, 1056, 976, 919, 863, 814, 741, 557, 503
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 498,8713; izračunana masa: 498,8711

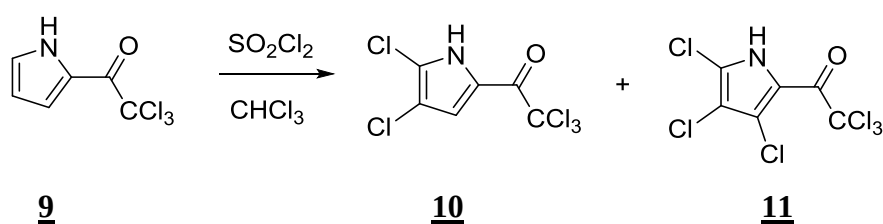
4.5 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona



V bučki smo raztopili spojino **8** (5 mL, 72,06 mmol, 1 ekv.) v 30 mL kloroforma, postavili na ledeno kopel, dodali trietilamin (13 mL, 93,68 mmol, 1,3 ekv.), pokrili bučko s septumom in prepihali z argonom. Nato smo previdno po kapljicah dodajali 2,2,2-trikloroacetil klorid (8,85 mL, 79,27 mmol, 1,1 ekv.), še naprej prepihovali z argonom in pustili mešati 3 ure na sobni temperaturi. Produkt smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. Reakcijski zmesi smo dodali 30 mL kloroforma in spirali z 10 % citronsko kislino (2 × 30 mL). Nastalo emulzijo smo ločili s presesavanjem. Sledilo je spiranje z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30 mL) in spet smo morali ločevati fazi s presesavanjem. Ker se fazi še vedno nista ločili, smo dodali 250 mL kloroforma ter spirali s 100 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Nadaljevali smo s kristalizacijo, kjer smo uporabili kombinacijo topil HEX/EA. Dobili smo oljnato snov, zato smo dodatno uparili topili in ponovno dobili oljnato snov, iz katere je na sobni temperaturi izpadla oborina. Končni produkt je tehtal 5,007 g.

2,2,2-trikloro-1-(1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-on (9)	
Molekulska formula: C ₆ H ₄ Cl ₃ NO	M _w : 212,45 g/mol
Izgled: črna oborina	Izkoristek: 32,71 %
T _{tal} : 50–53 °C	R _f : 0,53 (EA : HEX = 1 : 6)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 6,41 (dt, 1H, J ₁ = 4,1 Hz, J ₂ = 2,5 Hz, pirol-CH), 7,20 (ddd, 1H, J ₁ = 3,1 Hz, J ₂ = 2,5 Hz, J ₃ = 1,3 Hz, pirol-CH), 7,42 (m, 1H, pirol-CH), 9,70 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3316, 2988, 1651, 1535, 1463, 1423, 1384, 1318, 1135, 1110, 1063, 1035, 841, 807, 728, 686, 594, 558

4.6 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona



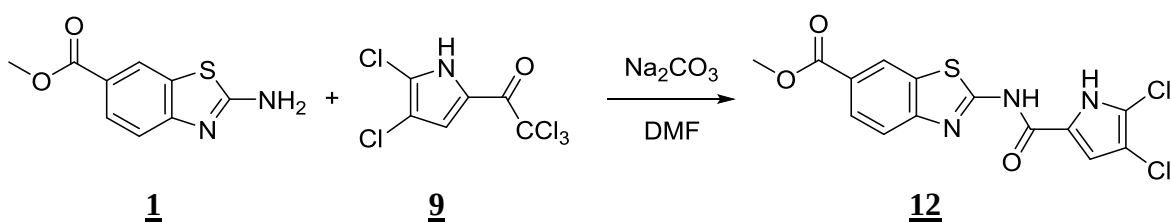
Spojino **9** (5,007 g, 23,74 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 110 mL kloroforma, prepihali z argonom, postavili na ledeno kopel in previdno po kapljicah dodajali sulfuril klorid (4 mL, 49,49 mmol, 2,1 ekv.) ter pustili mešati na sobni temperaturi. Ker se TLC-kromatogram, razvit po 30 minutah od začetka reakcije, ni razlikoval od TLC-kromatograma ob začetku reakcije, smo dodatno dokopavali sulfuril klorid (1 mL, 23,74 mmol, 0,5 ekv.). Po 30 minutah je bila na TLC-kromatogramu še vedno prisotna izhodna spojina, zato smo še enkrat počasi dodajali sulfuril klorid (1 mL, 23,74 mmol, 0,5 ekv.). 30 minut kasneje smo prekinili reakcijo z dodatkom 100 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in 20 mL nasičene raztopine NaCl. Po ločitvi faz smo vodno fazo ekstrahirali s 100 mL DKM, združili organski fazi in uparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza EA : HEX = 1 : 20). Dobili smo 1,967 g suhega produkta. Uspeli smo izolirati še 164 mg stranskega produkta **11**.

2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-on (10)	
Molekulska formula: C ₆ H ₂ Cl ₅ NO	M _w : 281,34 g/mol
Izgled: svetlo roza kristali	Izkoristek: 29,7 %
T _{tal} : 89–92 °C	R _f : 0,40 (EA : HEX = 1 : 4)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7,32 (s, 1H, pirol-CH), 9,51 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3378, 3266, 3139, 2988, 1653, 1575, 1541, 1458, 1417, 1371, 1326, 1278, 1231, 1168, 1094, 1015, 951, 912, 873, 805, 720, 682, 630, 612, 593, 533

2,2,2-trikloro-1-(3,4,5-trikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-on (11)	
Molekulska formula: C ₆ HCl ₆ NO	M _w : 315,78 g/mol
Izgled: sivi kristali	Izkoristek: 21,9 %
T _{tal} : 90–94 °C	R _f : 0,70 (EA : HEX = 1 : 6)

¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 9,38 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3378, 3328, 1674, 1530, 1427, 1380, 1314, 1278, 1183, 1129, 1093, 1041, 1023, 980, 912, 868, 849, 803, 777, 742, 687, 662, 644, 624, 606, 572
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 311,8102; izračunana masa: 311,8111

4.7 Sinteza metil 2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilata

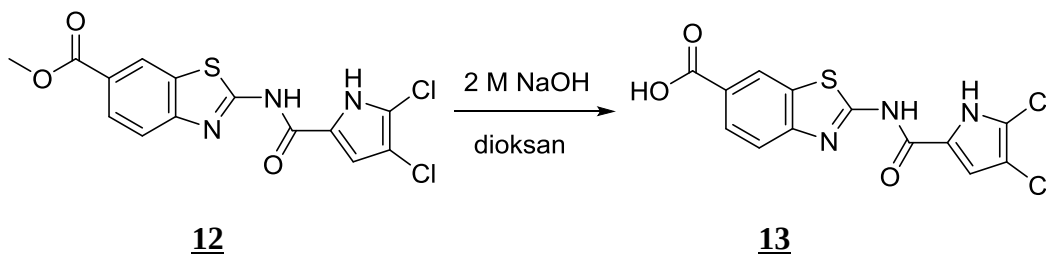


Spojino **9** (295 mg, 1,06 mmol, 1,1 ekv.) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali spojino **1** (200 mg, 0,960 mmol, 1 ekv.) in Na₂CO₃ (126 mg, 0,960 mmol, 1 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 80 °C za 24 ur. Nato smo reakcijski zmesi dodali 30 mL EA in spirali z 10 % citrasko kislino (20 mL). Nastala je rjava oborina, ki smo jo prefiltrirali s presesavanjem in posušili (60 °C, 18 ur). NMR spekter je potrdil, da smo dobili 240 mg produkta.

metil 2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilat (<u>12</u>)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₉ Cl ₂ N ₃ O ₃ S	M _w : 370,20 g/mol
Izgled: umazano bela oborina	Izkoristek: 70,0 %
T _{tal} : / (razpad pri 262 °C)	R _f : 0,70 ((DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,89 (s, 3H, -COOCH ₃), 7,54 (s, 1H, pirol-CH), 7,84 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 8,04 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, Ar-H-5), 8,68 (d, 1H, <i>J</i> = 1,7 Hz, Ar-H-7), 12,87, (s, 1H, -NH-), 13,37 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3248, 2958, 1706, 1671, 1609, 1544, 1432, 1391, 1332, 1277, 1249, 1186, 1127, 1022, 983, 902, 862, 827, 766, 740, 623, 586, 538

HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 367,9660; izračunana masa:367,9663
--------------	--

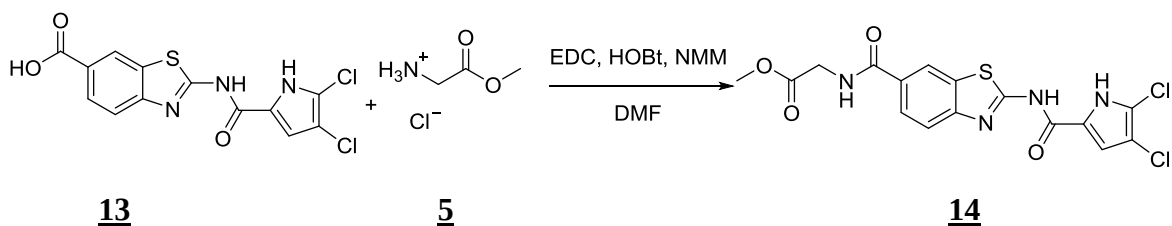
4.8 Sinteza 2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilne kisline



Na oljni kopeli pri 80 °C smo raztopili spojino **12** (240 mg, 0,652 mmol, 1 ekv.) v 10 mL dioksana in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (1,63 mL, 3,21 mmol, 5 ekv.). Po 20 urah je reakcija potekla, kar sta potrdila NMR in MS spekter. V reakcijski zmesi so bili prisotni oborjeni delci, zato smo dodali 1 mL vode, ki je raztopil nastalo natrijevo sol. Nato smo uparili MeOH pod znižanim tlakom, dodali 5 mL vode in nakisali reakcijsko zmes z 1 M vodno raztopino HCl do pH = 1. Oborjen produkt smo prefiltrirali s presesavanjem in posušili (60 °C, 18 ur); tehtal je 205 mg.

2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilna kislina (<u>13</u>)	
Molekulska formula: C ₁₃ H ₇ Cl ₂ N ₃ O ₃ S	M _w : 356,18 g/mol
Izgled: temno rjava oborina	Izkoristek: 88,7 %
T _{tal} : > 300 °C	R _f : 0,43 (DKM : MeOH + CH ₃ COOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 7,53 (d, 1H, <i>J</i> = 2,1 Hz, pirol-CH), 7,82 (d, 1H, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H-4), 8,02 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, Ar-H-5), 8,64 (d, 1H, <i>J</i> = 1,7 Hz, Ar-H-7), 12,86 (s, 1H, pirol-CO-NH-) 13,37 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz, pirol-NH); na NMR spektru ne vidimo signala za Ar-COOH
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2980, 1661, 1603, 1534, 1387, 1330, 1268, 1230, 1183, 1022, 990, 906, 864, 831, 767, 723, 620, 507
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 353,9498; izračunana masa:353,9507

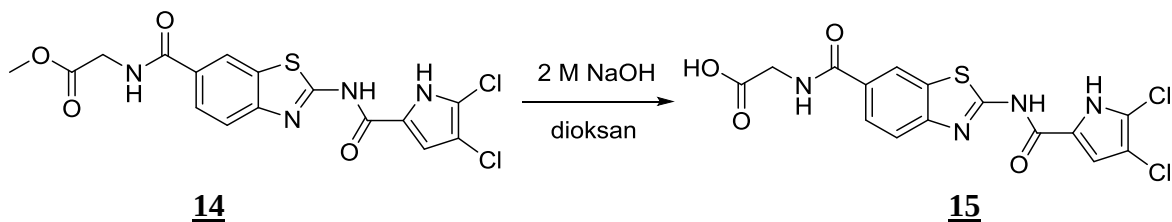
4.9 Sinteza metil (2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-karbonil)glicinata



Spojino **13** (180 mg, 0,505 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL DMF. Bučko smo postavili na ledeno kopel in dodali EDC (116 mg, 0,606 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (101 mg, 0,657 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (111 μ L, 1,01 mmol, 2 ekv.). Po 20 minutah mešanja smo dodali še spojino **5** (70 mg, 0,556 mmol, 1,1 ekv.) in pustili mešati na sobni temperaturi za 18 ur. Reakcijski zmesi smo nato dodali 30 mL EA in spirali z 10 % citronsko kislino (2 $\times$ 20 mL). Nastala je oborina v organski fazi, ki smo jo po ločitvi faz prefiltrirali s presesavanjem in sušili (60 $^{\circ}$ C, 18 ur). NMR spekter je potrdil nastanek 110 mg produkta.

metil (2-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-karbonil)glicinat (<u>14</u>)	
Molekulska formula: C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	M _w : 427,26 g/mol
Izgled: rumeno-rjava oborina	Izkoristek: 51,0 %
T _{tal} : 256–260 $^{\circ}$ C	R _f : 0,73 (DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,67 (s, 3H, Ar-CO-NH-CH ₂ -CO-O-CH ₃), 4,05 (d, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -CO-O-CH ₃), 7,52 (s, 1H, pirol-CH), 7,83 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 7,97 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, Ar-H-5), 8,53 (d, 1H, <i>J</i> = 1,7 Hz, Ar-H-7), 9,02 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -CO-O-CH ₃), 12,83 (s, 1H, -NH-), 13,37 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3582, 3459, 3207, 3126, 2958, 1731, 1640, 16022, 1568, 1283, 1243, 1195, 1053, 1019, 862, 833, 770, 752, 704, 616, 560, 517
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 424,9880; izračunana masa: 424,9878

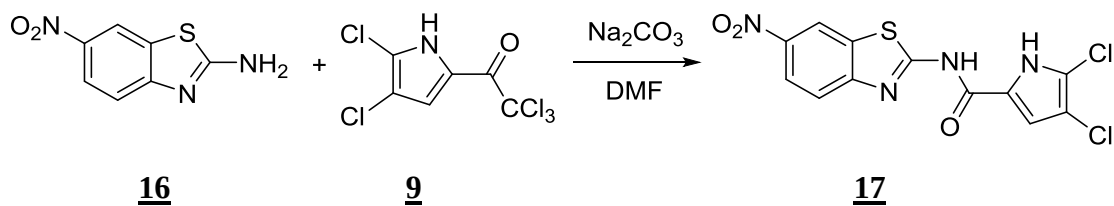
4.10 Sinteza (2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karbonil)glicina



Spojino **15** (90 mg, 0,211 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL dioksana in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (527 μ l, 1,05 mmol, 5 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 60 °C. Po 18 urah smo razvili masni spekter, ki je potrdil, da je reakcija potekla. V reakcijski zmesi so bili prisotni še oborjeni delci, zato smo dodali 1 mL vode, ki je raztopila nastalo sol. Pod znižanim tlakom smo uparili topilo, dodali 5 mL vode in nakisali z 1 M vodno raztopino HCl do pH = 1. Nastalo oborino smo prefiltrirali s presesavanjem in jo posušili (60°C, 18 ur). Dobili smo 55 mg produkta.

(2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karbonil)glicin (<u>15</u>)	
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	M _w : 413,23 g/mol
Izgled: umazano bela oborina	Izkoristek: 63,2 %
T _{tal} : 268–271 °C	R _f : 0,8 (DKM : MeOH + CH ₃ COOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,96 (d, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH), 7,52 (d, 1H, <i>J</i> = 2,3 Hz, pirol-CH), 7,83 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-4), 7,97 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, Ar-H-5), 8,53 (d, 1H, <i>J</i> = 1,6 Hz, Ar-H-7), 8,91 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz, Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH), 12,83 (s, 1H, pirol-CO-NH) 13,36 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz, pirol-NH), na NMR spektru ne vidimo signala za Ar-CO-NH-CH ₂ -COOH
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3165, 2269, 2162, 2032, 1969, 1667, 1525, 1387, 1328, 1298, 1234, 1182, 111104, 1056, 1022, 990, 944, 865, 812, 741, 670, 638, 610, 584, 557
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 410,9721; izračunana masa: 410,9722

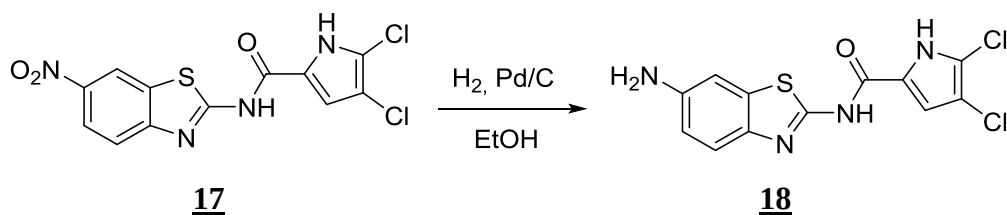
4.11 Sinteza 4,5-dikloro-*N*-(5-nitrobenzo[d]tiazol-2-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida



Natehtali smo spojino 9 (1,500 g, 5,379 mmol, 1 ekv.), jo raztopili v 15 mL DMF, nato pa dodali spojino 15 (1,050 g, 5,379 mmol, 1 ekv.) in Na₂CO₃ (0,704 g, 6,579 mmol, 1 ekv.). Bučko smo postavili na oljno kopel pri 80 °C za 72 ur. Sledil je dodatek 100 mL EA reakcijski zmesi in nato spiranje z 10 % citronsko kislino (2 × 50 mL). V organski fazi je nastala oborina, ki smo jo po ločitvi faz prefiltrirali s presesavanjem in posušili (60 °C, 18 ur). Dobili smo 1,460 g produkta.

4,5-dikloro- <i>N</i> -(5-nitrobenzo[d]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (<u>17</u>)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₄ O ₃ S	M _w : 357,17 g/mol
Izgled: rjavo-oranžna oborina	Izkoristek: 76,0 %
T _{tal} : 224–228 °C	R _f : 0,63 (DKM : MeOH = 40 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 7,51 (s, 1H, pirol-CH), 7,89 (d, 1H, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H-4), 7,96 (s, 1H, Ar-H-7), 8,29 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, Ar-H-5), 9,06 (d, 1H, <i>J</i> = 2,3 Hz, pirol-NH), 13,16 (s, 1H, pirol-CO-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3380, 3125, 2904, 1707, 1655, 1549, 1515, 1427, 1392, 1327, 1278, 1218, 1127, 1094, 1047, 1024, 906, 836, 743, 702, 666, 624, 573

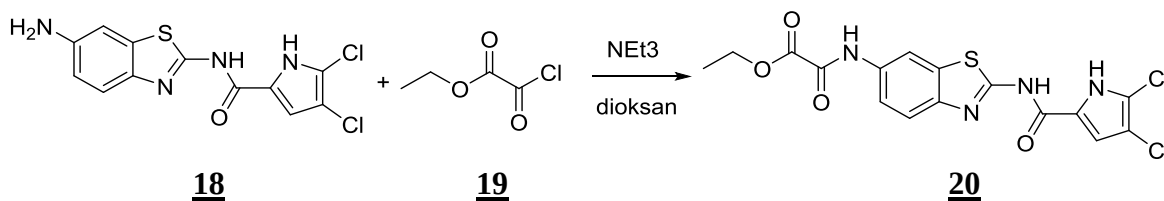
4.12 Sinteza *N*-(5-aminobenzo[d]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida



Spojino **16** (1,455 g, 4,074 mmol, 1 ekv.) smo suspendirali v 150 mL etanola, 5 minut prepihovali z argonom, nato dodali 145 mg paladija (10 % mase izhodne spojine) ter pričeli s prepihovanjem z vodikom. Po 24 urah mešanja na sobni temperaturi v vodikovi atmosferi smo reakcijsko zmes prefiltrirali in uparili etanol pod znižanim tlakom. Dobili smo 694 mg produkta.

<i>N</i>-(5-aminobenzo[d]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid (18)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₄ OS	M _w : 327,18 g/mol
Izgled: oker oborina	Izkoristek: 52,1 %
T _{tal} : 216–220 °C	R _f : 0,5 (DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 5,19 (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,72 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,1 Hz, Ar-H-5), 7,02 (d, 1H, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H-7), 7,43 (d, 1H, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H-4), 7,96 (s, 1H, pirol-CH), 12,27 (s, 1H, -NH-), 13,20 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3301, 1705, 1662, 1613, 1553, 1473, 1424, 1392, 13226, 1276, 1182, 1015, 918, 860, 811, 740, 663, 589, 517

4.13 Sinteza etil 2-((2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata

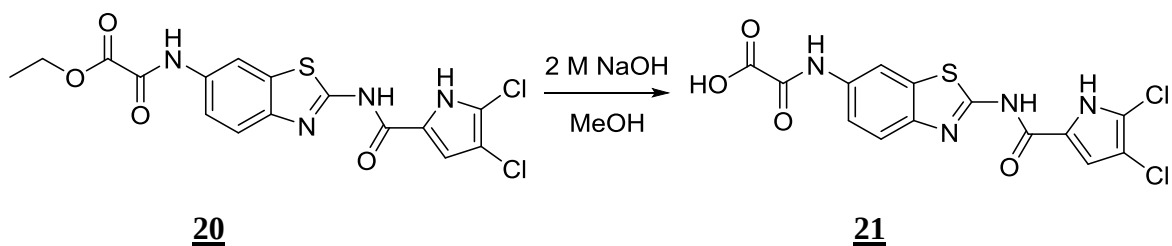


Spojino **18** (300 mg, 0,917 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL dioksana, dodali trietilamin (165 µL, 1,19 mmol, 1,3 ekv.), pustili mešati na ledeni kopeli za 20 minut in hkrati prepihovali z argonom. Nato smo po kapljicah dodali še etiloksalil klorid (154 µL, 1,38 mmol, 1,5 ekv.) in pustili mešati 3 ure na sobni temperaturi. Reakcijo smo prekinili z 10 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Po 10 minutah mešanja smo topilo uparili pod znižanim tlakom, suh preostanek pa s pomočjo ultrazvočne kadičke raztopili v 80 mL EA. Sledilo je spiranje z 10 % citronsko kislino (40 mL), vendar se fazi nista ločili tudi po dodatku 40 mL nasičene raztopine NaCl. Po presesavanju smo dobili nečisto oborino, ki

smo jo očistili s pomočjo kristalizacije v etanolu. Dobili smo 57 mg kristalov, matičnico po filtriranju pa smo uparili in dobili še 156 mg produkta.

etil 2-((2-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat (20)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	M _w : 427,26 g/mol
Izgled: rumena oborina	Izkoristek: 54,4 %
T _{tal} : 201–204 °C	R _f : 0,75 (DKM : MeOH = 20 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,34 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, Ar-NH-CO-CO-O-CH ₂ -CH ₃), 4,33 (q, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, Ar-NH-CO-CO-O-CH ₂ -CH ₃), 7,21 (s, 1H, pirol-CH), 7,71-7,80 (m, 2H, Ar-H-4 in Ar-H-5), 8,41 (s, 1H, Ar-H-7), 10,92-11,00 (m, 1H, Ar-NH-CO-CO-O-CH ₂ -CH ₃), 10,94 (s, 1H, Ar-NH-CO-CO-O-CH ₂ -CH ₃), 11,91-12,51 (s, 2H, 2x-NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3309, 2987, 1707, 1663, 1611, 1568, 1527, 1470, 1427, 1397, 1370, 1304, 1281, 1231, 1182, 1013, 861, 810, 742, 675, 628, 589, 549, 517

4.14 Sinteza 2-((2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoocetne kisline

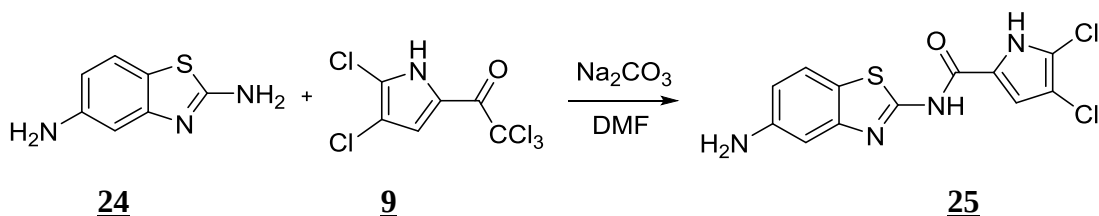


V bučki smo raztopili spojino **20** (156 mg, 0,365 mmol, 1 ekv.) v 10 mL MeOH in dodali 2 M vodno raztopino NaOH (913 µL, 1,83 mmol, 5 ekv.) in pustili mešati za 18 ur na sobni temperaturi. Ker je bila na TLC-kromatogramu prisotna še nečistoča, smo po uparevanju topila pod znižanim tlakom dodali 5 mL vode in alkalno vodno fazo spirali z DKM (2x10 mL). Vodno fazo smo nakisali z 1 M vodno raztopino HCl do pH = 1, nastalo oborino pa prefiltrirali s presesavanjem in posušili (60 °C, 10 ur). Dobili smo 32 mg produkta.

% vodno raztopino amonijaka do pH = 6. Nastala je oborina, ki smo jo prefiltrirali s presesavanjem in posušili (60 °C, 6 ur). Dobili smo 6,404 g oborine. Naalkaljene vodne raztopine (skupaj 400 mL) smo ekstrahirali z DKM (800 mL), ločili fazi, organsko fazo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in DKM uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo še 2,208 g suhega preostanka. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza EA : HEX = 1 : 3) in dobili 1,503 g produkta.

5-nitrobenzo[d]tiazol-2-amin (<u>23</u>)	
Molekulska formula: C ₇ H ₅ N ₃ O ₂ S	M _w : 195,20 g/mol
Izgled: rdeč prašek	Izkoristek: 20,0 %
T _{tal} : 123–127 °C	R _f : 0,45 (EA : HEX = 1 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 6,27 (s, 2H, -NH ₂), 7,10 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,7 Hz, Ar-H-6), 7,51 (d, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz, Ar-H-4), 7,58 (d, 1H, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H-7)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3420, 3314, 3208, 2157, 1636, 1609, 1562, 1507, 1472, 1309, 1242, 1170, 1114, 864, 820, 754, 686, 639, 540

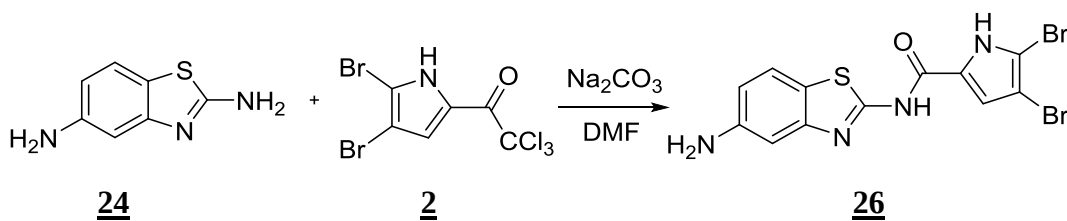
4.16 Sinteza *N*-(5-aminobenzo[d]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida



Spojino 9 (169 mg, 0,605 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 2 mL DMF, dodali spojino 24 (100 mg, 0,605 mmol, 1 ekv.) in Na₂CO₃ (79 mg, 0,605 mmol, 1 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 80 °C. Po 24 urah smo reakcijski zmesi dodali 20 mL EA in spirali z 10 % citronsko kislino (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Po 10 minutah mešanja na ledeni kopeli je začela v organski fazi izpadati oborina, ki smo jo prefiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 50 mg produkta.

<i>N</i>-(5-aminobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid (25)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₄ O ₃ S	M _w : 327,18 g/mol
Izgled: svetlo roza oborina	Izkoristek: 25,3 %
T _{tal} : 289–293 °C	R _f : 0,71 (DKM : MeOH = 40 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 5,22 (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,63 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,8 Hz, Ar-H-6), 6,92 (s, 1H, pirol-CH), 7,46 (s, 1H, Ar-H-4), 7,55 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H-7), 12,46 (s, 1H, -NH-), 13,24 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3206, 2986, 1656, 1549, 1396, 1331, 1296, 1238, 1181, 1025, 958, 851, 829, 811, 746, 688, 635, 603, 583, 501,
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 324,9711; izračunana masa: 324,9718

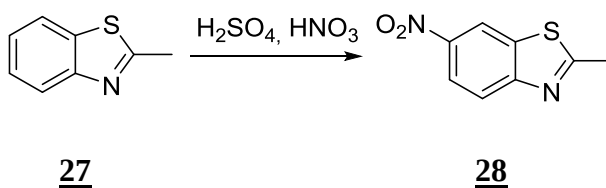
4.17 Sinteza *N*-(5-aminobenzo[*d*]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida



V bučki smo raztopili spojino **2** (224 mg, 0,605 mmol, 1 ekv.) v 4 mL DMF, dodali Na₂CO₃ (79 mg, 0,605 mmol, 1 ekv.) in spojino **23** (100 mg, 0,6053 mmol, 1 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 80 °C. Po 44 urah smo reakcijski zmesi dodali 20 mL EA in spirali z 10 % citronsko kislino (2 × 10 mL). Po ločitvi faz smo združeni vodni fazi ponovno spirali s svežim EA (60 mL). Organski fazi smo združili in ju spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 30 mL). Vseskozi med spiranjem je nastajala emulzija. Pri zadnjem spiranju smo zmes prefiltrirali s presesavanjem, ločili fazi in organsko fazo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in matičnico skoncentrirali na 40 mL pod znižanim tlakom. Bučko smo pustili čez noč na sobni temperaturi in izpadel je naš produkt, ki smo ga nato prefiltrirali s presesavanjem in ga posušili (60 °C, 20 ur). Dobili smo 95 mg suhega produkta.

<i>N</i>-(5-aminobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid (26)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₈ Br ₂ N ₄ OS	M _w : 416,09 g/mol
Izgled: umazano bela oborina	Izkoristek: 37,7 %
T _{tal} : 272–276 °C	R _f : 0,71 (DKM : MeOH = 40 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 5,20 (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,63 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,1 Hz, Ar-H-6), 6,91 (s, 1H, pirol-CH), 7,43 (s, 1H, Ar-H-4), 7,55 (d, 1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H-7), 12,42 (s, 1H, -NH-), 13,18 (s, 1H, -NH-)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3398, 3210, 2972, 1658, 1555, 1435, 1384, 1330, 1294, 1228, 1176, 980, 957, 851, 828, 811, 745, 687
HR-MS (ESI-)	izmerjena masa: 412,8698; izračunana masa: 412,8707

4.18 Sinteza 2-metil-6-nitrobenzo[*d*]tiazola

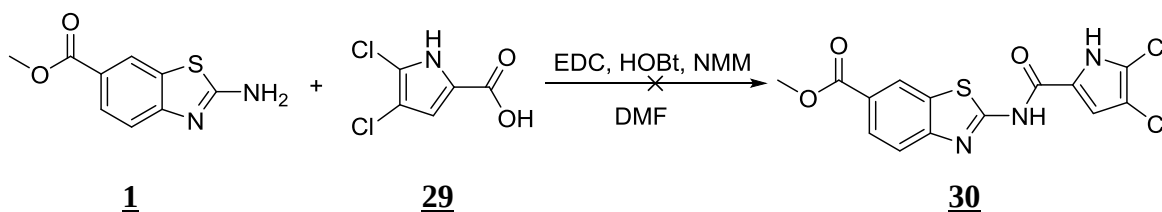


V bučko smo odmerili H₂SO₄ (3,60 mL, 67,5 mmol, 4 ekv.), jo postavili na ledeno kopel in po kapljicah dodali spojino **27** (2 mL, 15,7 mmol, 1 ekv.). Nato smo previdno dokapavali HNO₃ (1,9 mL, 45,2 mmol, 3 ekv.). Po 10 minutah mešanja smo bučko odstavili iz ledene kopeli. Po 24 urah mešanja na sobni temperaturi smo reakcijsko zmes počasi prelili na 25 g ledu in pustili mešati 5 minut. Nastala je bela oborina, ki smo ji dodali vodno raztopino amonijaka, da smo dosegli pH = 10, pri čemer je nastala oranžna oborina. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili, da oborina ni čista. Kristalizacija z EA je bila neuspešna, zato smo suspenzijo vroče prefiltrirali in kristalizirali z etanolom. Dobili smo 77 mg manj čistega produkta. Matičnico smo nato uparili pod znižanim tlakom, suh preostanek pa kristalizirali z etanolom in dobili 876 mg čistega produkta.

2-metil-6-nitrobenzo[<i>d</i>]tiazol (28)	
Molekulska formula: C ₈ H ₆ N ₂ O ₂ S	M _w : 194,21 g/mol
Izgled: beli igličasti kristali	Izkoristek: 31,2 %
T _{tal} : 148–152 °C	R _f : 0,58 (DKM : MeOH = 30 : 1)

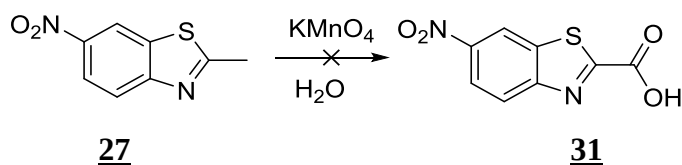
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 2,89 (s, 3H, Ar-CH ₃), 8,10 (d, 1H, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H-4), 8,31 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, Ar-H-5), 9,12 (d, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz, Ar-H-7)
¹³ C NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	20,23 (1C), 119,10 (1C), 121,36 (1C), 122,28 (1C), 135,91 (1C), 144,07 (1C), 156,76 (1C), 174,56 (1C)
IR (ATR)	3067, 1602, 1570, 1503, 1434, 1328, 1268, 1238, 1174, 1117, 1039, 994, 904, 825, 749, 719, 672, 650, 551, 510

4.19 Neuspešen poskus sinteze metil 2-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzo[d]tiazol-6-karboksilata



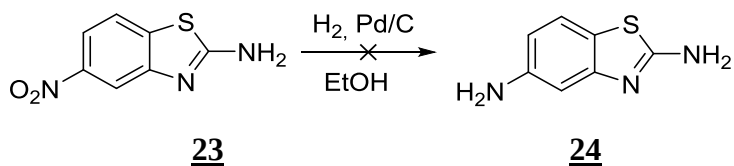
Spojino **29** (200 mg, 1,11 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL DMF, postavili na ledeno kopel, nato pa dodali EDC (256 mg, 1,33 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (221 mg, 1,44 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (244 μ L, 2,22 mmol, 2 ekv.). Po 20 minutah mešanja smo dodali spojino **1** in pustili mešati na sobni temperaturi. Po 24 urah smo v reakcijsko zmes dodali 30 mL EA in spirali z 10 % citronske kisline (2 $\times$ 20 mL). Zaradi možne prisotnosti produkta v vodni fazi smo vodno fazo ekstrahirali še s svežim EA (60 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 $\times$ 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (40 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 40 : 1). Po NMR-spektru smo ugotovili, da je nastal vmesni stranski produkt in druge nečistote.

4.20 Neuspešen poskus sinteze 6-nitrobenzo[d]tiazol-2-karboksilne kisline



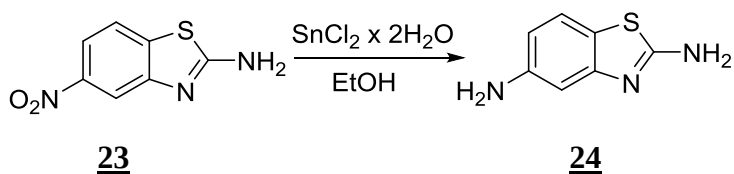
Spojino **27** (400 mg, 2,06 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 8 mL vode in dodali KMnO₄ (644 mg, 4,07 mmol, 2 ekv.) ter pustili mešati na oljni kopeli pri 105 °C. Po 2 urah smo dodali enako količino KMnO₄. 2 uri po dodatku se je reakcijska zmes obarvala črno. Pustili smo mešati na oljni kopeli za 18 ur. Zgoščeni črni zmesi smo dodali še 2 mL vode, nato pa smo jo prefiltrirali preko Celita (diatomejske prsti), matičnico pa uparili pod znižanim tlakom in dobili 290 mg nečistega rumenega preostanka, ki pa ni bil želeni produkt.

4.21 Neuspešen poskus sinteze benzo[d]tiazol-2,5-diamina



Spojino **23** (300 mg, 1,58 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL etanola, zaprli bučko s septumom in prepihali z argonom. Po 5 minutah smo dodali 30 mg paladija (10 % mase reaktanta), pričeli s prepihovanjem z vodikom in pustili mešati na sobni temperaturi. Po 72 urah mešanja nismo opazili sprememb na kromatogramu. Reakcijsko zmes s paladijem smo prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Reakcija ni potekla.

4.22 Neuspešen poskus sinteze benzo[d]tiazol-2,5-diamina



Spojino **23** (1,080 g, 5,684 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 100 mL etanola in dodali SnCl₂ × 2H₂O (6,412 g, 28,42 mmol, 5 ekv.) ter postavili bučko na oljno kopel pri 90 °C. Po 45 minutah se je spremenila barva reakcijske zmesi (rdeče v rumeno). Preverili smo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo ter izolirali produkt. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom, surov produkt pa raztopili v 100 mL 1 M vodne raztopine NaOH. Nastala je bela emulzija. Spirali smo z EA (8 × 50 mL). Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Ker je bila masa suhega preostanka nizka, smo vodno fazo še dodatno naalkalili do pH = 8 in spirali z vročim EA (4 × 50 mL). Nato smo vodno fazo z ustreznim pH-jem pustili mešati z EA za 15 ur in nadalje ekstrahirali vodno fazo z vročim EA (5 × 50 mL). Združene organske faze smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom.

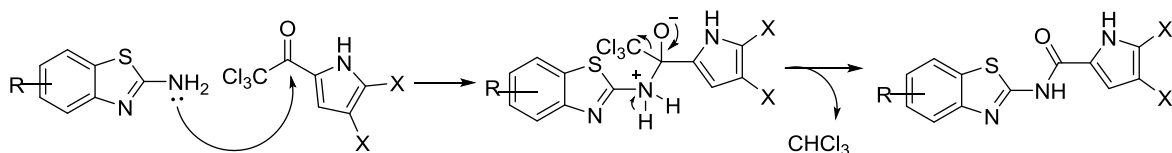
S tankoplastno kromatografijo smo preverili sestavo vodne faze in ugotovili, da je še vedno prisoten produkt. Zato smo spirali ponovno naalkaljeno vodno fazo z DKM (2×50 mL). Združeni organski fazi smo posušili nad brezvodnim Na_2SO_4 , prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Zaradi prisotnosti številnih nečistoč produkta nismo uspeli izolirati.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar sinteznih reakcij

5.1.1 Tvorba amidne vezi na mestu 2 benzotiazolnega obroča

V prvi stopnji smo na benzotiazolne derivate pripenjali različno halogenirana derivata 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona in tvorili amidno vez na mestu 2 benzotiazolnega skeleta (Slika 12). Za boljši potek N-aciliranja smo reaktantoma dodali Na₂CO₃, ki ohranja neionizirano obliko izhodnega amina tekom reakcije in izboljša nukleofilnost proste amino skupine za napad elektrofilnega karbonilnega ogljika 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona. Nastane nestabilen tetraedrični intermediat, ki hitro reagira do končnega produkta. Kot topilo smo uporabili DMF zaradi slabše topnosti izhodnega amina. Reakcijo smo pospešili s segrevanjem na oljni kopeli pri 80 °C. Po najmanj 24 urah smo pričeli z izolacijo produkta s pomočjo ekstrakcije. Reakcijsko zmes smo spirali z 10 % citrsko kislino, s katero smo odstranili bazične nečistoče (izhodni amin, Na₂CO₃, DMF) v vodno fazo. V vodi netopni produkt je izpadel iz vodne faze že po tem spiranju. NMR-spekter je potrdil čistoto vseh produktov pri derivatih benzotiazola s substituiranim mestom 6 – **3**, **12**, **17**. Pri derivatih benzotiazola z amino skupino na mestu 5 ni izpadel produkt po spiranju, zato smo nadaljevali s spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃ in nasičeno raztopino NaCl. Med spiranjem je pogosto nastajala emulzija, ki smo jo poskušali ločiti s presesavanjem, dodatkom večjega volumna organskega topila oz. nasičene raztopine NaCl.



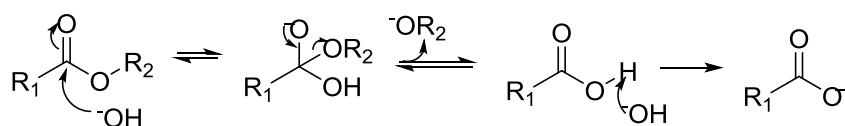
Slika 12: Mehanizem N-aciliranja benzotiazolnega obroča na mestu 2. Prirejeno po (28).

N-aciliranje aromatske amino skupine na mestu 6 smo izvajali z etiloksalil kloridom. Zaradi visoke reaktivnosti elektrofila smo izvajali reakcijo pod inertno argonovo atmosfero. Na ledeni kopeli smo hladili reakcijsko zmes le 20 minut, da se dioksan ni strdil. Za nevtralizacijo nastajajoče klorovodikove kisline smo dodali prebitek trietilamina. Reakcijo smo prekinili z dodatkom nasičene raztopine NaHCO₃, ki je dokončno nevtralizirala

nastalo klorovodikovo kislino. Zaradi izstopajočega CO₂ smo pustili mešati 10 minut. Produkt smo neuspešno očistili s pomočjo ekstrakcije, zato smo nadaljevali s kristalizacijo v etanolu.

5.1.2 Alkalna hidroliza estrov

Za uvajanje različnih substituentov na mestu 6 benzotiazolnega obroča smo morali cepiti estre vmesnih produktov s pomočjo alkalne hidrolize (Slika 13). Estre smo raztopili v dioksanu oz. metanolu in dodali 2 M vodno raztopino NaOH. MeOH igra vlogo topila in dodatnega nukleofila. Izkoristek pri uporabi različnih topil je podoben, vendar smo pri uporabi metanola dobili manj čist produkt, ki smo ga dodatno čistili z ekstrakcijo z DKM¹⁸. Pri sintezi spojine **21** smo pustili reakcijo potekati na sobni temperaturi. Ostale reakcije niso potekale pri sobni temperaturi, zato smo jih pospešili s segrevanjem. Med reakcijo smo opazili nastajajoče netopne delce ioniziranega produkta v organskem topilu, zato smo reakcijski zmesi dodali nekaj kapljic vode. Po uparevanju organskega toplata smo dodali destilirano vodo in raztopino nakisali do pH = 1 in s tem pretvorili produkt v neionizirano netopno oborino, ki smo jo odfiltrirali. Izkoristki alkalne hidrolize pri aromatskih estrih so bili višji kot pri hidrolizi alifatskih estrov, saj dodatni polarnejši substituenti na mestu 6 povečajo topnost v vodi in so izgube pri izolaciji večje.



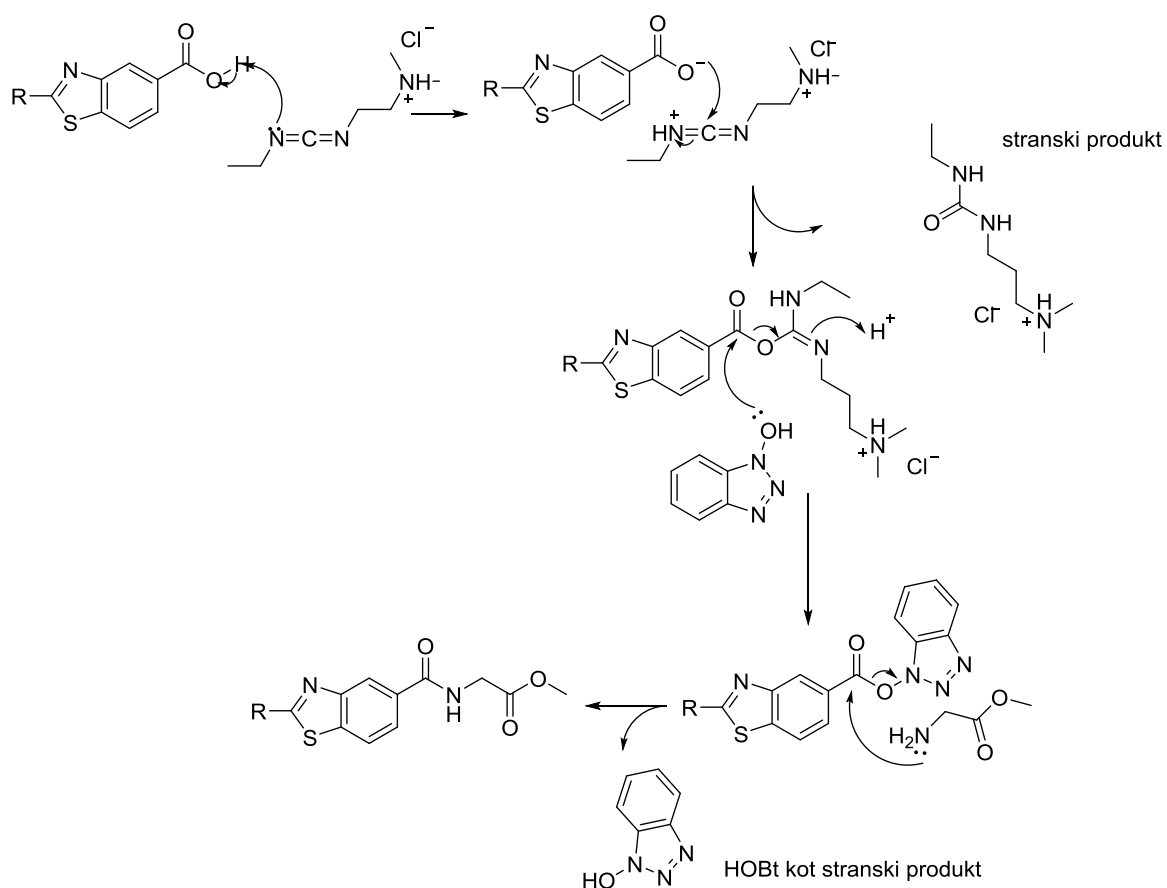
Slika 13: Mehanizem alkalne hidrolize. Prirejeno po (28).

5.2.3 Tvorba amidnih vezi z uporabo sklopitvenih reagentov

Nastale pirolamide s prosto aromatsko karboksilno kislino smo nato sklopili z amino skupino zaestrenega glicina. Za povečanje elektrofilne narave karbonilnega ogljika smo s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC in HOBt tvorili intermediat z dobro izstopajočo skupino za potek reakcije (Slika 14). Na ledeni kopeli smo raztopili sintetizirane vmesne produkte v DMF, dodali NMM, EDC in HOBt ter pustili mešati 20 min. Po odcepu protona karboksilne kisline z NMM je nastal nukleofilni karboksilat, ki je napadel elektrofilno karbodiimidno skupino EDC. Nastali O-acilsečninski derivat je nato reagiral s HOBt do še

¹⁸ V vodno fazo po ekstrakciji z DKM potuje naš ioniziran produkt, v organski fazi pa so preostale nečistoče (izhodna spojina).

reaktivnejšega estra. Sledil je dodatek amina in mešanje reakcijske zmesi na sobni temperaturi. Zaestreni glicin se je ob prebitku NMM pretvoril v neionizirano obliko, s čimer se je povečala njegova nukleofilnost in lažji napad na elektrofilni center aktiviranega estra. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo v EA. Po spiranju organske faze z 10 % citrsko kislino smo odstranili nečistote z bazičnimi centri (prebitek EDC, vmesnega O-acilsečninskega derivata, NMM, derivata glicina in DMF). Nadaljevali smo s spiranjem z nasičeno raztopino NaHCO₃, s katero smo se znebili kislih nečistot (nezreagiranih izhodnih kislin, HOBt). Dokončno smo sprali organsko fazo z nasičeno raztopino NaCl za odtegnitev vode iz organske faze. Pri sintezi spojine **14** smo dobili izoborjen čist produkt že po spiranju z 10 % citrsko kislino, ki smo ga le odfiltrirali.

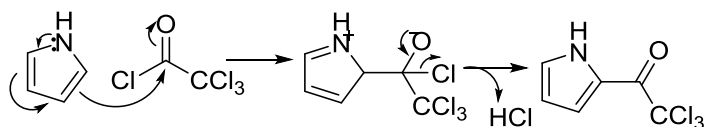


Slika 14: Mehanizem tvorbe amidne vezi preko sklopitvenih reagentov. Prirejeno po (28).

5.1.4 Sinteza 4,5-dikloropirrolamidnega dela spojin

Priprava 4,5-dikloropirrolamidnega dela spojin je vključevala tvorbo 2,2,2-trikloro-1-(1H-pirol-2-il)etan-1-ona, ki smo ga nato klorirali. 2,2,2-trikloro-1-(1H-pirol-2-il)etan-1-ona

smo sintetizirali z dodajanjem 2,2,2-trikloroacetil klorida raztopljenemu pirolu v kloroformu. Zaradi eksotermne narave reakcije smo reakcijo izvedli v inertni argonovi atmosferi na ledeni kopeli, dodali bazični trietilamin ter previdno po kapljicah še kislinski klorid. Produkt smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. Reakcijsko zmes smo spirali z 10 % citrsko kislino, s katero smo odstranili bazični trietilamin v vodno fazo, z nasičeno raztopino NaHCO_3 , s katero smo se znebili 2,2,2-trikloroacetil klorida oziroma morebiti nastale 2,2,2-trikloroocetne kisline, in nasičeno raztopino NaCl . Pri vseh spiranjih smo imeli težave z nastankom emulzij, zato smo poskusili s filtriranjem zmesi pod znižanim tlakom, nato pa povečali volumne organskega topila in sredstev za spiranje. Preostalo vodo v organski fazi smo odstranili s sušenjem nad brezvodnim Na_2SO_4 . Zaradi nizke čistote produkta smo izvedli kristalizacijo s kombinacijo topil HEX/EA . Nastala je le oljnata snov, iz katere je izpadla oborina pri sobni temperaturi. Navkljub slabi čistoti smo nadaljevali z naslednjo stopnjo reakcije. Elektrofилno substitucijo je usmerjal elektronski vpliv dušika na mesto 2 oz. 5, saj je bila tako omogočena boljša delokalizacija pozitivnega naboja, kar je resonančno stabiliziralo aromatski sistem (Slika 15).



Slika 15: Mehanizem elektrofилne substitucije na pirolu. Prirejeno po (28).

Kloriranje 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona smo dosegli s počasnim dodajanjem reaktivnega sulfuril klorida na ledeni kopeli v inertni argonovi atmosferi. Reakcijo smo prekinili z nasičeno raztopino NaHCO_3 , ki je reagirala s prebitnim sulfuril kloridom, hkrati pa nevtralizirala nastajajočo klorovodikovo kislino. Zaradi velike količine nastalega CO_2 ob nevtralizaciji smo reakcijsko zmes pustili mešati 20 min. Nečist produkt, izoliran po ekstrakciji, smo poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo poleg pričakovanega produkta pridobili še stranski trikloriran produkt **11**. Tega smo dobili kot posledico dodatka še enega ekvivalenta sulfuril klorida zaradi domnevne prisotnosti izhodne spojine v reakcijski zmesi glede na kromatogram. Elektrofилno substitucijo je tokrat poleg elektronskega vpliva dušika na mesto 5 usmerjal še elektronegativen 2,2,2-trikloroacetil klorid. Močno elektronegativni substituent na mestu 2 je usmerjal substitucijo na mesto 4. Razmerje substitucij je bilo odvisno od relativnega vpliva obeh usmerjanj in selektivnosti elektrofila. V našem primeru sta bili substituirani mesti 4 in 5.

5.1.5 Katalitsko hidrogeniranje – redukcija nitro skupine do amino skupine

Redukcijo nitro skupine pri spojini do amino skupine smo dosegli s katalitskim hidrogeniranjem. Suspendirani spojini **17** v etanolu smo odstranili zrak s prepihanjem z inertnim argonom, nato pa smo nadaljevali reakcijo v vodikovi atmosferi. Redukcijo je kataliziral 10 % Pd/C, s katerim smo ravnali previdno zaradi tveganja vžiga v stiku z zrakom. Nastajanje produkta smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in po 24 urah mešanja odstranili katalizator s filtriranjem pod znižanim tlakom, etanol pa uparili. Slabši izkoristek reakcije si razlagamo s slabšo topnostjo spojine **17** v etanolu.

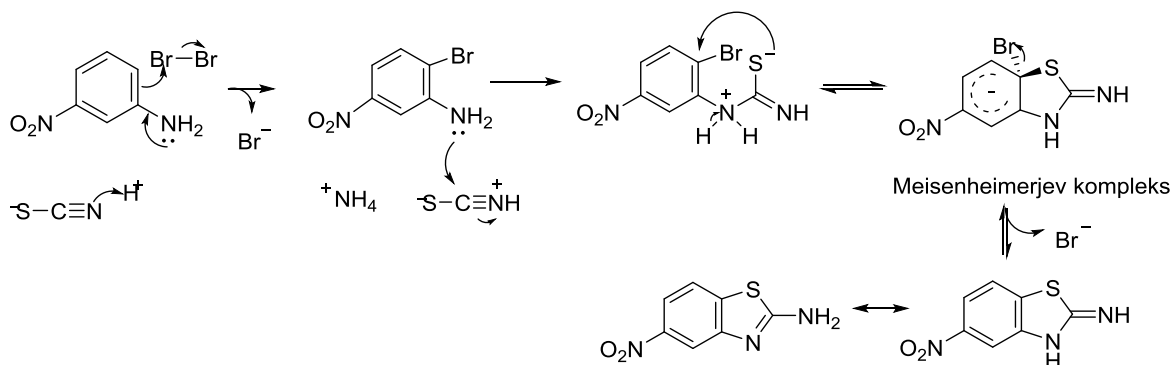
5.1.6 Sinteza 5-substituiranega benzotiazolnega derivata

Poskušali smo sintetizirati podobne benzotiazolne derivate s substitucijo na mestu 5. Za pridobitev osnovnega benzotiazolnega skeleta smo raztopili amonijev tiocianat in 3-nitroanilin v ledocetu in po kapljicah dodajali raztopino broma v ledocetu. Brom se veže na aromatski obroč na mesto 6 preko mehanizma elektrofilne aromatske substitucije. Amino skupina močno usmerja vezavo na *orto* mesto in mesto 6 je sterično najmanj ovirano za potek reakcije. Zaradi usmerjanja nitro skupine na mesto 5 (*meta* položaj) in posledično drugačne sledeče ciklizacije smo za boljšo selektivnost reakcijski zmesi počasi po kapljicah dodajali raztopino broma in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel. Ker se ledocet strdi že pri $T_{\text{tališča}} = 16,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo bučko sproti postavljali na sobno temperaturo in jo tik pred dodatkom naslednjih kapljic raztopine broma postavili nazaj na ledeno kopel. Sočasno prosta amino skupina je napadla elektrofilni ogljik amonijevega tiocianata (Slika 16). Ledocet je kot polarno protično topilo omogočal še dodatno povečanje elektrofilnosti tiocianata. Tiolna skupina je nato kot močen nukleofil napadla aromatski ogljik mesta 6 z nizko elektronsko gostoto¹⁹. Potekla je ciklizacija in nastal je t. i. Meissenheimerjev kompleks. Po 16 urah mešanja smo reakcijski zmesi dodali vodo, segreli na 85 °C in jo vroče prefiltrirali s presesavanjem. S pomočjo TLC-kromatograma smo ugotovili prisotnost produkta v preostali oborini, zato smo ponovili spiranje z očetno kislino, segrevanje in vroče filtriranje. V netopni oborini so bile nečistoče (amonijev tiocianat, vmesni produkt – neciklizirana spojina, ki se ne raztaplja v vodi²⁰). Zbrane matičnice smo naalkalili in deprotonirali 2-amino-5-nitrobenzotiazol z raztopino amonijaka, da je izpadel iz vodne raztopine. Da smo povečali izkoristek, smo naalkaljene raztopine ekstrahirali še z

¹⁹Nitro skupina močno privlači elektrone in resonančno stabilizira negativni naboj (negativen induktivni efekt). Najbolj elektronsko podhranjeno mesto je mesto 6, ki je v *para* položaju glede na nitro skupino.

²⁰ Polarna protična topila (v našem primeru ledocet) stabilizirajo negativni naboj nuklofila (tiolna skupina) s tvorbo solvatacijskega plašča. Tako upočasnjujejo nukleofilni napad na močno elektrofilen ogljik.

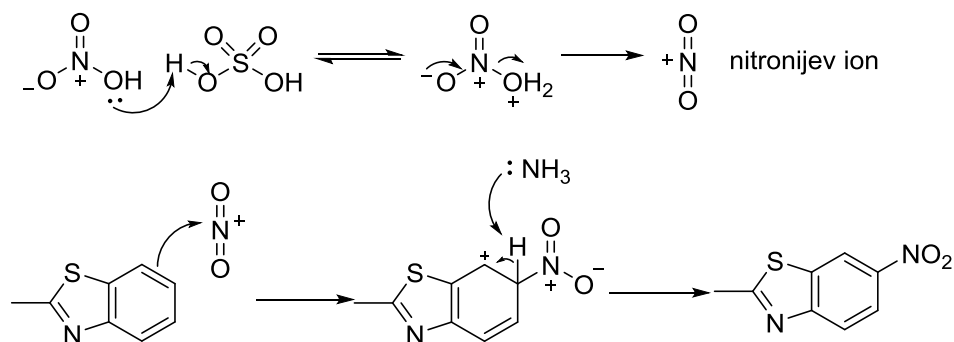
DKM, v katerega je deloma prehajal naš produkt. Zaradi pomanjkljive čistote smo produkt dodatno čistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 16: Mehanizem ciklizacije spojine 23. Prirejeno po (28).

5.1.7 Nitriranje benzotiazolnega obroča

Pri tej reakciji smo uvajali nitro skupino na mestu 6 benzotiazolnega obroča. Elektrofилna substitucija nitro skupine na aromatski sistem poteka v treh stopnjah. Zaradi eksotermne narave reakcije smo počasi dodajali HNO_3 v raztopino benzotiazolnega derivata v H_2SO_4 na ledeni kopeli. V prvi stopnji je koncentrirana H_2SO_4 protonirala dušikovo(V) kislino in nastal je zelo reaktiven nitronijev ion NO_2^+ . Ta stopnja je najpočasnejša in določa hitrost reakcije. Sledila je reakcija z aromatskim sistemom in nato deprotonacija aromatskega obroča (Slika 17).



Slika 17: Mehanizem nitriranja aromatskega obroča. Prirejeno po (29).

Produkt smo izolirali z zlitjem reakcijske zmesi na led, pri čemer je izpadla bela oborina. Naalkalili smo jo z vodno raztopino amonijaka do $\text{pH} = 10$ oz. do pojava oranžne oborine. Zaradi nečistega produkta smo nadaljevali s kristalizacijo z EA, ki je bila prav tako

neuspešna. Suspenzijo smo vroče prefiltrirali in kristalizirali z etanolom, s čimer smo dobili bele igličaste kristale.

5.1.8 Komentar neuspešnih sintez

5.1.8.1 N-aciliranje 2-amino-benzotiazolnih derivatov s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC, HOBt in NMM

Sintezo potencialnih benzotiazolnih zaviralcev smo pričeli s tvorbo amidne vezi med 2-amino-benzotiazolnimi derivati in derivati 1*H*-pirola-2-karboksilne kisline s sklopitvenimi reagenti. Uporabili smo enak postopek sinteze in izolacije kot pri sklapljanju aromatske karboksilne kisline z derivati glicina. Dobili smo zmes spojin, ki smo jo poskusili očistiti s kristalizacijo s kombinacijo topil diklorometan/kloroform oz. kolonsko kromatografijo, vendar neuspešno. NMR je potrdil prisotnost mnogih nečistoč, med drugim prisotnost intermediata aktiviranega estra s HOBt. Nižja reaktivnost je posledica manj elektrofilnega karbonilnega ogljika aktiviranega estra s HOBt glede na karbonilni ogljik 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona.

5.1.8.2 Redukcija 2-amino-5-nitrobenzotiazola

Za nadaljnje N-aciliranje benzotiazolnega obroča na mestu 5 smo morali reducirati nitro skupino v amino skupino. Najprej smo preizkusili metodo katalitskega hidrogeniranja, pri kateri smo najprej z argonom izgnali zrak iz raztopine 2-amino-5-nitrobenzotiazola v etanolu, nato pa previdno dodali katalizator Pd/C in prepihovali z vodikom. Tudi po daljšem mešanju ni bilo opaznih sprememb na TLC-kromatogramu, po izolaciji pa je NMR potrdil prisotnost izhodne spojine. Poskušali smo tudi z redukcijo s kositrovim kloridom. Že po 45 minutah smo opazili spremembo barve reakcijske zmesi iz rdeče v rumeno. S tankoplastno kromatografijo smo potrdili prisotnost produkta poleg mnogih nečistoč. Produkt smo poskušali izolirati z ekstrakcijo. Z dodatkom 1 M vodne raztopine NaOH smo produkt pretvorili v neionizirano obliko in omogočili prehod v organsko fazo EA oz. DKM pri nadaljnji ekstrakciji. Ekstrakcijo smo večkrat ponovili, tudi z vročim topilom, vendar smo dobili malo nečistega produkta, ki pa se ni uspešno ločil pri kolonski kromatografiji. Med glavnimi vzroki za neuspelo reakcijo je predvsem slaba topnost izhodne nitro spojine in amina po reakciji v organskih topilih.

5.1.8.3 Oksidacija metilne skupine do karboksilne kisline

Oksidacijo metilne skupine smo poskusili doseči z dodatkom oksidanta KMnO_4 v vodni raztopini spojine **27** na oljni kopeli pri $105\text{ }^\circ\text{C}$. Oksidant smo v enaki količini dodali še po 2 urah. Zmes se je obarvala črno in se po mešanju zgostila. Razredčeno zmes smo prefiltrirali preko diatomejske prsti. NMR ni potrdil prisotnosti pričakovane spojine.

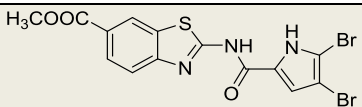
5.2 Rezultati biokemijskih testiranj

5.2.1 Zaviralna jakost končnih spojin na DNA-girazi in topoizomerazi IV

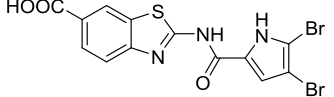
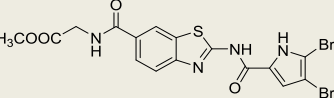
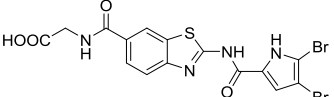
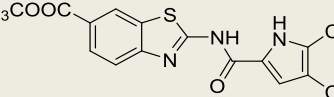
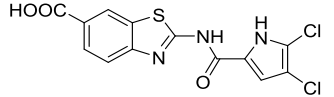
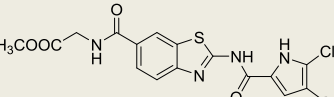
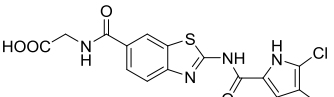
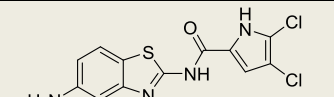
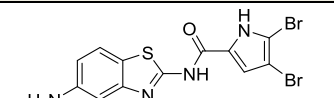
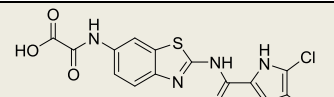
Deset sintetiziranih končnih spojin (**3**, **4**, **6**, **7**, **1**, **13**, **14**, **15**, **25** in **26**) smo testirali na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Merili smo zaviranje aktivnosti encima pri koncentracijah spojin $10\text{ }\mu\text{M}$, $1\text{ }\mu\text{M}$ in $0,1\text{ }\mu\text{M}$ ²¹ ter določili srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}) (Preglednica 1). Srednja zaviralna koncentracija je koncentracija zaviralca, pri kateri je aktivnost encima 50 % glede na aktivnost encima v odsotnosti zaviralca. Rezultati so podani kot rezidualna aktivnost encima (RA), ki nam pove, kakšna je preostala aktivnost encima v stiku z zaviralcem pri določeni koncentraciji. Nižja kot je rezidualna aktivnost encima, večji je zaviralni učinek zaviralca. Pri $\text{RA} = 100\text{ }\%$ je encim popolnoma aktiven in zaviralec ni aktiven oz. ni prisoten, medtem ko je pri $\text{RA} = 0\text{ }\%$ funkcionalnost encima popolnoma zavrta.

Zaviralno jakost najbolj aktivnih spojin na DNA-girazi iz *E. coli* smo določili tudi na DNA-girazi iz bakterije *S. aureus*, preverili pa smo tudi rezidualno aktivnost topoizomeraze IV iz teh dveh sevov bakterij (Preglednica 2).

Preglednica 1: Zaviralna jakost spojin, testiranih na DNA-girazi iz bakterije *E. coli*, izražena kot rezidualna aktivnost encima (RA) pri koncentracijah $10\text{ }\mu\text{M}$, $1\text{ }\mu\text{M}$ in $0,1\text{ }\mu\text{M}$ ter vrednosti IC_{50} .

Spojina	Strukturna formula spojine	RA ($10\text{ }\mu\text{M}$) [%]	RA ($1\text{ }\mu\text{M}$) [%]	RA ($0,1\text{ }\mu\text{M}$) [%]	IC_{50} [μM]
3		58	92	/	~ 10

²¹ Rezidualne aktivnosti DNA-giraze niso opazovali pri vseh spojinah s koncentracijo $0,1\text{ }\mu\text{M}$, temveč le pri tistih, ki so se izkazale kot boljši zaviralci encima pri višjih koncentracijah.

<u>4</u>		8	2	1	0,005
<u>6</u>		5	4	23	0,038
<u>7</u>		7	8	0	0,01
<u>12</u>		86	100	/	/
<u>13</u>		5	3	0	0,019
<u>14</u>		4	7	24	0,037
<u>15</u>		3	3	4	0,017
<u>25</u>		79	95	/	/
<u>26</u>		39	79	/	~ 5
<u>21</u>		/	/	/	0,087

Preglednica 2: Zaviralna jakost spojin 4, 13, 7 in 15 na DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*, izražena kot IC₅₀ [μM] oz. RA pri koncentraciji spojine 10 μM [%].

Spojina	DNA-giraza IC ₅₀ [μM] ali RA pri 10 μM [%]		Topoizomeraza IV IC ₅₀ [μM] ali RA pri 10 μM [%]	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<u>4</u>	0,005 μM	1,75 μM	24 %	4 %
<u>7</u>	0,010 μM	57 %	3 %	21 %

<u>13</u>	0,019 μ M	^{/22}	20 %	11 %
<u>15</u>	0,017 μ M	72 %	11 %	65 %
<u>21</u>	0,087 μ M	0,51 μ M	1,8 μ M	1,7 μ M

Iz rezultatov lahko opazimo razliko v aktivnosti spojin z enako substitucijo benztiazolnega skeleta na mestu 5 oz. 6, ki se razlikujejo v pirolamidnem substituentu na mestu 2. 4,5-dibromopirolamidni derivati so močnejši zaviralci kot 4,5-dikloropirolamidni derivati. Razlika je opazna predvsem pri aktivnejših spojinah **4** in **13**, saj se njuni vrednosti IC₅₀ razlikujeta za približno štirikrat. Izjemoma sta rezidualni aktivnosti DNA-giraze pri *E. coli* pri spojinah **6** in **14** podobni kljub razlikam v pirolamidnem derivatu.

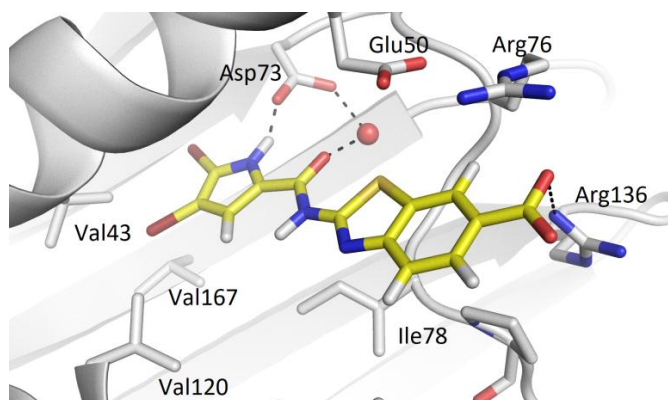
Na jakost zaviranja encima vpliva tudi substituent na mestu 6 benztiazolnega skeleta. Celotno gledano je najboljši zaviralec spojina **4** z najkrajšim substituentom na mestu 6, ki se je izkazala kot močan zaviralec DNA-giraze in topoizomeraze IV iz obeh bakterij. Prosta aromatska karboksilna skupina omogoča najmočnejše interakcije z gvanidinsko skupino aminokislinskih ostankov Arg76 in/ali Arg136. DNA-girazo zavira v nizkih nanomolarnih koncentracijah in je en najmočnejših zaviralcev DNA-giraze pripravljenih na Fakulteti za farmacijo. Po zaviralni jakosti ji sledi spojina **7**. Daljša alifatska veriga sterično zapolni vezavno mesto in zmanjša zaviralno jakost spojine, vseeno pa lahko prosta alifatska karboksilna kislina še tvori interakcije z Arg76 in/ali Arg136, saj je vrednost IC₅₀ še vedno v nizkem nanomolarnem območju. Tudi estri **6** in **14** še vedno ohranita močno inhibicijo DNA-giraze, torej najverjetneje tvorita dodatne vodikove vezi z Arg76 in/ali Arg136, ne pa ionskih vezi, ki so prisotne pri kislinskih derivatih. Nasprotno pa sta se aromatska estri **3** in **12** izkazala kot neaktivna. Večje spremembe v rezidualni aktivnosti zaradi spremenjene dolžine verige na mestu 6 so prisotne pri obeh proteinih pri bakteriji *S. aureus*.

Spojini **3** in **12** izkazujeta najmanjše zaviranje encimske aktivnosti DNA-giraze med pripravljenimi benztiazolnimi derivati. Primerljivo zaviralno jakost imata tudi spojini **25** in **26** s prosto amino skupino na mestu 5 benztiazolnega skeleta.

²² Ni bilo izmerjeno.

Izhodiščne spojine **21** nismo testirali, saj je bila predhodno testirana na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Njena zaviralna jakost je prav tako v nanomolarnem koncentracijskem območju, vendar je slabša glede na zaviralno delovanje preostalih sintetiziranih spojin s substituentom na mestu 6 benzotiazolnega obroča (izjemoma je boljša od spojin **3** in **12**).

Vezavo končnih spojin v vezavno mesto molekule ATP DNA-giraze iz bakterije *E. coli* smo preučevali s pomočjo molekulskega sidranja s programom FRED (OpenEye Software Inc.). Prisotne so vodikove vezi in kation- π interakcije. Neposredno vodikovo vez opazimo med stransko verigo Asp73 in NH skupino pirola. Isti aminokislinski preostanek tvori še dodatno, posredno vodikovo vez s karbonilno skupino pirolamidnega dela spojin preko ulete molekule vode. Med planarnim benzotiazolnim obročem in stransko verigo Arg76 nastanejo kation- π interakcije. To še dodatno okrepi vezavo spojin v hidrofoben žep. Terminalna karboksilna skupina tvori še dodatne vodikove vezi s stransko verigo Arg136 (Slika 19).



Slika 18: Vezava spojine **4** v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije *E. coli* (vodikove vezi so predstavljene s prekinjeno črto).

Pri topoizomerazi IV opazimo podobne trende aktivnosti pri bakteriji *S. aureus*, medtem ko je pri *E. coli* rezidualna aktivnost encima višja pri 4,5-dikloropirolamidnem derivatu spojine **4** in krajših substituentih na mestu 6 (spojini **7** in **15**). Zanimivo bi bilo izvesti testiranja spojin pri nižjih koncentracijah, kar bi nam razjasnilo ta pojav.

Iz rezultatov je razvidno, da je večina testiranih spojin dokaj dobrih zaviralcev DNA-giraze, saj zavirajo obravnavana proteina v nizkem mikromolarnem in nanomolarnem koncentracijskem območju. Spojine so najmanj aktivne na DNA-girazi iz *S. aureus*,

medtem ko sta spojini **4** in **13** na topoizomerazi IV iz bakterije *S. aureus* izkazali boljšo zaviralno aktivnost. Vendar nam realnejšo uporabnost preučevanih spojin osvetlijo testiranja protibakterijskega delovanja teh zaviralcev.

5.2.2 Protibakterijsko delovanje

Vsem sintetiziranim spojinam smo določali zaviranje rasti pri po Gramu pozitivnih bakterijah *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. faecium* ter po Gramu negativnih bakterijah *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. coli* in še dveh mutiranih sevih *E. coli* (Preglednica 3). Mutirani sev *E. coli* z izbitim genom *tolC* ima okvarjeno izlivno črpalko, medtem ko ima sev z izbitim genom *lpxC* bolj prepustno membrano zaradi okvarjene biosinteze lipida A.

Preglednica 3: Protibakterijsko delovanje sintetiziranih spojin pri koncentraciji 50 μ M po 24-ih urah. Rezultati so podani kot odstotek zaviranja rasti bakterij v primerjavi z minimalno zaviralno koncentracijo pozitivne kontrole, ciprofloksacina.

Spojina	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli tolC</i>	<i>E. coli lpxC</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>
<u>3</u>	0	73	17	0	2	5	3	10	14	7
<u>4</u>	55	100	97	9	100	14	10	4	7	6
<u>6</u>	1	70	16	12	36	10	5	0	2	2
<u>7</u>	0	61	0	0	0	6	8	3	1	1
<u>12</u>	0	60	16	0	0	13	1	13	17	8
<u>13</u>	17	100	100	2	100	10	0	9	15	6
<u>14</u>	2	66	0	2	3	5	9	0	5	0
<u>15</u>	0	65	0	0	0	6	14	4	9	3
<u>25</u>	0	0	5	0	7	4	0	6	11	6
<u>26</u>	1	0	0	0	0	0	13	6	10	7
<u>ciprofloksacin</u> (MIC [μM])	1,51	3,02	48,29	0,05	0,02	0,12	3,02	3,62	1,81	0,11

Glede na zgornje rezultate lahko povzamemo, da so sintetizirane spojine aktivnejše na po Gramu pozitivnih bakterijah (predvsem pri *E. faecalis* in *E. faecium*), medtem ko na po Gramu negativnih sevih spojine niso presegle 20 % zaviranja rasti bakterij. Aktivne spojine so zavrle rast mutiranega seva *E. coli* tolC²³ z okvarjeno izlivno črpalko, kar nam potrjuje, da je glavni razlog neučinkovitosti sintetiziranih spojin na po Gramu negativne bakterije črpanje spojin preko izlivnih črpalk iz bakterijske celice. Rasti seva *E. coli* lpxC niso učinkovito zavirale, kar pomeni, da imajo spojine primerne fizikalno-kemijske lastnosti za vstop v bakterijsko celico preko celične stene.

Najmočnejše protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim bakterijam sta izkazali spojini **4** in **13**. Spojini najbolj zavirata rast bakterij *E. faecalis* (obe spojini 100 % zavreta rast) in *E. faecium* (spojina **4** 97 % zavre rast bakterije, medtem ko jo spojina **13** popolnoma zavre). Rast *E. faecalis* delno zavirajo tudi preostale testirane spojine, razen spojini **25** in **26**, ki aktivnosti nista pokazali niti na testiranjih na DNA-girazi. Rast bakterije *S. aureus* delno zavira le spojina **4**, ki je izkazala že večjo aktivnost pri testiranju na DNA-girazi in topoizomerazi IV iz *S. aureus*. Sklepamo, da spojina **4** najverjetneje zavira rast *S. aureus* preko zaviranja DNA-giraze in topoizomeraze IV.

Najučinkovitejšim zaviralcem smo določili še minimalno zaviralno koncentracijo (MIC). To je koncentracija spojine, ki vsaj 90 % zavre rast mikroorganizmov. Testiranje je potekalo v koncentracijskem območju 0,78–75 µM na *E. faecalis*, *E. faecium* in mutiranem sevu *E. coli* tolC. Za pozitivno kontrolo so uporabili različne koncentracije ciprofloksacina raztopljenega v DMSO.

Preglednica 4: Minimalne zaviralne koncentracije (MIC) [µM] pri najaktivnejših spojinah pri primarnem testiranju zavrtja bakterijske rasti.

Spojina	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i> tolC
4	6,25	6,25	3,13
13	25,00	/	6,25
ciprofloksacin	3,02	48,29	0,015

Za spojino **4** smo pri obeh po Gramu pozitivnih bakterijah določili enak MIC – 6,25 µM (Preglednica 4), kar potrjuje dobro zaviralno aktivnost spojine proti tem bakterijam. Na *E.*

²³ Splošno najaktivnejši spojini **4** in **13** sta popolnoma zavrli rast mutiranega seva *E. coli* tolC.

faecalis smo testirali še 4,5-dikloropirrolamidni derivat spojine **4**, spojino **13**, za katero smo določili višjo vrednost MIC, vendar še vedno v nizkem mikromolarnem območju. Vrednosti MIC pri sevu *E. coli* z okvarjeno izlivno črpalko sta nizki, kar spet nakazuje neučinkovitost spojin zaradi izlivnih črpalk pri divjem sevu *E. coli*.

5.2.3 Protivirusno delovanje

Desetim končnim spojinam (**3**, **4**, **6**, **7**, **1**, **13**, **14**, **15**, **25** in **26**) smo določili tudi protivirusno delovanje in citotoksičnost. Splošni pregled testiranja je predstavljen v preglednici 5. Aktivnost spojin je izražena kot srednja učinkovita koncentracija (EC₅₀), določena preko opazovanja citopatoloških morfoloških sprememb pod mikroskopom in MTS-testa. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, smo preverili citotoksičnost spojin. Rezultati so podani kot srednja citotoksična koncentracija (CC₅₀) in kot minimalna citotoksična koncentracija (MCC). Pri CC₅₀ določamo metabolno aktivnost celic preko MTS-testa, medtem ko MCC predstavlja koncentracijo spojine, pri kateri zaznamo morfološke celične spremembe pod mikroskopom.

Preglednica 5: Rezultati protivirusnega delovanja sintetiziranih spojin (/: spojina ne izkazuje niti citotoksičnosti niti protivirusne aktivnosti; x: spojina izkazuje citotoksičnost na izbrani celični liniji; ⊕ : spojina je aktivna in ni citotoksična).

Virus/spojina	celična linija	3	4	6	7	12	13	14	15	25	26
herpes simpleks virus-1 (KOS)	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
herpes simpleks virus-2 (G)	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
herpes simpleks virus-1 (TK ⁻ KOS ACV)	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus vakcinija	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
adenovirus-2	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
humani koronavirus (229E)	HEL	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus vezikularnega stomatitisa	HeLa	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus kokseki B4	HeLa	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
SARS	HeLa	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus para-influence-3	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

reovirus-1	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus Sindbis	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus kokseki B4	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus Punta Toro	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus rumene mrzlice	VERO	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
virus influence A (H1N1)	MDCK	⊕	x	⊕	x	⊕	x	⊕	x	x	x
virus influence A (H3N2)	MDCK	⊕	x	⊕	x	⊕	x	⊕	x	x	x
virus influence B	MDCK	⊕	x	⊕	x	⊕	x	⊕	x	x	x

Spojine niso izkazale zaviralne aktivnosti proti večini virusom, razen pri virusu influence tipa A in B, podobno kot izhodiščna spojina **21**. Pri spojinah z izkazano zaviralno aktivnostjo proti virusu smo test ponovili. Vrednosti EC₅₀ so se večinoma razlikovale, zato smo predstavili rezultate v obliki povprečnih vrednosti s standardno deviacijo (preglednica 6). Spojine niso izkazale citotoksičnosti na celičnih linijah v koncentracijskem intervalu 0–100 µM, z izjemo spojin **4**, **7**, **13**, **15** in **25** na celičnih linijah MDCK pri virusih gripe. Te spojine niso izkazovale delovanja proti virusom influence.

Preglednica 6: Protivirusno delovanje sintetiziranih spojin in učinkovin v terapiji proti virusom gripe A (seva H1N1 in H3N2) in virusom gripe tipa B. Rezultati so podani kot CC₅₀ [μM], MCC [μM] oz. EC₅₀ [μM] (kot povprečna EC₅₀ [μM] in standardna deviacija).

Spojina	citotoksičnost		protivirusna EC ₅₀					
	CC ₅₀ [μM]	minimalna citotoksična koncentracija [μM]	influenca A/H1N1 A/Ned/378/05		influenca A/H3N2 A/HK/7/87		influenca B B/Ned/537/05	
			CPE ocena [μM]	MTS [μM]	CPE ocena [μM]	MTS [μM]	CPE ocena [μM]	MTS [μM]
<u>3</u>	>100	≥100	39 ± 16	27 ± 13	48 ± 14	30 ± 16	27 ± 10	14 ± 7
<u>4</u>	37,5	20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<u>6</u>	>100	>100	36 ± 3	28,7 ± 1	46 ± 17	24 ± 17	64 ± 51	36 ± 22
<u>7</u>	80,6	≥20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<u>12</u>	>100	≥100	28 ± 23	23 ± 7	48 ± 4	41 ± 4	23 ± 16	19 ± 3
<u>13</u>	33,2	20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<u>14</u>	>100	>100	39 ± 27	31 ± 7	45 ± 0	46 ± 14	34 ± 35	27 ± 24
<u>15</u>	>100	≥20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<u>25</u>	>100	20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<u>26</u>	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
oseltamivir karboksilat	>100	>100	8,9	8,5	>100	>100	10	9,4
ribavirin	>100	≥100	10	10	10	10	6,8	2,6
amantadin	>100	>100	10	9,5	9	7,7	>100	>100
rimantadin	>200	>200	3,5	3,4	0,8	0,4	>200	>200

Iz zgornjih rezultatov je razvidno, da so protivirusno delovanje zoper sevom virusa gripe izkazale spojine **3**, **6**, **12** in **14**. Vsem aktivnim spojinam je skupna estrska skupina na mestu 6 benzotiazolnega obroča. Povprečne vrednosti EC_{50} so namreč podobne, medtem ko posamezni EC_{50} spojine **3** pa močno variirata²⁴. Potrebovali bi večje število testiranj za izračun bolj točne EC_{50} . Opazen je tudi vpliv halogena na pirolamidnem delu. 4,5-dibromopirolamidni derivati kažejo večjo protivirusno aktivnost pri večini preučevanih sevov. 4,5-dikloropirolamidni derivat se je izkazal le pri parih spojin **3** in **12** pri sevu H1N1 ter **6** in **14** pri virusu gripe tipa B.

Največjo zaviralno aktivnost imajo spojine proti virusu gripe tipa B, najmanjšo pa proti sevu H3N2 virusa gripe tipa A. Celotno gledano ima spojina **12** s kratkim substituentom na mestu 6 in 4,5-dikloropirolamidnim delom največjo protivirusno aktivnost. Če primerjamo rezultate naših spojin s protivirusnimi učinkovinami v terapiji, so spojine slabši zaviralci.

Testiranje vezave na Hsp90 ni bilo pravočasno izvedeno, zato ne moremo predpostavljati mehanizma protivirusnega delovanja sintetiziranih spojin.

²⁴ Problem razpršenosti podatkov je predvsem opazen pri vrednostih EC_{50} , pridobljenih iz opazovanja CPE pod mikroskopom. Zato smo rezultate primerjali predvsem preko EC_{50} iz MTS-testiranja.

6 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali različne derivate *N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida kot zaviralce Hsp90 in DNA-giraze, ki se razlikujejo v substituentu na mestu 6 oz. 5. Pri načrtovanju smo izhajali iz spojine **21**, ki se je že predhodno izkazala kot zaviralec DNA-giraze in kot spojina, ki se veže na Hsp90 in izkazuje protivirusno delovanje proti virusom gripe. Končnim spojinam smo določali zaviranje delovanja DNA-giraze, njihovo protibakterijsko in protivirusno delovanje.

Pri testiranju na DNA-girazi iz *E. coli* se je najbolje izkazala spojina **4** s prosto aromatsko karboksilno kislino na mestu 6 in 4,5-dibromopirrolamidnim substituentom na mestu 2. DNA-girazo je namreč zavrta v nizkem nanomolarnem koncentracijskem območju. Tudi preostale spojine so izkazale zaviralno aktivnost v nanomolarnih oz. nizkih mikromolarnih koncentracijah. Najbolj ključna za vezavo je prosta karboksilna kislina, ki tvori interakcije z aminokislinskima ostankoma Arg76 in/ali Arg136. S tvorbo estra karboksilne kisline in daljšanjem alifatske verige na mestu 6 zaviralna jakost spojin pada. Spojina **4** močno zavira DNA-girazo iz bakterije *S. aureus* in topoizomerozo IV obeh omenjenih bakterij.

Spojinam smo preverili še protibakterijsko aktivnost. Najboljše protibakterijsko delovanje sta izkazali spojina **4** in njen dikloropirrolamidni analog, spojina **13**. Obe sta močno zavirali DNA-girazo iz *E. coli*, delovanje na DNA-girazo iz *S. aureus* in topoizomerozo IV pa je bilo šibkejše. Kljub temu sta zavirali po Gramu pozitivne bakterije, vendar nista zavirali rasti po Gramu negativne bakterije *E. coli*. Tu opazimo pomen ostalih faktorjev, ki vplivajo na protibakterijsko aktivnost poleg vezave spojine v vezavno mesto proteina, npr. fizikalno-kemijske lastnosti spojine, ki vplivajo na raztapljanje in permeabilnost spojin ter sposobnost izogibanja bakterijskim mehanizmom odpornosti proti njihovim zaviralcem. Razlog neučinkovitosti testiranih spojin je najverjetneje črpanje spojin iz bakterijske celice preko izlivnih črpalk, kar smo potrdili z zaviranjem rasti mutiranega seva *E. coli* z okvarjeno izlivno črpalko pod vplivom spojin **4** in **13**.

Rezultati protivirusne aktivnosti končnih spojin so pokazali, da so le spojine z estrsko skupino na mestu 6 benzotiazolnega obroča (spojine **3**, **6**, **12** in **14**) aktivne proti virusom gripe tipa A (H1N1 in H3N2) in tipa B. Najboljšo aktivnost je izkazala spojina **12** s krajšim substituentom na mestu 6 in 4,5-dikloropirrolamidno skupino na mestu 2.

Mehanizma delovanja ne moremo predpostavljati zaradi nedokončanega testiranja na Hsp90 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih.

Z aktivnimi spojinami **4** in **13** smo odprli nove možnosti optimizacije benzotiazolnih zaviralcev DNA-giraze. Predvidevamo, da je potrebno izboljšati tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin, da lahko preidejo do ciljane tarče ter načrtovati spojine, ki ne bi bili substrati izlivnih črpalk. Tako bi razširili spekter delovanja obravnavanih potencialnih zaviralcev DNA-giraze. Zanimivo pa bi bilo tudi natančneje raziskati mehanizem protivirusnega delovanja proti virusom gripe.

7 LITERATURA

1. Méthot P-O, Alizon S: What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 2014; 5(8): 775–85.
2. <http://www.who.int/csr/disease/epidemic-focus/global-epidemic-response/en/>, dostopano dne 1.5.2017.
3. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 6th edition, Philadelphia, 2008: 1028–31.
4. <http://www.cambridgemedicine.org/hamilton2016>, dostopano dne 1.5.2017.
5. Theuretzbacher U: Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013; 1(2): 63–9.
6. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451 (7181): 990–3.
7. <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2014/541340/abs/>, dostopano 11.5.2017.
8. Geller R, Taguwa S, Frydman J: Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823(3): 698–706.
9. Carrat F, Flahault A: Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25(39–40): 6852–62
10. Velthuis A, Fodor E: Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology* 2016; 14(8): 479–93.
11. Du J, Cross TA, Zhou H-X: Recent progress in structure-based anti-influenza drug design. *Drug Discovery Today* 2012; 17(19–20): 1111–20.
12. Chase G, Deng T, Fodor E, Leung B W, Mayer, D, Schemmle M, Brownlee G: Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture. *Virology* 2008; 377(2):431–9.
13. P.D. Nagy, R.Y. Wang, J. Pogany, A. Hafren, K. Makinen, Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 2011; 411(2): 374–382.
14. Naito T, Momose F, Kawaguchi A, Nagata K: Involvement of Hsp90 in Assembly and Nuclear Import of Influenza Virus RNA Polymerase Subunits. *Journal of Virology* 2007; 81(3):1339–49.

15. Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K: Identification of Hsp90 as a Stimulatory Host Factor Involved in Influenza Virus RNA Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(47): 45306–14.
16. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S: HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Cell Biology* 2010; 11(7): 515–28.
17. Butler LM, Ferraldeschi R, Armstrong HK, Centenera MM, Workam P: Maximizing the Therapeutic Potential of Hsp90 Inhibitors. *Molecular Cancer Research* 2015; 13(11): 1445–1451.
18. Bhat R, Tummalapalli SR, Rotella DP: Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57(21): 8718–28.
19. Pearl LH: Review: The Hsp90 Molecular Chaperone – An Enigmatic ATP-ase. *Biopolymers* 2016; 105(8): 594–607.
20. Prodromou C: Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochemical Journal*. 2016; 473(16): 2439–52.
21. Connor JH, McKenzie MO, Parks GD, Lyles DS: Antiviral Activity and RNA Polymerase Degradation Following Hsp90 Inhibition in a Range of Negative Strand Viruses. *Virology* 2007; 36 (1): 109–19.
22. Burlison JA, Neckers L, Smith AB, Maxwell A, Blagg BS. Novobiocin: Redesigning a DNA Gyrase Inhibitor for Selective Inhibition of Hsp90. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128(48): 1529–36.
23. Dutta R, Inouye M.: Review: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2000; 25(1): 24–8.
24. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology* 2011; 92(3): 479–97.
25. Tomašič T, Mašič P. L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14(1): 130–51.
26. Gjorgjieva M, Tomašič T, Barančokova M, Katsamakas S, Ilaš J, Tammela P, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of Benzothiazole Scaffold-Based DNA-Gyrase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 59(19): 8941–54.

27. Gubvaev A, Klostermeier D: DNA-induced narrowing of the gyrase N-gate coordinates T-segment capture and strand passage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(34):14085–90.
28. Tišler M. *Organska kemija*, 2. Izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2013: 239–43, 281–83, 303–5.
29. Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P. *Organic chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001, 552.
30. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2875#header>, dostopano dne 24.8.2017.