

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KOVAČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA PIROLAMIDNIH
ZAVIRALCEV PROTEINA TOPLOTNEGA
ŠOKA 90 (Hsp90) IN DNA-GIRAZE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LIDIJA KOVAČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA PIROLAMIDNIH
ZAVIRALCEV PROTEINA TOPLOTNEGA
ŠOKA 90 (Hsp90) IN DNA-GIRAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF PYRROLAMIDE
INHIBITORS OF HEAT SHOCK PROTEIN 90
(Hsp90) AND DNA GYRASE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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.

Encimska testiranja so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Centre for Drug Research, Fakultete za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vso strokovno pomoč, prijaznost, potrpežljivost in podarjeno znanje pri izdelavi magistrske naloge.

Velika zahvala gre tudi družini za spodbudo, podporo in razumevanje med pisanjem magistrske naloge in tekom študija.

Izjava

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

Lidija Kovač

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	ii
KAZALO SLIK.....	v
KAZALO SHEM.....	vi
KAZALO TABEL.....	vi
POVZETEK	vii
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV	ix
1 UVOD	1
1.1 HEPATITIS C.....	1
1.2 VIRUS HEPATITISA C.....	2
1.3 GHKL NADDRUŽINA ATPaz.....	4
1.4 Hsp90.....	5
1.4.1 Struktura Hsp90.....	5
1.4.2 Interakcije Hsp90 z reprodukcijskim ciklom virusa hepatitisa C.....	6
1.5 ZDRAVLJENJE OKUŽBE S HCV	7
1.6 PROTIBAKTERIJSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE	8
1.7 TOPOIZOMERAZE	9
1.7.1 DNA-GIRAZA in TOPOIZOMERAZA IV	10
1.8 ATP-VEZAVNO MESTO DNA-GIRAZE	12
1.9 ATP-VEZAVNO MESTO Hsp90	13
1.10 MOLEKULSKO MODELIRANJE.....	14
2 NAČRT DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	19

3.1	PROGRAMSKA OPREMA	19
3.2	MATERIALI	19
3.3	KROMATOGRAFSKE METODE	19
3.3.1	Tankoplastna kromatografija (TLC).....	19
3.3.2	»Flash« kolonska kromatografija	19
3.3.3	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC	19
3.4	SPEKTROSKOPSKE METODE	20
3.4.1	Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	20
3.4.2	Masna spektrometrija (MS).....	20
3.5	DOLOČEVANJE TALIŠČA.....	20
3.6	DOLOČANJE OPTIČNE SUČNOSTI	20
3.7	BIOKEMIJSKA TESTIRANJA	21
4	EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1	Sinteza (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo [d]thiazol-6-yl)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamide.....	23
4.2	Sinteza <i>tert</i> -butyl (S)-(2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-2-oxoethyl)carbamate	24
4.3	Sinteza <i>tert</i> -butyl (S)-(3-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-3-oxopropyl)carbamate	25
4.4	Sinteza (S)-2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-2-oxoethan-1-amonijevega klorida.....	26
4.5	Sinteza (S)-3-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-3-oxopropan-1-amonijevega klorida	27
4.6	Sinteza (S)-N-(6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)nicotinamide	28
4.7	Sinteza 3-((<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino)benzoic acid.....	29
4.8	Sinteza <i>tert</i> -butyl (S)-(3-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-carboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)phenyl)carbamate.....	30

4.9	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)izonikotinamida.....	31
4.10	Sinteza (<i>S</i>)-3-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)benzenamonijevega klorida.....	32
4.11	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(4-(2-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata.....	33
4.12	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksamida.....	34
4.13	Sinteza acetilglicina.....	35
4.14	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-acetamidoacetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	35
4.15	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-(2-(2-aminotiazol-4-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	36
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	37
5.1	KOMENTAR SINTEZE.....	37
5.1.1	Reakcija sklopitve pri tvorbi amidne vezi.....	37
5.1.2	Uvedba karbamatne zaščitne skupine.....	38
5.1.3	Uvedba acetilne skupine naaminsko skupino glicina.....	39
5.1.4	Odščita karbamatne zaščitne skupine z reakcijo acidolize.....	40
5.1.5	Alkalna hidroliza.....	41
5.2	REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ.....	42
5.2.1	Rezultati bioloških testiranj za DNA-girazo.....	42
5.2.2	Rezultati določanja protibakterijske aktivnosti spojin.....	48
5.2.3	Rezultati bioloških testiranj za Hsp90.....	51
6	SKLEP.....	57
7	LITERATURA.....	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Potek okužbe z virusom hepatitisa C	1
Slika 2: Prikaz genoma HCV in nastanka zrelih proteinov	3
Slika 3: Shematski prikaz pomembnih elementov Bergeratov-ega vzorca zvitja	4
Slika 4: Prikaz odprte in zaprte konformacijske oblike Hsp90.	5
Slika 5: Prikaz konformacijskega cikla Hsp90.....	6
Slika 6: Prikaz učinkovin, ki delujejo na različne tarče v bakterijski celici	8
Slika 7: Prikaz različnih mehanizmov bakterijske rezistence	9
Slika 8: Katalitični cikel DNA-giraze	11
Slika 9: Kristalna struktura: a) GyrB ₂ iz bakterije <i>E. coli</i> v kompleksu z ADPNP in b) GyrA ₂ iz bakterije <i>E. coli</i> v kompleksu s simociklinonom D8	11
Slika 10: Shematski prikaz interakcij med molekulo ATP in ATP-vezavnim mestom DNA-giraze iz bakterije <i>Escherichia coli</i>	13
Slika 11: Predvidena vezava spojine TTM-07 v vezavnem mestu Hsp90	15
Slika 12: Prikaz predlaganih strukturnih sprememb na spojnini TTM-07	16
Slika 13: Prikaz vezave spojine TTM-07 v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze iz bakterije <i>E. coli</i>	46
Slika 14: Prekrivanje kristalnih struktur DNA-giraze iz <i>E. coli</i> , DNA-giraze iz <i>S. aureus</i> , topoizomeraze IV iz <i>E. coli</i> in topoizomeraze IV iz <i>S. aureus</i>	48
Slika 15: Predvidena vezava spojine 5 v ATP-vezavnem mestu Hsp90 - 1.....	54
Slika 16: Predvidena vezava spojine 5 v ATP-vezavnem mestu za Hsp90 - 2.....	54
Slika 17: Shematski prikaz vezave spojine 5 v ATP-vezavnem mestu za Hsp90 glede na sidranje s programom FlexX.	55

KAZALO SHEM

Shema 1: Reagenti in pogoji za sintezo izhodne spojine 2.....	16
Shema 2: Reagenti in pogoji za sintezo spojin - 1.....	17
Shema 3: Reagenti in pogoji za sintezo spojin - 2.....	18
Shema 4: Prikaz nastanka amidne vezi ob prisotnosti EDC in HOBt.....	38
Shema 5: Prikaz nastanka tetraedričnega intermedjata.	39
Shema 6: Uvedba acetilne skupine na aaminsko skupino glicina.....	40
Shema 7: Priprava plinastega HCl.....	40
Shema 8: Potek odščite Boc zaščitne skupine z acidolizo.....	41
Shema 9: Prikaz poteka mehanizma alkalne hidrolize	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezidualna aktivnost spojin na DNA-girazi iz <i>E. coli</i>	42
Preglednica 2: Vrednosti IC ₅₀ ali rezidualna aktivnost encimov DNA-giraze in topoizomeraze IV iz <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i> za spojine	44
Preglednica 3: Vrednosti IC ₅₀ strukturno podobnih spojin na DNA-girazi in topoizomerazi IV bakterij <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i>	45
Preglednica 4: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij <i>E. faecalis</i> in <i>S. aureus</i>	49
Preglednica 5: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij <i>E. coli</i> in <i>P. aeruginosa</i>	50
Preglednica 6: Rezultati bioloških testiranj na Hsp90 in celični model replikona HCV za končne spojine 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15 in 16	51
Preglednica 7: Rezultati bioloških testiranj na Hsp90 in celični model replikona HCV za izhodno spojino TTM-07	52

POVZETEK

Okužba z virusom hepatitisa C (HCV) predstavlja velik problem v zdravstvu, saj ocenjujejo, da je na svetu z njim okuženih okoli 110 milijonov ljudi. Trenutna terapija s kombinacijo pegiliranega interferona α in ribavirina, ali pa z novejšimi zdravili (kombinacija različnih neposredno delujočih protivirusnih učinkovin (DAAs)) ni uspešna v vseh primerih okužbe z HCV (odvisno od genotipa virusa, stanja jeter...). Poleg tega pa virus zelo hitro razvija rezistenco proti DAAs, zato je pomembno odkrivanje novih tarč za zaviranje virusne replikacije v gostiteljski celici. Za svojo replikacijo HCV uporablja mehanizme gostiteljske celice, med drugim tudi protein toplotnega šoka 90 (Hsp90). V okviru magistrske naloge smo zato načrtovali in sintetizirali nove potencialne zaviralce Hsp90, ki temeljijo na pirolamidni strukturi. Le-ti so bili že predhodno odkriti na Fakulteti za farmacijo v sklopu iskanja zaviralcev bakterijske DNA-giraze. Oba encima spadata v GHKL naddružino ATPaz in imata podobno strukturo ATP-vezavnega mesta. Vsem sintetiziranim spojinam smo zato ovrednotili biološko aktivnost tako na Hsp90, kot tudi na DNA-girazi.

Tekom eksperimentalnega dela magistrske naloge smo sintetizirali dvanajst novih končnih spojin. Izhajali smo iz predhodno sintetizirane spojine (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida, ki ima K_d na Hsp90 v μM območju. Odločili smo se za uvedbo substituentov, ki izkoriščajo dodatne interakcije z Lys58 in Asp102, da bi dosegli močnejšo zaviralno jakost spojin. Možnost tvorbe omenjenih interakcij smo potrdili s pomočjo molekulskega sidranja spojin v ATP-vezavno mesto Hsp90. Pri načrtovanju spojin z molekulskim sidranjem smo bili uspešni, saj smo dobili spojine z boljšimi aktivnostmi in večjo selektivnostjo glede na izhodiščno spojino.

Večina spojin je izkazala tudi zaviralno aktivnost DNA-giraze v μM do nM območju, čeprav smo spojine načrtovali glede na ATP-vezavno mesto Hsp90.

Ključne besede: Hsp90, DNA-giraza, GHKL naddružina ATPaz, protivirusno delovanje, protibakterijsko delovanje.

ABSTRACT

Infection with hepatitis C virus (HCV) represents a major problem in health care, since it is estimated that in the world about 110 million people are infected with this virus. Current therapy, which is a combination of pegylated interferon α and ribavirin, or newer drugs (combination of various direct acting anti-viral agents (DAAs)), is not successful in all cases (depending on genotype of virus, status of liver,...). In addition, virus is rapidly developing resistance to the DAAs, therefore it is necessary to discover new targets for inhibition of viral replication in a host cell. HCV is using host mechanisms for its replication, including the heat shock protein 90 (Hsp90). In the context of the master's thesis, we designed and synthesized new potential Hsp90 inhibitors, based on the pyrrolamide structure. Inhibitors with pyrrolamide structure were previously discovered at the Faculty of pharmacy, University of Ljubljana during the discovery project of novel bacterial DNA gyrase inhibitors. Both enzymes belong to the GHKL superfamily and have similar structure of the ATP-binding site. Therefore, all synthesized compounds have been evaluated for biological activity on both enzymes, Hsp90 and DNA gyrase.

During the experimental work of this master's thesis we synthesized twelve final compounds. We started with the previously synthesized compound (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]thiazol-6-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrol-2-carboxamide, which has a K_d value for Hsp90 in the μM range. We decided to introduce substituents that have potential to interact with Lys58 and Asp102 in order to achieve stronger inhibitory effect of Hsp90. The possibility of formation of already mentioned interactions was confirmed by means of the molecular docking of compounds into the ATP-binding site of Hsp90. We have been successful in design of compounds with molecular docking, as we have obtained compounds with improved activities and greater selectivity with respect to the starting compound.

Most of the final compounds have also been proven to inhibit activity of DNA gyrase in μM to nM range, although the compounds were designed to fit the ATP-binding site of Hsp90.

Key words: Hsp90, DNA gyrase, GHKL ATPase superfamily, antiviral, antibacterial.

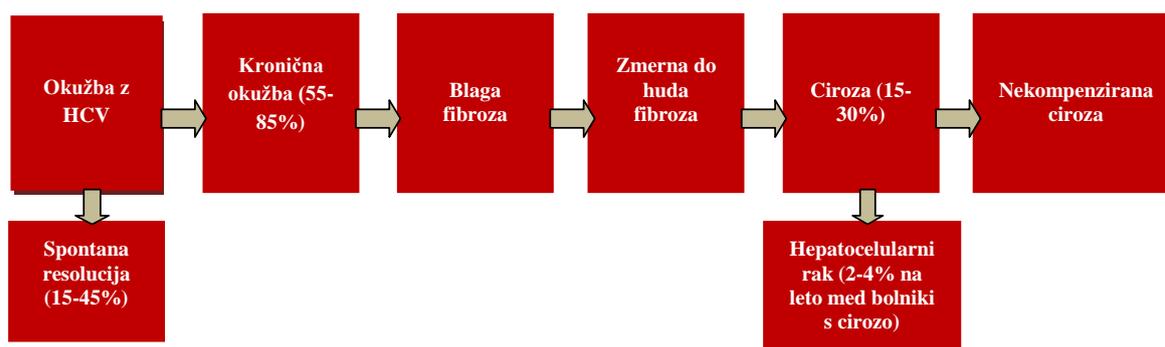
SEZNAM OKRAJŠAV

Ac ₂ O	acetanhidrid
ADP	adenozin-5'-difosfat
ADPNP	5'-adenilil-β,γ-imidodifosfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Boc ₂ O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
LD ₅₀	koncentracija spojine, ki povzroči smrt 50% celic
DAAAs	neposredno delujoča protivirusna zdravila
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
G+ / G-	grampozitiven / gramnegativen
HCV	virus hepatitisa C
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Hsp90	protein toplotnega šoka 90
HTS	reševanje visoke zmogljivosti
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zavre delovanje encima za 50%
K _d	afinitetna konstanta vezave
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrsko magnetna resonanca
NTRs	nekodirajoče regije
ORF	»open reading frame« - bralni okvir
RA	rezidualna aktivnost encima
RNA	ribonukleinska kislina
TLC	tankoplastna kromatografija

1 UVOD

1.1 HEPATITIS C

Hepatitis C je bolezen jeter, ki jo povzroča virus hepatitisa C (HCV). Novejše študije ocenjujejo, da je na svetu okoli 110 milijonov ljudi okuženih s HCV (prisotnost HCV-protiteles v krvi), od tega pa jih je okoli 80 milijonov kronično okuženih (prisotnost HCV-RNA v krvi). Obstajata dve obliki hepatitisa C: akutna in kronična oblika, ki se razvije v 6 mesecih po okužbi. (1) Okužba z HCV pri 20-30% primerov povzroči akutne simptome, ki so pri posameznikih lahko različno izraženi. Pojavijo se lahko vročina, utrujenost, zmanjšanje apetita, slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu, temen urin in zlatenica. Večina ljudi s kroničnim hepatitisom C na začetku nima nobenih jasnih simptomov, šele po več letih lahko pride do ciroze jeter, kronične bolezni jeter ali jetnoceličnega raka. Zaradi imunološkega odziva na okužbo se lahko pojavi tudi trombocitopenija (zmanjšano število krvnih ploščic). (2) Potek razvoja okužbe je prikazan na Slika 1.(1)

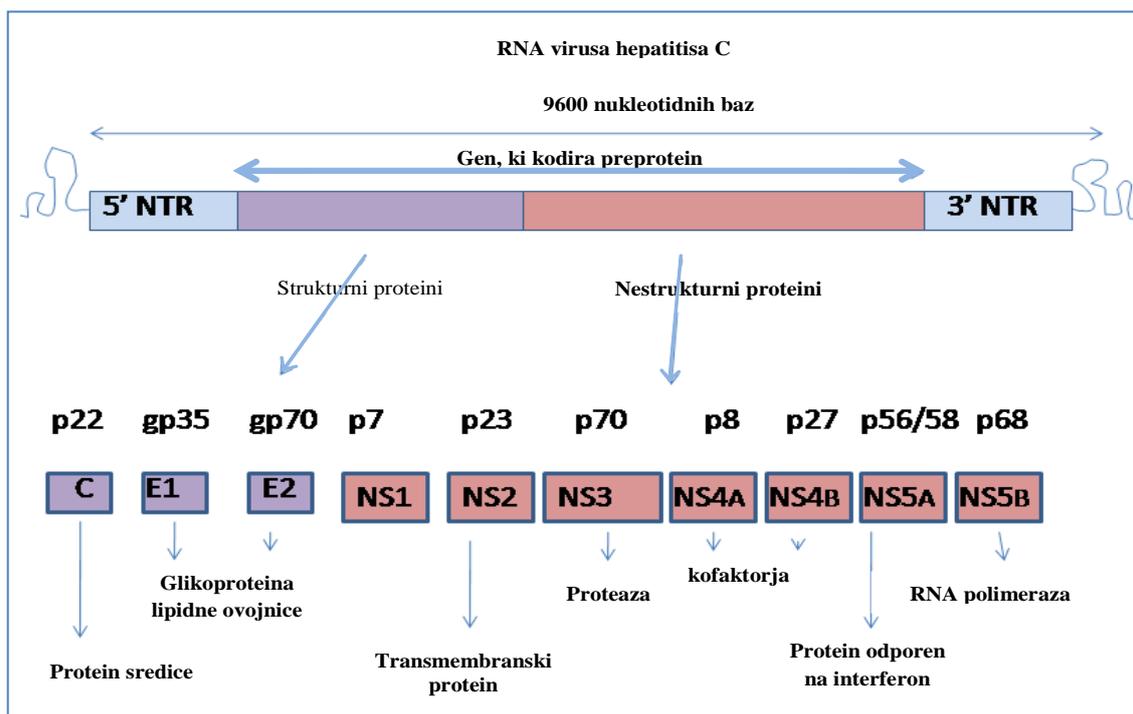


Slika 1: Potek okužbe z virusom hepatitisa C (prirejeno po 1).

V razvitem svetu je poglavitna pot prenosa bolezni intravensko jemanje mamil, v manj razvitih delih sveta pa transfuzije krvi, izdelkov iz krvi ali presajanje organov brez izločilnega preizkusa na prisotnost HCV. Do prenosa bolezni lahko pride tudi pri tetoviranjih ali pirsingih, če se uporablja nesterilizirana oprema ali kontaminirana barvila. Obstaja tudi možnost vertikalnega prenosa bolezni iz matere na otroka, ki sicer ni pogosta (v manj kot 10% nosečnosti). (1)

1.2 VIRUS HEPATITISA C

Leta 1989 so z metodami rekombinantne tehnologije DNA prvič uspešno izolirali genom virusa hepatitisa C (HCV). Pred tem so znanstveniki ta virus imenovali ne-A, ne-B hepatitis. (3) Virus hepatitisa C (družina: Flaviviridae, rod: Hepacivirus) je majhen virus, velikosti 50-80 nm, ki je sestavljen iz središice, obdane z ikozaedričnim beljakovinskim plaščem in lipidno ovojnico, v kateri sta prisotni dve vrsti virusnih glikoproteinov, E1 in E2. Na osnovi genetskih razlik med posameznimi izolati virusa, se le ta razvršča v 6 genotipov s številnimi podtipi znotraj posameznega genotipa, ki imajo različno geografsko porazdelitev in odzivnost na zdravljenje z interferonom α . Po okužbi se virus s krvjo prenese do jeter, kjer preko z receptorji posredovane endocitoze vstopa v gostiteljeve celice. Mehanizem vstopa virusa v celico še ni popolnoma pojasnjen. Do sedaj so odkrili različne receptorje, ki sodelujejo pri tem procesu. Med pomembnejšimi receptorji so CD81 (tetraspanin), SRB1 (glavni receptor za vstop lipoproteina visoke gostote v hepatocit), poleg tega pa tudi beljakovini tesnih stikov klavdin-1 (CLDN1) in okludin (OCLN). HCV, ki se v krvi veže na serumske lipoproteine, pa lahko vstopi tudi preko vezave apolipoproteina B na receptor za LDL holesterol. Po vstopu v celico pride do fuzije virusa v endolizosomu celice in sproščanja virusnega genoma v citoplazmo hepatocita. Dedni zapis HCV se nahaja v obliki pozitivno usmerjene enovijačne RNA in je sestavljen iz 9600 nukleotidov. Virusna RNA je sestavljena iz enega bralnega okvirja (ORF) in dveh nekodirajočih regij na 5' in 3' koncu RNA molekule (NTRs). Omenjeni NTRs vsebujejo elemente, ki so pomembni za proces prevajanja in podvajanja virusne RNA. 5' NTR ima vezavno mesto za ribosom (IRES – angl. internal ribosome entry site = notranje ribosomsko vezavno mesto), kjer se začne prevajanje HCV genoma v en beljakovinski produkt, sestavljen iz okoli 3000 aminokislin. Poliprotein se nato s celičnimi in virusnimi proteazami razcepi na 10 zrelih proteinov (Slika 2). (4,5)



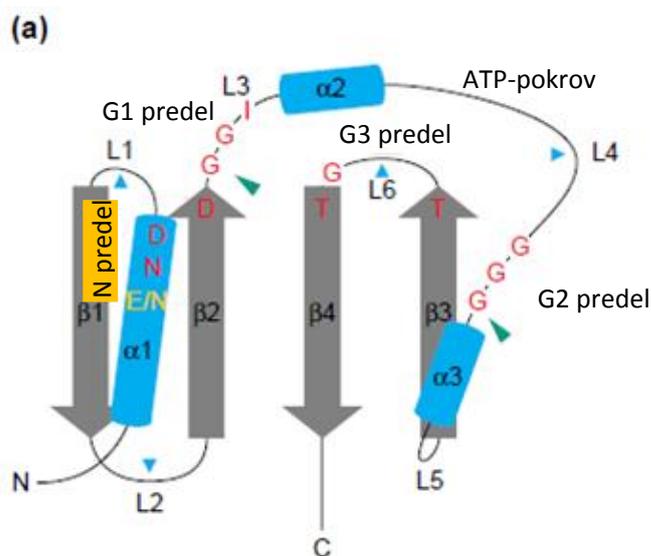
Slika 2: Prikaz genoma HCV in nastanka zrelih proteinov. (prirejeno po 5)

Nastali virusni proteini se povežejo z znotrajceličnimi membranami, s čimer ustvarijo ustrezno mikrookolje v citoplazmi, imenovano tudi membranska mreža (ang. »membranous web«). Skupaj tvorijo replikacijski kompleks, ki omogoča podvojevanje virusne RNA. Virusna od RNA-odvisna RNA polimeraza NS5B omogoči sintezo genomu komplementarne negativno usmerjene RNA, ki nato služi kot matrica za nastanek nove kopije pozitivno usmerjene RNA. Mehanizem sestavljanja in izstopanja novonastalih virusov iz hepatocitov še ni dobro raziskan. Raziskave kažejo, da pri tem najverjetneje sodelujejo virusni proteini sredice, E1 in E2. Omenja pa se tudi sproščanje novonastalih virusov preko mehanizma, ki se uporablja za metabolizem lipidov. (5)

Ker virus za svojo reprodukcijo uporablja mehanizme gostitelja, lahko na njegovo translacijo in replikacijo vpliva več različnih celičnih faktorjev, med drugim tudi protein toplotnega šoka 90 (ang. »heat shock protein 90«, Hsp90) (6).

1.3 GHKL NADDRUŽINA ATPaz

V GHKL naddružino ATPaz poleg Hsp90 in DNA-giraze spadajo še histidin kinaze, ki delujejo kot transkripcijski faktorji pri prokariontih, in MutL, ki je udeležen pri popravljanju DNA. Kljub temu, da ne kažejo podobnosti v aminokislinskem zaporedju (ujemanje < 15%), pa imajo vsi zelo podobno strukturo ATP-vezavnega mesta. Vsi člani naddružine imajo namreč v svoji strukturi skupen strukturni element imenovan Bergeratov vzorec zvitja (Slika 3). Gre za α/β -sendvič, sestavljen iz štirih mešanih β -struktur in treh α -vijačnic. Vijačnici $\alpha 1$ in $\alpha 3$ potekata vzporedno z mešanimi β -strukturami, $\alpha 2$ -vijačnica pa poteka pravokotno na ostale elemente. Ti α - in β -elementi skupaj tvorijo »žepek«, v katerega se veže molekula ATP. Le-ta tvori interakcije z aminokislinskimi ostanki, ki so večinoma na vmesnih zavojih, ki pa se med posameznimi predstavniki GHKL naddružine razlikujejo. Posledica tega je, da čeprav imajo podobno vezavno mesto za ATP, le-to ni popolnoma identično (7).



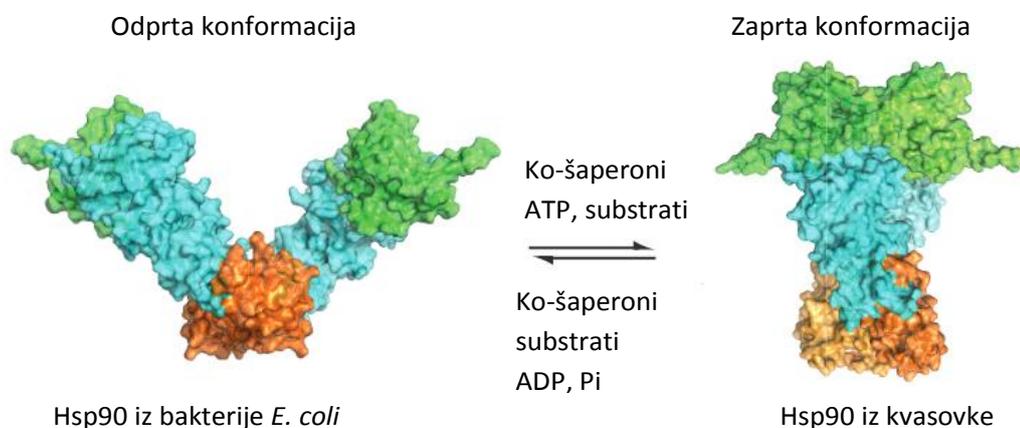
Slika 3: Shematski prikaz pomembnih elementov Bergeratovega vzorca zvitja. (7)

1.4 Hsp90

Protein toplotnega šoka 90 (Hsp90) je strukturno ohranjeni molekularni šaperon z ATPazno aktivnostjo, ki olajša replikacijo virusov, tako da omogoča pravilno zvijanje proteinov, vključenih v prevajanje signalov, razmeščanje proteinov v celici, zorenje receptorjev ter prirojeno in pridobljeno imunost. Obstajajo 4 izoforme Hsp90: Hsp90 α , Hsp90 β , GRP94 in TRAP1. Hsp90 α in Hsp90 β se nahajata v citosolu, GRP94 v endoplazemskem retikulumu, TRAP1 pa v mitohondriju celic. (8, 9)

1.4.1 Struktura Hsp90

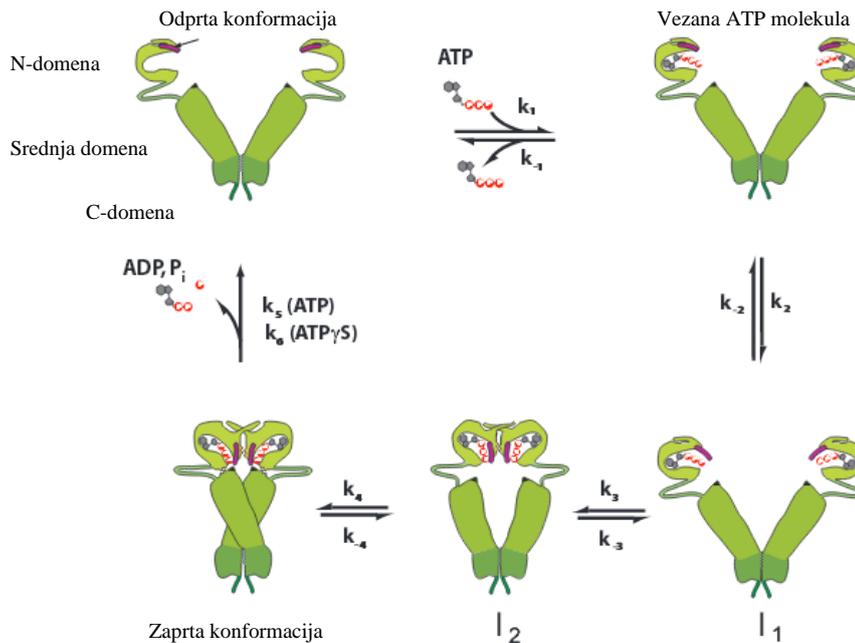
Aktivna oblika Hsp90 je homodimerna. Vsak monomer je sestavljen iz N-končne domene z vezavnim mestom za ATP, srednje domene in C-končne domene, ki omogoča dimerizacijo proteina. Aktivnost Hsp90 je regulirana z različnimi ko-šaperoni, ki vplivajo na njegov ATPazni cikel, kar omogoča selektivno vezavo substratov Hsp90 in povezavo z ostalimi šaperonskimi sistemi. Poznamo odprto in zaprto konformacijsko obliko Hsp90 (Slika 4).



Slika 4: Prikaz odprte in zaprte konformacijske oblike Hsp90. Z zeleno barvo je predstavljena N-končna domena, z modro barva srednja domena in z oranžno barvo C-končna domena (prirejeno po 10).

V mirujoči obliki, ko na Hsp90 ni vezana molekula ATP, se encim nahaja v odprti konformacijski obliki, ki tvori obliko črke V. Po hitri vezavi molekule ATP, pride do počasne pretvorbe konformacijskega stanja v obliko I₁ (intermediat 1), v kateri se ATP

»pokrov« zapre, vendar sta N-končni domeni še vedno odprti. Naslednja stopnja je oblika I₂ (intermediat 2), v kateri pride do dimerizacije N-končnih domen. Temu sledi še reorganizacija in interakcija srednje domene z N-končno domeno ter nastanek končne zaprte konformacijske oblike encima. V tej stopnji pride do hidrolize molekule ATP. Po končani hidrolizi molekule ATP pride do disociacije N-končnih domen in sproščanja ADP in P_i molekul iz encima ter povrnitve encima v odprto konformacijsko obliko (Slika 5). (10)



Slika 5: Prikaz konformacijskega cikla Hsp90 (prirejeno po 10)

1.4.2 Interakcije Hsp90 z reprodukcijskim ciklom virusa hepatitisa C

Japonski znanstveniki so že leta 2006 dokazali, da proteina FKBP8 in Hsp90 regulirata replikacijo RNA HCV (6). V raziskavi so s pomočjo rešetanja iskali gostiteljske proteine v knjižnici človeških proteinov možganov in jeter, ki bi tvorili interakcije z virusnim proteinom NS5A. Ugotovili so, da se z NS5A veže protein FKBP8, član družine FK506 vezočih proteinov prek svojih TRPs domen (ang. »tetratricopeptide repeat«). Skupaj s Hsp90 tvorita multikompleks, ki je odgovoren za replikacijo molekule RNA HCV. Z željo po ugotovitvi, če Hsp90 vpliva na replikacijo RNA, so uporabili znani zaviralec Hsp90, geldanamycin. Rezultati so pokazali, da z zaviranjem Hsp90 pride do zaviranja replikacije virusa. (6)

V študiji objavljeni leta 2009 so ugotovili tudi, da ima Hsp90 pomembno vlogo v stabilizaciji virusnega proteina NS3. NS3 je multifunkcionalni protein s proteazo, ki omogoča pretvorbo proteina NS3 v protein NS5B. Kot že prej omenjeno je NS5B od RNA odvisna RNA-polimeraza, ki omogoča sintezo genomu komplementarne negativno usmerjene RNA. Le-ta nato služi kot matrica za podvajanje virusne RNA. Z zaviranjem Hsp90 torej vplivamo na delovanje NS5B, s čimer zaviramo sintezo novih pozitivno usmerjenih verig virusne RNA (11).

Najnovejše študije, objavljene v začetku tega leta, pa ugotavljajo še vpliv Hsp90 na sproščanje novonastalih HCV. V raziskavi so z merjenjem intracelularnih in ekstracelularnih koncentracij virusnih RNA in virusnega proteina C ugotovili, da zaviralec Hsp90 radicikol v večji meri zmanjša njuni ekstracelularni koncentraciji, kar pomeni, da je Hsp90 najverjetneje vpleten tudi v mehanizme sestavljanja in sproščanja novonastalih virusnih delcev in ne le v replikacijo virusne RNA, kot so prvotno domnevali (12).

Zaradi vseh opisanih interakcij Hsp90 z reprodukcijskim ciklom HCV je Hsp90 zanimiva nova tarča za odkrivanje novih protivirusnih zdravilnih učinkovin.

1.5 ZDRAVLJENJE OKUŽBE S HCV

Prvotna terapija okužbe z HCV je temeljila na podkožni aplikaciji interferona α , ki ima zaviralno delovanje na replikacijo HCV in imunomodulatorno delovanje na že okužene jetrne celice ter peroralni aplikaciji ribavirina, ki deluje kot nukleozidni zaviralec.

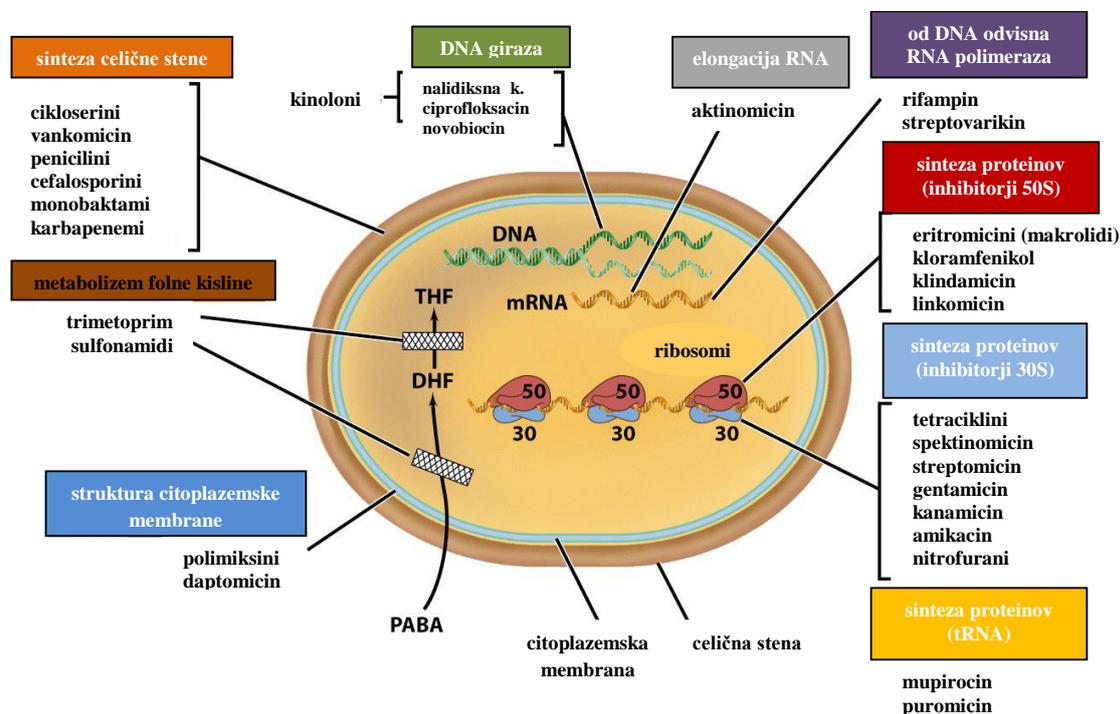
Kasneje so v kombinaciji z ribavirinom začeli uporabljati pegiliran interferon α , ki ima daljši razpolovni čas. Žal je bila ta kombinacija zdravil slabo tolerirana s strani bolnikov, saj je imela resne neželene učinke in uspešnost zdravljenja le 40-65%, odvisno od genotipa HCV, prisotnosti jetrne ciroze in podobno.

Do velikega napredka v zdravljenju hepatitisa C je prišlo z odkritjem novih peroralnih zdravil, ki delujejo direktno na replikacijski cikel virusa. Zdravila, ki so jih poimenovali neposredno delujoča protivirusna zdravila (ang. »direct-acting antivirals, DAAs«), delujejo kot zaviralci NS3/4A proteaze (asunaprevir, paritaprevir, simeprevir), NS5A (daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir) ali NS5B – od RNA odvisne RNA-polimeraze (sofosbuvir, dasabuvir). Terapija se prilagaja vsakemu posamezniku posebej glede na to, s katerim genotipom HCV je okužen in glede na stanje njegovih jeter (ciroza,...). (1)

Pri zdravljenju z eno vrsto DAAs pride do pojava rezistence virusa proti zdravilni učinkovini, zato je bolj uspešno kombinirano zdravljenje z DAAs. Do razvoja rezistence najverjetneje pride pri podvojevanju virusne RNA z od RNA odvisno RNA-polimerazo NS5B, ki ima visoko nagnjenost do napak pri svojem delu, zato se virusna RNA ne prebne spreminja. Zaradi možnosti pojava rezistence proti DAAs, raziskujejo nove tarče za zdravljenje okužbe s HCV, ki ne bi delovale direktno na virus, ampak bi vplivale na njegovo replikacijo posredno, preko zaviranja gostiteljskih mehanizmov, ki jih pri svoji replikaciji uporablja virus. Kot primerno tarčo v zadnjem času omenjajo tudi molekulski šaperon Hsp90. (13)

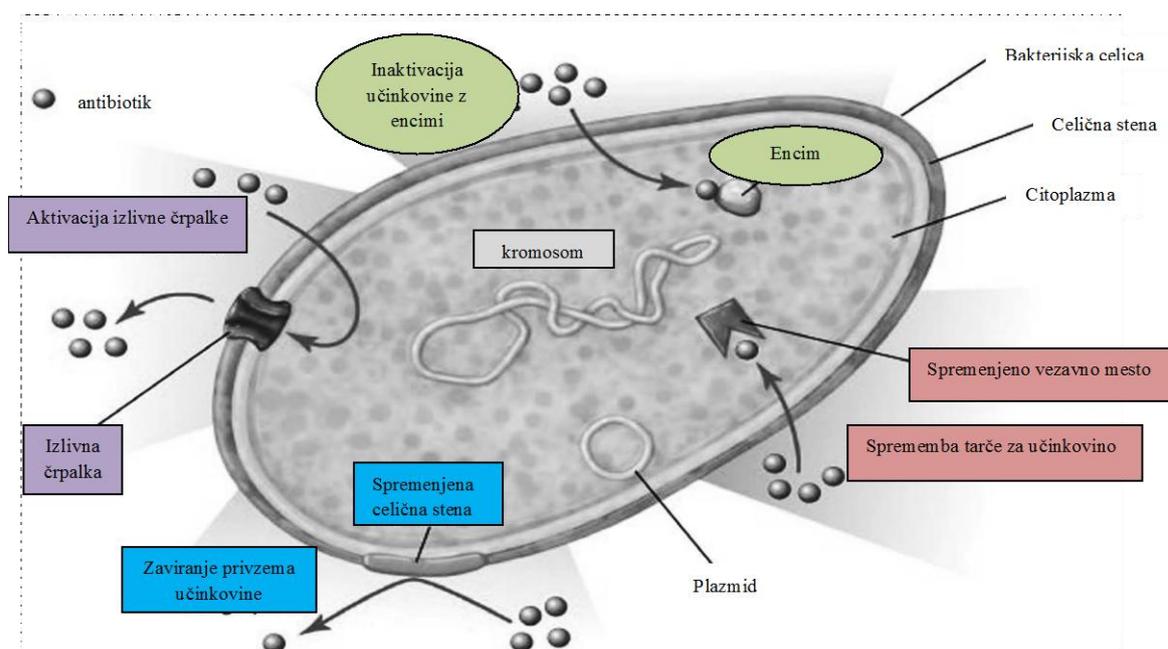
1.6 PROTIBAKTERIJSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Bakterijske okužbe lahko zdravimo s protibakterijskimi učinkovinami sinteznega, polysinteznega ali naravnega izvora, ki imajo lahko bakteriostatično (zavirajo rast in razmnoževanje bakterij) ali pa bakteriocidno (povzročijo smrt bakterij) delovanje. Poznamo več mehanizmov delovanja protibakterijskih učinkovin, ki so skupaj s primeri učinkovin predstavljeni na Slika 6. (14)



Slika 6: Prikaz učinkovin, ki delujejo na različne tarče v bakterijski celici (prirejeno po 14)

V zadnjem času pa kljub poznavanju različnih mehanizmov delovanja protibakterijskih učinkovin narašča rezistenca bakterij. Svetovna zdravstvena organizacija ugotavlja, da zaradi odpornosti bakterij proti protibakterijskim učinkovinam, nekoč povsem obvladljive, običajne infekcije ne bodo več ozdravljive. (15) Bakterije namreč razvijejo različne mehanizme, ki so predstavljeni na Slika 7, in postanejo odporne proti posameznim ali celo vsem vrstam protibakterijskih učinkovin. (14) Zaradi vedno večjega pojavljanja rezistentnih bakterijskih sevov pospešeno iščemo nove tipe protibakterijskih učinkovin. V zadnjem času so raziskave usmerjene tudi na zaviranje bakterijskih topoizomeraz IIa, ker omogočajo hkratno zaviranje dveh encimov (zaviranje DNA-giraze in topoizomeraze IV) in s tem manjšo možnost razvoja bakterijske rezistence. Nastanek rezistence zaradi mutacije tarče lahko namreč upočasnimo, če uporabimo protibakterijske učinkovine, ki delujejo na dve tarči hkrati. Da bi prišlo do rezistence, bi namreč moralo priti do mutacije na dveh različnih genih za rezistenco med eno generacijo bakterij, kar je manj verjetno. (16)



Slika 7: Prikaz različnih mehanizmov bakterijske rezistence (prirejeno po 14)

1.7 TOPOIZOMERAZE

Topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembe topoloških stanj molekule DNA. Njihovo delovanje je življenjskega pomena za celice, saj vplivajo na procese podvojevanja, prepisovanja in popravljanja nepravilnosti v strukturi DNA. Delimo jih na dva tipa:

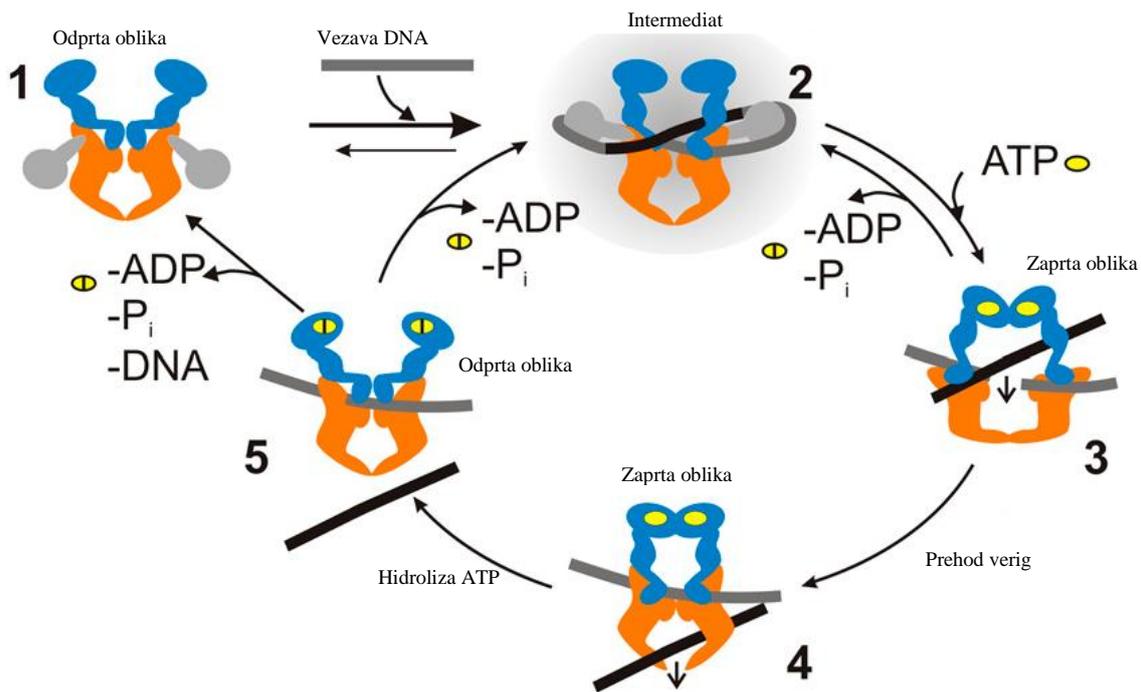
topoizomeraze tipa I in topoizomeraze tipa II. Topoizomeraze tipa I sodelujejo pri odvijanju dodatno zvite verige molekule DNA in katalizirajo cepitev ene verige dvojne vijačnice. Tvorijo energetsko ugodnejšo, sproščeno obliko molekule DNA. Topoizomeraze tipa II pa katalizirajo cepitev obeh verige vijačnice hkrati. Njihova naloga je zvijanje molekule DNA s tvorbo dodatnega negativnega zavoja vijačnice.

Evkariontske in prokariontske topoizomeraze se med seboj pomembno razlikujejo, kar omogoča selektivnost sintetiziranih zaviralcev. Do sedaj znani zaviralci DNA-giraze in topoizomeraze IV fluorokinoloni namreč izkazujejo dokazano večjo afiniteto do prokariontske kot do evkariontske oblike encima. Ena glavnih strukturnih razlik med evkariontskimi in prokariontskimi topoizomerazami je, da evkariontske topoizomeraze tvorijo homodimerno strukturo encima, medtem ko so prokariontske topoizomeraze heterodimerne strukture. Med pomembnejše tarče za protibakterijske učinkovine sodita bakterijska DNA-giraza in topoizomeraza IV, ki spadata med topoizomeraze tipa IIa (16, 17).

1.7.1 DNA-GIRAZA in TOPOIZOMERAZA IV

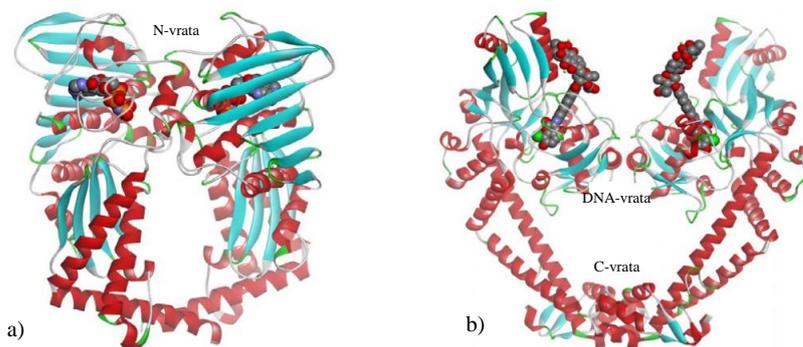
DNA-giraza je encim, ki tvori funkcionalni heterodimer A_2B_2 , sestavljen iz dveh podenot giraze A (GyrA) in dveh podenot giraze B (GyrB). Naloga podenote GyrA je uvajanje dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA pred podvojevalnimi vilicami. S tem zmanjša torzijsko napetost med podvojevanjem, kar omogoči podvojevanje molekule DNA. Pri tem porablja energijo, ki se sprosti pri hidrolizi molekule ATP, ki se veže na podenoto GyrB. (16, 17)

Podobno kot pri Hsp90 poznamo tudi pri DNA-girazi dve konformacijski obliki: odprto in zaprto konformacijo. Konformacijske spremembe so prikazane na Slika 8, ki prikazuje katalitični cikel DNA-giraze. Ko na encim nista vezani molekuli DNA in ATP, je le-ta v odprti konformacijski obliki. Najprej pride do vezave molekule DNA in tvorbe intermediata. Na intermediat se potem veže molekula ATP, kar povzroči spremembo konformacijske oblike encima. Nastane zaprta konformacijska oblika encima, ki omogoči nadaljnje procese prekinitve in ponovne združitve verig DNA ter nastanka negativno zavite molekule DNA. V zadnji fazi pride do hidrolize molekule ATP. Ob tem se sprosti dovolj energije, da se encimska struktura odpre in sprosti spremenjeno molekulo DNA. (18)



Slika 8: Katalitični cikel DNA-giraze (prirejeno po 18)

Glede na različne kristalne strukture so identificirali tri strukturna področja encima, poimenovana N-vrata, DNA-vrata in C-vrata. N-vrata so sestavljena iz dveh podenot GyrB in vsebujejo vezavno mesto za molekulo ATP, C- in DNA-vrata pa so sestavljena iz N-končne domene podenote GyrA. Funkcija DNA-vrat je, da povzročijo pretrganje in ponovno združitev verige DNA, medtem ko je naloga C-vrat odpust molekule DNA iz katalitskega mesta (16).



Slika 9: Kristalna struktura: a) GyrB₂ iz bakterije *E. coli* v kompleksu z ADPNP (PDB: 1E11) in b) GyrA₂ iz bakterije *E. coli* v kompleksu s simociklinonom D8 (PDB: 2Y3P) (prirejeno po 16).

Topoizomeraza IV je encim, ki nadzira dodatno zvijanje molekule DNA in razpletanje hčerinskih kromosomov na koncu podvojevanja. Strukturno je zelo podobna DNA-girazi, saj podobno kot DNA-giraza, tudi topoizomeraza IV tvori funkcionalni heterodimer C₂E₂. Sestavljen je iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta homologni podenotama GyrA in GyrB.

Podenoti GyrA in ParC sta torej odgovorni za cepitev in ponovno združevanje dvojne vijačnice, podenoti GyrB in ParE pa vsebujeta vezavno mesto za molekulo ATP (15, 17).

1.8 ATP-VEZAVNO MESTO DNA-GIRAZE

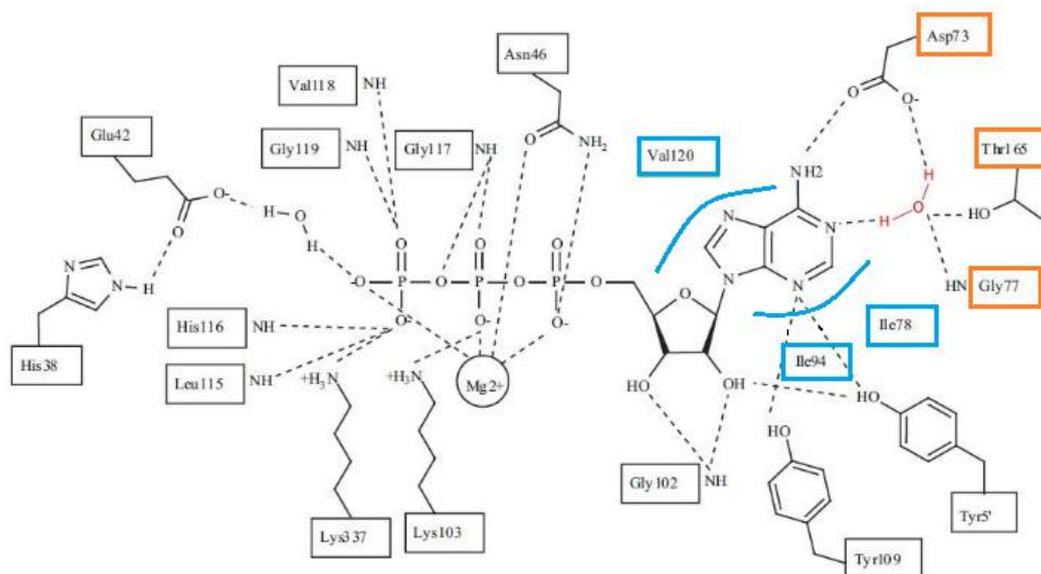
Do danes še ni poznana celotna kristalna struktura tetramerov DNA-giraze in topoizomeraze IV, so pa poznani določeni posamezni strukturni fragmenti obeh encimov. Znane so tudi kristalne strukture obeh encimov v kompleksu z ADPNP (nehidrolizirajoči analog ATP) in različnimi strukturnimi razredi zaviralcev. (19)

Nove spojine načrtujemo glede na poznano ATP-vezavno mesto DNA-giraze, zato je pomembno, da preučimo, kakšne interakcije tvori molekula ATP z vezavnim mestom encima (Slika 10). Le-ta je v vezavnem mestu stabilizirana s številnimi neposrednimi in posrednimi vodikovimi vezmi z aminokislinskimi ostanki encima. Adeninski obroč molekule ATP tvori vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki Asp73, Thr165, Gly77, Tyr5 in Tyr109 ter hidrofobne interakcije z Val120, Ile78 in Ile94.

Pri sintezi novih spojin želimo posnemati predvsem interakcijo molekule ATP z Asp73. Molekula ATP tvori z Asp73 dve vodikovi vezi, eno neposredno in eno posredno preko ohranjene molekule vode. Če želimo torej posnemati ti interakciji, mora potencialni zaviralec DNA-giraze vsebovati donor vodikove vezi, ki se bo povezal s karboksilno skupino Asp73 in akceptor vodikove vezi, ki bo tvoril posredno povezavo preko molekule vode do Asp73.

Človeški genom vsebuje več sto proteinov, ki vsebujejo vezavno mesto za molekulo ATP, zato je pri razvoju novih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze zelo pomemben dejavnik tudi selektivnost vezave. Le-to ponavadi dosežemo tako, da vezavo molekule ATP oponašamo le delno ter izkoriščamo sekundarna vezavna mesta, ki so značilna za posamezni encim. Pri načrtovanju novih zaviralcev DNA-giraze zato želimo tvorbo

dotatne interakcije z aminokislinskim ostankom Arg136, ki ga molekula ATP ne doseže in je značilen samo za DNA-girazo in topoisomerozo IV. (16, 19)



Slika 10: Shematski prikaz interakcij med molekulo ATP in ATP-vezavnim mestom DNA-giraze iz bakterije *Escherichia coli*. S črno črtkano črto so prikazane H-vezi in koordinacijske vezi, z modro polno črto pa hidrofobne interakcije. Z oranžnimi okvirčki so prikazane aminokislinske, ki tvorijo vodikovo vez posredno preko strukturno ohranjene vode (prikazana z rdečo barvo), z modrimi okvirčki pa aminokislinske, ki tvorijo hidrofobne interakcije. (prirejeno po 19)

1.9 ATP-VEZAVNO MESTO Hsp90

ATP-vezavno mesto Hsp90 je po svoji strukturi zelo podobno ATP-vezavnemu mestu DNA-giraze. Glede na primerjavo kristalnih struktur obeh encimov vidimo, da adeninski obroč molekule ATP tudi v vezavnem mestu Hsp90 tvori neposredne in posredne vodikove vezi z aminokislinskima ostankoma Asp93 in Thr184 (Asp73 in Thr165 pri DNA-girazi iz *E. coli*). Zato želimo tudi pri načrtovanju zaviralcev Hsp90 ohraniti interakcijo z Asp93. V ta namen načrtujemo zaviralce, ki imajo donor in akceptor vodikove vezi v neposredni bližini. V ATP-vezavnem mestu Hsp90 pa se nahaja tudi aminokislinski ostanek Asp102, s katerim molekula ATP ne tvori interakcij, vendar pa je njegova struktura primerna za tvorbo vodikovih vezi z zaviralci Hsp90 in doseganje selektivnosti napram drugim ATP-vezočim encimom.

1.10 MOLEKULSKO MODELIRANJE

V zadnjem času se je močno razširila uporaba različnih računalniških programov pri odkrivanju, razvoju in načrtovanju novih zdravilnih učinkovin. (20)

Virtualno reševanje (ang. virtual screening) je reševanje milijonskih virtualnih knjižnic spojin in je dober nadomestek laboratorijskemu reševanju visoke zmogljivosti (ang. high throughput screening – HTS), ki je časovno zelo zamudno in precej drago. Kot rezultat dobimo skrženo knjižnico spojin z ugodnimi ADME lastnostmi in potencialnim delovanjem na izbrano tarčo, ki jih nato potestiramo v laboratoriju. (21)

Poznamo več oblik virtualnega reševanja, od filtriranja na podlagi osnovnih deskriptorjev (molekulska masa, logP, št. akceptorjev in donorjev H vezi,...), 2D in 3D reševanja na osnovi podobnosti z znanim ligandom, do strukturno podprtega virtualnega reševanja (sidranja). V magistrski nalogi smo uporabili zadnjo obliko virtualnega reševanja – sidranje. (20, 21)

Za izvedbo sidranja moramo poznati 3D strukturo tarčnega mesta proteina. V javno dostopni bazi podatkov Protein Data Bank (PDB), ki je objavljena na spletu, obstaja že veliko kokristaliziranih tarčnih proteinov z različnimi ligandi. Tudi sami smo v tej bazi poiskali kristalno strukturo našega preučevanega proteina Hsp90 z ligandom. (20, 21, 22)

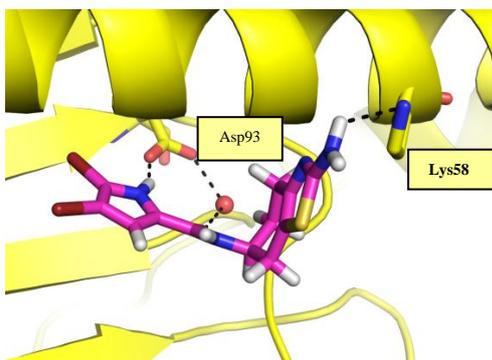
Proces sidranja sestoji iz dveh stopenj. Prva stopnja je postavljanje spojine v vezavno mesto proteina, druga stopnja pa ocenitev vezavne energije. (ang. »posing and scoring«). Poznamo več različnih programov (FlexX, OEDocking, Autodock, GOLD...), ki se med seboj razlikujejo po načinu obravnavanja spojine in proteina (kot fleksibilne ali rigidne strukture oz. različne kombinacije) in po različnih algoritmih cenilnih funkcij. (21)

Da ugotovimo, ali je naša metoda sidranja primerna za ustrezen protein, naredimo ocenitev/validacijo metode sidranja. Uspešnost metode sidranja ponavadi ocenimo tako, da ligand iz kristalne strukture ponovno sidramo v eksperimentalno določeno vezavno mesto. Dobljeno vezavo liganda, predvideno z metodo sidranja, primerjamo z eksperimentalno določeno strukturo vezave iz kristalne strukture. (20)

Glede na dobljene končne rezultate sidranja spojin najboljše spojine kupimo, če so komercialno dostopne oziroma sintetiziramo, če niso, ter ovrednotimo njihovo biološko aktivnost.

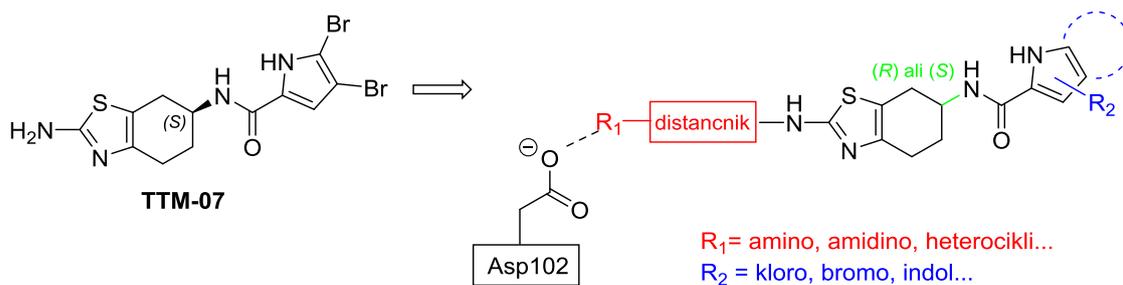
2 NAČRT DELA

Pri eksperimentalnem delu bomo načrtovali in sintetizirali nove potencialne ATP-kompetitivne zaviralce Hsp90. Izhajali bomo iz novega strukturnega tipa zaviralcev DNA-giraze in Hsp90, ki so bili nedavno odkriti in sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.



Slika 11: Predvidena vezava spojine **TTM-07** v vezavnem mestu Hsp90

S pomočjo strukturno podprtega načrtovanja bomo na osnovi predvidene vezave spojine **TTM-07** v ATP-vezavnem mestu Hsp90 (Slika 11) načrtovali nove potencialne zaviralce Hsp90. Hsp90 in DNA-giraza sicer spadata v isto GHKL naddružino proteinov in imata precej podobno vezavno mesto za ATP, vendar smo pri primerjavi njunih kristalnih struktur ugotovili, da ima Hsp90 večji dodatni žep, v katerem se nahaja aminokislinski ostanek Asp102. Le-ta je primerna aminokislina v vezavnem mestu Hsp90 za tvorbo vodikovih vezi in/ali ionskih interakcij, s čimer bi izboljšali jakost vezave in potencialno tudi protivirusno aktivnost. Zato bomo na amino skupino na mestu 1 uvajali funkcionalne skupine, ki omogočajo tvorbo omenjene interakcije. Predlagane strukturne spremembe so predstavljene na Slika 12.

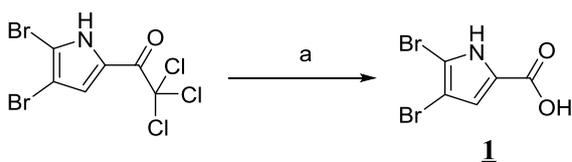


Slika 12: Prikaz predlaganih strukturnih sprememb na spojini **TTM-07**

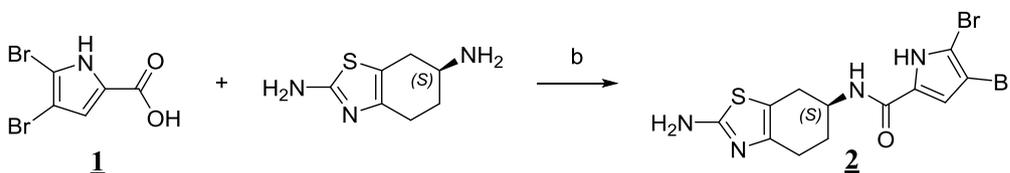
Najprej bomo narisali knjižnico analogov spojine 1 s pomočjo programskega paketa ChemBioOffice. S pomočjo programa OMEGA (OpenEye) bomo nato ustvarili knjižnico konformerov, ki jo bomo v naslednjem koraku sidrali v kristalno strukturo človeškega Hsp90 s programom FRED (OEDocking), ki je del programskega paketa OpenEye. Na osnovi rezultatov sidranja bo sledila sinteza izbranih novih potencialnih zaviralcev Hsp90.

V prvi stopnji bomo sintetizirali (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid (spojina 2). Prvi korak bo alkalna hidroliza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona, da bomo dobili 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino, ki jo bomo v naslednjem koraku skupaj s (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2,6-diaminom uporabili za sintezo spojine 2 (naš izhodni produkt = **TTM-07**), kot prikazuje Shema 1.

1. korak:



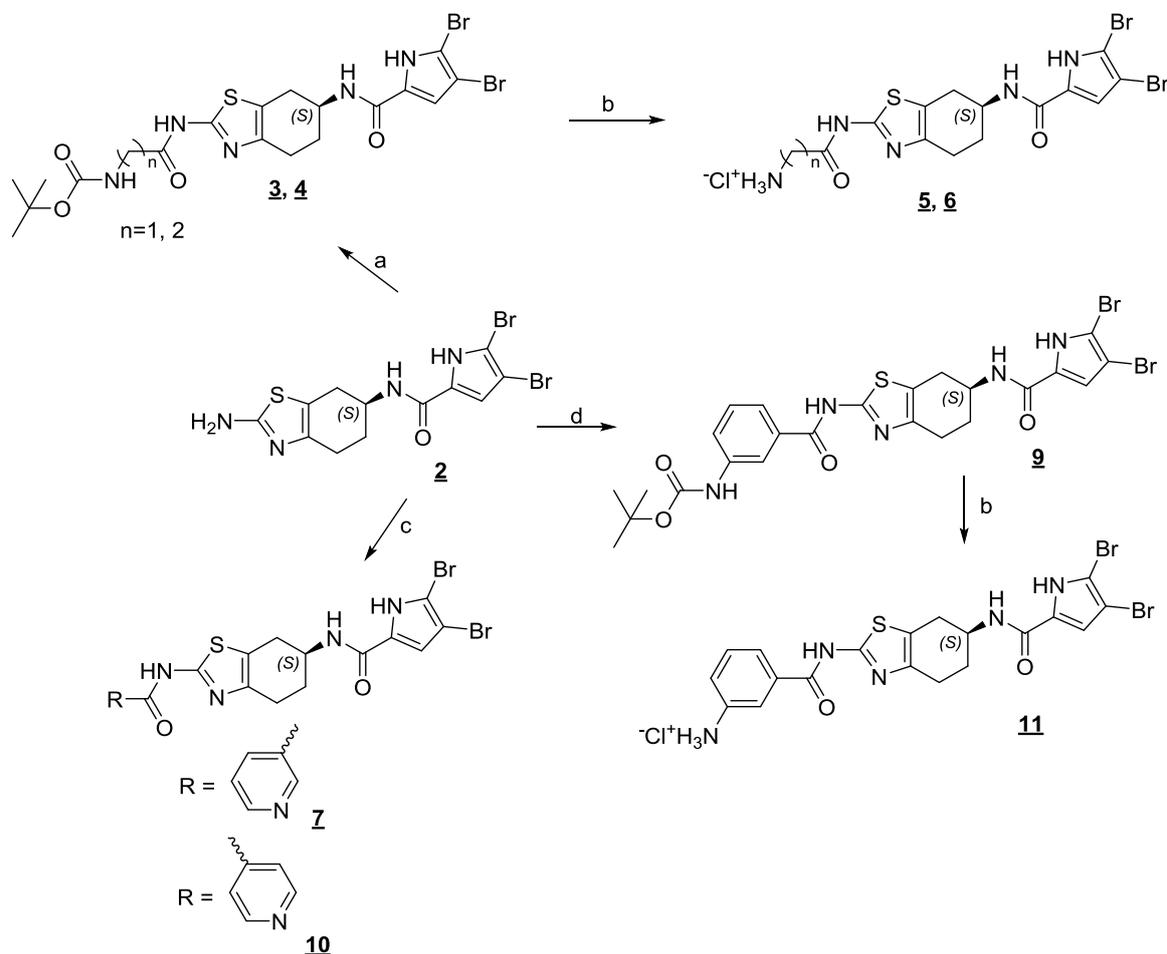
2. korak:



Shema 1: Reagenti in pogoji za sintezo izhodne spojine **2**.

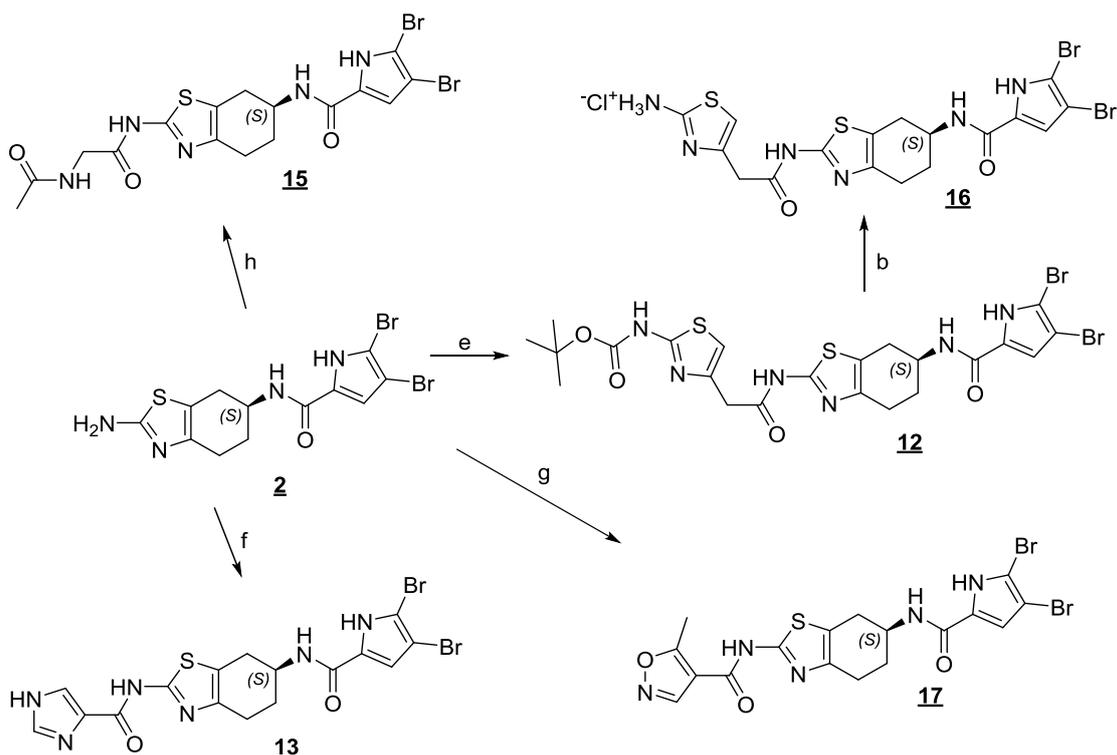
a) NaOH, MeOH, T=60°C, 1,5 h; b) DMF, EDC, HOBt, NMM, sobna T, 12 h

V drugi stopnji bomo pripravili različne končne spojine. Izhajali bomo iz predhodno pripravljene spojine **2**. Na aminske skupine spojine **2** bomo pripenjali različne substituentne z namenom, da bi dosegli dodatne interakcije z Asp102 v ATP-vezavnem mestu Hsp90. Potek reakcij je prikazan na Shema 2 in Shema 3.



Shema 2: Reagenti in pogoji za sintezo spojin - 1.

a) Boc-Gly ali Boc-β-Ala, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h; b) acetil klorid, MeOH, 0 °C, nato MeOH raztopina z Boc zaščitene spojine, sobna T, 18 h; c) nikotinska ali izonikotinska kislina, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h; d) 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)benzojska kislina, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h.



Shema 3: Reagenti in pogoji za sintezo spojin - 2.

b) acetil klorid, MeOH, 0 °C, nato MeOH raztopina z Boc zaščitene spojine, sobna T, 18 h;
 e) 2-(2-((*tert*-butoksilkarbonil)amino)thiazol-4-il)ocetna kislina, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h; f) imidazol-4-karboksilna kislina, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h;
 g) 5-metilizoksazol-4-karboksilna kislina, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h; h) *N*-acetilglicin, EDC, HOBt, NMM, DMF, sobna T, 12 h.

Pripravljene končne spojine bomo tudi biološko ovrednotili na encimih Hsp90 in DNA-girazi. Spojine bomo sicer načrtovali na osnovi ATP-vezavnega mesta Hsp90, vendar jih bomo zaradi podobnosti z ATP-vezavnim mestom DNA-giraze testirali tudi na DNA-girazo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PROGRAMSKA OPREMA

Za risanje spojin in reakcijskih shem ter za poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0, programskega paketa CambridgeSoft. Narisane spojine smo pretvorili v SMILES zapis in jim generirali različne konformere s pomočjo programa OMEGA, programskega paketa OpenEye. Na spletni strani smo poiskali ustrezno kristalno strukturo človeškega proteina Hsp90 (PDB koda: 4L8Z (22)) in ga ustrezno pripravili s programom MAKE_RECEPTOR (OpenEye). Na njem smo nato izvedli sidranje spojin s programom FRED (OEDocking), ki je del programskega paketa OpenEye. Dobljene rezultate smo pregledali s programom VIDA (OpenEye).

3.2 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili reagente in topila proizvajalcev Fluka, Merck, Sigma-Aldrich, Acros Organics in Tokyo Chemical Industry.

3.3 KROMATOGRAFSKE METODE

3.3.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Za TLC smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminiјastem nosilcu. Uporabili smo ga kot metodo za spremljanje poteka reakcij in izbiro ustrezne mobilne faze za čiščenje spojin s »flash« kolonsko kromatografijo. Spojine smo detektirali pod UV lučko z valovno dolžino 254 nm.

3.3.2 »Flash« kolonska kromatografija

Za čiščenje spojin smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. Za izvedbo »flash« kolonske kromatografije smo uporabili steklene kolone različnih velikosti, silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm, proizvajalca Merck in različne mobilne faze, ki smo jih izbrali s pomočjo TLC analize ter so navedene pri sintezi posameznih spojin.

3.3.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC

HPLC analize so bile izvedene na sistemu Agilent Technologies 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (220 nm, 254 nm in 280 nm), G1316A termostatom in G1313A avtomatskim

vzorčevalnikom. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 x 150 mm) in sledečo metodo:

- 1) mobilna faza: 0,1% TFA v vodi (A) in acetonitril (B)
- 2) gradient:
 - a. 2 minuti: 95% A,
 - b. 12 minut: 90% A do 10% A
 - c. 1 minuta: 10% A do 5% A
 - d. 5 minut: 5% A
- 3) hitrost pretoka: 1,0 mL/min
- 4) volumen injiciranja: 10 μ L

3.4 SPEKTROSKOPSKE METODE

3.4.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektri sintetiziranih spojin so bili posneti pri 400 MHz oziroma 100 MHz na napravi Bruker Avance III na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$. Vzorce smo raztopili v devteriranem dimetilsulfoksidu ($\text{DMSO-}d_6$) ali devteriranem MeOH ($\text{MeOH-}d_4$), kot interni standard pa uporabili TMS. Za procesiranje spektrov smo uporabili program MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mesterlab Research S.L.

3.4.2 Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre končnih spojin so posneli na spektrometru Autospec (VG - Analytical) z ESI metodo na Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.5 DOLOČEVANJE TALIŠČA

Spojinam smo določevali talilne intervale s Koflerjevim talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in so nekorrigirana.

3.6 DOLOČANJE OPTIČNE SUČNOSTI

Optična sučnost je bila izmerjena na polarimetru PerkinElmer 241 MC. Poročana vrednost optične sučnosti je enaka povprečni vrednosti petih uspešnih meritev z uporabo integracijskega časa 5 s.

3.7 BIOKEMIJSKA TESTIRANJA

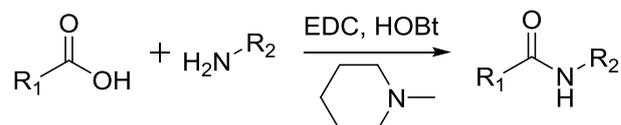
Zaviralna aktivnost spojin na encimih DNA-giraza in topoizomeraza IV iz bakterije *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* je bila določena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Primarna testiranja so opravili pri koncentracijah 100 μM in 10 μM ali 1 μM in 0,1 μM . Spojinam, ki so pri teh koncentracijah izkazovale dobre aktivnosti, so nato določili še IC_{50} . (metoda je opisana v članku 23)

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem so določili protibakterijsko delovanje spojin na izbranih bakterijskih sevih *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem so določevali tudi vezavo spojin na Hsp90 z mikroskalno termoforezo. Rezultati so podani kot K_d . Izvedli so tudi testiranja v celičnem modelu replikona HCV pri koncentraciji 50 μM . Spojinam, ki so izkazovale dobro aktivnost pri tej koncentraciji, so nato določili še vrednost IC_{50} in toksičnost/selektivnost.

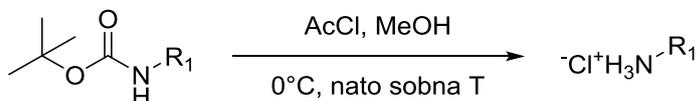
4 EKSPERIMENTALNO DELO

SPLOŠNI POSTOPEK A: (sklopitvena reakcija)



Karboksilno kislino (1 ekv) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (DMF) in ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Nato smo dodali EDC (1,2 ekv), HOBt (1,3 ekv) in bazo *N*-metilmorfolin (NMM, 2 ekv), da smo dobili pH ≈ 8. Dobljeno reakcijsko zmes smo mešali 20 minut na ledeni kopeli, da je potekla aktivacija kisline. Po tem času smo odstranili ledeno kopel in dodali amin (1 ekv). Pustili smo, da je reakcija ob konstantnem mešanju potekala 12 ur pri sobni temperaturi (T).

SPLOŠNI POSTOPEK B: (odščita Boc skupine na aminu - acidoliza)

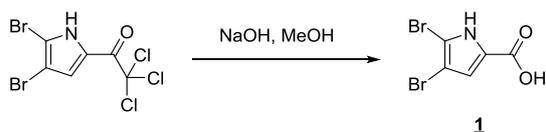


V bučko smo odmerili ustrezno količino MeOH in jo postavili na ledeno kopel ter zamašili s septumom. Z iglo smo prebodli septum in po kapljicah dodali acetilklorid (10 ekv). Raztopino smo mešali 30 minut na ledeni kopeli, da je potekla reakcija nastanka HCl. Prek septuma smo dodali z Boc skupino zaščiten amin (1 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini MeOH. Dobljeno zmes smo mešali 1 h na ledeni kopeli in nato še 18 h na sobni T, da je potekla odščita NH₂ skupine.

4.1 Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida

1. korak: Sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline

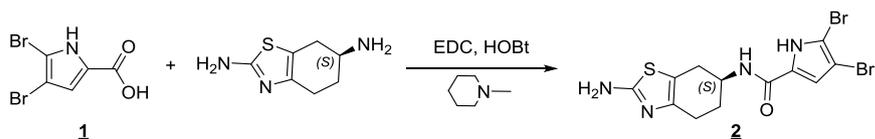
ALKALNA HIDROLIZA



V metanolu (30 mL) smo raztopili 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (2,502 g; 6,75 mmol; 1 ekv). Dobljeni raztopini smo dodali 2 M NaOH (16,88 mL; 5 ekv). Reakcijsko zmes smo med mešanjem segrevali 1,5 ure na oljni kopeli pri 60 °C. Po končani reakciji smo najprej pod znižanim tlakom uparili topilo (MeOH), nato pa naredili ekstrakcijo z dietiletom (4x30 mL). Vodno fazo smo na ledeni kopeli nakisali z 1 M HCl do pH = 2, pri tem je izpadla oborina, ki smo jo odnučali in posušili v sušilniku (40 °C).

Dobili smo 1,367 g čistega produkta **1**. Izkoristek reakcije: 75,2%. Izgled: rjava oborina. Elementna sestava: C₅H₃Br₂NO₂. M_r = 268,89 g/mol. T_t = 168–171 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,83 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz, CH), 12,73-12,89 (m, 1H, NH), 12,91-13,03 (m, 1H, -COOH) ppm.

2. korak: Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida



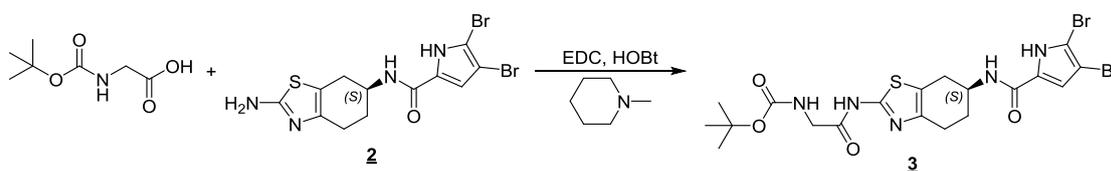
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **1** (1,356 g; 5,043 mmol; 1 ekv) in (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2,6-diamina (0,854 g; 5,043 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 100 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z 1% raztopino citronske kisline (2x20 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x50 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Dobili smo 1,678 g čistega produkta.

Na TLC kromatogramu smo opazili, da smo pri spiranju z 1% raztopino citronske kisline v vodno fazo izgubili tudi nekaj našega produkta (tvorba soli), zato smo to fazo ponovno ekstrahirali z etilacetatom (2x50 mL). Dobljeno organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x50 mL) in nato še z nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL) ter sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Dobili smo še 0,164 g čistega produkta.

Po obeh ekstrakcijah skupaj smo dobili 1,842 g čistega produkta. Izkoristek reakcije: 86,9%. Izgled: rumeno-oranžni kristali. Elementna sestava: C₁₂H₁₂Br₂N₄OS. M_r = 420,12 g/mol. T_i = 150–153 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,71-1,84 (m, 1H, H_A-7), 1,87-1,97 (m, 1H, H_B-7), 2,42-2,50 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,79 (dd, 1H, J₁ = 5,3 Hz, J₂ = 15,0 Hz, H_B-4), 4,07-4,20 (m, 1H, CHNH), 6,69 (s, 2H, NH₂), 7,00 (s, 1H, CH-pirol), 8,06 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NHCO), 12,69 (s, 1H, NH-pirol) ppm.

4.2 Sinteza *terc*-butil (*S*)-(2-(((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata



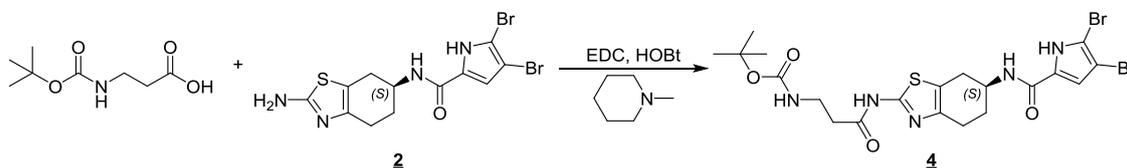
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz Boc-Gly (0,068 g; 0,390 mmol; 1 ekv) in spojine **2** (0,164 g; 0,390 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃

(2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Spojino **3** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z mobilno fazo (MF): DKM/MeOH = 20/1.

Dobili smo 0,059 g čistega produkta **3**. Izkoristek reakcije: 26,2%. Izgled: svetlo rumeni kristali. Elementna sestava: C₁₉H₂₃Br₂N₅O₄S. M_r = 577,29 g/mol. T_t > 300 °C. [α]_D -2,96 (c = 0,15 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,35 (s, 9H, 3xCH₃), 1,79-1,93 (m, 1H, H_A-7), 1,95-2,04 (m, 1H, H_B-7), 2,57-2,76 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,98 (dd, 1H, J₁ = 4,9 Hz, J₂ = 15,6 Hz, H_B-4), 3,81 (d, 2H, J = 6,2 Hz, -NH-CH₂-CO-), 4,12-4,26 (m, 1H, -CHNH), 7,00 (d, 1H, J = 1,9 Hz, -CH-pirol), 7,14 (t, 1H, J = 6,1 Hz, -CO-NH-CH₂-), 8,10 (d, 1H, J = 7,7 Hz, -NH-CO-), 11,94 (s, 1H, -NH-), 12,70 (s, 1H, NH-pirol) ppm. HRMS (ESI⁻) *m/z* za C₁₉H₂₂Br₂N₅O₄S ([M-H]⁻): izračunana masa 573,9759; izmerjena masa 573,9752. HPLC: t_r 13,233 min (96% pri 254 nm).

4.3 Sinteza *terc*-butil (*S*)-(3-(((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropil)karbamata

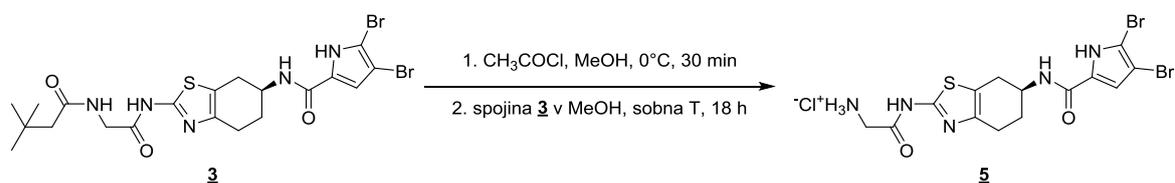


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz Boc-β-Ala (0,090 g; 0,476 mmol; 1 ekv) in spojine **2** (0,200 g; 0,476 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Spojino **4** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z MF: DKM/MeOH = 30/1.

Dobili smo 0,146 g čistega produkta **4**. Izkoristek reakcije: 52,0%. Izgled: živo rumeni kristali. Elementna sestava: C₂₀H₂₅Br₂N₅O₄S. M_r = 591,32 g/mol. T_t = 175-178 °C. [α]_D-4,22 (c = 0,31 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,37 (s, 9H, 3xCH₃), 1,76-1,94 (m, 1H, H_A-7), 1,94-2,06 (m, 1H, H_B-7), 2,53-2,73 (m, 5H, CH₂, H-5, H_A-4), 2,97 (dd, 1H, J₁ = 5,2 Hz, J₂ = 15,5 Hz, H_B-4), 3,21 (dd, 2H, J₁ = 6,9 Hz, J₂ = 12,8 Hz, -CH₂), 4,11-4,25 (m, 1H, -CH), 6,89 (t, 1H, J = 5,6 Hz, -CO-NH-CH₂-), 7,00 (d, 1H, J = 2,8 Hz, -CH-pirol), 8,10 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -NH-CO-), 11,90 (s, 1H, -NH-), 12,70 (d, 1H, J = 2,6 Hz, NH-pirol) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ 23,59, 28,05, 28,49 (3C), 29,25, 36,40, 45,10, 77,24, 79,91, 99,75, 105,97, 119,89, 126,80, 143,07, 156,21, 156,65, 159,56, 169,83 ppm. HRMS (ESI⁻) *m/z* za C₂₀H₂₄Br₂N₅O₄S ([M-H]⁻): izračunana masa 587,9916; izmerjena masa 587,9901. HPLC: t_r 13,328 min (98% pri 254 nm).

4.4 Sinteza (S)-2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-amonijevega klorida



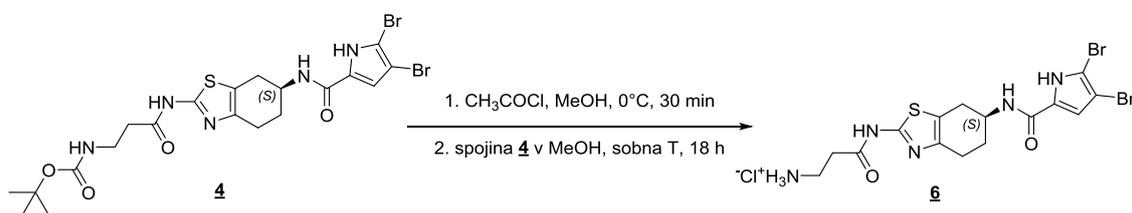
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku B iz spojine **3** (0,037 g; 0,064 mmol; 1 ekv) ter dodatkom acetilklorida (0,05 mL; 0,64 mmol; 10 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (MeOH) in dobljeno spojino posušili.

Dobili smo 0,031 g čistega produkta **5**. Izkoristek reakcije: 94,2%. Izgled: rumeno - rjavi kristali. Elementna sestava: C₁₄H₁₆Br₂ClN₅O₂S. M_r = 513,63 g/mol. T_t = 242-245 °C. [α]_D-4,42 (c = 0,24 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,81-1,93 (m, 1H, H_A-7), 1,95-2,06 (m, 1H, H_B-7), 2,61-2,76 (m, 3H, H-5, H_A-4), 3,00 (dd, 1H, J₁ = 5,2 Hz, J₂ = 15,6 Hz, H_B-4), 3,83-3,91 (m, 2H, ⁺NH₃-CH₂-CO-), 4,13-4,26 (m, 1H, -CHNH), 7,01 (d, 1H, J = 2,8 Hz, -CH-pirol), 8,21 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -NH-CO-), 8,28 (t, 3H, J = 5,1 Hz, -NH₃⁺), 12,41 (s, 1H, -NH-), 12,76 (d, 1H, J = 2,6 Hz, NH-pirol) ppm. ¹³C NMR (100

MHz, MeOH- d_4) δ 24,43, 29,15, 29,57, 42,82, 46,82, 79,73, 79,08, 100,01, 106,29, 114,79, 123,06, 128,66, 140,27, 166,69 ppm. HRMS (ESI⁻) m/z za C₁₄H₁₄Br₂N₅O₂S ([M-H]⁻): izračunana masa 473,9235; izmerjena masa 473,9230. HPLC: t_r 10,799 min (100% pri 254 nm).

4.5 Sinteza (S)-3-(((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropan-1-amonijevega klorida

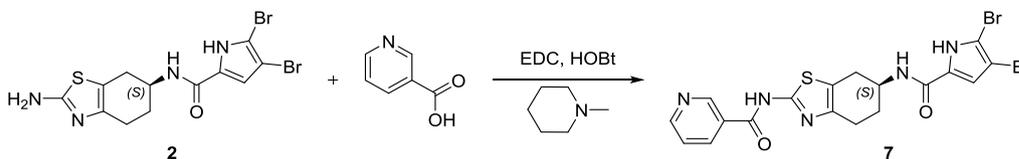


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku B iz spojine **4** (0,100 g; 0,169 mmol; 1 ekv) ter dodatkom acetilklorida (0,12 mL; 1,69 mmol; 10 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (MeOH) in dobljeno spojino dobro posušili.

Dobili smo 0,087 g čistega produkta **6**. Izkoristek reakcije: 97,8%. Izgled: svetlo rjavi kristali. Elementna sestava: C₁₅H₁₈Br₂ClN₅O₂S. $M_r = 527,66$ g/mol. $T_t = 238-241$ °C. $[\alpha]_D^{-5,51}$ ($c = 0,25$ g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,80-1,94 (m, 1H, H_A-7), 1,95-2,06 (m, 1H, H_B-7), 2,60-2,78 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,82 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, -COCH₂), 2,98 (dd, 1H, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 16,4$ Hz, H_B-4), 3,04-3,11 (m, 2H, -CH₂NH₃⁺), 4,00 (-CH, signal se prekriva s signalom za vodo), 7,02 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, -CH-pirol), 7,99 (s, 3H, -NH₃⁺), 8,27 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, -NH-CO-), 12,18 (s, 1H, -NH-), 12,78 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, NH-pirol) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, MeOH- d_4) δ 21,66, 27,01, 27,80, 32,40, 34,43, 45,03, 98,63, 104,92, 113,52, 121,62, 127,18, 135,55, 159,50, 159,83, 169,42 ppm. HRMS (ESI⁻) m/z za C₁₅H₁₆Br₂N₅O₂S ([M-H]⁻): izračunana masa 487,9432; izmerjena masa 487,9392. HPLC: t_r 10,799 min (100% pri 254 nm).

4.6 Sinteza (*S*)-*N*-(6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]tiazol-2-il)nikotinamida



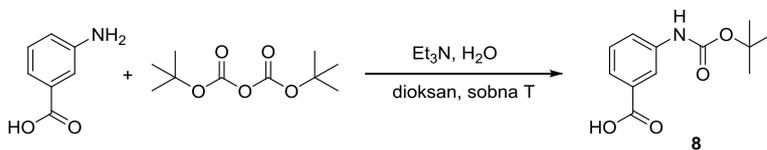
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,200 g; 0,476 mmol; 1 ekv) in nikotinske kisline (0,059 g; 0,476 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat).

Na TLC kromatogramu smo opazili, da naš produkt vsebuje nečistote, zato smo spojino **7** poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo, ki žal ni bila uspešna, saj se naš produkt kljub segrevanju in povečevanju deleža MeOH ni topil v mobilni fazi (DKM:MeOH =30:1). Produkt smo zato kristalizirali iz metanola.

Dobili smo 0,065 g čistega produkta **7**. Izkoristek reakcije: 26,0%. Izgled: živo rumeni kristali. Elementna sestava: C₁₈H₁₅Br₂N₅O₂S. M_r = 525,22 g/mol. T_i = 275-278 °C. [α]_D+2,50 (c = 0,34 g/mL, DMF). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,83-1,96 (m, 1H, H_A-7), 1,98-2,07 (m, 1H, H_B-7), 2,66-2,83 (m, 3H, H-5, H_A-4), 3,04 (d, 1H, J = 14,6 Hz, H_B-4), 4,16-4,29 (m, 1H, CHNH), 7,02 (d, 1H, J = 2,7 Hz, -CH-pirol), 7,58 (dd, 1H, J₁ = 4,8 Hz, J₂ = 7,9 Hz, CH-piridin), 8,13 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -NH-CO-), 8,41 (ddd, 1H, J₁ = 1,7 Hz, J₂ = 2,3 Hz, J₃ = 8,1 Hz, CH-piridin), 8,79 (d, 1H, J = 4,2 Hz, CH-piridin), 9,20 (d, 1H, J = 1,8 Hz, CH-piridin), 12,67-12,79 (m, 2H, NH-pirol, -NH-) ppm. HRMS (ESI⁺) *m/z* za C₁₈H₁₄Br₂N₅O₂S ([M-H]⁺): izračunana masa 521,9235; izmerjena masa 521,9232. HPLC: t_r 11,503 min (98% pri 254 nm).

4.7 Sinteza 3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)benzojske kisline



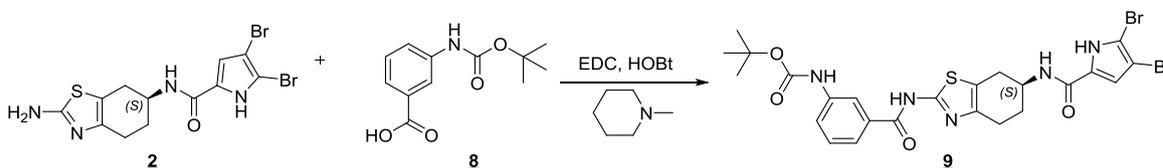
Raztopini 3-aminobenzojske kisline (2,000 g; 14,58 mmol; 1 ekv) in trietilamina (Et₃N; 4,1 mL; 29,16 mmol; 2 ekv) v mešanici vode (17 mL) in 1,4-dioksana (33 mL) smo pri sobni T dodali Boc-anhidrid (5,091 g; 23,33 mmol; 1,6 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 16 h pri sobni T.

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili 1,4-dioksan. Ker smo imeli naš produkt v obliki soli z Et₃N, smo dodali 2 M HCl (približno 33 mL), da smo nevtralizirali bazo. Naš produkt je izpadel v obliki oborine, ki smo jo odnučali in spirali s heksanom, da smo dobili čist produkt.

Na NMR spektru smo opazili, da naš produkt vsebuje še sledove topil (voda,...), kar je opazno tudi iz izkoristka reakcije, ki je bil večji kot 100%.

Dobili smo 3,520 g produkta **8**. Izkoristek reakcije: 101,8%. Izgled: beli kristali. Elementna sestava: C₁₂H₁₅NO₄. M_r = 237,26 g/mol. T_t = 185-188 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,50 (s, 9H, 3xCH₃), 7,37 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz, -CH-benzen), 7,53 (ddd, 1H, *J*₁ = 1,1 Hz, *J*₂ = 1,6 Hz, *J*₃ = 7,7 Hz, -CH-benzen), 7,63 (ddd, 1H, *J*₁ = 8,1 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, *J*₃ = 1,0 Hz, -CH-benzen), 8,15 (s, 1H, -CH-benzen), 9,57 (s, 1H, -NH-), 12,91 (s, 1H, -COOH) ppm.

4.8 Sinteza *terc*-butil (*S*)-(3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il) karbamoil)fenil)karbamata

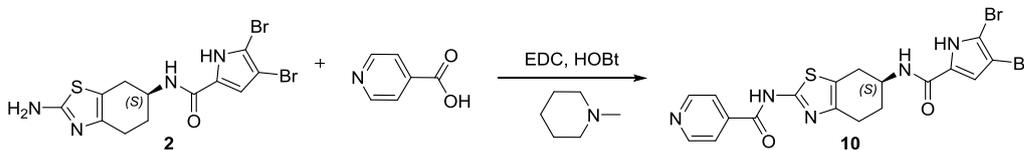


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,200 g; 0,476 mmol; 1 ekv) in spojine **8** (0,113 g; 0,476 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Spojino **9** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z MF: DKM/MeOH = 30/1.

Dobili smo 0,076 g čistega produkta **9**. Izkoristek reakcije: 25,0%. Izgled: živo rumeni kristali. Elementna sestava: C₂₄H₂₅Br₂N₅O₄S. M_r = 639,36 g/mol. T_f = 177-180 °C. [α]_D+10,67 (c = 0,07 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,50 (s, 9H, 3xCH₃), 1,83-1,96 (m, 1H, H_A-7), 1,97-2,07 (m, 1H, H_B-7), 2,62-2,83 (m, 3H, H-5, H_A-4), 3,04 (dd, 1H, J₁ = 4,1 Hz, J₂ = 16,0 Hz, H_B-4), 4,16-4,31 (m, 1H, -CH), 7,02 (d, 1H, J = 2,7 Hz, -CH-pirol), 7,40 (t, 1H, J = 8,0 Hz, -CH-benzen), 7,61 (d, 1H, J = 8,0 Hz, -CH-benzen), 7,70 (d, 1H, J = 8,1 Hz, -CH-benzen), 8,12 (d, 1H, J = 7,7 Hz, -NH-CO-), 8,16 (s, 1H, -CH-benzen), 9,59 (s, 1H, -NH-Boc), 12,44 (s, 1H, -NH-), 12,71 (d, 1H, J = 2,7 Hz, NH-pirol) ppm. HRMS (ESI⁺) *m/z* za C₂₄H₂₄Br₂N₅O₄S ([M-H]⁺): izračunana masa 635,9916; izmerjena masa 635,9909. HPLC: t_r 14,840 min (100% pri 254 nm).

4.9 Sinteza (S)-N-(6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-il)izonikotinamida



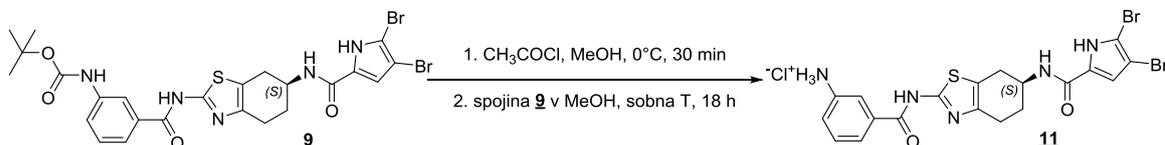
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,200 g; 0,476 mmol; 1 ekv) in izonikotinske kisline (0,059 g; 0,476 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Na TLC kromatogramu smo opazili, da naš produkt vsebuje nečistoče, zato smo ga kristalizirali iz MeOH. Kristale smo posušili v sušilniku (50 °C).

Dobili smo 0,075 g čistega produkta **10**. Izkoristek reakcije: 30,0%. Izgled: temno rumeni kristali. Elementna sestava: C₁₈H₁₅Br₂N₅O₂S. M_r = 525,22 g/mol. T_i = 196-199 °C. [α]_D+9,03 (c = 0,34 g/mL, DMF). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,84-1,96 (m, 1H, H_A-7), 1,99-2,13 (m, 1H, H_B-7), 2,62-2,83 (m, 3H, H-5, H_A-4), 3,04 (d, 1H, J = 14,0 Hz, H_B-4), 4,17-4,30 (m, 1H, CHNH), 7,02 (d, 1H, J = 2,7 Hz, -CH-pirol), 7,97 (dd, 2H, J₁ = 4,4 Hz, J₂ = 1,7 Hz, 2x CH-piridin), 8,13 (d, 1H, J = 7,8 Hz, -NH-CO-), 8,77-8,84 (m, 2H, 2x CH-piridin), 12,72 (d, 1H, J = 2,6 Hz, NH-pirol), 12,84 (s, 1H, -NH-) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ 25,87, 29,87, 29,91, 47,46, 99,99, 106,07, 109,49, 109,82, 109,86, 114,62, 114,87, 123,43, 128,82, 144,12, 144,49, 151,10, 161,21, 169,93 ppm. HRMS (ESI) *m/z* za C₁₈H₁₄Br₂N₅O₂S ([M-H]⁻): izračunana masa 521,9235; izmerjena masa 521,9240. HPLC: t_r 11,390 min (95% pri 254 nm).

4.10 Sinteza (*S*)-3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]tiazol-2-il)karbamoi)benzenamonijevega klorida

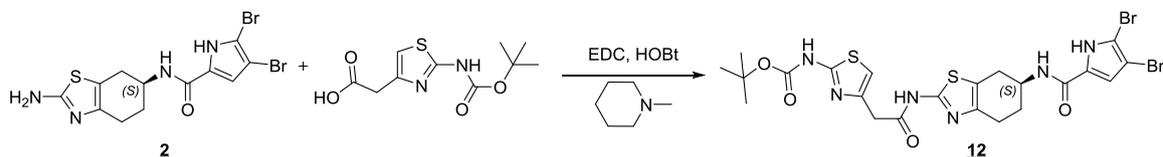


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku B iz spojine **9** (0,060 g; 0,094 mmol; 1 ekv), ter dodatkom acetilklorida (0,07 mL; 0,94 mmol; 10 ekv). Ko smo razvili TLC kromatogram, smo opazili, da odščita ni potekla do konca, zato smo reakcijo nastavili še enkrat po splošnem postopku B. Tokrat je bila reakcija bolj uspešna in smo dobili čist produkt.

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (MeOH) in dobljeno spojino dobro posušili v sušilniku (50°C).

Dobili smo 0,035 g čistega produkta **11**. Izkoristek reakcije: 64,8%. Izgled: oranžni kristali. Elementna sestava: C₁₉H₁₈Br₂ClN₅O₂S. M_r = 575,50 g/mol. T_t = 192-195 °C. [α]_D^{-2,38} (c = 0,18 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,83-1,95 (m, 1H, H_A-7), 1,98-2,08 (m, 1H, H_B-7), 2,62-2,81 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,99-3,09 (m, 1H, H_B-4), 4,22-4,30 (m, 1H, CHNH), 7,02 (d, 1H, *J* = 2,8 Hz, -CH-pirol), 7,36-7,44 (m, 1H, CH-benzen), 7,53 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, CH-benzen), 7,81 (s, 1H, CH-benzen), 7,91 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, CH-benzen), 8,19 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, -NH-CO-), 12,75 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, NH-pirol) ppm, signala za NH₃⁺ in NH- nista vidna v spektru. ¹³C NMR (100 MHz, MeOH-*d*₄) δ 23,79, 28,83, 29,36, 46,66, 100,02, 106,32, 114,73, 123,00, 124,56, 128,65, 129,01, 129,76, 132,06, 133,09, 135,07, 138,78, 161,31, 161,66, 166,10 ppm. HRMS (ESI⁻) *m/z* za C₁₉H₁₆Br₂N₅O₂S ([M-H]⁻): izračunana masa 535,9391; izmerjena masa 535,9390. HPLC: t_r 11,715 min (99% pri 254 nm).

4.11 Sinteza *tert*-butil (*S*)-(4-(2-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata

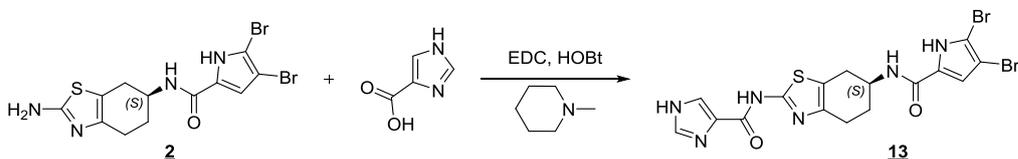


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,094 g; 0,225 mmol; 1 ekv) in spojine 2-(2-((*tert*-butoksilkarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetna kislina (0,058 g; 0,225 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Spojino **12** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z MF: DKM/MeOH = 30/1.

Dobili smo 0,079 g čistega produkta **12**. Izkoristek reakcije: 53,2%. Izgled: živo rumeni kristali. Elementna sestava: C₂₂H₂₄Br₂N₆O₄S₂. M_r = 660,40 g/mol. T_t = 182-185 °C. [α]_D^{-1,16} (c = 0,21 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,47 (s, 9H, 3xCH₃), 1,79-1,92 (m, 1H, H_A-7), 1,95-2,05 (m, 1H, H_B-7), 2,61-2,74 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,98 (dd, 1H, J₁ = 5,2 Hz, J₂ = 16,1 Hz, H_B-4), 3,74 (s, 2H, -CH₂-CO), 4,12-4,26 (m, 1H, -CHNH), 6,92 (s, 1H, tiazol-CH-), 7,00 (d, 1H, J = 2,8 Hz, -CH-pirol), 8,09 (d, 1H, J = 7,6 Hz, -NH-CO-), 11,44 (s, 1H, NH-Boc), 12,07 (s, 1H, -NH-), 12,70 (d, 1H, J = 2,7 Hz, NH-pirol) ppm. HRMS (ESI⁺) *m/z* za C₂₂H₂₃Br₂N₆O₄S₂ ([M-H]⁺): izračunana masa 656,9589; izmerjena masa 656,9571. HPLC: t_r 14,209 min (77% pri 254 nm).

4.12 Sinteza (*S*)-*N*-(6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-imidazol-4-karboksamida

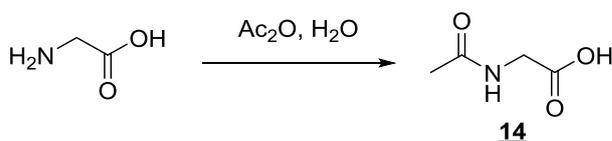


Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,130 g; 0,309 mmol; 1 ekv) in imidazol-4-karboksilne kisline (0,035 g; 0,309 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo (etilacetat). Spojino **13** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z MF: DKM/MeOH = 20/1 toliko časa, da se je eluirala celotna izhodna spojina, nato pa smo povečali polarnost mobilne faze MF: DKM/MeOH = 9/1. Žal ločba ni bila najbolj uspešna, zato smo ponovili kolonsko kromatografijo s spremenjeno MF: etilacetat/MeOH = 5/2.

Dobili smo 0,057 g čistega produkta **13**. Izkoristek reakcije: 38,9%. Izgled: živo rumeni kristali. Elementna sestava: C₁₆H₁₄Br₂N₆O₂S. M_r = 514,20 g/mol. T_i = 178-181 °C. [α]_D+0,00 (c = 0,31 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,80-1,95 (m, 1H, H_A-7), 1,95-2,06 (m, 1H, H_B-7), 2,57-2,83 (m, 3H, H-5, H_A-4), 3,01 (dd, 1H, J₁ = 15,8 Hz, J₂ = 5,2 Hz, H_B-4), 4,13-4,30 (m, 1H, -CHNH), 7,00 (s, 1H, -CH-pirol), 7,87 (d, 1H, J = 1,0 Hz, -CH-imidazol), 8,02 (d, 1H, J = 1,0 Hz, -CH-imidazol), 8,11 (d, 1H, J = 7,7 Hz, -NH-CO-), 11,25 (s, 1H, -NH-), 12,76 (s, 2H, NH-imidazol in NH-pirol) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 24,60, 28,38, 28,57, 45,23, 97,63, 104,68, 112,90, 119,43, 121,52, 121,58, 128,18, 133,94, 136,61, 143,46, 155,27, 158,48 ppm. HRMS (ESI⁺) *m/z* za C₁₆H₁₃Br₂N₆O₂S ([M-H]⁺): izračunana masa 510,9187; izmerjena masa 510,9190. HPLC: t_r 11,041 min (99% pri 254 nm).

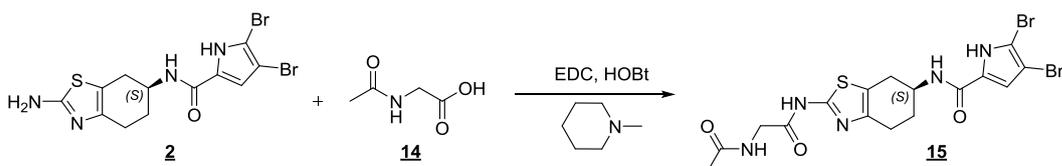
4.13 Sinteza acetilglicina



V bučko smo zatehtali glicin (1,00 g; 0,0133 mol; 1 ekv) in ga raztopili v 10 mL destilirane vode. V raztopino smo dodali acetanhidrid (2,52 mL; 0,0266 mol; 2 ekv) in pustili mešati 1 uro pri sobni T. Nastalo reakcijsko zmes smo nato čez noč dali v hladilnik, da je nastala oborina. Naslednji dan smo oborino odnučali in sprali z ledeno destilirano vodo. Dobljeni produkt smo posušili v sušilniku (100 °C).

Dobili smo 0,745 g čistega produkta **14**. Izkoristek reakcije: 47,9%. Izgled: beli kristali. Elementna sestava: C₄H₇NO₃. M_r = 117,10 g/mol. T_t = 183-186 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,84 (s, 3H, -CH₃), 3,72 (d, 2H, J = 5,9 Hz, -CH₂-), 8,18 (t, 1H, J = 5,4 Hz, -NH-), 12,52 (s, 1H, -COOH) ppm.

4.14 Sinteza (S)-N-(2-(2-acetamidoacetamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida



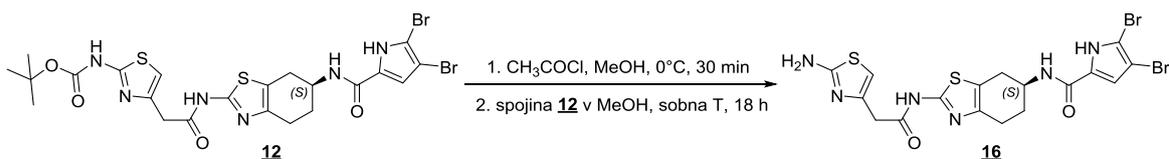
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku A iz spojine **2** (0,200 g; 0,476 mmol; 1 ekv) in spojine **14** (0,058 g; 0,476 mmol; 1 ekv).

Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom uparili topilo (DMF), preostanek v bučki pa raztopili v 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo najprej sprali z destilirano vodo (1x10 mL) in z 1% raztopino citronske kisline (1x10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nazadnje z nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Po končani ekstrakciji smo organsko fazo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, matičnici pa pod znižanim tlakom uparili topilo

(etilacetat). Spojino **15** smo čistili s kolonsko kromatografijo. Kolono smo spirali z 100% etilacetatom (EA) toliko časa, da se je eluirala celotna izhodna spojina **2**, nato pa smo povečali polarnost mobilne faze MF: EA/MeOH = 5/2, da se je eluirala še spojina **15**.

Dobili smo 0,098 g čistega produkta **15**. Izkoristek reakcije: 39,7%. Izgled: temno rumeni kristali. Elementna sestava: C₁₆H₁₇Br₂N₅O₃S. M_r = 519,21 g/mol. T_f = 195-198 °C. [α]_D -7,42 (c = 0,30 g/mL, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,83-1,91 (m, 4H, H_A-7, -COCH₃), 1,96-2,03 (m, 1H, H_B-7), 2,58-2,77 (m, 3H, H-5, H_A-4), 2,99 (dd, 1H, J₁ = 5,2 Hz, J₂ = 15,5 Hz, -CH₂), 3,94 (d, 2H, J = 5,8 Hz, -NH-CH₂), 4,13-4,24 (m, 1H, -CHNH), 7,01 (d, 1H, J = 2,8 Hz, -CH-pirol), 8,11 (d, 1H, J = 7,7 Hz, -NH-CO-), 8,26 (t, 1H, J = 5,9 Hz, -CO-NH-), 11,98 (s, 1H, -NH-), 12,71 (d, 1H, J = 2,6 Hz, NH-pirol) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22,33, 24,62, 28,35, 28,56, 41,85, 45,25, 97,76, 104,52, 112,90, 119,29, 128,04, 143,47, 155,29, 158,35, 167,88, 169,84 ppm. HRMS (ESI) *m/z* za C₁₆H₁₆Br₂N₅O₃S ([M-H]⁻): izračunana masa 515,9341; izmerjena masa 515,9346. HPLC: t_r 11,480 min (99% pri 254 nm).

4.15 Sinteza (*S*)-*N*-(2-(2-(2-aminotiazol-4-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida



Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku B iz spojine **12** (0,050 g; 0,076 mmol; 1 ekv) ter dodatkom acetilklorida (0,05 mL; 0,76 mmol; 10 ekv). Ko smo razvili TLC kromatogram, smo opazili, da odščita ni potekla do konca, zato smo reakcijo nastavili še enkrat po splošnem postopku B. Tokrat je bila reakcija bolj uspešna, vendar naš produkt ni bil popolnoma čist (na TLC kromatogramu smo še vedno lahko opazili liso izhodnega produkta **12**), zato smo najprej odparili MeOH, nato pa naredili ekstrakcijo. Reakcijsko zmes smo raztopili v vodi in etilacetatu, pri temu so nam v vodni fazi izpadli kristali, ki smo jih odnučali. V liju ločniku smo nato ločili vodno in organsko fazo, vodno fazo

naalkalili z NaOH do pH okoli 10, da smo nevtralizirali kislino (HCl). Nekaj našega produkta se je pri temu iz soli pretvorilo v nevtralno obliko in izpadlo v obliki kristalov, ki smo jih odnučali. Preostalo vodno fazo smo ekstrahirali z etilacetatom, da smo dobili naš produkt v organsko fazo ter nato odparili topilo na rotavaporju (etilacetat) in posušili.

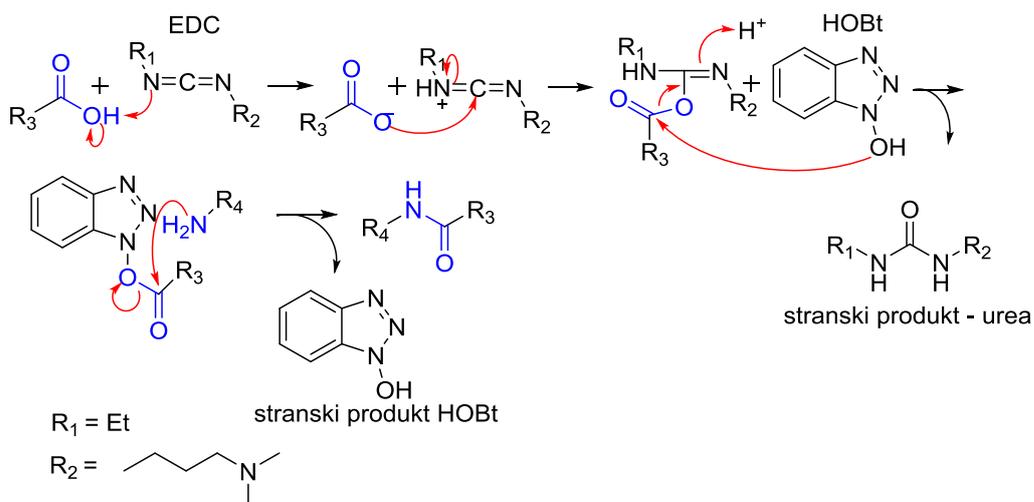
Dobili smo 0,010 g čistega produkta **16**. Izkoristek reakcije: 23,3%. Izgled: svetlo rjavi kristali. Elementna sestava: $C_{17}H_{16}Br_2N_6O_2S_2$. $M_r = 560,28$ g/mol. $T_f > 300$ °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,80-1,94 (m, 1H, H_A -7), 1,96-2,05 (m, 1H, H_B -7), 2,65-2,79 (m, 3H, H-5, H_A -4), 2,98 (dd, 1H, $J_1 = 4,0$ Hz, $J_2 = 15,5$ Hz, H_B -4), 3,80 (s, 2H, $-CH_2-CO$), 4,14-4,23 (m, 1H, $-CHNH$), 6,70 (s, 1H, tiazol- CH -), 7,02 (s, 1H, $-CH$ -pirol), 8,16 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, $-NH-CO-$), 9,01 (s, 2H, $-NH_2$), 12,23 (s, 1H, $-NH-$), 12,74 (s, 1H, NH -pirol) ppm. HRMS (ESI $^-$) m/z za $C_{17}H_{15}Br_2N_6O_2S_2$ ($[M-H]^-$): izračunana masa 556,9065; izmerjena masa 556,9070. HPLC: t_r 11,480 min (99% pri 254 nm).

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZE

5.1.1 Reakcija sklopitve pri tvorbi amidne vezi

Pri sintezi spojin smo se v veliki meri posluževali sklopitvenih reagentov za tvorbo amidne vezi, saj omogočajo selektivno aktivacijo karboksilne kisline. Aktivirana karboksilna kislina nato reagira z aminom in tvori amidno vez. Uporabili smo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBt). Dodatek HOBt-a poleg EDC-ja poveča učinkovitost nastanka amidne vezi ter prepreči morebitno racemizacijo. Shema 4 prikazuje nastanek amidne vezi z uporabo omenjenih sklopitvenih reagentov. Najprej pride do nastanka aktiviranega estra z nukleofilno adicijo karboksilata na elektrofilni karbodiimidni ogljikov atom sklopitvenega reagenta EDC. V tej stopnji lahko pride do racemizacije in prenosa acilne skupine ter s tem nastanka nereaktivne *N*-acilsečnine. Stranski reakciji se lahko izognemo z ohladitvijo reakcijske zmesi na 0 °C in dodatkom reagenta HOBt, ki je selektivni nukleofil in reagira z aktiviranim estrom pred prenosom acilne skupine. Reakcija poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije, pri čemer pride do nastanka stranskega produkta (pripadajoče uree). Nazadnje poteče še reakcija z aminom in pride do tvorbe amidne vezi ter recikliranja reagenta HOBt. (24)



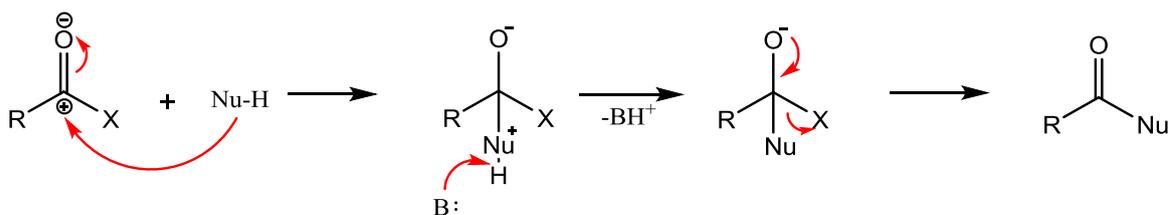
Shema 4: Prikaz nastanka amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta EDC in HOBT (prirejeno po 24).

Spojine smo izolirali z ekstrakcijo v etilacetat. S spiranjem organske faze z destilirano vodo in citronsko kislino smo se znebili nezreagirane izhodnega amina, EDC in NMM, s spiranjem z NaHCO_3 pa še nezreagirane kisline in HOBT. Pri spojini **2** je pri spiranju s citronsko kislino prišlo do tvorbe soli, zato smo izgubljali produkt v vodno fazo in smo morali narediti dodatno ekstrakcijo z etilacetatom. Pri ostalih spojinah nismo imeli podobnih težav.

5.1.2 Uvedba karbamatne zaščitne skupine

Karbamatno zaščitno skupino smo uvedli na amino skupino 3-aminobenzojske kisline. Amino skupine so namreč srednje močne baze in odlični nukleofili, zato jih je treba zaščititi, da ne reagirajo v naslednji stopnji sinteze. V reakcijsko zmes smo poleg izhodne spojine (3-aminobenzojska kislina) dodali še bazo trietilamin (Et_3N), di-*t*-butil dikarbonat (Boc_2O) in dioksan. Boc_2O dodamo kot reagent za uvedbo karbamatne skupine. Bazo dodamo zato, da povečamo nukleofilnost aminske skupine ter nevtraliziramo nastajajočo kislino ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$). Če ne bi nevtralizirali nastajajoče kisline, bi lahko prišlo do protonacije amino skupine in reakcija ne bi potekla do konca. Boc_2O je slabo topen v vodnih raztopinah. Z dodatkom dioksana povečamo njegovo topnost v reakcijski zmesi in s tem izboljšamo stik med reagenti in pospešimo potek reakcije.

Shema 5 prikazuje potek uvedbe karbamatne zaščite na amino skupino. Najprej pride do nukleofilne adicije in tvorbe nestabilnega tetraedričnega intermediata. Nestabilnost tetraedričnega intermediata izvira iz steričnih ovir okoli kvarternega C-atoma in ločitve naboja. Le-ta zato razpade in dobimo končno spojino z zaščiteno amino skupino. Istočasno lahko poteče stranska reakcija med Boc₂O in H₂O, pri čemer nastane CO₂ in *t*-butanol.



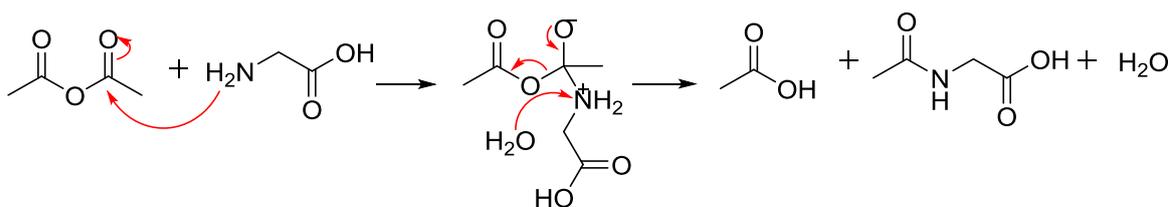
Shema 5: Prikaz nastanka tetraedričnega intermediata. Nu-H = 3-aminobenzojska kislina, RCOX = Boc₂O (kjer je R = (CH₃)₃CO-; X = -OCOOC(CH₃)₃) in B = Et₃N. (prirejeno po 25, 26)

Uporaba Boc zaščitne skupine je zelo pogosta pri zaščiti primarnih in sekundarnih aminov, saj je taka zaščita obstojna pri hidrogenolizi, pri reakcijah z bazami in nukleofilnimi reagenti, hkrati pa neobstoja v kislih pogojih, zato je odstranjevanje Boc zaščitne skupine dokaj preprosto.

5.1.3 Uvedba acetilne skupine na aminsko skupino glicina

Pri tej reakciji smo amin pretvorili v amid. Amide najpogostejše sintetiziramo iz aminov z uporabo kislinskih kloridov ali anhidridov. V kislem in bazičnem okolju so običajno stabilni, zato jih redko uporabimo kot zaščitne skupine. Izjema so amidi z močnimi elektronakceptorskimi skupinami, ki so manj odporni proti kislinski hidrolizi.

Acetilno skupino lahko uvedemo z dodatkom acetanhidrida ali pa z dodatkom acetilklorida v kombinaciji z bazo. V našem primeru smo uporabili acetanhidrid. Pride do nukleofilnega napada amino skupine na eno od karbonilnih skupin acetanhidrida, pri čemer nastane nestabilen tetraedrični intermedat, ki razpade na amidni produkt in očetno kislino. Potek reakcije je prikazan na Shema 6.

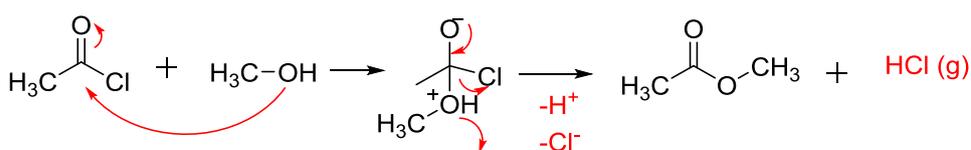


Shema 6: Uvedba acetilne skupine na aminske skupino glicina (prirejeno po 26)

V našem primeru acetilne skupine nismo uvedli zaradi zaščite aminske skupine, ampak zato, ker smo želeli pripraviti spojino s takim fragmentom (spojina **15**) in ovrednotiti njeno aktivnost.

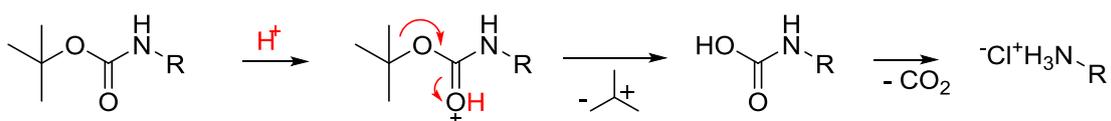
5.1.4 Odščita karbamatne zaščitne skupine z reakcijo acidolize

Boc zaščitno skupino lahko selektivno odstranimo s kislimi pogoji acidolize. Kot acidolizni reagent zelo pogosto uporabimo trifluoroocetno kislino, lahko pa uporabimo tudi plinasti HCl v izbranem topilu. Pri eksperimentalnem delu smo za odščito uporabili plinasti HCl, ki smo ga tvorili *in situ* z reakcijo med MeOH in acetilkloridom. Potek *in situ* priprave plinastega HCl je prikazan na Shema 7. Metanol deluje kot nukleofil in napade acetilklorid, ki je kislinski klorid. Le-ti so znani po tem, da so zelo dovzetni za napad nukleofilov, saj so halogenidi dobro izstopajoče skupine, kar še dodatno poveča primanjkljaj elektronske gostote na karbonilnem C-atomu. Reakcija poteče stopenjsko preko tvorbe nestabilnega tetraedričnega intermedija.



Shema 7: Priprava plinastega HCl (prirejeno po 26)

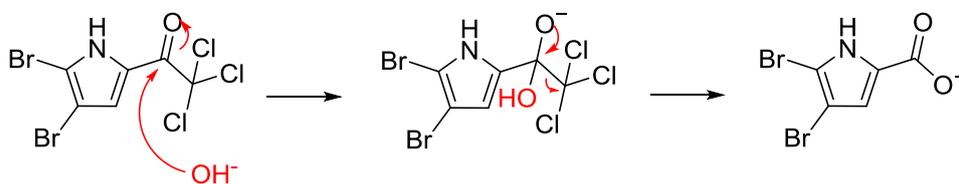
Po *in situ* pripravi plinastega HCl smo v reakcijsko zmes vnesli z Boc zaščitno skupino zaščiteno amin. Najprej pride do protonacije karbonilne skupine in nato do nastanka karbaminske kisline, ki je zelo nestabilna in takoj razpade na ogljikov dioksid, 2-metilprop-1-en in amin. Naš končni produkt je bil v obliki soli, saj pride zaradi kislinskih pogojev reakcije do protoniranja odščitene aminske skupine produkta. Na Shema 8 je prikaz mehanizma odščite aminske skupine.



Shema 8: Potek odščite Boc zaščitne skupine z acidolizo

5.1.5 Alkalna hidroliza

Hidroksilni ion napade karbonilno skupino naše spojine. Pride do tvorbe nestabilnega tetraedričnega intermediata in posledično poteče nukleofilna substitucija. (Shema 9)



Shema 9: Prikaz poteka mehanizma alkalne hidrolize (prirejeno po 26)

Naš končni produkt je v obliki soli, zato smo v postopku izolacije reakcijsko zmes nakisali z 1 M HCl, pri čemer pride do pretvorbe $\text{COO}^- \text{Na}^+$ v COOH in zaradi zmanjšane topnosti produkta ta običajno izpade iz reakcijske zmesi v obliki oborine.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

5.2.1 Rezultati bioloških testiranj za DNA-girazo

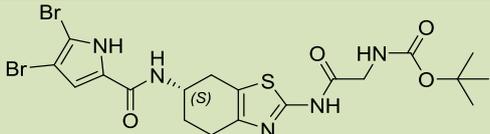
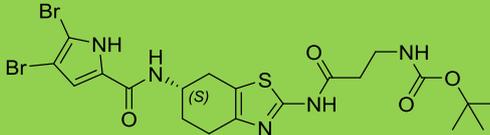
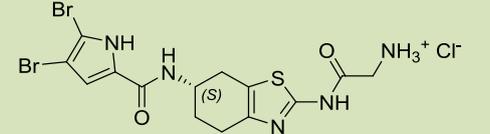
Končnim spojinam **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16** smo najprej izmerili inhibitorno aktivnost na encimu DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli*. Rezultati v Preglednica 1 so podani kot % rezidualne aktivnosti (RA) encima, ki jo izračunamo po naslednji formuli:

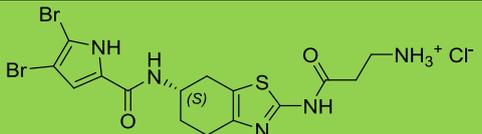
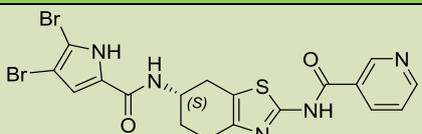
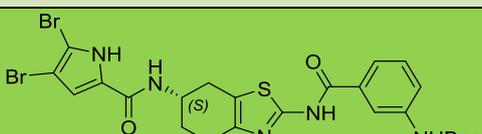
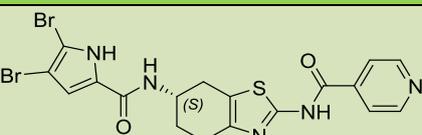
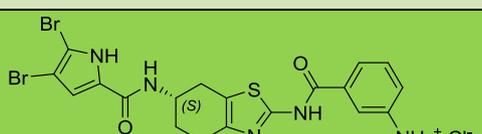
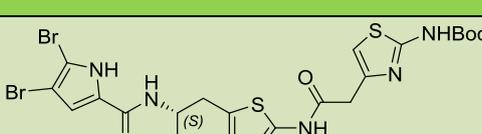
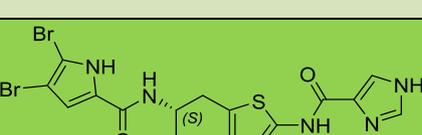
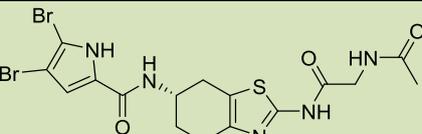
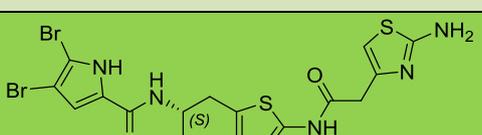
$$RA_{\text{encima}} (\%) = 100\% - \text{zaviralna aktivnost zaviralca} (\%)$$

Čim manjši je RA_{encima} , tem boljše zaviralne lastnosti ima testirana spojina.

Osnovna raztopina vsake posamezne spojine je bila pripravljena v DMSO-ju (konc. = 10 mM). V pripravljene končne raztopine je koncentracija DMSO-ja največ 1%. Pri takšni koncentraciji DMSO-ja je bilo dokazano, da je encim popolnoma aktiven ter da topilo ne vpliva na potek encimske reakcije. V vsakem testu so bile testirane tudi kontrolne raztopine (slepa raztopina = raztopina substrata brez encima, pozitivna kontrola = raztopina novobiocina (znanega inhibitorja) in negativna kontrola = raztopina substrata in encima brez dodatka inhibitorja).

Preglednica 1: Rezidualna aktivnost spojin **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16** na DNA-girazi iz *E. coli*

Spojina	Struktura	Rezidualna aktivnost encima (RA_{encima})			
		100 μM	10 μM	1 μM	0,1 μM
3		0%	-1%	17%	75%
4		0%	-2%	26%	84%
5		-1%	-3%	44%	89%

<u>6</u>		-1%	-1%	62%	95%
<u>7</u>		-1%	-1%	55%	101%
<u>9</u>		28%	38%	96%	/
<u>10</u>		-1%	-1%	47%	105%
<u>11</u>		2%	-3%	49%	93%
<u>12</u>		1%	-3%	7%	60%
<u>13</u>		-3%	-3%	35%	81%
<u>15</u>		-3%	-3%	1%	65%
<u>16</u>		-3%	-30%	29%	88%

Iz rezultatov lahko sklepamo, da so vse spojine, razen spojine 9, dokaj dobri zaviralci DNA-giraze iz bakterije *E. coli*, saj zavirajo delovanje encima v nanomolarnem do mikromolarnem območju. Vsem spojinam, z izjemo spojine 9, smo določili še IC₅₀ za

DNA-girazo iz *E. coli*. Nekaterim spojinam smo izmerili tudi zaviralne aktivnosti na DNA-girazi iz bakterije *S. aureus* in topoizomerazi IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati so zbrani v

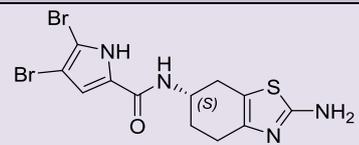
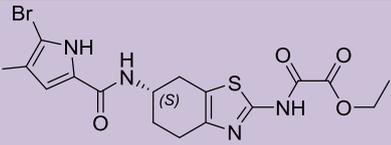
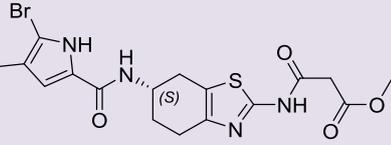
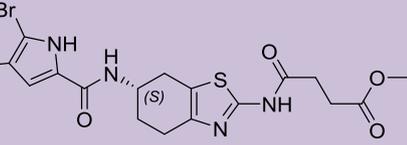
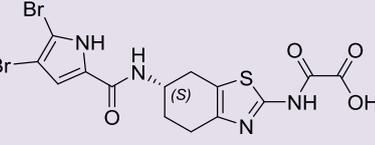
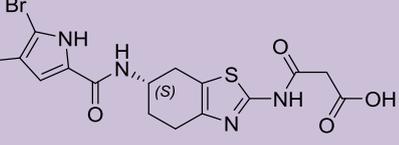
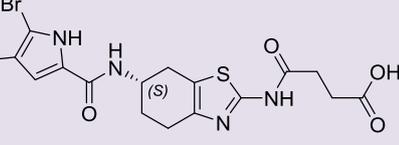
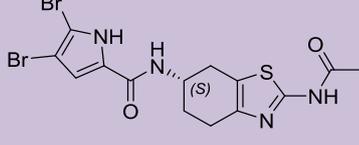
Preglednica 2.

Preglednica 2: Vrednosti IC₅₀ ali rezidualna aktivnost encimov (c = 100 μM) DNA-giraze in topoizomeraze IV iz *E. coli* in *S. aureus* za spojine **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16**.

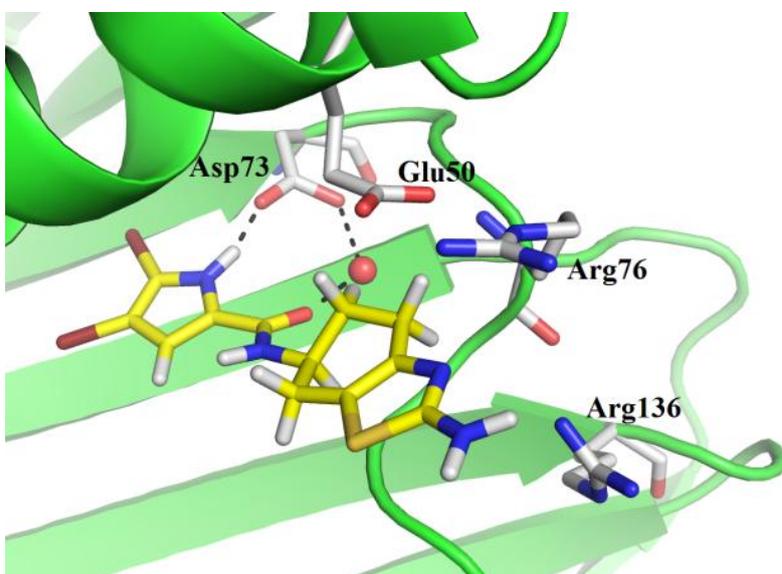
Sintetizirane spojine		DNA-giraza IC ₅₀ (μM) ali RA (%)		topoizomeraza IV IC ₅₀ (μM) ali RA (%)	
Spojina	M (g/mol)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<u>3</u>	577,29	0,45 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>4</u>	591,32	0,69 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>5</u>	513,63	1,1 μM	70%	67%	100%
<u>6</u>	527,66	0,88 μM	74%	44%	70%
<u>7</u>	525,22	0,80 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>9</u>	639,36	63%	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>10</u>	525,22	1,3 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>11</u>	575,70	1,8 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
<u>12</u>	660,40	0,34 μM	141%	87%	93%
<u>13</u>	514,20	0,45 μM	79%	21%	10%
<u>15</u>	519,21	0,52 μM	65%	10%	61%
<u>16</u>	560,28	2,0 μM	61%	102%	99%

Rezultate smo primerjali z do sedaj znanimi inhibitorji s podobno strukturno formulo, ki so bili že predhodno sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. (Preglednica 3) (23)

Preglednica 3: Vrednosti IC₅₀ strukturno podobnih spojin na DNA-girazi in topoizomerazi IV bakterij *E. coli* in *S. aureus* (23)

Spojine objavljene v članku (23)		DNA-giraza		topoizomeraza IV	
		IC ₅₀ (μM) ali RA (%)		IC ₅₀ (μM) ali RA (%)	
Oznaka spojine in njena struktura		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<u>3</u>		12 μM	90%	101%	102%
<u>23</u>		0,10 μM	80 μM	74%	180 μM
<u>24</u>		0,096 μM	110 μM	86 μM	74%
<u>25</u>		0,093 μM	113%	97%	99%
<u>34</u>		0,058 μM	120 μM	200 μM	78 μM
<u>35</u>		0,069 μM	86 μM	74 μM	76 μM
<u>36</u>		0,049 μM	270 μM	90%	110 μM
<u>45</u>		0,15 μM	26 μM	98%	101%

Pri našem eksperimentalnem delu smo izhajali iz spojine **3** (lab. oznaka **TTM-07**), ki ima $IC_{50} = 12 \mu\text{M}$ za DNA-girazo iz *E. coli* (23). Njena vezava v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije *E. coli* je prikazana na Slika 13. Molekulsko sidranje predvidi dve interakciji spojine z ATP-vezavnim mestom DNA-giraze, in sicer eno neposredno vodikovo vez preko aminske skupine pirola z Asp73 in eno posredno vodikovo vez preko karbonilne skupine in vode do Asp73. V vezavnem mestu sta prikazana še aminokislinska ostanka Arg76 in Arg136, ki sta primerna za tvorbo vodikovih vezi s spojinami, vendar spojina **TTM-07** predvidoma z njima ne tvori interakcij.



Slika 13: Prikaz vezave spojine **TTM-07** v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze iz bakterije *E. coli* (23).

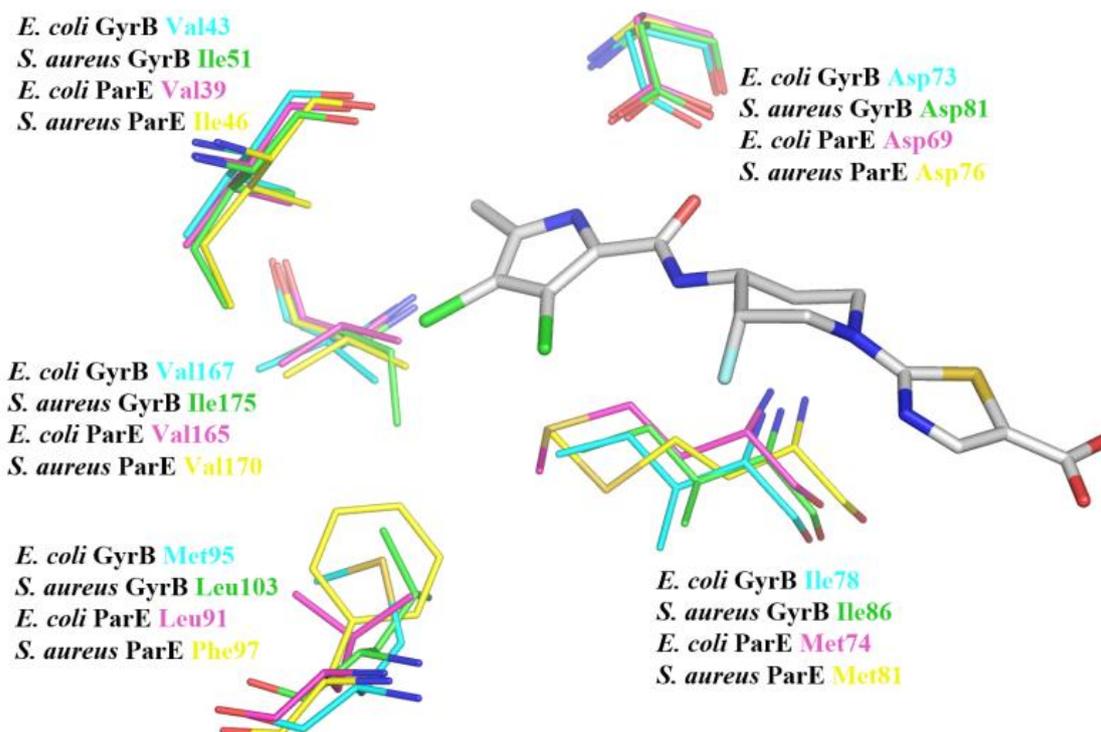
Naše sintetizirane spojine imajo vrednosti IC_{50} med $0,34 \mu\text{M}$ do $2,0 \mu\text{M}$, kar pomeni, da smo dosegli od 36- do 6-kratno izboljšanje IC_{50} glede na izhodno spojino **TTM-07**. Naš najbolj obetavni zaviralec DNA-giraze iz *E. coli* je spojina **12**, ki ima $IC_{50} = 0,34 \mu\text{M}$. Gre za spojino, ki smo ji na aminsko skupino izhodne spojine **TTM-07** pripeli 2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetno kislino. Razlog za močnejšo aktivnost spojine **12** glede na spojino **TTM-07** je najverjetneje ta, da spojina **12** tvori omenjeno interakcijo z gvanidinskim delom Arg76/Arg136, medtem ko je **TTM-07** ne. Opazimo lahko, da ko smo spojini **12** odstranili Boc zaščitno skupino (spojina **16**), se je le tej možno zmanjšala aktivnost. IC_{50} spojine **16** je $2,0 \mu\text{M}$, kar je 6-kratno zvišanje glede na spojino **12**, ki ima

$IC_{50} = 0,34 \mu\text{M}$. Razlog je v tem, da spojina **16** ne more tvoriti interakcij z gvanidinskim delom Arg76/Arg136, saj ne vsebuje akceptorja vodikove vezi. Podobno opazimo pri parih spojin **3** in **5**, ter **4** in **6**, kjer imajo spojine z Boc zaščitenimi amini boljšo aktivnost kot prosti amini. Zanimiva je tudi primerjava med spojinama **3** in **15**. Razlika v njuni strukturi je samo v zaščiti amino skupine. Spojina **15** ima vezan acetilni fragment, spojina **3** pa Boc zaščitno skupino. Razlike v aktivnosti spojin skoraj ni, saj ima spojina **15** $IC_{50} = 0,52 \mu\text{M}$, spojina **3** pa $IC_{50} = 0,45 \mu\text{M}$. Očitno pride do podobne interakcije z ATP-vezavnim mestom encima in velikost fragmenta, vezanega na amino skupino, nima bistvenega vpliva (ne pride do steričnih ovir).

Spojinam smo določili tudi inhibitorno aktivnost na topoizomerazi IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Glede na dobljene vrednosti RA imamo dve obetavni spojinini, ki izkazujejo delovanje v mikromolarnem območju. Gre za spojinini **13** in **15**. Spojina **13** izkazuje zaviralno delovanje tako na topoizomerazo IV bakterije *E. coli* (RA = 21%) kot tudi na topoizomerazo IV iz bakterije *S. aureus* (RA = 10%) pri koncentraciji 100 μM . Prišlo je torej do 5- oz. 10- kratnega izboljšanja aktivnosti glede na izhodno spojino **TTM-07**, ki ima RA $\approx 100\%$ pri obeh encimih. Spojina **15** pa izkazuje predvsem aktivnost na topoizomerazo IV iz bakterije *E. coli*, njena RA = 10% pri koncentraciji 100 μM .

Na žalost nobena od spojin ne izkazuje aktivnosti na DNA-girazo iz bakterije *S. aureus*.

Razlog, da so spojine aktivne samo na DNA-girazo iz bakterije *E. coli* bi lahko bil v tem, da le-ta vsebuje večji hidrofobni žep v ATP-vezavnem mestu kot preostali trije encimi. Tako so na primer pri DNA-girazi iz bakterije *E. coli* aminokislina Val43, Met95 in Val167 zamenjane z večjimi aminokislinami Ile51, Leu103 in Ile175 pri DNA-girazi iz bakterije *S. aureus*, kar zmanjša prostornino hidrofobnega žepa (Slika 14). Zato se spojine, ki vsebujejo večje 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamidno ogrodje ne morejo vsidirati v hidrofobni žep teh encimov, tako kot se to zgodi pri DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Posledica tega je, da ne pride do vezave spojin z Asp73, zato imajo spojine slabo aktivnost. Dodaten razlog za slabšo aktivnost spojin na DNA-girazo iz bakterije *S. aureus* lahko iščemo tudi v tem, da ne pride do željene interakcije z Arg144 (Arg136 pri DNA-girazi bakterije *E. coli*). (23)



Slika 14: Prekrivanje kristalnih struktur DNA-giraze iz *E. coli* (PDB oznaka: 4DUH; svetlo modra barva), DNA-giraze iz *S. aureus* (PDB oznaka: 3TTZ; zelena barva), topoizomeraze IV iz *E. coli* (PDB oznaka: 4HZ0; roza barva) in topoizomeraze IV iz *S. aureus* (PDB oznaka: 4URL; rumena barva). Struktura zaviralca pirolamidnega tipa iz kristalne strukture 3TTZ je predstavljena v sivih palčkah. Povzeto po (23).

Naša želja so spojine, ki bi hkrati izkazovale aktivnost na DNA-girazo in na topoizomerazo IV posamezne bakterije, saj bi imeli dvojno zaviranje, s čimer bi zmanjšali možnost razvoja rezistence bakterij zaradi mutacije tarče. Če pogledamo dobljene spojine v tej luči, sta najbolj obetavni spojini **13** in **15**, ki imata IC_{50} v nanomolarnih koncentracijah, hkrati pa izkazujeta tudi aktivnost na topoizomerazo IV bakterije *E. coli*.

Spojine **23-25**, **34-36** in **45** iz članka (23) imajo sicer boljšo aktivnost kot naše spojine, vendar pa nam dobljeni rezultati odpirajo možnost za načrtovanje novih zaviralcev DNA-giraze z drugačnimi strukturnimi elementi.

5.2.2 Rezultati določanja protibakterijske aktivnosti spojin

Vsem končnim spojinam smo določili delež inhibicije rasti dvema G^+ bakterijama *E. faecalis* ter *S. aureus* in dvema G^- bakterijama *E. coli* in *P. aeruginosa* pri koncentraciji 50

μM v primerjavi s ciprofloksacinom kot pozitivno kontrolo. Rezultati so prikazani v Preglednica 4 in Preglednica 5.

Preglednica 4: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij *E. faecalis* in *S. aureus* v treh časovnih točkah: 4 h, 8 h in 24 h.

spojina	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<u>3</u>	61	11	37	33	41	19
<u>4</u>	42	10	30	31	45	22
<u>5</u>	55	0	17	30	18	0
<u>6</u>	38	2	12	24	3	0
<u>7</u>	36	1	6	37	1	0
<u>9</u>	27	25	48	24	0	7
<u>10</u>	26	8	15	23	15	0
<u>11</u>	53	10	25	50	23	8
<u>12</u>	22	17	25	17	30	25
<u>13</u>	85	46	53	72	45	40
<u>15</u>	57	31	52	11	19	11
<u>16</u>	95	90	80	102	70	48

Preglednica 5: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa* v treh časovnih točkah: 4 h, 8 h in 24 h.

spojina	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<u>3</u>	22	36	21	48	16	0
<u>4</u>	27	38	20	40	11	0
<u>5</u>	29	13	1	12	0	0
<u>6</u>	9	2	11	9	1	11
<u>7</u>	5	2	5	0	1	0
<u>9</u>	8	10	10	0	3	0
<u>10</u>	9	2	8	0	2	0
<u>11</u>	0	0	5	0	0	0
<u>12</u>	9	7	11	18	8	0
<u>13</u>	26	21	16	18	5	0
<u>15</u>	10	2	8	0	1	0
<u>16</u>	22	14	0	0	0	0

Spojina 16 izkazuje dobro protibakterijsko na grampozitivnih kulturah *E. faecalis* in *S. aureus* pri 50 μ M koncentraciji po 4 urah, saj izkazuje podobno delovanje kot pozitivna kontrola ciprofloksacin, vendar pa protibakterijska aktivnost pri obeh sevih po 24 urah precej pade (s 95% na 80% pri *E. faecalis* in z 102% na 48% pri *S. aureus*). Podobno se zgodi pri spojini 13, ki izkazuje 85% inhibicijo rasti bakterije *E. faecalis* po 4 urah, vendar po 24 urah precej pade, na 53%. Več kot 50% inhibicijo rasti pri 50 μ M koncentraciji po 4 urah izkazujejo še spojine 3, 5, 11 in 15 za bakterijo *E. faecalis* ter spojini 11 in 13 za bakterijo *S. aureus*, vendar tudi v teh primerih aktivnost po 24 urah precej pade. Nobena od spojin ne izkazuje več kot 50% inhibicije rasti gramnegativnih bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa*. Najverjetnejši razlog neaktivnosti spojin na gramnegativne bakterije je v tem, da spojine slabo prodirajo skozi bakterijsko celično steno, ki je pri gramnegativnih bakterijah še kompleksnejša kot pri grampozitivnih bakterijah.

Za doseganje protibakterijskega učinka je poleg zaviranja delovanja encima pomembno tudi, da spojina prehaja v bakterijsko celico skozi bakterijsko celično steno. Namreč,

čprav spojina daje dobre rezultate v *in vitro* testiranjih, le-ti v testiranjih na živih bakterijah ne bodo opazni, če spojina ne bo uspela priti do encima, da bi ga lahko zavirala. To je eden od večjih izzivov odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin; kako pripraviti spojine s protibakterijsko aktivnostjo, ki bi prehajale skozi bakterijske celične stene, a ne bi bile podvržene raznim obrambnim mehanizmom bakterij, kot so izlivne črpalke, metabolizem spojin.

5.2.3 Rezultati bioloških testiranj za Hsp90

Končnim spojinam **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16** smo najprej izmerili afinitetno konstanto vezave K_d z mikroskalno elektroforezo na rekombinantnem humanem Hsp90 (Preglednica 6). Spojine smo nato testirali v celičnem modelu replikona HCV pri 50 μM in aktivnim spojinam (zaviralna aktivnost > 50% pri 50 μM) v nadaljevanju določili vrednosti IC_{50} , LD_{50} in izračunali indeks selektivnosti ($\text{LD}_{50}/\text{IC}_{50}$) (Preglednica 6). Z določitvijo afinitetne konstante vezave K_d smo želeli potrditi, da je zaviranje Hsp90 eden od možnih mehanizmov protivirusnega delovanja sintetiziranih končnih spojin. Rezultate smo primerjali glede na spojino **TTM-07** (Preglednica 7 **Error! Reference source not found.**), ki je bila predhodno sintetizirana na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.

Preglednica 6: Rezultati bioloških testiranj na Hsp90 in celični model replikona HCV za končne spojine **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16**

Spojina	K_d Hsp90 (μM)	% zaviranja replikona HCV pri 50 μM	replikon HCV IC_{50} (μM)	celice replikona HCV LD_{50} (μM)	indeks selektivnosti
<u>3</u>	ni bilo določeno	87	30	66	ni bilo določeno
<u>4</u>	ni bilo določeno	97	23	18	0,8
<u>5</u>	16 ± 5,1	94	1,2	127	106
<u>6</u>	27 ± 2,2	96	20	68	3,4

<u>7</u> *	ni bilo določeno	30	ni bilo določeno	ni bilo določeno	ni bilo določeno
<u>9</u>	ni vezave	0	ni bilo določeno	ni bilo določeno	ni bilo določeno
<u>10</u> *	ni bilo določeno	72	9,1	245	27
<u>11</u>	14 ± 2,4	91	1,1	49	45
<u>12</u> *	ni bilo določeno	58	ni bilo določeno	ni bilo določeno	ni bilo določeno
<u>13</u>	40 ± 4,9	79	19	88	4,6
<u>15</u>	28 ± 5	93	2,7	151	56
<u>16</u>	12 ± 1,9	94	8,0	66	8,3

* Spojine 7, 10 in 12 so se slabo topile v EtOH, zato afinitetna konstanta vezave K_d še ni bila določena.

Preglednica 7: Rezultati bioloških testiranj na Hsp90 in celični model replikona HCV za izhodno spojino **TTM-07**

Spojina	K_d Hsp90 (μ M)	% zaviranja replikona HCV pri 50 μ M	replikon HCV IC_{50} (μ M)	celice replikona HCV LD_{50} (μ M)	indeks selektivnosti
<u>TTM-07</u>	39 ± 14	77	2,0	90	45

Vrednost IC_{50} nam pove, kolikšna koncentracija spojine je potrebna, da pride do 50% zaviranja replikona HCV. Nižja kot je ta vrednost, bolj aktivna je spojina. Dobimo jo iz krivulje odziva v odvisnosti od koncentracije testirane spojine, in sicer tako, da se izračuna koncentracija, potrebna za zaviranje 50% maksimalnega odziva.

Vrednost LD_{50} nam pove, kolikšna koncentracija testirane spojine povzroči smrt 50% testiranih celic. Višja kot je ta vrednost, manj toksična je spojina za gostiteljske celice.

Iz obeh vrednosti je izračunan indeks selektivnosti po naslednji formuli:

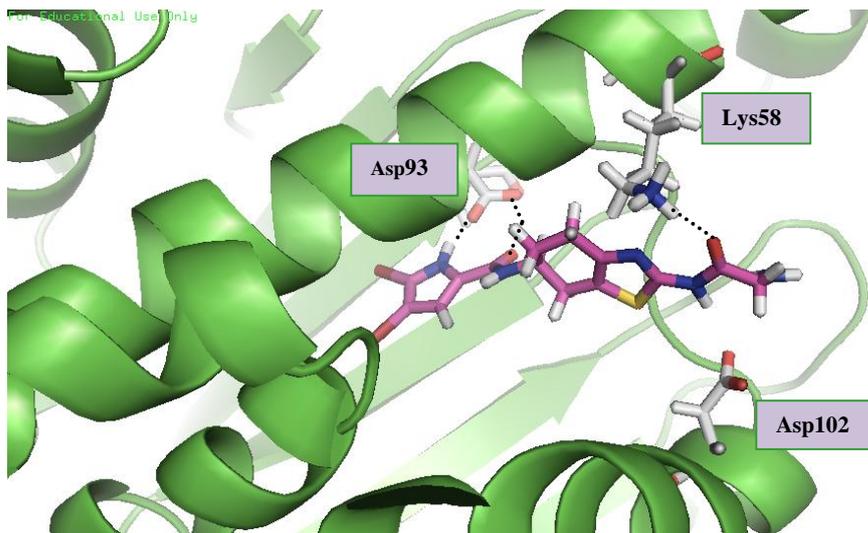
$$\text{Indeks selektivnosti} = \text{LD}_{50} / \text{IC}_{50}$$

Višji kot je indeks selektivnosti, bolj selektivna je spojina in manj nevarnosti je, da bi prišlo do citotoksičnega učinka na gostiteljske celice pri terapevtskem odmerku.

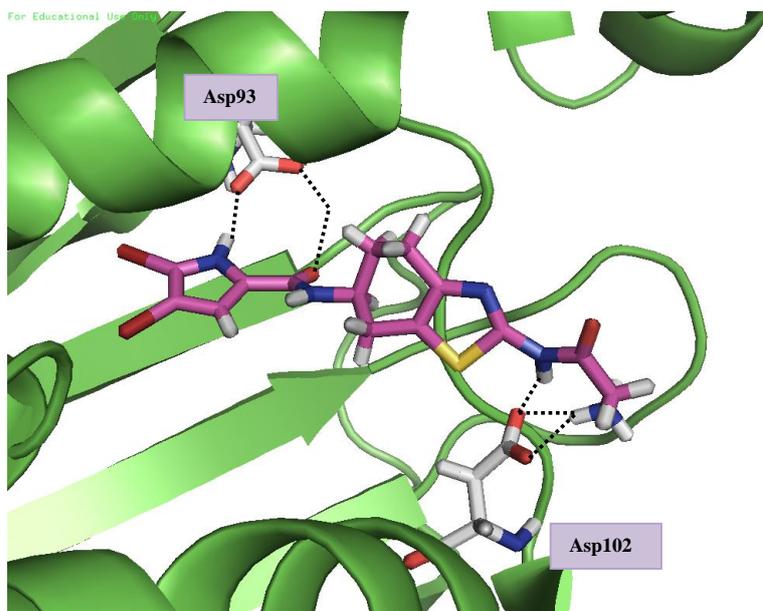
Spojina je bila določena tudi afinitetna konstanta vezave na Hsp90, ki nam pove kolikšna koncentracija spojine je potrebna, da je zapolnjenih 50% vseh vezavnih mest proteina. Manjša kot je njena vrednost, večja je afiniteta spojine do proteina (boljša vezava). Podana je kot povprečje 3 meritev in standardne deviacije.

Naša najbolj obetavna spojina je glede na rezultate spojina **5**, ki ima $\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$, kar je skoraj 2-kratno izboljšanje glede na izhodno spojino **TTM-07**, ki ima $\text{IC}_{50} = 2,0 \mu\text{M}$. Znižanje IC_{50} na celičnem modelu replikona HCV je lahko posledica višje afinitete do Hsp90 ($K_d = 16 \mu\text{M}$) zaradi dodatnih interakcij spojine **5** z amino skupino Lys58 in s karboksilno kislino Asp102, ki smo ju predvideli pri načrtovanju spojin (Slika 15 in Slika 16). Na sliki 15 in 16 vidimo, da različni programi različno predvidijo vezavo spojine **5** v ATP-vezavno mesto Hsp90. Do tega pride zato, ker imajo različni programi v ozadju različne algoritme za sidranje spojin v vezavno mesto encima.

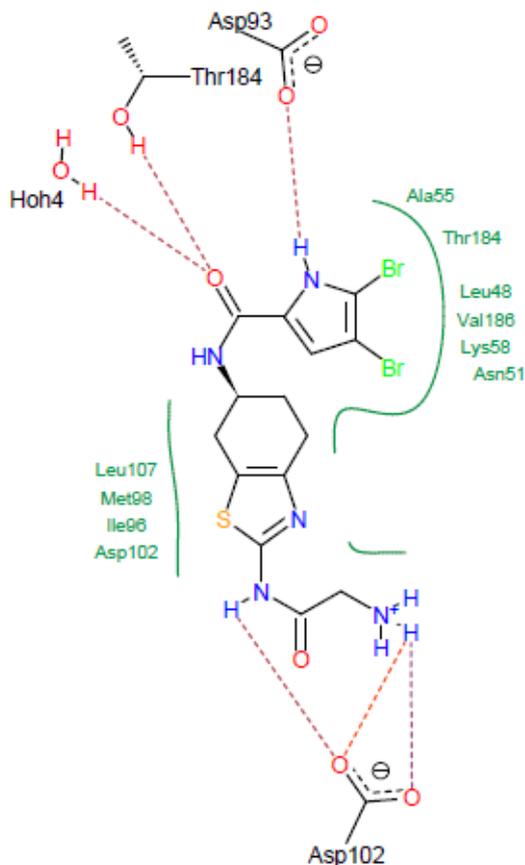
Prav tako ima spojina **5** tudi večjo selektivnost, saj je njen $\text{LD}_{50} = 127 \mu\text{M}$ in je torej posledično indeks selektivnosti enak 106. Pride torej do približno 2-kratnega izboljšanja selektivnosti glede na spojino **TTM-07** ($\text{LD}_{50} = 90 \mu\text{M}$, indeks selektivnost = 45). Spojina **5** ima tudi nižjo afinitetno konstanto ($K_d = 16 \mu\text{M}$) glede na spojino **TTM-07** ($K_d = 39 \mu\text{M}$). Načrtovanje spojine **5** se je izkazalo za zelo uspešno, saj ima izboljšane vse vrednotene parametre glede na izhodno spojino **TTM-07**.



Slika 15: Predvidena vezava spojine **5** v ATP-vezavnem mestu Hsp90 glede na sidranje s programom FRED (OEDocking). Encim je prikazan z zeleno, zaviralec z vijolično, ključne aminokisliline s sivo barvo, vodikove vezi pa s črno barvo. Slika je bila pripravljena s programom PyMOL.



Slika 16: Predvidena vezava spojine **5** v ATP-vezavnem mestu za Hsp90 glede na sidranje s programom FlexX. Encim je prikazan z zeleno, zaviralec z vijolično, ključne aminokisliline s sivo barvo, vodikove vezi pa s črno barvo. Slika je bila pripravljena s programom PyMOL. (molekularno sidranje s programom FlexX je delo doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.)



Slika 17: Shematski prikaz vezave spojine **5** v ATP-vezavnem mestu za Hsp90 glede na sidranje s programom FlexX.

Spojina **11**, ki vsebuje 3-aminofenilni fragment in ima IC_{50} v celičnem modelu replikona HCV $1,1 \mu\text{M}$ izkazuje še malenkost boljšo aktivnost kot spojina **5** ($IC_{50} = 1,2 \mu\text{M}$), prav tako ima tudi nižjo vrednost afinitetne konstante ($K_d = 14 \mu\text{M}$), vendar pa je njen indeks selektivnosti za približno dvakrat nižji, zato je spojina **5** bolj obetavna za nadaljnjo optimizacijo.

Ugoden rezultat daje tudi spojina **15**, ki ima $IC_{50} = 2,7 \mu\text{M}$, kar je sicer nekoliko višje kot izhodna spojina **TTM-07**, vendar pa spojina **15** izkazuje boljšo afiniteto do proteina (nižja K_d) ter večjo selektivnost (višji indeks selektivnosti).

Preostale spojine imajo višje vrednosti IC_{50} in nižje indekse selektivnosti, kot izhodna spojina **TTM-07**, zato niso tako zanimive za nadaljnjo optimizacijo spojin, so pa pomemben doprinos k razumevanju povezave med strukturo in delovanjem tako za vezavo na Hsp90 kot tudi za protivirusno delovanje proti HCV.

Opazimo lahko, da ima spojina **3**, ki vsebuje Boc zaščitno skupino, slabšo aktivnost kot spojina **5** s prosto aaminsko skupino. Razlika v strukturi (prisotnosti oziroma odsotnosti Boc zaščitne skupine na aaminski skupini) privede do 25-kratne razlike v aktivnosti spojine. Najverjetnejši razlog je v tem, da z Boc zaščitena aaminska skupina, zaradi steričnih ovir ne tvori interakcije s karboksilno skupino Asp102 in ima posledično višjo K_d vrednost. Pričakujemo namreč, da imajo spojine z nižjo K_d vrednostjo boljše protivirusno delovanje, torej nižji IC_{50} . Pri paru spojin **4** in **6** ta razlika ni tako opazna, saj očitno že nezaščitena aaminska skupina β -alanina ne tvori omenjene interakcije, zato je aktivnost obeh spojin nižja ($IC_{50} \approx 20 \mu M$).

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove spojine, ki se vežejo na Hsp90 in so derivati (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida (naša spojina **2** oz. predhodno sintetizirana spojina **TTM-07**). Z uvajanjem substituentov na amino skupino izhodne spojine smo želeli doseči interakcijo spojine z Asp102 in s tem izboljšati njeno vezavo na Hsp90 ter posledično doseči močnejše protivirusno delovanje.

Hsp90 in DNA-giraza spadata v isto GHKL naddružino in imata zelo podobno ATP-vezavno mesto, zato smo vseh končnim spojinam poleg določitve vezave na Hsp90 določili tudi aktivnost na DNA-girazo in dobili sledeče rezultate:

Hsp90:

- Najboljše rezultate izkazuje spojina **5**, ki ima IC_{50} na replikon HCV = 1,2 μ M, LD_{50} na celice replikona HCV = 127 μ M, indeks selektivnost = 106, ter afinitetno konstanto K_d na Hsp90 = 16 μ M.
- Dobro aktivnost izkazujeta še spojini **11** in **15**, vendar sta manj selektivni.

DNA-giraza:

- Najboljše rezultate izkazuje spojina **12**, ki ima IC_{50} za DNA-girazo iz *E. coli* = 0,34 μ M. Najverjetnejši razlog za izboljšanje aktivnosti spojine **12** je interakcija spojine z Arg76/Arg136 v vezavnem mestu.
- Tudi ostale končne spojine, z izjemo spojine **9**, zavirajo DNA-girazo iz *E. coli* v nanomolarni do mikromolarni koncentraciji.

DNA-giraza in topoizomeraza IV iz *E. coli*:

- Željena je dvojna inhibicija bakterije, da preprečimo pojav rezistence bakterij. S tega vidika sta najbolj obetavni spojini **13** in **15**, ki izkazujeta delovanje na oba encima.

ATP-vezavno mesto Hsp90 ima velik potencial kot tarča za protivirusne učinkovine za zdravljenje okužbe s HCV. Dobljeni rezultati predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo spojin tega strukturnega tipa zaviralcev Hsp90.

Podobno tudi rezultati, dobljeni s testiranjem spojin na DNA-girazo, odpirajo nove možnosti za nadaljnje načrtovanje zaviralcev DNA-giraze, čeprav bo potrebno še veliko raziskav, da bomo dosegli ustrezno selektivno toksičnost in širokospektralno delovanje. Poleg dokazane zaviralne aktivnosti na encimih je namreč pomembno tudi, da so spojine sposobne zaobiti vse bakterijske obrambne mehanizme in doseči zaviralno aktivnost tudi na celični ravni.

7 LITERATURA

- 1) http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615_eng.pdf
(dostopano: 26.05.2016).
- 2) <http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm#cFAQ41> (dostopano: 26.05.2016).
- 3) H. Wang, A. W. Tai: Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication, *Viruses* 2016; 8(5): 142.
- 4) T. K. H. Scheel, C. M. Rice: Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies, *Nature Medicine* 2013; 19(7): 837-849.
- 5) J. Dubuisson, F.-L. Cosset: Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update, *Journal of Hepatology* 2014; 61(1): 3-13.
- 6) T. Okamoto, Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi and Y. Matsuura: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90, *The EMBO Journal* 2006; 25(20): 5015-5025.
- 7) R. Dutta, M. Inouye: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily, *Trends in Biochemical Sciences* 2000; 25(1): 24-28.
- 8) R. Geller, S. Taguwa, J. Frydman: Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication, *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823(3): 698-706.
- 9) R. Bhat, S. R. Tummalapalli, D. P. Rotella: Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57(21): 8718-8728.
- 10) J. Li, J. Buchner: Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery, *Biomedical Journal* 2013; 36(3): 106-117.
- 11) S. Ujino, S. Yamaguchi, K. Shimotohno, H. Takaku: Heat-shock Protein 90 Is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3, *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(11): 6841-6846.
- 12) N. Kubota, M. Nomoto, G.-W. Hwang, T. Watanabe, M. Kohara, T. Wakita, A. Naganuma, S. Kuge: Hepatitis C virus inhibitor synergism suggests multistep interactions between heat-shock protein 90 and hepatitis C virus replication, *World Journal of Hepatology* 2016; 8(5): 282-290.

- 13) K. Chayama, C. N. Hayes: HCV Drug Resistance Challenges in Japan: The Role of Pre-Existing Variants and Emerging Resistant Strains in Direct Acting Antiviral Therapy, *Viruses* 2015; 7(10): 5328-5342.
- 14) G. S. Bbosa, N. Mwebaza, J. Odda, D. B. Kyegombe, M. Ntale: Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, *Health* 2014; 6(5): 410-425.
- 15) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (dostopano 06.06.2016).
- 16) T. Tomašič, L. P. Mašič: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14(1): 130-151.
- 17) F. Collin, S. Karkare, A. Maxwell: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 92(3): 479-497.
- 18) Gubaev, D. Klostermeier: 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): 14085-14090.
- 19) Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents, *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14(19): 2033-2047.
- 20) V. Vyas, A. Jain, A. Jain, A. Gupta: Virtual Screening: A Fast Tool for Drug Design, *Scientia Pharmaceutica* 2008; 76(3): 333-360.
- 21) Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M., Pečar S.: *Farmacevtska kemija III: Vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010
- 22) www.pdb.org (dostopano 15.04.2015).
- 23) T. Tomašič, S. Katsamakas, Ž. Hodnik, J. Ilaš, M. Brvar, T. Solmajer, S. Montalvão, P. Tammela, M. Banjanac, G. Ergović, M. Anderluh, L. P. Mašič, D. Kikelj: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site, *Journal of Medical Chemistry* 2015; 58(14): 5501-5521.
- 24) http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm (dostopano 17.07.2016).

- 25) Farmaceutvska kemija III, vaje in seminarji: dodatne vsebine za razumevanje –
ZAŠČITNE SKUPINE
- 26) Farmaceutvska kemija III, vaje in seminarji: dodatne vsebine za razumevanje –
METODE N- in O- ACILIRANJA