

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEN KUŽAT

**SINTEZA 3,4-DIKLORO-5-METIL-1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDNIH
ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE IN TOPOIZOMERAZE IV**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEN KUŽAT

SINTEZA 3,4-DIKLORO-5-METIL-1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDNIH ZAVIRALCEV
DNA-GIRAZE IN TOPOIZOMERAZE IV

SYNTHESIS OF 3,4-DICHLORO-5-METHYL-1*H*-PYRROLE-2-CARBOXAMIDE-
BASED INHIBITORS OF DNA-GYRASE AND TOPOISOMERASE IV

Ljubljana, 2016

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

Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani in Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. *In vitro* testiranja so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Centre for Drug Research, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki na Finskem.

Zahvala:

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za ves čas, trud in posredovano strokovno pomoč med izdelavo magistrske naloge.

Velika zahvala gre tudi mojim najbližjim, ki so mi med študijem stali ob strani.

Izjava

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

Alen Kužat

Ljubljana, 2016

Vsebina

1 Uvod	1
1.1 Odkrivanje protibakterijskih učinkovin skozi čas	1
1.1.1 »Zlata doba protibakterijskih učinkovin« (1940-1962)	1
1.1.2 Protibakterijske učinkovine za 21. stoletje	1
1.1.3 Novejši pristopi k odkrivanju protibakterijskih učinkovin	2
1.2 Prokarionti	3
1.2.1 Zgradba prokariontske celice	3
1.2.2 Rezistenca proti protibakterijskim učinkovinam	4
1.3 Topoizomeraze tipa II	5
1.3.1 Struktura topoizomeraz tipa IIA	6
1.3.2 Mehanizem delovanja topoizomeraz tipa IIA	7
1.4 Zaviralci GyrA/ParC	8
1.4.1 Mehanizem delovanja kinolonov (razcepljeni kompleksi)	9
1.4.2 Vloga ionskega vodno-kovinskega mostu	9
1.5 Zaviralci GyrB/ParE	10
1.5.1 Glavno tarčno mesto - ATP-vezavno mesto	10
1.5.2 Struktura ATP-vezavnega mesta	10
1.5.3 Kumarini	13
1.5.4 Pirolamidi	13
2 Namen dela	15
3 Materiali in metode	18
3.1 Materiali	18
3.1.1 Reagenti in topila	18
3.2 Kromatografske metode	18
3.2.1 Tankoplastna kromatografija	18
3.2.2 »Flash« kolonska kromatografija	18
3.3 Spektroskopske metode	18
3.3.1 Infrardeča spektroskopija (IR)	18
3.3.2 Jedrska magnetna resonanca (NMR)	19
3.3.3 Masna spektrometrija (MS)	19
3.4 Nomenklatura in risanje spojin	19

3.5 Določevanje tališča.....	19
3.6 Biološka testiranja	19
4 Eksperimentalni del.....	20
4.1 Sinteza 5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata.....	20
4.2 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	21
4.3 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	22
4.4 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline.....	23
4.5 Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	24
4.6 Sinteza metil (S)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata.....	26
4.7 Sinteza (S)-3,4-dikloro- <i>N</i> -(2-(3-hidrazinil-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	27
4.8 Sinteza (S)-3,4-dikloro-5-metil- <i>N</i> -(2-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	28
4.9 Sinteza (S)-3,4-dikloro- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	30
4.10 Sinteza (S)- <i>N</i> -(6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)-5-metilizoksazol-4-karboksamida	31
4.11 Sinteza (S)- <i>N</i> -(6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)izonikotinamida	33
4.12 Sinteza (S)- <i>N</i> -(6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksamida	34
4.13 Izolacija (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2,6-diamina.....	36
5 Rezultati in razprava.....	37
5.1 Komentar sinteznih postopkov	37
5.1.1 Komentar sinteze spojine 7	37
5.1.2 Komentar sinteze spojine 12	41
5.2 Rezultati bioloških testiranj	43
5.2.1 IC ₅₀ vrednosti določene na DNA girazi in topoizomerazi IV iz bakterije <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i>	43
5.2.3 Protibakterijska aktivnost.....	46
6 Sklep.....	48
7 Literatura	49

Kazalo slik, shem in preglednic

Slika 1: Linezolid	2
Slika 2: Prikaz širjenja rezistence preko genov a) ter prikaz bioloških mehanizmov rezistence b) (prirejeno po 7)	5
Slika 3: Procesi katalizirani s strani različnih DNA topoizomeraz (prirejeno po 10).....	6
Slika 4: Struktura DNA-giraze (prirejeno po 10).....	7
Slika 5: Katalitični cikel topoizomeraz tipa IIA. (prirejeno po 11).....	8
Slika 6: Struktura molekule kinolona in naftiridona. Kjer je X ogljih, gre za kinolon, ko pa je X dušik, gre za naftiridon. (prirejeno po 12).....	9
Slika 7: Moteno delovanje DNA-giraze v prisotnosti kinolonov. (prirejeno po 13).....	9
Slika 8: Shema ionskega vodno-kovinskega mostu. (prirejeno po 14)	10
Slika 9: Shema ključnih elementov ATP-vezavnega mesta. (prirejeno po 17).....	11
Slika 10: Shematski prikaz interakcij med ATP in 24 kDa fragmentom GyrB. (prirejeno po 18).....	12
Slika 11: Kemijske strukture pirolamidnih zaviralcev odkritih pri AstraZeneci. (prirejeno po 23).....	14
Slika 12: Kristalna struktura pirolamida a v kompleksu z GyrB24 iz bakterije <i>S. aureus</i> .(prirejeno po 23)	14
Slika 13: Interakcija med encimom in pirolamidom.	43
Shema 1: Struktura oroidina in novega zaviralca DNA giraze.	15
Shema 2: Reagenti in pogoji. a) Na, EtOH; b) SO ₂ Cl ₂ , CCl ₄ ; c) H ₂ , Pd/C, EtOH; d) NaOH, abs. EtOH.	15
Shema 3: Reagenti in pogoji. a) <i>L</i> -vinska kislina.....	16

Shema 4: Reagenti in pogoji. a) HATU, DIPEA, DMF; b) metil 3-kloro-3-oksopropanoat, Et ₃ N, 1,4-dioksan; c) H ₂ N-NH ₂ , EtOH; d) CDI, DMF; e) izocianatoetan ali 5-metilizoksazol-4-karbonil klorid ali izonikotinska kislina ali 1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksilna kislina.	17
Shema 5: Nukleofilna substitucija.....	37
Shema 6: Izbor primerne topila.	38
Shema 7: Alkalna hidroliza estra.	39
Shema 8: Sinteza s sklopitvenim reagentom 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat	40
Shema 9: Nukleofilna substitucija.....	41
Shema 10: Ciklizacija s karbonildiimidazolom	42
 Preglednica I: Zaviralne aktivnosti spojin na izoliranih encimih DNA-giraze in topoizomeraze IV iz bakterij <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Preglednica II: Zaviralne aktivnosti strukturno podobnih spojin na izoliranih encimih DNA-giraze in topoizomeraze IV iz bakterij <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Preglednica III: Delež zaviranja rasti bakterij <i>Enterococcus faecalis</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> po 4, 8 in 24 urah.....	47
Preglednica IV: Delež zaviranja rasti bakterij <i>Escherichia coli</i> in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> po 4, 8 in 24 urah.....	47

POVZETEK

Živimo v času, ko bakterijska rezistenca na protibakterijske učinkovine predstavlja vedno večjo težavo. Zato je potrebno razvijati učinkovine, proti katerim bi bakterije postale težje odporne. Smiselno je torej odkrivati učinkovine, ki bi imele v mikroorganizmih nove tarče, ali pa iste tarče, vendar bi nanje delovale z drugačnim mehanizmom delovanja.

Bakterijska DNA-giraza in topoizomeraza IV sta esencialna bakterijska encima, ki nadzorujeta topološko stanje molekule DNA med replikacijo. Oba encima sta že uveljavljeni tarči protibakterijskih učinkovin. Ključni vir energije za delovanje obeh encimov predstavlja molekula ATP.

V magistrski nalogi bomo podrobneje predstavili sintezo novih pirolamidnih zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV. Zaviralci so bili načrtovani tako, da se vežejo v ATP-vezavno mesto na encimu. Pirolni fragment zaviralcev naj bi oponašal adeninski del molekule ATP. Hkrati smo na pirol vezali tudi elektron-privlačne skupine, s čimer smo izboljšali interakcije v vezavnem mestu. Na zaviralce smo vezali tudi različne stranske verige, s čimer smo preučevali, kako to vpliva na samo vezavo molekule.

Končnim spojinam smo sprva določili rezidualno aktivnost na izoliranem encimu pri koncentraciji 100 μM , in če je bila rezidualna aktivnost encima manjša od 50%, smo tem spojinam nadalje določili še vrednosti IC_{50} na izoliranih encimih DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterijskih sevov *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Največjo zaviralno aktivnost na izolirani DNA-girazi iz bakterije *E. coli* je izkazala spojina **11** z $\text{IC}_{50}=0,0418 \mu\text{M}$. Spojine so bile testirane tudi za protibakterijsko aktivnost na dveh po Gramu pozitivnih (*Enterococcus faecalis* in *S. aureus*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*) bakterijskih sevih. Od vseh spojin je samo spojina **12** izkazovala protibakterijsko aktivnost na bakterijskih sevih *E. faecalis* in *S. aureus* pri $\text{MIC}=50 \mu\text{M}$.

Ključne besede: bakterijska rezistenca, DNA-giraza, topoizomeraza IV, protibakterijske učinkovine

ABSTRACT

Nowadays bacterial resistance represents an increasing problem, since the existing drugs are no more that effective towards resistant bacteria. Therefore, it is necessary to discover drugs, against which bacteria would develop resistance more difficult. It makes sense to discover drugs acting on new targets in microorganism or targeting known targets, but with a different mode of action.

Bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV are essential enzymes that control the topological state of DNA during replication and are validated antibacterial drug targets. The source of energy for both enzymes represents the ATP molecule.

In this Master's thesis we will present the synthesis of novel pyrrolamide-based inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. Inhibitors were designed in a way to bind into the ATP-binding site. The pyrrole fragment mimics the adenine part of the ATP molecule. We have also attached electron withdrawing groups on the pyrrol moiety to achieve better interactions in the binding, introduced different side chains and studied structure-activity relationship.

Final compounds were also tested for their enzyme inhibitory activity at 100 μM . If the residual activity of the enzyme was lower than 50%, we determined also the IC_{50} values on isolated enzymes DNA gyrase and topoisomerase IV from bacterial strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The most potent compound on the isolated DNA gyrase from *E. coli* was compound **11** with an IC_{50} value of 0,0418 μM . The compounds were also tested for antibacterial activity on two Gram positive (*Enterococcus faecalis* in *S. aureus*) and two Gram negative (*E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*) bacterial strains. Among all compounds only compound **12** showed activity against *E. faecalis* and *S. aureus* bacterial strains at $\text{MIC}=50 \mu\text{M}$.

Keywords: bacterial resistance, DNA gyrase, topoisomerase IV, antibacterial drugs

SEZNAM OKRAJŠAV

ADPNP: adenzin 5'-(β , γ -imino)trifosfat

Arg136: arginin 136

Asn46: asparagin 46

Asp73: aspartat 73

Asp81: aspartat 81

ATP: adenzin-5'-trifosfat

CDI: 1,1'-karbonildiimidazol

CTD: C-končna domena

DIPEA: *N,N*-diizopropiletilamin

DKM: diklorometan

DMF: *N,N*-dimetilformamid

Et₃N: trietilamin

GHKL: ang. GyrB-Hsp90-histidin/serin protein kinase-MutL

GyrA: podenota A DNA giraze

GyrB: podenota B DNA giraze

HATU: 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev 3-oksidi
heksafluorofosfat

NTD: N-končna domena

TBTU: 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniev tetrafluoroborat

WHD: ang. winged helix domain

1 Uvod

1.1 Odkrivanje protibakterijskih učinkovin skozi čas

Odkritje in razvoj protibakterijskih učinkovin v 20. stoletju je bil eden od glavnih napredkov v znanosti in zdravstvu, od katerega je imelo človeštvo veliko koristi. V 21. stoletju pa se vse bolj srečujemo s pojavom rezistence proti protibakterijskim učinkovinam, ki so bile odkrite v prejšnjem stoletju ter hkrati ogrožajo našo sposobnost v borbi proti bakterijskim okužbam. Čeprav je nekaj novih protibakterijskih učinkovin v razvoju, to še vedno ni zadovoljivo za današnje zdravstvene potrebe (1).

1.1.1 »Zlata doba protibakterijskih učinkovin« (1940-1962)

Začetek je bil z odkritjem penicilina leta 1928, ko se je na gojišču po naključju pričela razraščati plesen iz rodu *Penicillium*. V bližini plesni je Alexander Fleming opazil, da je bila rast stafilokokov zavrtla. Kmalu zatem je leta 1930 sledilo odkritje Domagka, in sicer analogov *p*-aminobenzojske kisline - sulfonamidov. Nato je sledilo odkritje še ostalih razredov protibakterijskih učinkovin [aminoglikozidi (1944), tetraciklini (1945), cefalosporini (1948), makrolidi (1949), glikopeptidi (1956), kinoloni (1961) in karbapenemi (1967)] ter njihovih derivatov v t.i. »zlati dobi protibakterijskih učinkovin« (1,2).

1.1.2 Protibakterijske učinkovine za 21. stoletje

Z vstopom v 21. stoletje se je pojavila bakterijska rezistenca proti že odkritim protibakterijskim učinkovinam. V preteklem desetletju je bilo registriranih nekaj novih protibakterijskih učinkovin za uporabo v terapiji, vendar večina teh novih učinkovin predstavlja zgolj manjše razlike v primerjavi s strukturami že obstoječih učinkovin, predvsem v primerjavi z beta-laktami in fluorokinoloni. Zastrahuječe je dejstvo, da so bile odkrite zgolj 4 učinkovine z relativno novim skeletom: linezolid (slika 1), fidaksomicin, daptomicin in retapamulin, ki pa ne predstavljajo resnično novega razreda protibakterijskih učinkovin, saj so zgolj modificirani skeleti spojin, ki so bili odkrite že v preteklosti (3).



Slika 1: Linezolid

1.1.3 Novejši pristopi k odkrivanju protibakterijskih učinkovin

Lynn Silver je okarakterizirala rezultat kot »nično odkritje«, saj od leta 1987 (odkritje daptomicina) ni bilo uspešno identificiranega nobenega novega skeleta za protibakterijske učinkovine (3). Tu se začne porajati vprašanje, kaj je preteklih 50 let vodilo v to obdobje, da je bil tako majhen napredek na področju odkrivanja novih učinkovin s protibakterijskim delovanjem.

V preteklosti so bili naravni produkti najbolj bogat vir za zagotavljanje novih protibakterijskih učinkovin. Danes se je veliko raziskav osredotočilo tudi na testiranje naravnih virov, vendar so večinoma odkrivali že obstoječe spojine. V velikih farmacevtskih podjetjih so izvajali zelo obširna rešetanja spojin, pri čemer so vložili ogromno sredstev, vendar brez večjih uspehov. Razlog za tolikšen neuspeh verjetno leži v tem, da se pri rešetanju uporabljajo knjižnice, ki jim primanjkuje raznolikosti. Po večini so knjižnice za rešetanje zasnovane tako, da upoštevajo pravilo 5 Lipinskega za peroralno biološko uporabnost ter vsebujejo večinoma spojine, ki imajo tarče v človeškem telesu. Na drugi strani so antibiotiki izredno polarne spojine ($\log D_{7,4}$ je od -2,8 do -0,2), ki imajo tudi izredno visoke molekulske mase (102-1449) (4).

Podrobnejše poznavanje penetracije in izlivnih sistemov pri bakterijah ter knjižnice z veliko raznolikostjo spojin, ki pokrivajo področje protibakterijskih zahtev za učinkovino, lahko pripeljejo do občutno boljših rezultatov. Tarče protibakterijskih učinkovin, ki izkazujejo visoko raznolikost za vezavo ligandov, ravno tako ponujajo priložnost za odkritje novih učinkovin, ki se vežejo na drugo mesto kot že obstoječe učinkovine, pri čemer se lahko izognemo nastanku navzkrižne rezistence. Lep primer tarčne raznolikosti izkazujejo encimi topoizomeraze tipa II (4).

1.2 Prokarionti

Najznačilnejše karakteristike, po katerih se prokarionti razlikujejo od evkariontov, so te, da so relativno majhni, velikostnega reda 1 μm v premeru ter da nimajo jedrne membrane. Pri večini bakterij je DNA krožna, dolžine približno 1 mm. Področje v celici, kjer je DNA shranjena, označujemo z izrazom nukleoid.

1.2.1 Zgradba prokariontske celice

Zgradba prokariontske celice je mnogo bolj enostavna kot zgradba evkariontske, vendar z eno izjemo; prokariontska celica ima bolj zapleteno zgradbo celične ovojnice.

Ekvivalent jedru evkariontske celice predstavlja pri prokariontu nukleoid. Strukture, izolirane iz nukleoida, predstavljajo molekulo DNA, nekaj RNA molekul, RNA polimeraze ter še nekateri drugi proteini. Prokarionti v citoplazmi nimajo plastidov, kot so mitohondriji in kloroplasti, encimi za transport elektronov pa so locirani v citoplazemski membrani. Mikrotubulne strukture, ki so značilnost evkariontskih organizmov, so pri bakterijah običajno odsotne.

Celična stena se pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah razlikuje. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je relativno enostavna, sestavljena iz dveh do treh slojev, in sicer citoplazemske membrane, debelega sloja peptidoglikana in pri nekaterih bakterijah zunanjšega sloja, ki je lahko kapsula ali pa S-sloj. Slednji je proteinski ali glikoproteinski sloj, katerega vloga ni čisto jasna, domneva pa se, da naj bi služil za adhezijo, ali pa ščitil peptidoglikan pred razgradnjo. Pri po Gramu negativnih bakterijah pa celična ovojnica predstavlja zelo kompleksno strukturo. Citoplazemska membrana (notranja membrana) je obdana s tanko plastjo peptidoglikana, na katerem je zasidrana kompleksna zunanja membrana, lahko pa je prisotna tudi kapsula ali S-sloj. Prostor med notranjo in zunanjo membrano pa se imenuje periplazemski prostor.

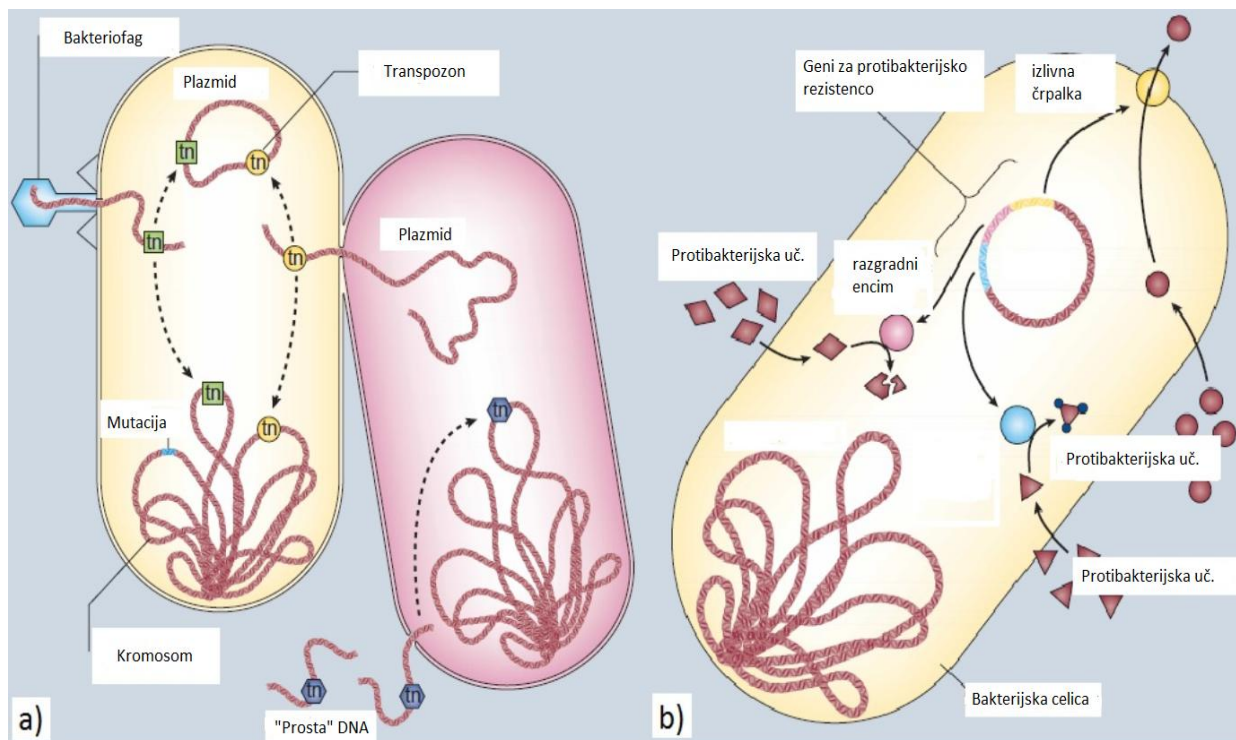
Nekatere bakterije so zmožne tvoriti tudi endospore, ki nastanejo v odgovor na hude okoljske razmere, kot je npr. primanjkljaj hrane. Pri tem vsaka celica tvori interno sporo, ki se sprosti, zatem ko poteče avtoliza materinske celice. Spora je stanje, ko je celica v počitku in je visoko odporna proti dehidraciji, toploti in kemijskim dejavnikom. Ko so razmere ponovno ugodne, se spora aktivira in skali v eno vegetativno celico (5).

1.2.2 Rezistenca proti protibakterijskim učinkovinam

Naraščajoča pojavnost bakterijske rezistence je posledica kombinacije mikrobioloških karakteristik ter socialnih in tehnoloških sprememb, ki so povečale prenos rezistentnih organizmov. Posledica bakterijske rezistence je povečana obolevnost, smrtnost ter stroški v zdravstvu (6).

Geni z zapisom za rezistenco se lahko med bakterijami širijo s pomočjo različnih mehanizmov, kot so npr.: plazmidi, bakteriofagi, golo DNA ali transpozoni. Model gena z zapisom za rezistenco proti tetraciklinom je tet(M) gen, ki je običajno lociran na transpozonu Tn916. Najden je bil pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah, aerobnih in anaerobnih bakterijah ter v vseh okoljskih in bioloških nišah. Prenašajo se lahko tudi kromosomski geni, ki so prevzeti s strani ene bakterije, tako da privzamejo golo DNA, ki je bila sproščena od nekega drugega mikroorganizma. Ta proces prenosa se imenuje transformacija.

Mehanizmi rezistence se lahko zelo razlikujejo. Nekateri mehanizmi so usmerjeni direktno proti protibakterijski učinkovini, kot na primer encimi β -laktamaze, ki razgradijo peniciline in cefalosporine. Drugi mehanizmi ciljajo na to, kako je zdravilna učinkovina transportirana. Poznamo izlivne črpalke, ki črpajo protibakterijske učinkovine iz celice, kar se kaže pri tetraciklinih, kloramfenikolu in fluorokinolonih. Tretji mehanizem pa deluje tako, da spremeni tarčno mesto učinkovine, s čimer učinkovini onemogoči vezavo in s tem zaviranje vitalne funkcije v bakterijski celici (slika 2) (7).



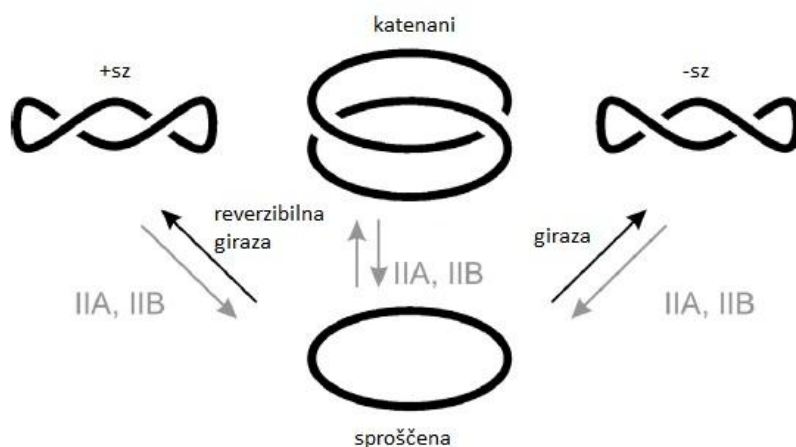
Slika 2: Prikaz širjenja rezistence preko genov a) ter prikaz bioloških mehanizmov rezistence b) (prirejeno po 7)

1.3 Topoizomeraze tipa II

Topoizomeraze tipa II delimo na topoizomeraze tipa IIA in topoizomeraze tipa IIB. Topoizomeraze tipa IIA vključujejo bakterijsko DNA-girazo in topoizomerozo IV ter evkariontske in virusne topoizomeraze (topoizomeraze II), medtem ko topoizomeraze tipa IIB vključujejo topoizomeraze VI iz arhej, homologe iz rastlin, iz nekaj protistov in nekaj bakterij (8).

Topoizomeraze tipa II cepijo in znova združujejo dve verigi DNA, kar dopušča prehod hčerinski molekuli DNA skozi razdruženo dvojno vijačnico. Pri prokariontih so encimi tetrameri velikosti približno 370 kDa; pri evkariontih pa so encimi homodimeri s primerljivo molekulsko maso. Evkariontski in prokariontski encimi so po aminokislinskem zaporedju podobni, kar da slutiti, da imajo podobno strukturo in mehanizem delovanja. Pri vseh je potrebna molekula ATP, da se zažene nov reakcijski cikel. Njihovo delovanje se kaže v sproščanju negativno in pozitivno dodatno zvite molekule DNA, združevanju in razdruževanju dvoverižnih krogov ter zvijanju dvoverižnih molekul. DNA-giraza pa je

edinstvena po sposobnosti, da lahko uvaja negativna dodatna zvitja v molekulo DNA (slika 3) (9).



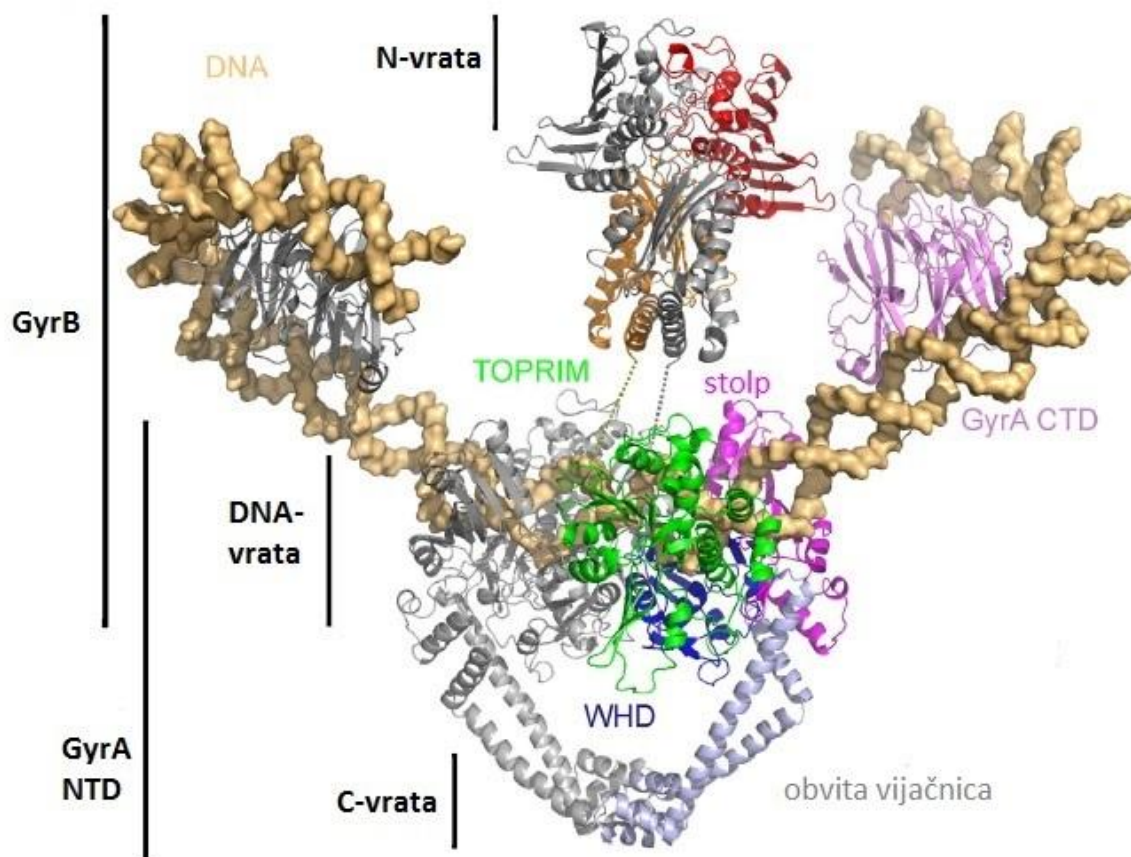
Slika 3: Procesi katalizirani s strani različnih DNA topoizomeraz (prirejeno po 10)

1.3.1 Struktura topoizomeraz tipa IIA

DNA-giraza in topoizomeraza IV imata heterotetramerno strukturo, ki je sestavljena iz dveh parov GyrA in GyrB podenot pri DNA-girazi in dveh parov ParC in ParE podenot pri topoizomerazi IV (8).

GyrA je razdeljena v dve domeni, in sicer v N-končno domeno (NTD), ki je sestavljena iz dveh heliks domen (ang. winged helix domain (WHD), tower domain), obvite vijačnice (ang. coiled coil domain) in C-končne domene (CTD). GyrB vsebuje N-končno ATPazno domeno iz družine GHKL (ang. GyrB-Hsp90-histidin/serin protein kinase-MutL), domeno za prenos signala (ang. transducer domain) in C-končno (TOPRIM) domeno, ki je značilna za topoizomerase in primazo (slika 4).

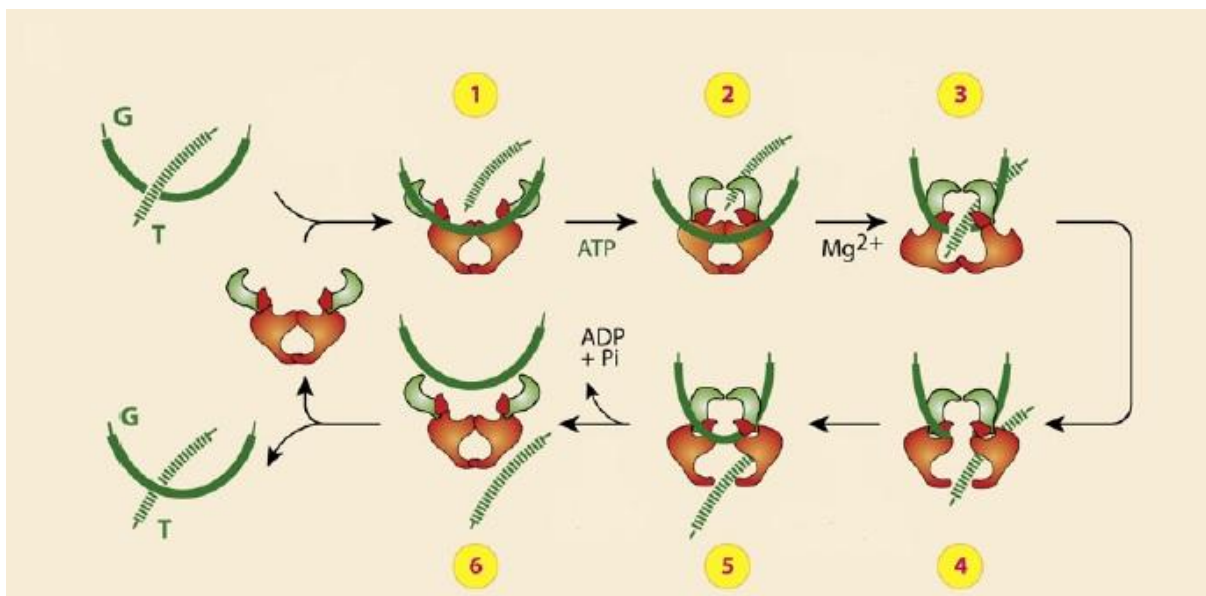
GyrA N-končna domena prikazuje obliko srca, ki je dimer, in je s strani stabilizirana z dvojimi vrati (C- in DNA-vrati), ki omejujejo centralno votlino. Zgornji predelek tvorita dve heliks domeni (ang. winged helix domain (WHD), tower domain), ki zaščitita katalitične tirozinske preostanke. Spodnji predelek pa je sestavljen iz majhnih globularnih domen na konci domene obvite vijačnice, to so C-vrata. TOPRIM domena podenote B se stika s »tower« domeno in obvito vijačnico in skupaj tvorijo DNA-vrata (10).



Slika 4: Struktura DNA-giraze (prirejeno po 10)

1.3.2 Mehanizem delovanja topoizomeraz tipa IIA

Encimi se večinoma vežejo na predele, kjer je molekula DNA prekrižana (dodatno zvita DNA, vozli). Dva segmenta DNA, ki se križata, se imenujeta G (ang. gate)- in T (ang. transport)-segment. G-segment je cepljen s strani encima z namenom, da se T-segment prenese skozi kompleks DNA-encim. Ko se na encim veže molekula ATP, pride do konformacijske spremembe, pri čemer preide iz odprte v zaprto strukturo. V prisotnosti Mg^{2+} tirozinska ostanka iz vsakega monomera cepita fosfodiesterne vezi DNA na G-segmentu. Tako se lahko T-segment prenese skozi razcepljen G-segment. Pri normalnih pogojih je kompleks, pri katerem imamo razcepljen G-segment, zelo kratko živč. Ko je T-segment prenesen skozi G-segment, je T-segment sproščen iz encima, G-segment pa je ponovno ligiran (koraka 5 in 6, slika 5). Hidroliza molekule ATP povrne encim v začetno odprto strukturo in G-segment se sprostí (korak 6, slika 5) (11).

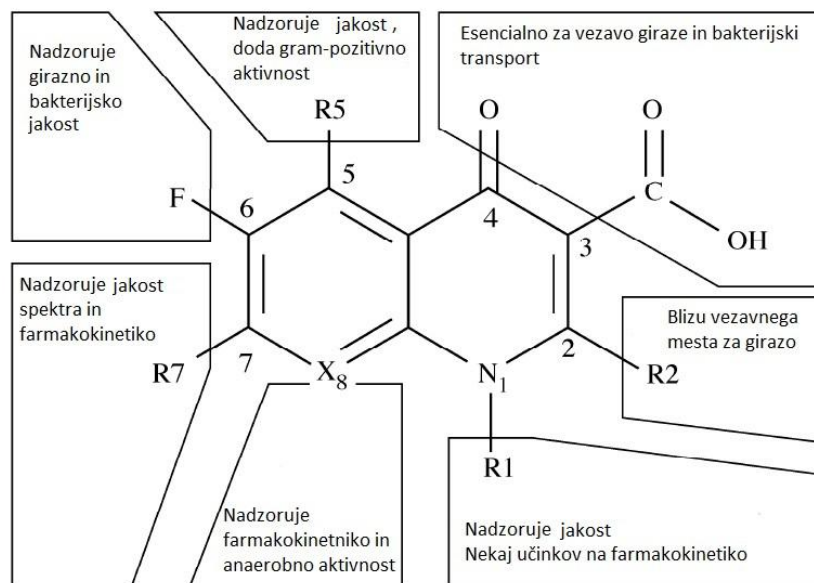


Slika 5: Katalitični cikel topoizomeraz tipa IIA. (prirejeno po 11)

1.4 Zaviralci GyrA/ParC

Kinoloni so bili središče (in so še) znanstvenih in kliničnih interesov vse od njihovega odkritja v zgodnjih letih 1960. To je zaradi tega, ker si lastijo veliko lastnosti, ki naj bi jih imela idealna protibakterijska učinkovina. Posedujejo širok spekter delovanja, dobro biološko uporabnost tako pri, peroralni kot pri intravenski aplikaciji, dosegajo visoke serumske koncentracije, visok volumen porazdelitve ter potencialno nizko pojavnost neželenih učinkov.

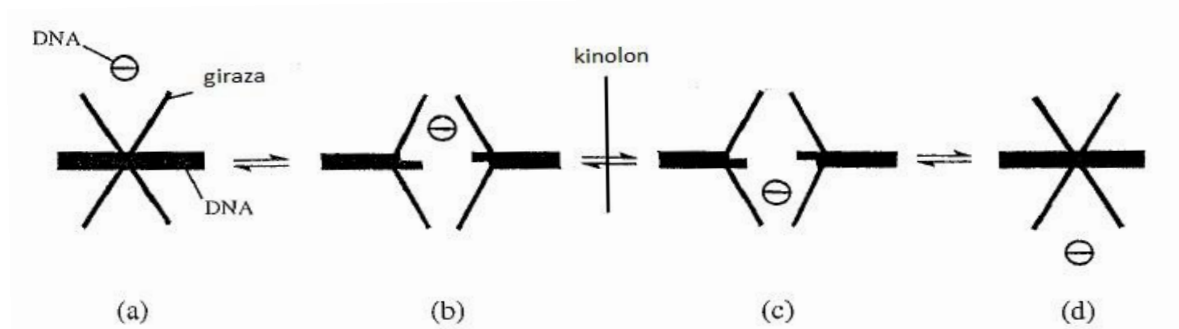
Kinoloni se vežejo na podenoti GyrA in ParC DNA-giraze in topoizomeraze IV, tako da nastane stabilen terciarni kompleks med encimom, DNA in učinkovino, kar prekine replikacijo molekule DNA. Slika 6 prikazuje osnovno molekulo fluorokinolona oz. farmakofor (12).



Slika 6: Struktura molekule kinolona in naftiridona. Kjer je X ogljik, gre za kinolon, ko pa je X dušik, gre za naftiridon. (prirejeno po 12)

1.4.1 Mehanizem delovanja kinolonov (razcepljeni kompleksi)

Osrednji dogodek interakcije med kinoloni in DNA-girazo ali topoizomerozo IV je tvorba kinolon-encim-DNA kompleksa, ki vsebuje razcepljeno DNA. Kinoloni naj bi ujeli v past kompleks encima in molekule DNA, zatem ko se razcepi molekula DNA, torej pri odprtih DNA vratih (Slika 7b). Pri tem je tvorba kompleksa popolnoma reverzibilna. (13).

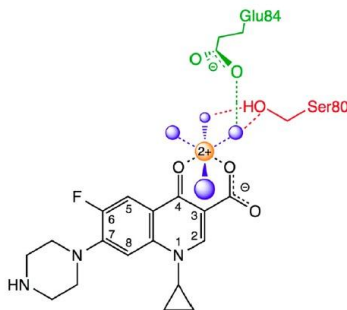


Slika 7: Moteno delovanje DNA-giraze v prisotnosti kinolonov. (prirejeno po 13)

1.4.2 Vloga ionskega vodno-kovinskega mostu

Kristalne strukture topoizomeraze IV kažejo, da kinoloni kelirajo divalentni kovinski ion (Mg^{2+}), ki se nato poveže z encimom preko molekul vode, le-te pa so koordinirane z

dvema aminokislinskima ostankoma, in sicer s serinom in glutamatom (slika 8). Delna prekinitev tega mostu, ki se kaže v mutaciji serina ali glutamata, signifikantno zmanjša jakost delovanja kinolonov (14).



Slika 8: Shema ionskega vodno-kovinskega mostu. (prirejeno po 14)

1.5 Zaviralci GyrB/ParE

1.5.1 Glavno tarčno mesto - ATP-vezavno mesto

ATP-vezavno mesto je locirano na podenoti GyrB DNA-giraze in podenoti ParE topoizomeraze IV. Leta 1950 so bili odkriti aminokumarini izolirani iz vrste gliv *Streptomyces*, ki so prvi naravni zaviralci, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto GyrB in ParE (15).

Aminokumarini so naravne substance, od katerih sta novobiocin in klorobiocin najznačilnejša predstavnika. Edini zaviralec GyrB, ki je bil uporabljen v terapiji, je novobiocin. So močni zaviralci DNA-giraze s K_i vrednostmi od 10^{-7} do 10^{-9} M. Vendar pa te spojine niso bile pretirano uspešne kot zdravilne učinkovine, saj imajo kar nekaj težav, kot so slaba topnost, slaba permeabilnost, niso zelo učinkovite proti po Gramu negativnim bakterijam, in so izkazovale neželene učinke.

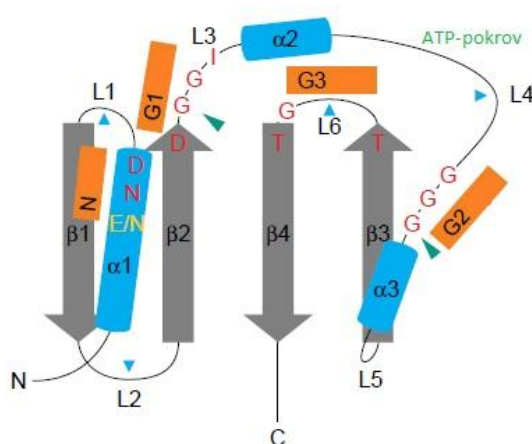
Na voljo so že številne kristalne strukture ATPazne domene DNA-giraze, kar omogoča racionalen pristop k razvijanju novih ligandov (16).

1.5.2 Struktura ATP-vezavnega mesta

ATPaza pri DNA topoizomerazah tipa IIA spada v GHKL naddružino, v katero uvrščamo še Hsp90, bakterijske histidin kinaze ter MutL. Značilnost te naddružine je ta, da

imajo vsi predstavniki značilno ATP-vezavno zvitje, ki ga imenujemo Bergeratov vzorec zvitja.

Ključni element Bergeratovega zvitja je α/β sendvič, ki je sestavljen iz štiriveržnih mešanih β -ploskev in treh α -vijačnic. Vijačnici $\alpha 1$ in $\alpha 3$ sta paralelni β -ploskvam, vijačnica $\alpha 2$ pa je orientirana prečno glede na α -vijačnici 1 in 3. ATP-vezavno mesto je omejeno s tremi α -vijačnicami ($\alpha 1$, $\alpha 2$ in $\alpha 3$) ter zankama L3 in L4. Dno tega žepa pa je sestavljeno iz hidrofobnih β -ploskev ($\beta 2$, $\beta 3$ in $\beta 4$). Najbolj unikatna značilnost, ki okarakterizira to strukturo v primerjavi z drugimi ATP vezavnimi mesti, je dolg fleksibilen ATP-pokrov.



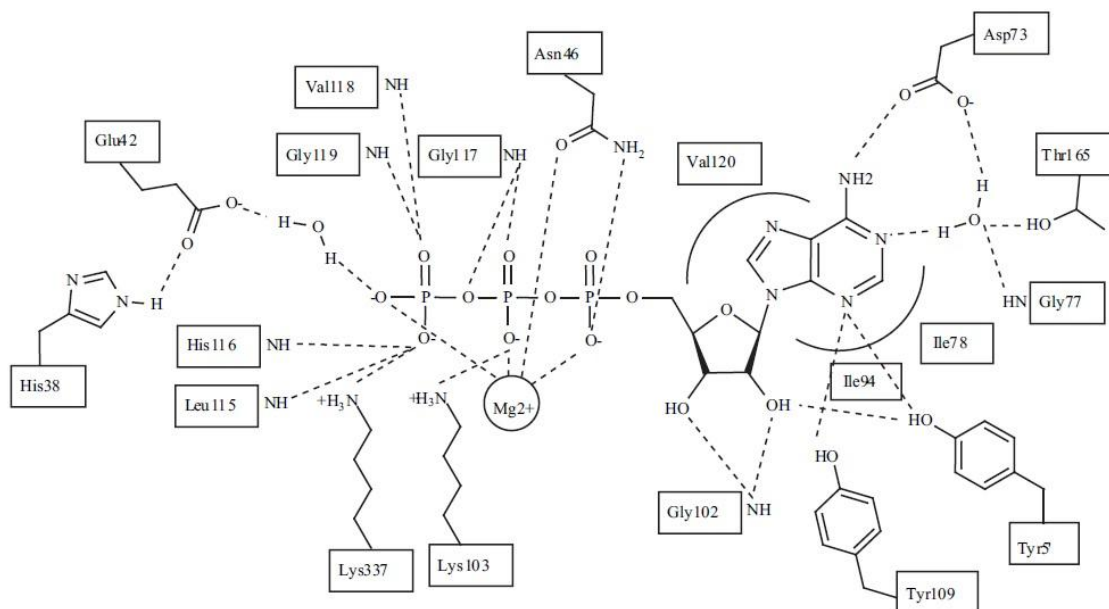
Slika 9: Shema ključnih elementov ATP-vezavnega mesta. (prirejeno po 17)

Encimi znotraj GHKL naddružine se razlikujejo po ATP-pokrovu. Pri GyrB ATP-pokrov popolnoma prekrije vezani nukleotid. Pri MutL ATP-pokrov delno izpostavi adenin topilu. Pri ostalih pa ATP-pokrov ne prekrije nukleotida v popolnosti in je zato nukleotid v celoti izpostavljen topilu (17).

Prva razrešena kristalna struktura, katerikoli bakterijske topoizomeraze tipa II, je bila kristalna struktura 42 kDa velikega N-končnega fragmenta GyrB iz *Escherichia coli* (imenovan GyrB43) v kompleksu z ne-hidrolizirajočim analogom ATP, ADPNP (adenozin 5'-(β , γ -imino)trifosfat). V prisotnosti ADPNP ali ATP fragment GyrB43 tvori dimer, ki je ravno tako sestavljen iz domene I in domene II, nukleotid pa ima vezavno mesto v domeni I.

Podrobnejša analiza kristalne strukture kompleksa GyrB43-ADPNP je razkrila, da je molekula ADPNP v prisotnosti Mg^{2+} stabilizirana z vodikovimi vezmi, nekatere tudi preko vodnih molekul, z aminokislinskimi ostanki Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 iz domene I (GyrB24 – 24 kDa velik N-končni fragment GyrB). Poleg tega aminokislinski ostanki Ile78, Ile94 in Val120 tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo (18).

Del vezavnega mesta za ATP tvori tudi Lys337 iz domene II (slika 10), ki tvori dodatno vodikovo vez z γ -fosfatom molekule ATP. Zelo pomemben strukturni element predstavlja kristalna molekula vode, ki tvori mrežo vodikovih vezi z adeninskim obročem ter aminokislinskimi ostanki Asp73, Gly77 in Thr165. Ta vodna molekula je ravno tako prisotna v ATP-vezavnem mestu v kompleksu z drugimi zaviralci. Stranska veriga Tyr5', ki pripada aminokislinskemu ostanku drugega monomera, tvori dve vodikovi vezi z 2'-hidroksil skupino riboze in dušikovim atomom adenina v obroču na mestu 3. Tyr5' je ohranjen pri vseh bakterijskih DNA-girazah in ga ne najdemo pri nobeni evkariontski ali virusni topoizomerazi tipa II. To pa predstavlja dobro možnost za razvoj selektivnosti zaviralcev bakterijske ATPaze (18).



Slika 10: Shematski prikaz interakcij med ATP in 24 kDa fragmentom GyrB. (prirejeno po 18)

1.5.3 Kumarini

Prvi zaviralci, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto, so bili kumarini novobiocin in klorobiocin. Pridobljeni pa so bili iz vrste *Streptomyces* (19). Kumarini stabilizirajo konformacijo encima, ki je neugodna za vezavo molekule ATP.

V prejšnjem stoletju je bil kloniran 24-kDa N-končni fragment GyrB, ki vsebuje ATP-vezavno mesto. Kristalna struktura kompleksa GyrB24 in novobiocina dokazuje, da se vezavni mesti za ATP in novobiocin delno prekrivata, kar pomeni, da so aminokumarini ATP-kompetitivni zaviralci DNA-giraze (20).

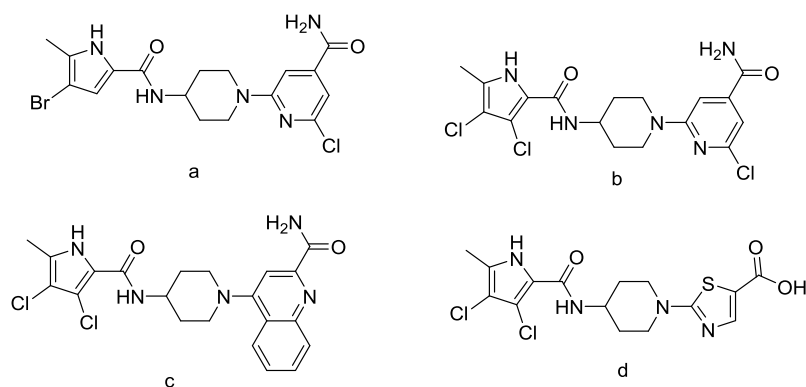
Kompleks novobiocina s 24 kDa velikim N-končnim fragmentom DNA-giraze B iz *Escherichia coli* predstavlja celo mrežo vodikovih vezi, ki vključuje predvsem sladkor novobiozo. Skupina 3'-karbomoil pri novobiozi tvori vodikove vezi z amidnim dušikom Ala47 in stransko verigo Asp73, pri tem pa tvori še dodatne vodikove vezi s tremi molekulami vode. 2'-hidroksil skupina novobioze tvori vodikovo vez s karbonilnim vodikom Asn46, kisik 4'-metoksi skupine pa tvori vodikovo vez s stransko verigo Asn46.

Poleg vodikovih vezi je tudi veliko hidrofobnih interakcij med proteinom in novobiocinom. 5',5'-Dimetil skupina sladkorne komponente je obkrožena s hidrofobnimi aminokislinami. Ravno tako se veže 4'-metoksi metilna skupina v hidrofobnem žepu, sestavljenim iz številnih hidrofobnih aminokislinskih preostankov (21).

V *in vitro* testih se kumarini kažejo kot močni zaviralci DNA giraze, vendar pa so veliko manj učinkoviti kot protibakterijske učinkovine, kar je posledica slabe topnosti, toksičnosti in manjše aktivnosti proti po Gramnegativnimi bakterijami (22).

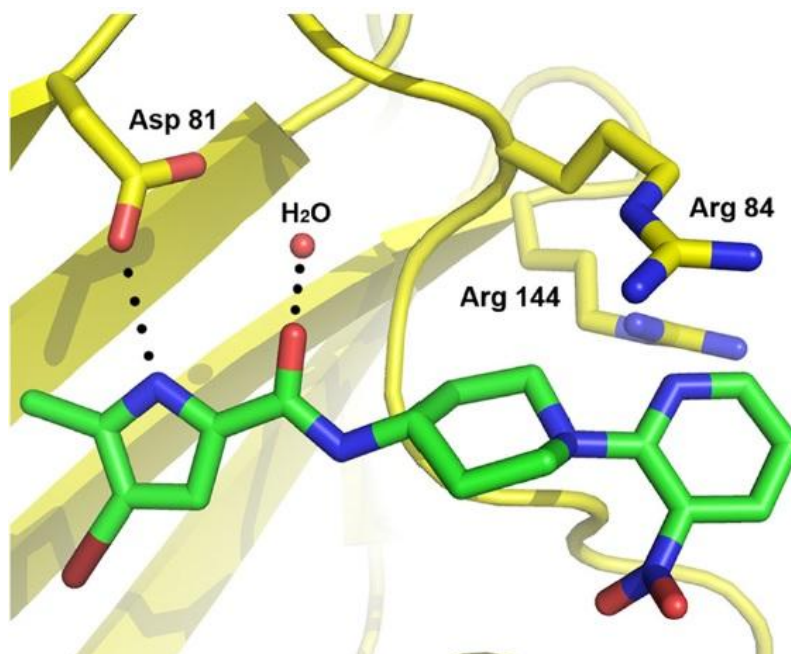
1.5.4 Pirolamidi

Pirolamidi predstavljajo nov razred potencialnih protibakterijskih učinkovin, ki imajo kot tarčo DNA-girazo. AstraZeneca je s pomočjo rešetanja knjižnice fragmentov z nuklearno magnetno resonanco odkrila spojine nizke molekulske mase, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto na DNA-girazi. Nadalje so spojine optimizirali s pomočjo rentgenske kristalografije, ki je razkrila vezavo in interakcije zaviralcev v vezavnem mestu in raziskovalcem pomagala pri načrtovanju boljših zaviralcev (slika 11) (23).



Slika 11: Kemijske strukture pirolamidnih zaviralcev odkritih pri AstraZeneci. (prirejeno po 23)

Slika 12 predstavlja kristalno strukturo spojine **a** vezane v ATP-vezavno mesto GyrB bakterije *S. aureus*. Pirol zavzema isti žep, kot adeninska skupina pri ATP, pri tem pa tvori vodikovo vez. Piridin spojine **a** sega izven ATP-vezavnega mesta in tvori interakcije z Arg84, s katerim ATP ne tvori interakcij, kar je pogoj za doseganje selektivnosti napram drugim proteinom, ki vežejo ATP. 3,4-dikloro substituenta na pirolu pri spojini **b** tvorita še več hidrofobnih interakcij v adeninskem žepu. Poleg tega sta klorova atoma elektron privlačni skupini, kar zniža pK_a pirolne NH skupine, s tem pa postane NH skupina tudi boljši elektron donor za Asp81. Spojina **b** pa ni izkazala samo boljše aktivnosti na encimu, temveč tudi boljšo protibakterijsko aktivnost kot spojina **a** (23).

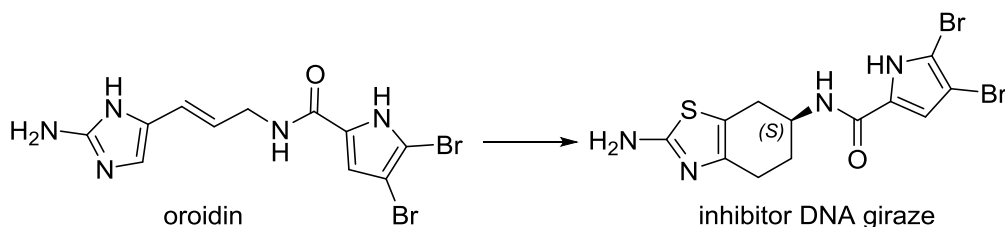


Slika 12: Kristalna struktura pirolamida **a** v kompleksu z GyrB24 iz bakterije *S. aureus*.(prirejeno po 23)

2 Namen dela

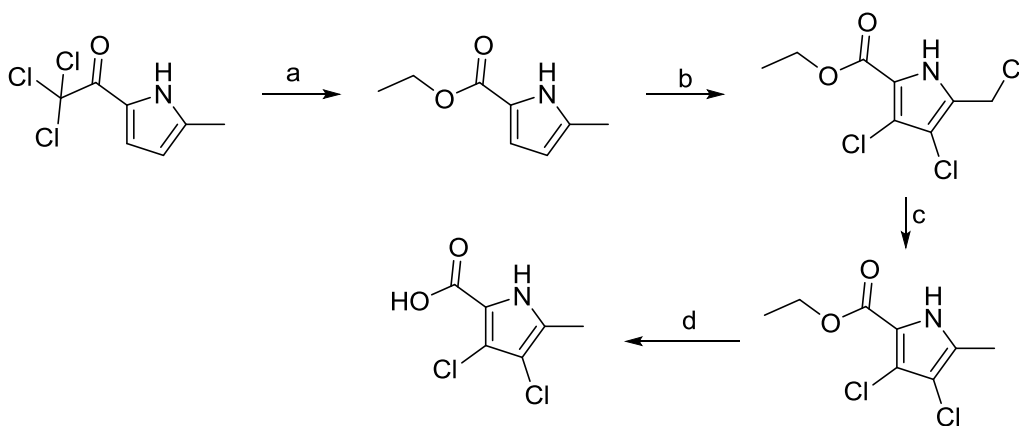
Pri eksperimentalnem delu bomo poskušali optimizirati strukturo novih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze in topoizomeraze IV. Z menjavo funkcionalnih skupin bomo poizkušali doseči boljše fizikalno-kemijske lastnosti in s tem doseči protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam.

Izhajali bomo iz analogov oroidina, ki so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (shema 1).



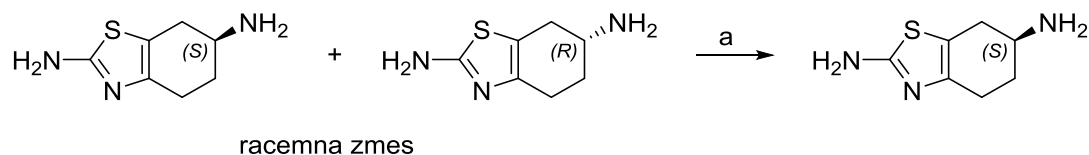
Shema 1: Struktura oroidina in novega zaviralca DNA giraze.

Sprva bomo iz predhodno sintetiziranega 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona sintetizirali 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (shema 2). V prvi stopnji bomo tvorili etilni ester, ki mu bo sledilo kloriranje pirolnega obroča ter stranske metilne skupine. S katalitskim hidrogeniranjem bomo alkilklorid reducirali do metilne skupine na pirolnem obroču. V zadnji stopnji bomo izvedli še alkalno hidrolizo estra do karboksilne kisline, ki jo bomo v naslednjih stopnjah pripeli na osnovno ogrodje.



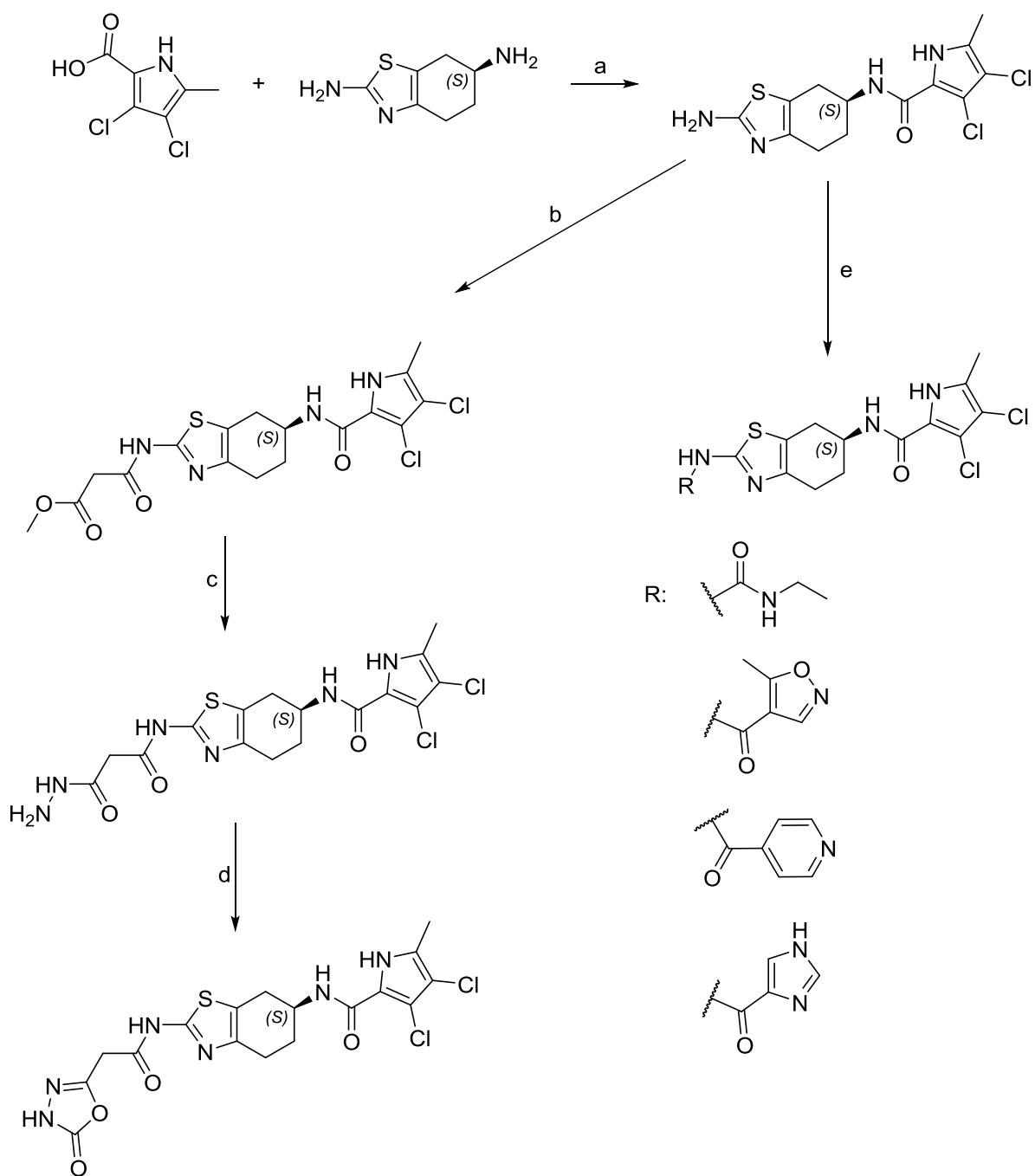
Shema 2: Reagenti in pogoji. a) Na, EtOH; b) SO₂Cl₂, CCl₄; c) H₂, Pd/C, EtOH; d) NaOH, abs. EtOH.

Iz racemne zmesi bomo pridobili čisti (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2,6-diamin. Za ločitev enantiomerov bomo uporabili optično aktivno kislino, in sicer L-vinsko kislino (shema 3).



Shema 3: Reagenti in pogoji. a) L-vinska kislina

Nato bomo naredili sklopitev med 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino in (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminom, s čimer bomo pripravili znan zaviralec DNA-giraze, na katerega bomo v nadaljnjih stopnjah pripenjali različne substituentne (shema 4). S tem bomo poizkušali doseči čim boljše prileganje zaviralca v vezavni žep za ATP in s tem doseči močno zaviralno aktivnost in posledično tudi protibakterijsko delovanje.



Shema 4: Reagenti in pogoji. a) HATU, DIPEA, DMF; b) metil 3-kloro-3-oksopropanoat, Et₃N, 1,4-dioksan; c) H₂N-NH₂, EtOH; d) CDI, DMF; e) izocianatoetan ali 5-metilizoksazol-4-karbonil klorid ali izonikotinska kislina ali 1H-imidazol-4-karboksilna kislina.

Sintetizirane spojine bomo tudi biokemijsko ovrednotili. Spojine bodo sprva testirane na izolirani DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* na Fakulteti za farmacijo. Nadalje bomo vrednotili tudi protibakterijsko delovanje aktivnih spojin na Fakulteti za farmacijo na Finskem.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Apollo Scientific Limited, Carlo Erba Reagents, Fluka, Gram Mol, Merck, TCI in Sigma-Aldrich.

3.2 Kromatografske metode

3.2.1 Tankoplastna kromatografija

Za spremljanje reakcij smo uporabljali tankoplastno kromatografijo. Vzorec smo nanašali z mikrolitrskimi kapilarami na plošče Merck Silica Gel 60 F254, z 0,20 mm debelim nanosom silikagela. Nanose smo razvijali v kadičkah, z mobilnimi fazami iz organskih topil v različnih razmerjih (razmerja so navedena v eksperimentalnem delu). Spojine na kromatogramih smo nato detektirali s pomočjo UV lučke z valovnimi dolžinama 254 nm ali 366 nm in z uporabo različnih orositvenih reagentov.

3.2.2 »Flash« kolonska kromatografija

Za čiščenje nečistega surovega produkta smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo. Volumen kolone je bil odvisen od količine nečistega vzorca. Za stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 z velikostjo delcev med 0,040 – 0,063 mm. Kot mobilno fazo pa smo uporabljali organska topila v različnih volumskih razmerjih, ki smo jih predhodno določili s pomočjo tankoplastne kromatografije.

3.3 Spektroskopske metode

3.3.1 Infrardeča spektroskopija (IR)

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

3.3.2 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Vzorci smo sprva raztopili v devteriranih topilih (DMSO- d_6 , MeOD- d_4) in nato spektre posneli s pomočjo spektrometra Bruker Advance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Dobljene spektre pa smo procesirali s pomočjo računalniškega programa MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mestrelab research S.L.

3.3.3 Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Autospec (VG – Analytical) s tehniko ESI v centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani.

3.4 Nomenklatura in risanje spojin

Pri risanju in poimenovanju spojin po IUPAC nomenklaturi smo si pomagali s programom ChemBioDraw Ultra 14.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.5 Določevanje tališč

Tališča smo določevali s Koflerejvemu mikroskopom na ogrevalni mizici Leica.

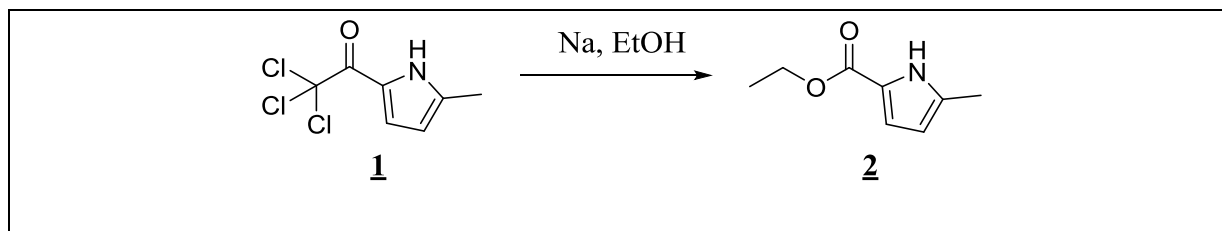
3.6 Biološka testiranja

Končnim spojinam smo najprej določili rezidualne aktivnosti pri koncentracijah 100 μM in 10 μM in nato še IC_{50} vrednosti na izolirani DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Na koncu smo testirali protibakterijsko aktivnost končnih spojin na po Gramu pozitivnih bakterijah *Enterococcus faecalis* in *S. aureus* ter po Gramu negativnih bakterijah *E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*.

Testiranja na izoliranih encimih na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani je izvedel izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm. Protibakterijsko delovanje so izvedli na Univerzi v Helsinkih na Finskem.

4 Eksperimentalni del

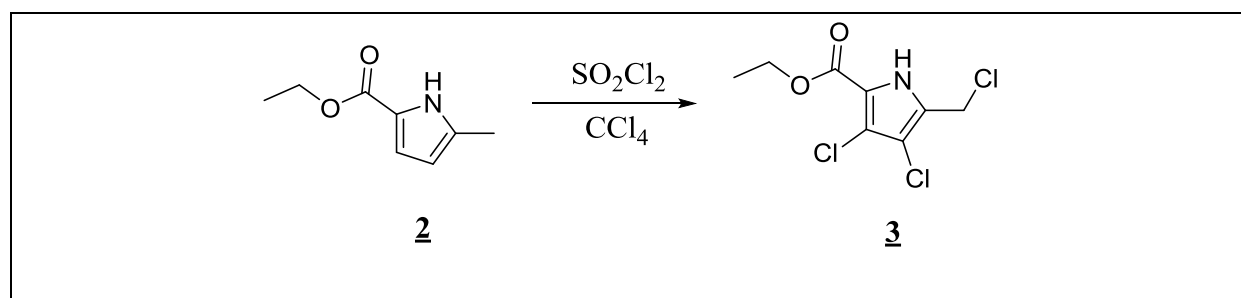
4.1 Sinteza 5-metil-1H-pirol-2-karboksilata



Postopek	V 100 mL absolutnega etanola (Emsure) smo dodali natehtan natrij (0,501 g, 0,022 mol). Natrij, ki smo ga vzeli iz toluena, smo najprej obrezali, saj se je na površini nabrala oksidirana plast (Na_2O). Na bučko z etanolom smo namestili še povratni hladilnik s klor-kalcijevo cevko. Počakali smo približno 30 min, da je ves natrij reagiral z etanolom in s tem dobili natrijev etoksid. V treh delih smo nato dodali izhodno spojino 1 (4,111 g, 0,018 mol), mešali pri sobni temperaturi in potek reakcijo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Reakcija je potekala 1h 40 min. Pri izolaciji smo reakcijski zmesi uparili topilo, surov produkt raztopili v vodi ter raztopino nakisali z 1M HCl do pH=3. Za konec smo naredili še ekstrakcijo vodne faze z etilacetatom ($V=2 \times 50 \text{ mL}$) (Carlo Erba Reagents). Dobili smo 2,42 g produkta.
Ime produkta	etil 5-metil-1H-pirol-2-karboksilat
Elementna sestava	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $M=153,18 \text{ g/mol}$
Izgled spojine	rjavi kristali
Izkoristek	$\eta=86,9\%$
Retencijski faktor (R_f)	$R_f=0,30$ (MF=heksan:EtOAc=4:1)

Tališče	98-100 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,30 (t, 3H, <i>J</i> = 7,3 Hz, CH ₃), 2,12 (s, 3H, CH ₃), 4,25 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂), 6,01 (d, 1H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH), 7,14 (d, 1H, <i>J</i> = 7,3 Hz, CH), 12,01 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3284, 2988, 1663, 1530, 1494, 1477, 1431, 1392, 1373, 1320, 1264, 1219, 1151, 1111, 1040, 1024, 987, 964, 871, 800, 771, 657, 613 cm ⁻¹

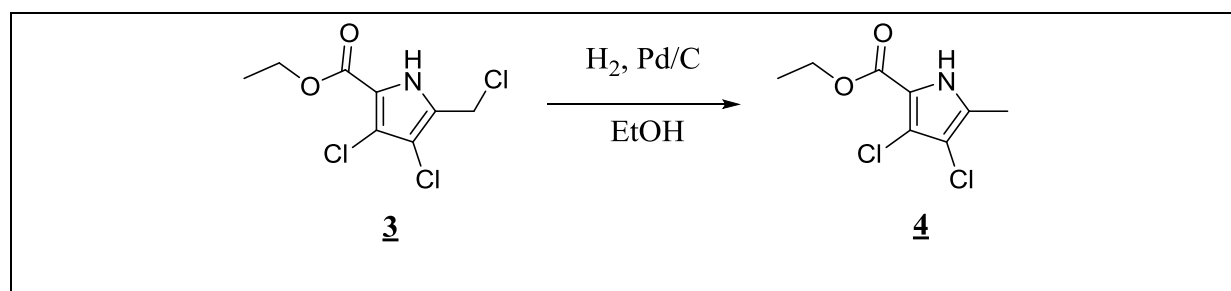
4.2 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1*H*-pirol-2-karboksilata



Postopek	Spojino <u>2</u> (2,404 g, 0,016 mol) smo raztopili v 30 mL tetraklorometana (Acros Organics). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, s čimer smo dosegli inertno atmosfero. V bučko na ledeni kopeli smo nato po kapljicah z brizgo dodajali sulfuril klorid (3,8 mL, 0,047 mol) (Acros Organics) ter pustili 30 min naj reakcija poteka. Po preteku 30 min je reakcija potekala pri sobni temperaturi (<i>T</i>=23 °C). Po treh urah smo prekinili reakcijo. V reakcijski zmesi je nastala oborina, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem in jo sušili v vakuumu. Dobili smo 2,907 g produkta <u>3</u>.
Ime produkta	etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat
Elementna sestava	C ₈ H ₈ Cl ₃ NO ₂ , <i>M</i> =256,51 g/mol

Izgled spojine	beli kristali
Izkoristek	$\eta=72,2\%$
Retencijski faktor (R_f)	$R_f=0,14$ (MF=heksan:EtOAc=4:1)
Tališče	107-110 °C
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,31 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3), 4,25 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2), 4,68 (s, 2H, CH_2), 11,98 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3284, 3140, 2989, 1664, 1531, 1494, 1478, 1432, 1392, 1373, 1320, 1264, 1219, 1151, 1111, 1024, 988, 964, 871, 800, 771, 658, 613 cm^{-1}

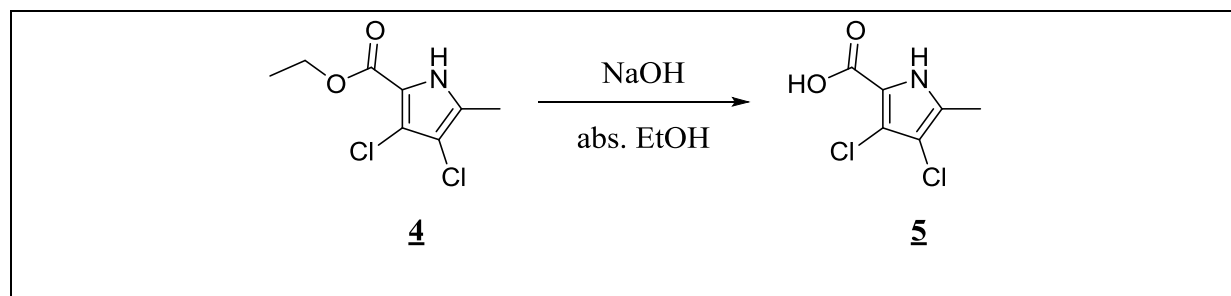
4.3 Sinteza etil 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilata



Postopek	V 60 mL etanola smo raztopili spojino 3 (2,900 g, 0,011 mol) in raztopino prepihali z argonom, da smo ustvarili inertno atmosfero. Nato smo dodali katalizator paladij na ogljiku (Pd/C) (0,29 g, cca. 10% mase spojine 3) (Fluka). Reakcijsko zmes smo po dodatku katalizatorja prepihali z vodikom in mešali v vodikovi atmosferi 3 dni. Reakcijsko zmes smo nato filtrirali z odsesavanjem skozi plast Celite[®] (Sigma Aldrich), na katerega se je adsorbiral Pd/C. Filtratu smo uparili topilo in surov produkt očistili s flash kolonsko kromatografijo, pri čemer smo kot mobilno fazo uporabili
----------	---

	diklorometan. Dobili smo 0,986 g produkta 4 .
Ime produkta	etil 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat
Elementna sestava	C ₈ H ₉ Cl ₂ NO ₂ , M=222,07 g/mol
Izgled spojine	rumeni kristali
Izkoristek	η=39,2%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,44 (MF=diklorometan)
Tališče	126-130 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,30 (t, 3H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₃), 2,21 (s, 3H, CH ₃), 4,26 (q, 2H, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂), 12,32 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3275, 2992, 1665, 1569, 1493, 1475, 1424, 1376, 1320, 1266, 1214, 1153, 1115, 1041, 1013, 868, 800, 764, 702, 638, 616 cm ⁻¹

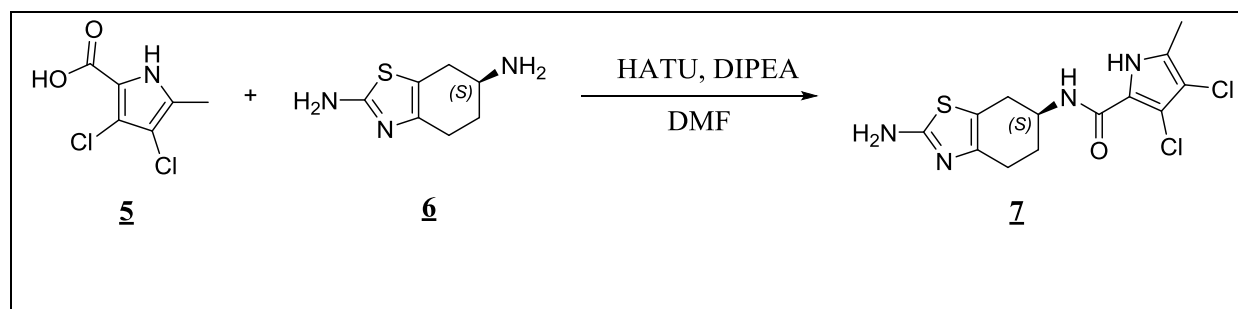
4.4 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline



Postopek	V 40 mL etanola (Emsure) smo raztopili spojino 4 (0,986 g, 4,44 mmol) in dodali 10 M NaOH (7,8 mL, 0,079 mol) (Emsure) ter reakcijsko zmes segrevali pri temperaturi refluxa na oljni kopeli. Po dveh urah je reakcija potekla, zato smo reakcijski zmesi uparili etanol. Preostalo vodno raztopino smo nato nakisali s koncentrirano HCl do pH=1-2 (Gram Mol). Pri tem je izpadla oborina, ki smo jo
----------	--

	filtrirali z odsesavanjem. Nastalo oborino smo sušili do konstantne mase pri 60 °C. Dobili smo 0,852 g produkta 5 .
Ime produkta	3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilna kislina
Elementna sestava	C ₆ H ₅ Cl ₂ NO ₂ , M=194,01 g/mol
Izgled spojine	vijoličen prah
Izkoristek	η=98,9%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0 (MF=diklorometan)
Tališče	134-137 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 2,19 (s, 3H, CH ₃), 12,17 (s, 1H, NH), 12,80 (s, 1H, COOH) ppm
IR (ATR)	3410, 3028, 2516, 2007, 1851, 1649, 1570, 1499, 1441, 1369, 1339, 1259, 1172, 1096, 1044, 1002, 976, 918, 783, 763, 710, 649, 615 cm ⁻¹

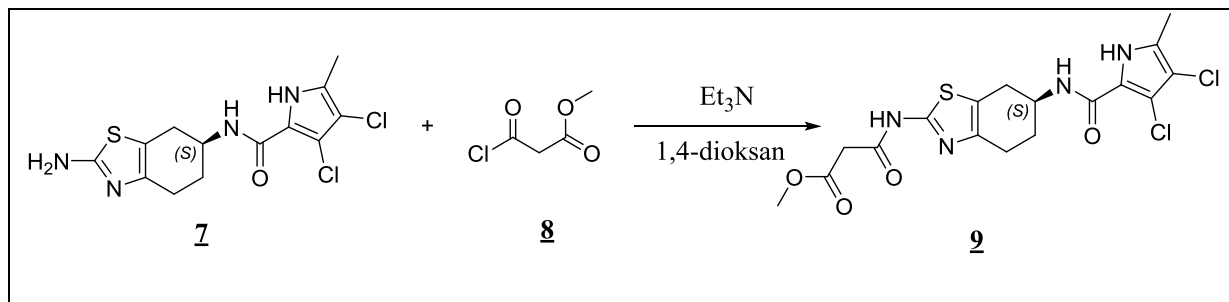
4.5 Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida



Postopek	V bučki smo raztopili spojino 5 (0,850 g, 4,38 mmol) v 40 mL <i>N,N</i> -dimetilformamida (DMF) (Emsure). Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli ter dodali še <i>N,N</i> -diizopropiletilamin (DIPEA) (1,5 mL, 8,76 mmol) (Fluka) in nato še 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat (HATU) (2,000 g,
----------	--

	5,25 mmol) (Apollo Scientific Limited). Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli 30 min, da je potekla aktivacija kisline. Potem smo dodali še spojino 6 (0,741 g, 4,38 mmol) in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi še preko noči. Nato smo reakcijski zmesi uparili topilo ter izvedli ekstrakcijo. Surovo reakcijsko zmes smo raztopili v 50 mL etilacetata ter spirali s citronsko kislino (2x30 mL), nasičeno raztopino raztopino hidrogenkarbonata (2x30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x30 mL). Surov produkt smo čistili s pomočjo »flash« kolonske kromatografije, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=20:1. Končna masa produkta 7 je bila 0,432 g.
Ime produkta	(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₃ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ OS, M=345,24 g/mol
Izgled spojine	rumenkasto-oranžen prah
Izkoristek	η=28,6%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,32 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	210-212 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,82-1,89 (m, 1H, CH ₂), 1,91-1,99 (m, 1H, CH ₂), 2,19 (s, 3H, CH ₃), 2,48-2,58 (m, 2H, CH ₂), 2,63-2,88 (m, 2H, CH ₂), 4,17-4,25 (m, 1H, CH), 6,70 (s, 2H, NH ₂), 7,28 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, CONH), 12,02 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3408, 3175, 3038, 2514, 2008, 1605, 1518, 1486, 1446, 1407, 1342, 1277, 1253, 1172, 1086, 1002, 975, 915, 848, 783, 671, 649 cm ⁻¹
HR-MS (ESI+)	izmerjena: 345,0341, izračunana: 345,0344

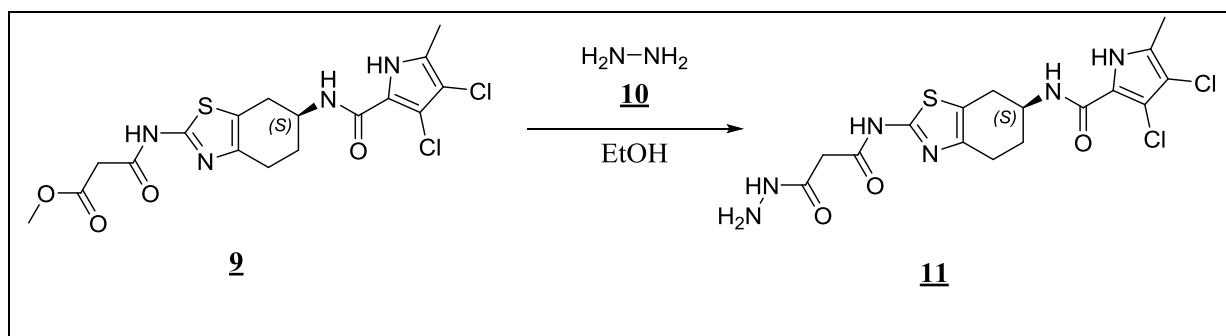
4.6 Sinteza metil (S)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata



Postopek	Izhodno spojino 7 (0,096 g, 0,28 mmol) smo raztopili v 10 mL 1,4-dioksana (Emsure). V bučko smo nato dodali trietilamin (58 µL, 0,42 mmol) (Merck) ter spojino 8 (45 µL, 0,42 mmol). Reakcija je potekala pri sobni temperaturi preko noči. Pri izolaciji smo reakcijski zmesi uparili topilo, zatem pa izvedli ekstrakcijo. Najprej smo raztopili v 25 ml etilacetata. Raztopini smo prenesli v lij ločnik in spirali s 10% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Končna masa produkta 9 je bila 0,061 g.
Ime produkta	(S)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat
Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄ S, M=445,32 g/mol
Izgled spojine	rjavi kristali
Izkoristek	η=49,3%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,38 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	207-211 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,82-1,89 (m, 1H, CH ₂), 1,91-1,99 (m, 1H, CH ₂), 2,19 (s, 3H, CH ₃),

	2,48-2,58 (m, 2H, CH ₂), 2,63-2,88 (m, 2H, CH ₂), 3,53 (s, 2H, CH ₂), 3,66 (s, 3H, CH ₃), 3,88-3,92 (m, 1H, CH), 8,04 (s, 1H, CONH), 12,16 (s, 1H, NH), 12,77 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3279, 2940, 1682, 1624, 1550, 1522, 1410, 1338, 1254, 1211, 1124, 1074, 1046, 736 cm ⁻¹
HR-MS (ESI+)	izmerjena: 445,0513, izračunana: 445,0504

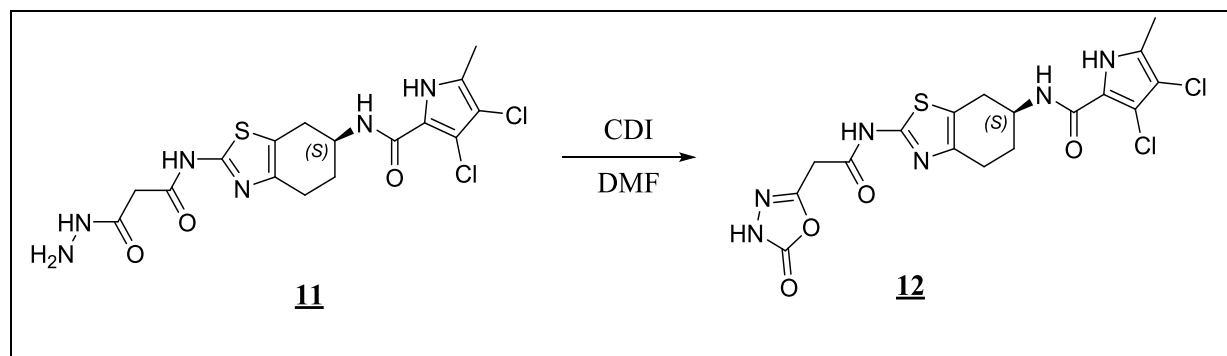
4.7 Sinteza (S)-3,4-dikloro-N-(2-(3-hidrazinil-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamida



Postopek	V 5 mL EtOH (Emsure) smo raztopili spojino 9 (0,061 g, 0,14 mmol) in dodali hidrazin hidrat (10) (66,6 µL, 1,4 mmol) (Sigma Aldrich). Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 80 °C. Naslednji dan smo reakcijski zmesi uparili topilo in surov produkt čistili s pomočjo »flash« kolonske kromatografije (MF= DKM:MeOH=20:1). Dobljena masa produkta 11 je bila 0,067 g.
Ime produkta	(S)-3,4-dikloro-N-(2-(3-hidrazinil-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₆ O ₃ S, M=445,32 g/mol
Izgled spojine	rumeni prah

Izkoristek	$\eta=93,4\%$
Retencijski faktor (R_f)	$R_f=0,32$ (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	214-217 °C
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,89-2,04 (m, 2H, H-7), 2,19 (s, 3H, CH ₃), 2,67-2,75 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,01 (dd, 1H, $J_1 = 15,5$ Hz, $J_2 = 4,7$ Hz, H _B -4), 3,27 (s, 2H, CH ₂), 4,20-4,30 (m, 1H, CH), 7,34 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, CONH), 9,25 (s, 1H, NH), 10,23 (s, 1H, NH), 12,01 (s, 2H, NH ₂) ppm
IR (ATR)	3320, 3192, 2970, 1700, 1626, 1526, 1485, 1448, 1411, 1350, 1302, 1273, 1253, 1170, 1080, 1033, 1003, 976, 924, 849, 783, 687, 647 cm^{-1}
HR-MS (ESI-)	izmerjena: 443,0454, izračunana: 443,0460

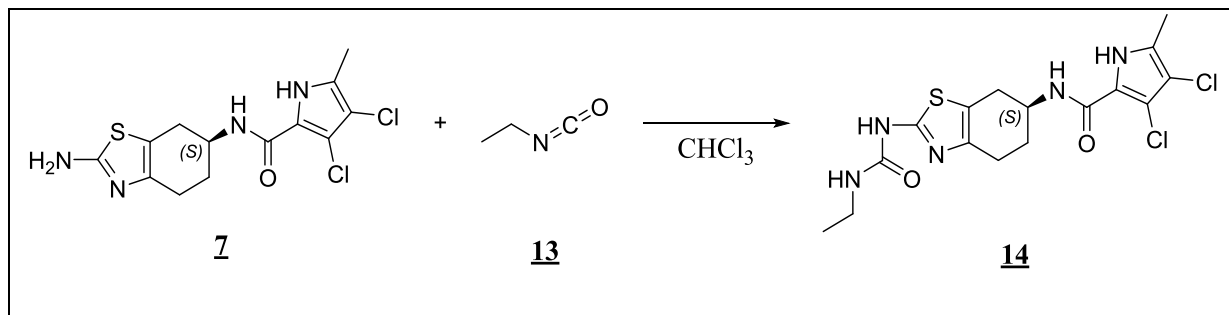
4.8 Sinteza (S)-3,4-dikloro-5-metil-N-(2-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida



Postopek	V 2 mL dimetilformamida (DMF) (Emsure) smo raztopili spojino 11 (0,042 g, 0,094 mmol), ki smo ji dodali 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) (0,031 g, 0,189 mmol) (Apollo Scientific). Reakcijsko zmes smo segrevali na oljni kopeli pri 100 °C.
----------	---

	Kljub temu da je reakcija potekala preko noči (približno 18 ur), je bilo iz tankoplastne kromatografije razvidno, da imamo še vedno veliko izhodne spojine in le malo produkta. Znova smo dodali CDI (0,031 g, 0,189 mmol) in reakcijo pustili naj poteka še dodatnih 21 ur. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo in jo očistili s pomočjo »flash« kolonske kromatografije, pri kateri smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=20:1. Dobili smo 0,014 g produkta 12.
Ime produkta	(S)-3,4-dikloro-5-metil-N-(2-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O ₄ S, M=471,31 g/mol
Izgled spojine	rumeni prah
Izkoristek	η=32,5%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,36 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	227-230 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,92-1,97 (m, 1H, H _A -7), 1,99-2,04 (m, 1H, H _B -7), 2,19 (s, 3H, CH ₃), 2,68-2,769 (m, 3H, H-5, H _A -4), 2,99-3,05 (m, 1H, H _B -4), 3,32 (s, 2H, CH ₂), 4,25-4,27 (m, 1H, CH), 7,35 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, CONH), 8,43 (s, 1H, NH), 12,01 (s, 1H, NH), 12,06 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3409, 3187, 2885, 1699, 1525, 1485, 1449, 1410, 1382, 1353, 1298, 1253, 1172, 1080, 1034, 1002, 975, 893, 848, 783, 686, 650 cm ⁻¹
HR-MS (ESI-)	izmerjena: 469,0262, izračunana: 469,0258

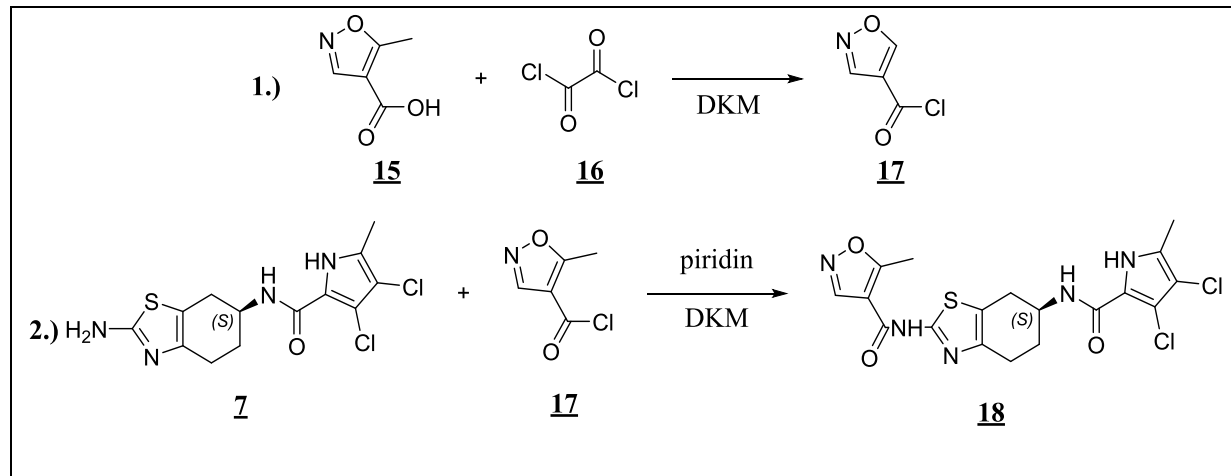
4.9 Sinteza (S)-3,4-dikloro-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2d]tiazol-6-il)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamida



Postopek	V 4 mL kloroforma (Emsure) smo raztopili spojino 7 (0,085g, 0,25 mmol) in dodali etilizocianat (13) (21,4 μL, 0,27 mmol) (Sigma Aldrich). Reakcija je potekala pri 65 °C na oljni kopeli. Po 5 urah poteka reakcije smo s pomočjo tankoplastne kromatografije ugotovili, da imamo še vedno veliko izhodne spojine 7. Dodali smo še etilizocianata (21,4 μL, 0,27 mmol) ter pustili, naj reakcija poteka čez noč. Naslednji dan je bilo po vnovični tankoplastni kromatografiji razvidno, da imamo veliko več nastalega produkta 14. Reakciji smo uparili topilo ter jo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=20:1). Dobili smo 0,033 g produkta 14.
Ime produkta	(S)-3,4-dikloro-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2d]tiazol-6-il)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₉ Cl ₂ N ₅ O ₂ S, M=416,32 g/mol
Izgled spojine	beli kristali
Izkoristek	η =33,5 %
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,47 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	242-246 °C

¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,06 (t, 3H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH ₂ CH ₃), 1,86-1,93 (m, 1H, H _A -7), 1,96-2,02 (m, 1H, H _B -7), 2,19 (s, 3H, CH ₃), 2,63-2,69 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2,95 (m, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,0 Hz, H _B -4), 3,10-3,17 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 4,20-4,28 (m, 1H, CH), 6,52 (t, 1H, <i>J</i> = 5,6 Hz, NH), 7,32 (d, 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, NH), 10,14 (s, 1H, NH), 12,02 (s, 1H, NH) ppm
IR (ATR)	3420, 3095, 2974, 1685, 1628, 1521, 1485, 1449, 1411, 1382, 1359, 1290, 1253, 1172, 1123, 1078, 1002, 975, 928, 838, 783, 755, 677, 645 cm ⁻¹
HR-MS (ESI-)	izmerjena: 414,0551, izračunana: 414,0558

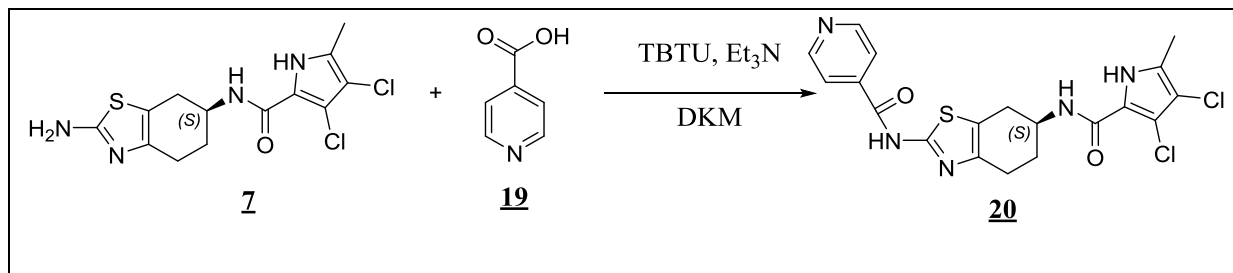
4.10 Sinteza (*S*)-*N*-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-5-metilizoksazol-4-karboksamida



Postopek	1.) Sprva smo pripravili kislinski klorid tako, da smo izhodno kislino 15 (0,048 g, 0,37 mmol) raztopili v 5 mL diklorometana (Merck) ter dodali še kapljico DMF (Emsure). Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel ter po kapljicah dodali oksalilklorid (16) (0,75 mL, 1,14 mmol) (Acros Organics). Reakcija je potekala čez
----------	---

	noč pri sobni temperaturi, naslednji dan pa smo uparili topilo in dobljeni kislinski klorid takoj uporabili v naslednji stopnji 2.). 2.) Nastali kislinski klorid 17 smo raztopili v 5 mL diklorometana (Merck) na ledeni kopeli, dodali 2 mL piridina (Emsure) ter spojino 7 (0,1 g, 0,29 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi preko noči. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in spirali s 10% citronsko kislino (2x15 mL), nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (2x15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x15 mL). Uparili smo etilacetat ter dobili 0,022 g čistega produkta 18.
Ime produkta	(S)-N-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)-5-metilizoksazol-4-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₈ H ₁₇ Cl ₂ N ₅ O ₃ S, M=454,33 g/mol
Izgled spojine	rjav prah
Izkoristek	η=16,7 %
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,30 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	219-224 °C
¹ H NMR (400 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄)	δ 2,02-2,09 (m, 1H, H _A -7), 2,14-2,18 (m, 1H, H _B -7), 2,25 (s, 3H, CH ₃), 2,63-2,71 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2,45-2,91 (s, 3H, CH ₃), 2,99 (m, 1H, <i>J</i> ₁ = 16,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,2 Hz, H _B -4), 3,41-4,47 (m, 1H, CH), 7,31 (s, 1H Ar-H) ppm
IR (ATR)	3419, 3094, 2973, 1707, 1624, 1527, 1486, 1443, 1410, 1382, 1357, 1293, 1251, 1173, 1122, 1079, 1002, 975, 897, 838, 783, 755, 672, 645, 627 cm ⁻¹

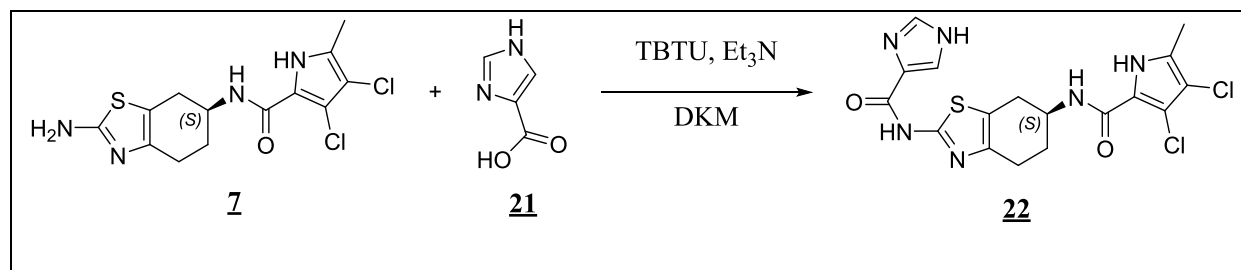
4.11 Sinteza (S)-N-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)izonikotinamida



Postopek	Spojino 19 (0,036 g, 0,29 mmol) smo raztopili v 5 mL diklorometana (Merck), dodali Et₃N (81 µL, 0,58 mmol) (Merck) in 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (TBTU) (0,112 g, 0,35 mmol) (Acros Organics). Počakali smo 30 min, da je uspešno potekla aktivacija izhodne kisline 19. Nato smo dodali še spojino 7 (0,068 g, 0,40 mmol) ter še 1 ekv. Et₃N (40,5 µL, 0,29 mmol). Reakcija je potekala preko noči pri sobni temperaturi. Pri izolaciji smo reakcijski zmesi uparili topilo, nato pa še izvedli ekstrakcijo, tako da smo surov produkt najprej raztopili v etilacetatu (30 mL) ter organsko fazo spirali s 10% citronsko kislino (2x15 mL), nasičeno raztopino natrijevega hidrogenkarbonata (2x15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x15 mL). Surov produkt smo čistili s kristalizacijo iz metanola. Naslednji dan smo izpadle kristale filtrirali z odsesavanjem ter jih dodatno posušili v sušilniku. Dobili smo 0,022 g produkta 20.
Ime produkta	(S)-N-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)izonikotinamid
Elementna sestava	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₅ O ₂ S, M=450,34 g/mol
Izgled spojine	rjav prah
Izkoristek	η=17,4 %

Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,34 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	207-210 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 1,98-2,02 (m, 1H, H _A -7), 2,03-2,08 (m, 1H, H _B -7), 2,12 (s, 3H, CH ₃), 2,74-2,82 (m, 3H, H _A -4, H-5), 3,07 (m, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,3 Hz, H _B -4), 4,25-4,36 (m, 1H, CH), 7,45 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, CONH), 7,97 (ddd, 2H, <i>J</i> ₁ = 4,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,6 Hz, 2 x ArH), 8,80 (dd, 2H, <i>J</i> ₁ = 4,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, 2 x ArH), 12,02 (s, 1H, NH), 12,85 (s, 1H, CONH) ppm
IR (ATR)	3217, 1678, 1637, 1600, 1523, 1434, 1412, 1337, 1293, 1231, 1085, 1064, 1005, 918, 840, 748, 705 cm ⁻¹
HR-MS (ESI+)	izmerjena: 450,0549, izračunana: 450,0558

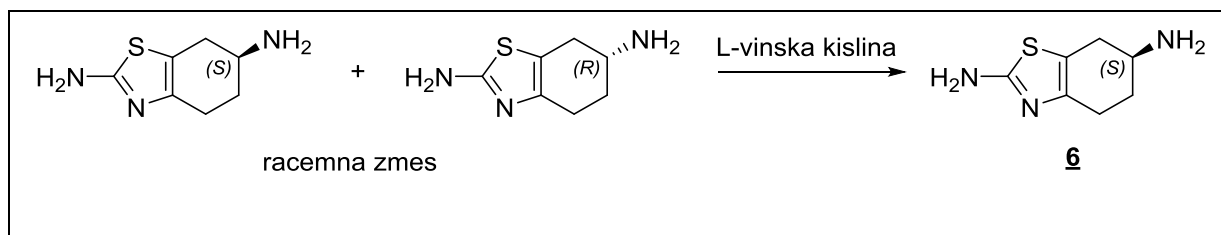
4.12 Sinteza (*S*)-*N*-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-1*H*-imidazol-4-karboksamida



Postopek	Spojino <u>21</u> (0,017 g, 0,15 mmol) smo raztopili v 5 mL diklorometana (Merck). Zatim smo dodali Et ₃ N (61,8 μL, 0,30 mmol) (Merck) ter 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniev tetrafluoroborat (TBTU) (0,057 g, 0,18 mmol) (Acros Organics). Počakali smo 30 min, da je uspešno potekla aktivacija izhodne kisline <u>21</u> . Nato smo dodali še spojino <u>7</u> (0,038 g, 0,23 mmol) ter še 1 ekv. Et ₃ N (30,09 μL,
----------	---

	0,15 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi preko noči. Iz kromatograma je bilo razvidno, da imamo zelo malo produkta in še zelo veliko izhodne spojine. V reakcijsko zmes smo dodali še kristalček 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Sigma Aldricht) ter pustili mešati preko vikenda. Pri izolaciji smo reakcijski zmesi uparili topilo ter jo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=9:1). Na koncu smo dobili 0,007 g produkta <u>22</u>.
Ime produkta	(S)-N-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksamid
Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O ₂ S, M=439,32 g/mol
Izgled spojine	bel prah
Izkoristek	η=10,7 %
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0,22 (MF=DKM:MeOH=9:1)
Tališče	205-207 °C
¹ H NMR (400 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄)	δ 2,06-2,10 (m, 1H, H _A -7), 2,14-2,22 (m, 1H, H _B -7), 2,25 (s, 3H, CH ₃), 2,80-2,86 (m, 3H, H _A -4, H-5), 3,18 (m, 1H, J ₁ = 16,8 Hz, J ₂ = 4,9 Hz, H _B -4), 4,43-4,49 (m, 1H, CH), 7,82 (s, 1H, ArH), 7,91 (d, 1H, J = 0,9 Hz, ArH) ppm
IR (ATR)	3209, 2924, 2325, 2205, 2157, 2135, 2047, 2011, 1986, 1946, 1636, 1523, 1433, 1371, 1337, 1299, 1231, 1086, 1064, 1002, 842, 749, 691, 661, 610 cm ⁻¹
HR-MS (ESI+)	izmerjena: 439,0515, izračunana: 439,0511

4.13 Izolacija (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diamina



Postopek	V 500 mL bučki smo raztopili racemno zmes (20,001 g, 0,118 mol) v 250 mL etanola in nato v raztopino dodali še L-vinsko kislino (17,749 g, 0,118 mol) (Sigma Aldrich). Raztopino smo mešali 3 ure, pri čemer je izpadla oborina. Oborino smo filtrirali z odsesavanjem ter jo nadalje raztopili v 140 mL destilirane vode in segrevali do bistre raztopine. Raztopino smo pustili čez noč naj se ohlaja in kristalizira. Dobljeno oborino smo znova filtrirali z odsesavanjem, jo ponovno raztopili v 40 mL destilirane vode ter segrevali. Tako smo tudi izvedli drugo kristalizacijo. Nastalo oborino smo znova filtrirali z odsesavanjem, jo raztopili v 20 mL destilirane vode in ji dodali 10 mL koncentrirane HCl. Raztopino smo naalkalili z 2 M NaOH do pH=13, pri tem so nam izpadli fini kristali produkta 6. Masa dobljenega produkta 6 je bila 3,257 g.
Ime produkta	(S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diamin
Elementna sestava	C ₇ H ₁₁ N ₃ S, M=169,25 g/mol
Izgled spojine	bela trdna snov
Izkoristek	η=32,2%
Retencijski faktor (R _f)	R _f =0 (MF=DKM:MeOH=20:1)

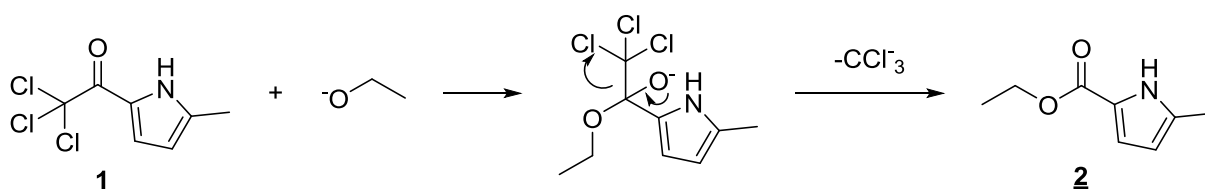
5 Rezultati in razprava

5.1 Komentar sinteznih postopkov

5.1.1 Komentar sinteze spojine 7

5.1.1.1 Komentar reakcije 4.1

Pri reakciji gre za nukleofilno substitucijo, ki poteka po enostopenjskem bimolekularnem mehanizmu (Shema 5). Sprva reagirata natrij in etanol v redoks reakciji, pri čemer dobimo natrijev etoksid, ki ima vlogo močnega nukleofila. Pri spojini 1 predstavlja karbonilni ogljik dober elektrofilni center, pri čemer je triklorometil dobro izstopajoča skupina. Nukleofil napade elektrofilni center, pri čemer pride do izstopa triklorometilne skupine in tvorbe estra.



Shema 5: Nukleofilna substitucija.

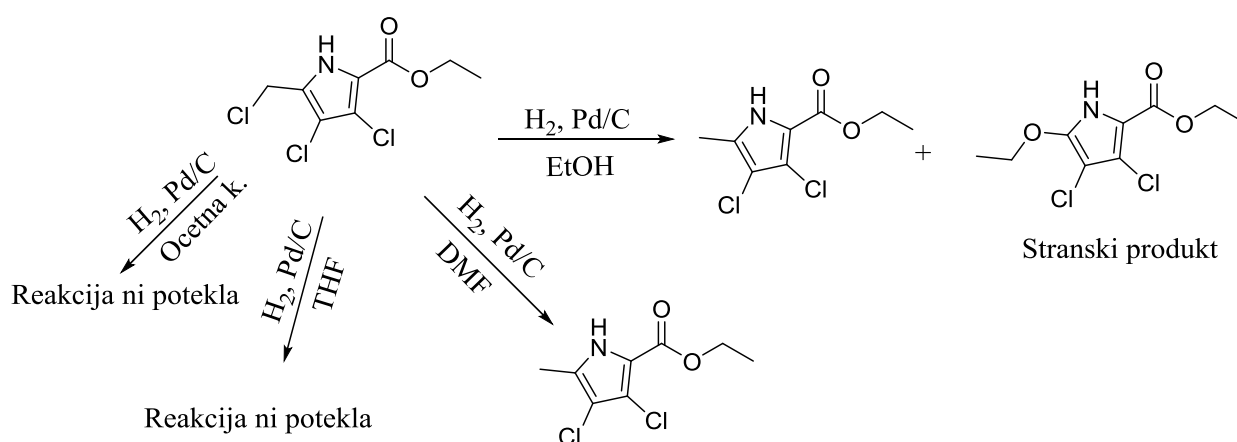
5.1.1.2 Komentar reakcije 4.2

Pri reakciji 4.2 smo morali zagotoviti inertno atmosfero, saj obstaja možnost, da bi potekla oksidacija izhodnega pirolovega obroča kot stranska reakcija (25). Dobili smo trikloriran produkt, ki je kloriran na aromatskem obroču in na metilni verigi pirolovega obroča. Kloriranje pirolovega obroča poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije. Kloriranje stranske metilne verige poteka po mehanizmu radikalske substitucije. Trikloriranje smo izvedli zato, saj reakcije ni možno ustaviti na stopnji želenega dikloriranega produkta. Pri nastanku radikala ima vlogo indikatorja sulfuril klorid. Pri nastanku kloriranega produkta pa nastaneta HCl in SO₂ kot stranska produkta (24, 25).

5.1.1.3 Komentar reakcije 4.3

Najprej smo poskušali poiskati najbolj primerno topilo, v katerem bi katalitsko hidrogeniranje poteklo z nastankom čim manj stranskih produktov. Pri reakciji 4.3 smo kot topilo sprva

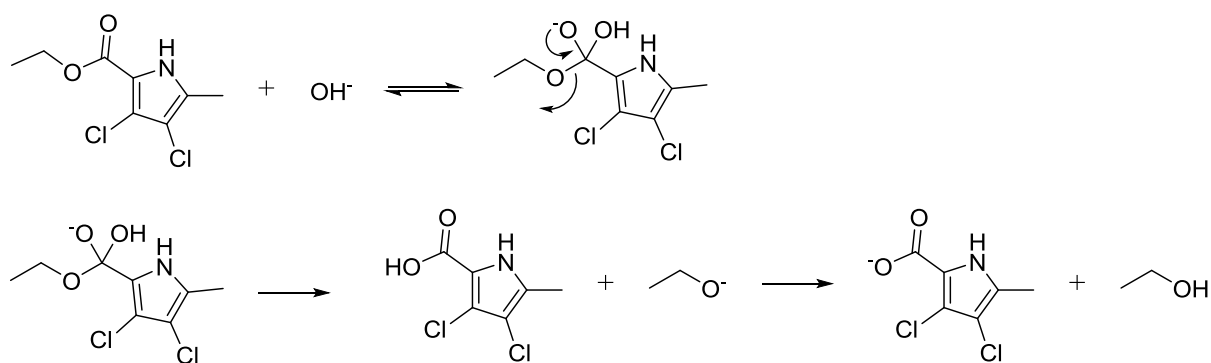
uporabili tetrahidrofuran, pri čemer reakcija ni potekla (Shema 6). Nato smo za topilo uporabili očetno kislino, saj smo predvidevali, da bo kinetika reakcije hitrejša, vendar zopet ni prišlo do nastanka želenega produkta. V tretje smo uporabili etanol za reakcijski medij, tu je reakcija potekla, vendar smo dobili tudi kar nekaj stranskega produkta, kar je zahtevalo čiščenje s »flash« kolonsko kromatografijo. Do nastanka stranskega produkta pa je prišlo zato, saj etanol predstavlja nukleofil, ki je napadel elektrofilni ogljik na stranski verigi pirola. Na koncu smo se odločili, da poskusimo še z *N,N*-dimetilformamidom, v katerem je reakcija potekla najbolje in smo dobili najvišji izkoristek.



Shema 6: Izbor primerne topila.

5.1.1.4 Komentar reakcije 4.4

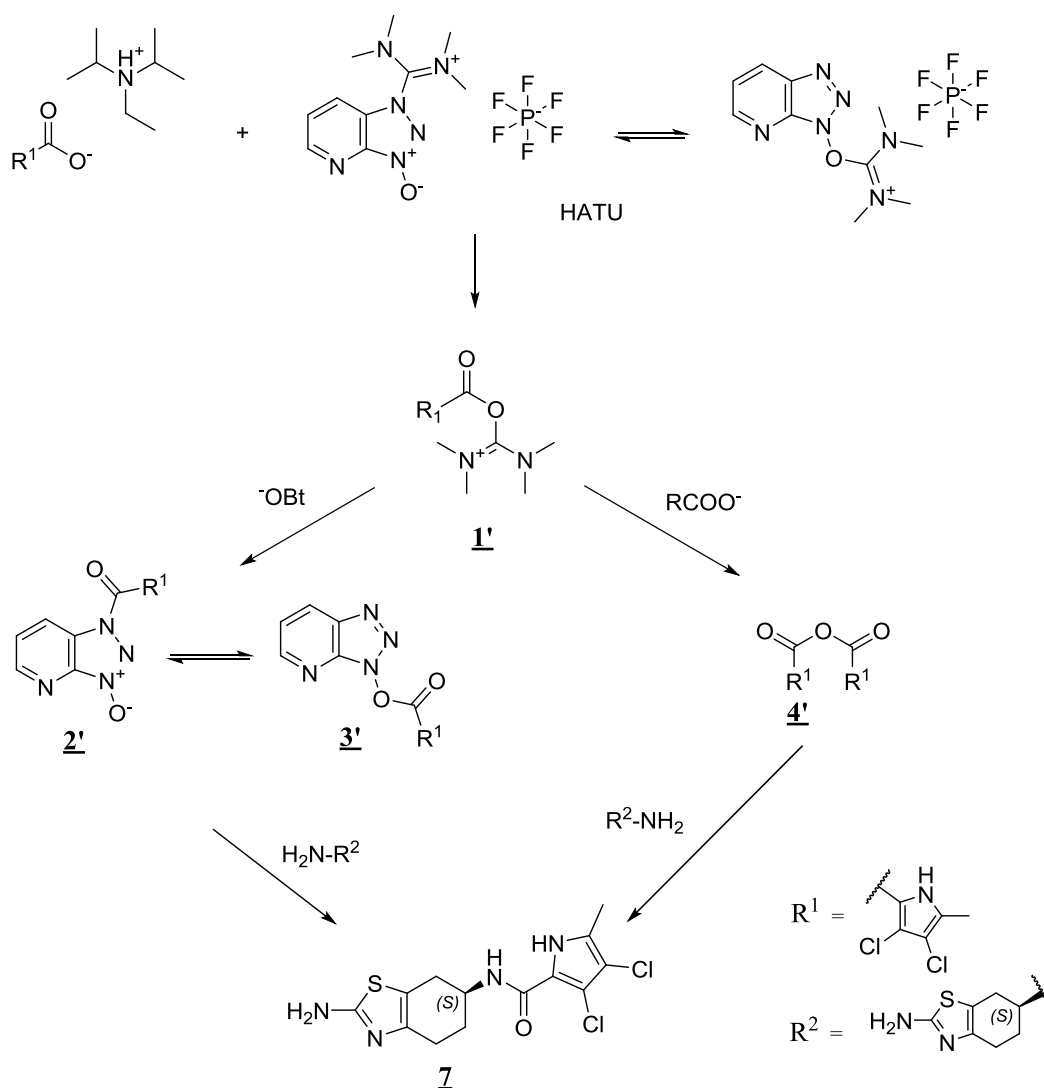
Pri hidrolizi estra smo se odločili za alkalno hidrolizo, saj gre za ireverzibilno reakcijo (Shema 7). Reakcija je ireverzibilna, saj v zadnji stopnji nastane kislina in alkohol, pri tem pa zaradi velike razlike v kislosti takoj nastane alkohol in karboksilatni ion oziroma zaradi alkalnih pogojev sol nastale kisline (25).



Shema 7: Alkalna hidroliza estra.

5.1.1.5 Komentar reakcije 4.5

Pri sintezi amida smo uporabili sklopitveni reagent HATU. Sklopitvene reagente največkrat dodamo direktno v zmes karboksilne kisline in amina. Uporabni so pa tudi za sintezo estrov. Delujejo tako, da aktivirajo karboksilno kislino v intermediate, ki so bolj elektrofilni in nato reagirajo z nukleofilnim aminom.



Shema 8: Sinteza s sklopitvenim reagentom 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev 3-oksidi heksafluorofosfat

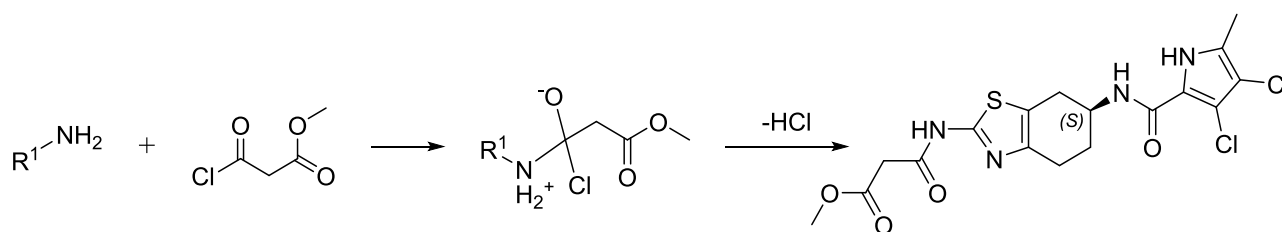
Točen mehanizem tvorbe amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU še ni povsem znan. Visoko reaktiven intermediat **1'** (Shema 8) naj bi bil vpleten v tvorbo aktiviranega estra **3'**, ki ima ključno vlogo pri tej sklopitveni reakciji. Odvisno od pogojev reakcije, spojina **3'** obstaja v obliki preprostega estra ali pa v ravnotežju z *N*-oksidom **2'**. Ključna spojina za potek reakcije je spojina **3'**. Ravno tako ne gre zanemariti poti preko nastanka simetričnega anhidrida **4'** (26).

5.1.2 Komentar sinteze spojine 12

Spojino smo sintetizirali v treh stopnjah. Pri prvi in drugi stopnji (reakciji 4.6 in 4.7) sinteze spojine (S)-3,4-dikloro-5-metil-N-(2-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida gre za nukleofilno substitucijo, in sicer poteče aminoliza estra s pomočjo hidrazina, pri čemer dobimo hidrazid. V tretji stopnji pa smo naredili ciklizacijo s pomočjo 1,1'-karbonildiimidazola, ki je donor karbonilne skupine.

5.1.2.1 Komentar reakcije 4.6

Reakcija sinteze amida med aminom in kislinskim kloridom poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije. Vlogo nukleofila ima aminska skupina na molekuli (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamida, elektrofil pa predstavlja karbonilni ogljik kislinskega klorida na metil 3-kloro-3-oksopropanoatu s kloridom kot dobro izstopajočo skupino (Shema 9).



Shema 9: Nukleofilna substitucija

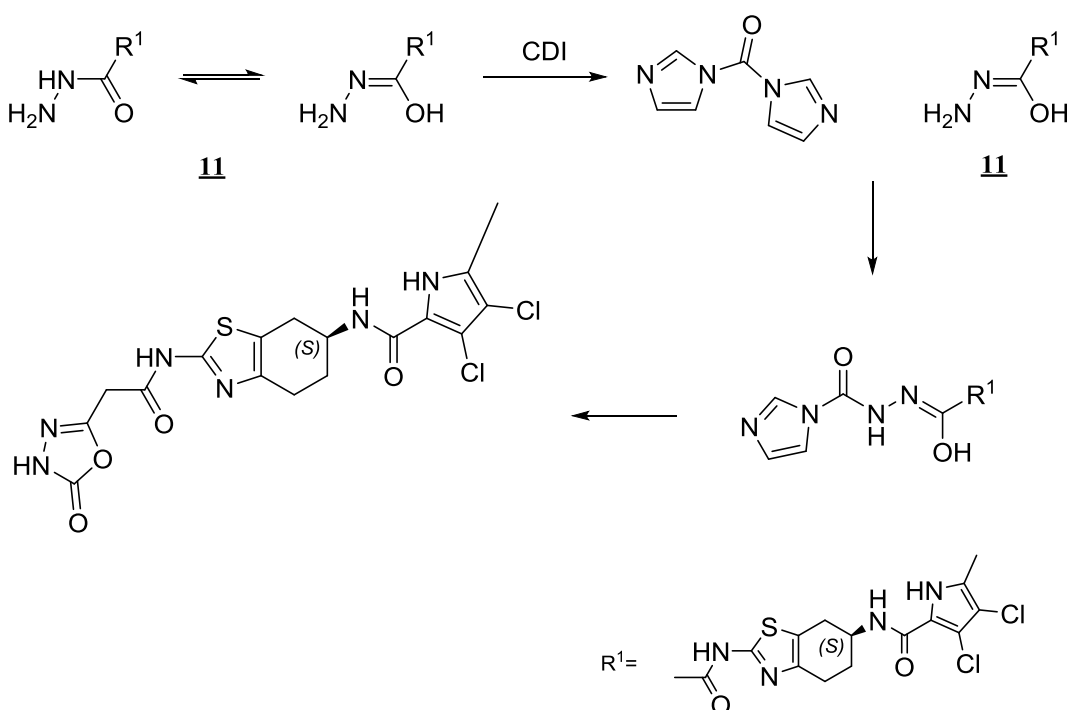
Nukleofilni amin napade elektrofilen karbonilni ogljik in pride do tvorbe tetraedričnega intermedrata. Po prerazporeditvi elektronov pride do izstopa HCl in tvorbe amidne vezi. Mehanizem je zelo podoben tudi pri reakciji 4.7, s to razliko, da nukleofil predstavlja hidrazin, elektrofilni center pa nosi produkt iz prejšnje stopnje.

5.1.2.2 Komentar reakcije 4.7

Pri tej reakciji gre za nukleofilno substitucijo. Hidrazin predstavlja nukleofil, ki napade karbonilni elektrofilni center. Metoksi skupina predstavlja izstopajočo skupino.

5.1.2.3 Komentar reakcije 4.8

Spojina **11** se lahko nahaja tudi v obliki imina oz. Schiffove baze (Shema 10). 1,1'-karbonildiimidazol je zelo elektrofilna molekula, zato lahko sprejme nukleofilni napad amina spojine **11**. V reakciji pa pride tudi do izstopa imidazola, ki velja za dobro izstopajočo skupino. Nato pride do vnovičnega nukleofilnega napada hidroksilne skupine na Schiffovi bazi. Ob tem napadu pride do izstopa še druge molekule imidazola ter do tvorbe cikličnega karbamata.

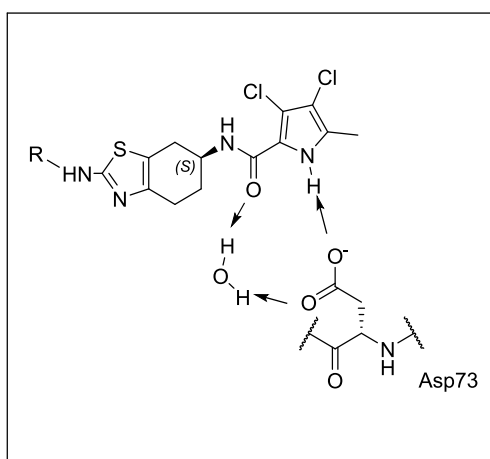


Shema 10: Ciklizacija s karbonildiimidazolom

5.2 Rezultati bioloških testiranj

5.2.1 IC₅₀ vrednosti določene na DNA girazi in topoizomerazi IV iz bakterije *E. coli* in *S. aureus*

Zaviralci delno oponašajo vezavo molekule ATP, saj ravno tako tvorijo vodikove vezi z Asp73 (številčenje pri *E. coli* GyrB) in strukturno ohranjeno molekulo vode (Slika 13). Da dosežemo močno zavrtost encima, so zaželeni tudi interakcije z Arg136 in Arg76 (27).



Slika 13: Interakcija med encimom in pirolamidom.

Sprva smo spojinam določili rezidualno aktivnosti, ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti. Spojinam, pri katerih je bila rezidualna aktivnost manjša od 50% pri 100 μ M ali 10 μ M koncentraciji spojine, smo določili še vrednosti IC₅₀.

Spojine **11**, **12**, **14** in **22** smo testirali na izoliranih encimih DNA-girazi in topoizomerazi IV iz po Gramu negativne bakterije *E. coli* in po Gramu pozitivne bakterije *S. aureus*. Spojini **18** in **20** pa sta bili testirani zgolj na DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Vse spojine imajo isti osnovni skelet, ki je (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid, razlikujejo se le po stranski verigi R (slika13). Zaviralne aktivnosti so prikazane v preglednici I.

Spojini **12** in **14** sta pokazali aktivnost zgolj na izolirani DNA-girazi iz *E. coli*, spojina **11** pa je poleg aktivnosti na DNA girazi iz *E. coli* pokazala tudi aktivnost na DNA-girazi in

topoizomerazi IV iz bakterije *S. aureus*, medtem ko je bila spojina **11** prav tako neaktivna na encimu topoizomeraza IV iz *E. coli*.

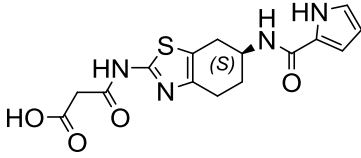
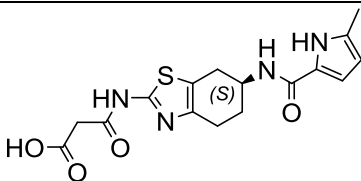
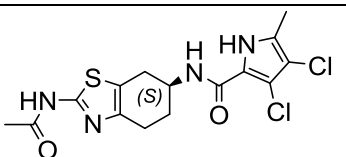
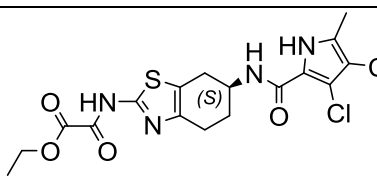
Najmočnejšo aktivnost na DNA-girazi iz *E. coli* je izkazala spojina **11** ($IC_{50} = 0,0418 \mu M$), sledila je spojina **12** ($IC_{50} = 0,0644 \mu M$), nato si sledijo spojine po padajoči aktivnosti **14**, **22**, **18** in **20** z najmanjšo izkazano aktivnostjo.

Preglednica I: Zaviralne aktivnosti spojin na izoliranih encimih DNA-giraze in topoizomeraze IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*.

Oznaka	Struktura	<i>E. coli</i> DNA giraza	<i>S. aureus</i> DNA giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
11		$IC_{50} = 0,0418 \mu M$	$IC_{50} = 0,535 \mu M$	RA (100 μM) = 90%	RA (100 μM) = 35%
12		$IC_{50} = 0,0644 \mu M$	RA (100 μM) = 66%	RA (100 μM) = 71%	RA (100 μM) = 99%
14		$IC_{50} = 0,228 \mu M$	RA (100 μM) = 81%	RA (100 μM) = 124 %	RA (100 μM) = 96%
18		$IC_{50} = 3,49 \mu M$	/	/	/
20		RA (100 μM) = 18%	/	/	/
22		$IC_{50} = 1,22 \mu M$	RA (100 μM) = 69%	RA (100 μM) = 91%	RA (100 μM) = 110%

Za lažjo razlago različnih aktivnosti spojin smo uporabili še nekaj strukturno podobnih spojin, ki so bile predhodno sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani (preglednica II).

Preglednica II: Zaviralne aktivnosti strukturno podobnih spojin na izoliranih encimih DNA-giraze in topoizomeraze IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*.

Oznaka	Struktura	<i>E. coli</i> DNA giraza	<i>S. aureus</i> DNA giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
TJL-1		Neaktivna	RA (100 μ M) = 95%	RA (100 μ M) = 121%	RA (100 μ M) = 99%
TJL-3		IC ₅₀ = 20,7 μ M	RA (100 μ M) = 84%	RA (100 μ M) = 54%	RA (100 μ M) = 94%
TNH-8		IC ₅₀ = 0,481 μ M	RA (10 μ M) = 80%	RA (100 μ M) = 108%	RA (100 μ M) = 97%
TNH-9		IC ₅₀ = 0,227 μ M	RA (10 μ M) = 41%	RA (100 μ M) = 94%	RA (100 μ M) = 73%

Pomembno vlogo pri interakciji z encimom ima substituiran pirollov obroč. Hidrofobni substituenti na pirollovem obroču tvorijo hidrofobne interakcije v hidrofobnem žepu ATP-vezavnega mesta (27). Poleg tega, elektron privlačni substituenti, povečajo kislost pirolne aminske skupine, s tem pa se tudi poveča jakost vodikove vezi, ki se tvori z Asp73. To je lepo razvidno, če primerjamo spojin **TJL-1** (neaktivna) in **TJL-3** (IC₅₀ = 20,7 μ M) z vsemi

ostalimi, ki imajo IC_{50} v nM – μ M območju. Pri tem opazimo, da ima najaktivnejša spojina **11** za faktor 500 nižji IC_{50} od spojine **TJL-3**.

Nobena od spojin, razen spojine **11** z $IC_{50} = 0,535 \mu$ M na DNA-girazi iz *S. aureus*, ni izkazala aktivnosti na *S. aureus* DNA-girazi, *E. coli* topo IV in *S. aureus* topo IV. To lahko razložimo na osnovi volumna hidrofobnega žepa. *E. coli* DNA-giraza ima v hidrofobnem žepu manjše aminokislinske preostanke Val43, Met95 in Val167, kar v primerjavi z *S. aureus* DNA-girazo z večjimi aminokislinskimi ostanki Ile51, Leu103 in Ile175, tvori večji hidrofobni žep. Velikosti hidrofobnih žepov si od največjega do najmanjšega sledijo tako: *E. coli* GyrB ($V = 157 \text{ \AA}^3$), *S. aureus* GyrB ($V = 140 \text{ \AA}^3$), *E. coli* ParE ($V = 149 \text{ \AA}^3$) in *S. aureus* ParE ($V = 155 \text{ \AA}^3$) (27).

Zelo pomembno vlogo pa ima tudi stranska veriga, ki je pripeta na 2-amino skupino tiazolnega fragmenta. Ta stranska veriga mora vsebovati akceptor vodikove vezi, ki nato tvori vodikovo vez z gvanidinsko skupino Arg136. Vse naše sintetizirane spojine **11**, **12**, **14**, **18**, **21**, **23**, ter spojini **TNH-8** in **TNH-9** imajo akceptore vodikove vezi, pa vendar pride do večjih variacij v aktivnosti. Največjo aktivnost je izkazala spojina **11**, takoj za njo ji sledi spojina **12**, nato pa sledijo spojine v povprečju s 6 x slabšo aktivnostjo od prvih dveh, in sicer **14**, **TNH-8** in **TNH-9**. Pri tem lahko sklepamo, da ima ključno vlogo tudi sama dolžina in položaj verige.

5.2.3 Protibakterijska aktivnost

Na koncu smo določili tudi protibakterijsko aktivnost spojin **11**, **12**, **14**, **18** in **20** na dveh po Gramu pozitivnih (*E. faecalis* in *S. aureus*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli* in *P. aeruginosa*) bakterijskih sevih.

Po 24 urah izpostavljenosti bakterij 50μ M zaviralca je največje zaviranje rasti dosegla spojina **12**. Pri *E. faecalis* je dosegla 99,74 %, pri *S. aureus* pa 98,82 % zaviranje po 24 urah (preglednica III), kar predstavlja dobro protibakterijsko aktivnost. Ti rezultati so bili vsekakor presenečanje, saj spojina ni izkazala aktivnosti na izoliranih encimih iz po Gramu pozitivnih bakterij. To nakazuje, da spojina mogoče sploh nima tarčnega mesta na encimih DNA-girazi ali topoizomerazi IV.

Preglednica III: Delež zaviranja rasti bakterij *Enterococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus* po 4, 8 in 24 urah.

Spojina	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		
	4h	8h	24h	4h	8h	24h
<u>11</u>	79,52	77,64	43,55	96,97	68,88	42,83
<u>12</u>	108,45	101,27	99,74	111,35	102,04	98,82
<u>14</u>	23,51	0,34	3,52	17,22	0,18	5,99
<u>18</u>				38,63	21,31	33,92
<u>20</u>				65,39	33,20	37,07

Spojine ne izkazujejo aktivnosti proti po Gramu negativnim bakterijam. Najverjetneje je razlog ta, da ima *E. coli* izlivne črpalke, s katerimi črpa spojine ven iz celice. Eden od problemov predstavlja tudi velika polarnost spojin, katere težko prehajajo celično steno (preglednica IV) (27).

Preglednica IV: Delež zaviranja rasti bakterij *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* po 4, 8 in 24 urah.

Spojina	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)		
	4h	8h	24h	4h	8h	24h
<u>11</u>	-2,73	-33,05	4,52	2,02	18,81	-20,06
<u>12</u>	13,30	-31,93	-0,65	-5,20	11,33	18,47
<u>14</u>	-3,26	14,36	5,99	-0,13	2,79	-9,56
<u>18</u>	0,35	-6,50	2,35			
<u>20</u>	-4,54	-4,80	6,08			

6 Sklep

Pri magistrski nalogi smo sintetizirali pirolamidne zaviralce DNA-giraze in topoizomeraze IV. Spojinam smo določili vrednosti IC_{50} na izoliranih bakterijskih encimih iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Na koncu pa smo spojinam določili še protibakterijsko aktivnost na dveh po Gramu pozitivnih bakterijah (*E. faecalis* in *S. aureus*) in dveh po Gramu negativnih bakterijah (*E. coli* in *P. aeruginosa*).

Od vseh testiranih spojin **11**, **12**, **14**, **22**, **18** in **20** je največjo aktivnost na DNA-girazi iz *E. coli* izkazala spojina **11** z $IC_{50}=0,0418 \mu M$. Poleg tega je spojina **11** edina izkazala vidno aktivnost na izolirani DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterije *S. aureus*.

Vse spojine, razen spojine **12**, niso izkazovale protibakterijske aktivnosti. Spojina je pri bakteriji *E. faecalis* dosegla 99,74 % in pri bakteriji *S. aureus* 98,82 % zaviranje rasti po preteku 24 ur. Da spojine niso izkazovale protibakterijske aktivnosti proti po Gramu pozitivnih bakterijah, je razlog verjetno ta, da imajo spojine slabo zaviralno aktivnost. Pri po Gramu negativnih bakterijah pa je razlog verjetno ta, da imajo bakterije izlivne črpalke, s katerimi črpajo spojino iz celice.

Pirolamidni derivati predstavljajo obetavno skupino spojin za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo, pri katerih je potrebno izboljšati fizikalno-kemijske lastnosti in zaviralno aktivnost, s čimer bi dosegli selektivno toksično, ter razširjen spekter delovanja.

7 Literatura

- (1) Chopra I. The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; 68; 496-505
- (2) Dale M.: *Pharmacology condensed*. 2. izid. Churchill Livingstone, 2009
- (3) Wright GD. Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology*. 2012;19(1):3–10.
- (4) Singh SB. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014;24(16):3683–9.
- (5) Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., Pfaller, Michael A.: *Medical microbiology*. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005
- (6) Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 1992;257(5073):1050–5.
- (7) Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*. 2004;10:S122–S129.
- (8) Mayer C, Janin YL. Non-quinolone inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases: a feat of bioisosterism. *Chemical reviews*. 2013;114(4):2313–42.
- (9) Sharma A, Mondragón A. DNA topoisomerases. *Current opinion in structural biology*. 1995;5(1):39–47.
- (10) Gubaev A, Klostermeier D. The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA repair*. 2014;16:23–34.
- (11) Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol*. 2010;17(5):421–33.
- (12) Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51(suppl 1):1–11.
- (13) Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1997;61(3):377–92.
- (14) Aldred KJ, Breland EJ, Vlčková V, Strub M-P, Neuman KC, Kerns RJ, et al. Role of the water-metal ion bridge in mediating interactions between quinolones and *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Biochemistry*. 2014;53(34):5558–67.

- (15) Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T. Structure-based discovery of substituted 4, 5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(14):6413–26.
- (16) Schechner M, Sirockin F, Stote RH, Dejaegere AP. Functionality maps of the ATP binding site of DNA gyrase B: generation of a consensus model of ligand binding. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(18):4373–90.
- (17) Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in biochemical sciences*. 2000;25(1):24–8.
- (18) Oblak M, Kotnik M, Solmajer T. Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(19):2033–47.
- (19) Tomašić T, Peterlin Mašič L. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(1):130–51.
- (20) Gormley NA, Orphanides G, Meyer A, Cullis PM, Maxwell A. The interaction of coumarin antibiotics with fragments of the DNA gyrase B protein. *Biochemistry*. 1996;35(15):5083–92.
- (21) Lewis RJ, Singh O, Smith CV, Skarzynski T, Maxwell A, Wonacott AJ, et al. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *The EMBO journal*. 1996;15(6):1412.
- (22) Heddle JG, Barnard FM, Wentzell LM, Maxwell A. The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. Taylor & Francis; 2000;19(8):1249–64.
- (23) Eakin, Ann E and Green, Oluyinka and Hales, Neil and Walkup, Grant K and Bist, Shanta and Singh, Alok and Mullen, George and Bryant, Joanna and Embrey, Kevin and Gao, Ning and others. Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: fragment-based nuclear magnetic resonance screening to identify antibacterial agents; 2012; 56(3):1240-1246
- (24) Matsumoto H, Nakano T, Kato M, Nagai Y. Side-chain monochlorination of toluenes with sulfonyl chloride catalyzed by tetrakis (triphenylphosphine) palladium (0). *Chemistry Letters*. 1978;7(2):223–6.
- (25) Tišler M.: *Organska kemija*. Ljubljana: DZS, 1982.
- (26) Reszka P, Methling K, Lalk M, Xiao Z, Weisz K, Bednarski PJ. Control of aspartate epimerization during the coupling of caspase specific tetrapeptides with aromatic amines by using N-[[dimethylamino]-1H-1, 2, 3-triazolo [4, 5-b]-pyridin-1-yl] methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide (HATU) as a coupling reagent. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2008;19(1):49–59.

- (27) Tomašić T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvao S, Tammela P, Banjanac M, Ergović G, Anderluh M, Peterlin Mašič L and Kikelj D. Discovery of 4, 5, 6, 7-tetrahydrobenzo [1, 2-d] thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP-binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;(58 (14)):5501–21.