

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA SKOK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV 2-AMINOTIAZOLA KOT
ATP-KOMPETITIVNIH ZAVIRALCEV HSP90 IN DNA-GIRAZE**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA SKOK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV 2-AMINOTIAZOLA KOT
ATP-KOMPETITIVNIH ZAVIRALCEV HSP90 IN DNA-GIRAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF 2-AMINOTHIAZOLE DERIVATIVES AS
ATP-COMPETITIVE HSP90 AND DNA-GYRASE INHIBITORS**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. *In vitro* testiranja so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Centre for Drug Research, Fakultete za farmacijo Univerze v Helsinki na Finskem.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vse nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi naloge ter za čas, ki mi ga je posvetil.

Zahvalil bi se tudi svoji družini in prijateljem, ki so me tekom celotnega študija podpirali in motivirali.

Izjava

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

Žiga Skok

Ljubljana, 2016

VSEBINA

Povzetek	vii
Abstract	viii
Seznam okrajšav	ix
1. UVOD	1
1.1. Zgodovina protimikrobnih zdravil	1
1.2. Odpornost mikroorganizmov proti zdravilnim učinkovinam	2
1.2.1. Intrinzična bakterijska odpornost	2
1.2.2. Pridobljena bakterijska odpornost	3
1.2.3. Virusna odpornost	5
1.3. Topoizomeraze	5
1.3.1. Znane učinkovine, ki ciljajo bakterijske topoizomeraze	6
1.4. Šaperoni	8
1.4.1. Hsp90	8
1.4.1.1. Vloga Hsp90 pri razmnoževanju virusov	9
1.4.1.2. Zaviralci Hsp90 kot protivirusne učinkovine	10
1.4.1.3. Znani zaviralci Hsp90	10
1.5. ATP vezavno mesto GHKL ATPaz/kinaz	11
2. Načrt za delo	13
3. Materiali in metode	16
3.1. Materiali	16
3.2. Poimenovanje in risanje spojin	16
3.3. Kromatografske metode	16
3.3.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)	16
3.3.2. »Flash« kolonska kromatografija	16
3.3.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	16
3.4. Spektroskopske metode	17
3.4.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)	17
3.4.2. Infrardeča spektroskopija (IR)	17
3.4.3. Masna spektrometrija (MS)	17
3.5. Določanje temperature tališča	17
3.6. Biokemijska testiranja	17

3.6.1.	Testiranje encimske zavirale aktivnosti na DNA-girazi	17
3.6.2.	Testiranje vezave na Hsp90.....	18
3.6.3.	Protibakterijska aktivnost.....	18
3.6.4.	Protivirusna aktivnost	18
3.6.5.	Molekulsko sidranje.....	18
4.	Eksperimentalno delo.....	19
4.1.	Sinteza di- <i>terc</i> -butil (5-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen)(<i>S</i>)-dikarbamata	19
4.2.	Sinteza (S)-5-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-benzen-1,3-diaminijevega klorida	20
4.3.	Sinteza 4-((<i>terc</i> -butilkarbonil)amino)benzojske kisline	21
4.4.	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(4-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata	22
4.5.	Sinteza (S)-4-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-benzenaminijevega klorida	23
4.6.	Sinteza metil 6-aminopikolinata.....	24
4.7.	Sinteza metil 6-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)pikolinata	25
4.8.	Sinteza 6-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)pikolinske kisline	25
4.9.	Sinteza metil 5-aminopikolinata.....	26
4.10.	Sinteza metil 5-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)pikolinata	27
4.11.	Sinteza 5-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)pikolinske kisline	27
4.12.	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(6-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamata	28
4.13.	Sinteza (S)-6-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-2-aminijevega klorida.....	29
4.14.	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(6-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamata	30
4.15.	Sinteza (S)-6-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-3-aminijevega klorida.....	31
4.16.	Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona in 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona.....	32
4.17.	Sinteza 4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline.....	33
4.18.	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	34

4.19. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(3-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata	35
4.20. Sinteza (<i>S</i>)-3-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijevega klorida.....	36
4.21. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata	37
4.22. Sinteza (<i>S</i>)-2-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida	38
4.23. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(6-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamata	39
4.24. Sinteza (<i>S</i>)-6-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-aminijevega klorida	40
4.25. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(6-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamata	41
4.26. Sinteza (<i>S</i>)-6-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-aminijevega klorida	42
4.27. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(4-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata	44
4.28. Sinteza (<i>S</i>)-4-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijevega klorida.....	45
4.29. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(3-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropil)karbamata	46
4.30. Sinteza (<i>S</i>)-3-((6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropan-1-aminijevega klorida.....	47
4.31. Sinteza 4-kloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline	48
4.32. Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-kloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	48
4.33. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-((6-(4-kloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata	50
4.34. Sinteza (<i>S</i>)-2-((6-(4-kloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida	51
4.35. Neuspešen poskus sinteze (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-((3-aminobenzil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo(1,2- <i>d</i>)tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	52
4.36. Neuspešni poskusi sinteze (<i>S</i>)-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	53
5. Rezultati in razprava	55

5.1.	Komentar sintez.....	55
5.1.1.	Uvajanje Boc zaščitne skupine	55
5.1.2.	Tvorba amidne vezi z uporabo skloplitvenih reagentov EDC in HOBr	57
5.1.3.	Sinteza osnovnega skeleta za drugo serijo spojin.....	59
5.1.4.	Odstranjevanje Boc zaščitne skupine	61
5.1.4.1.	Odstranjevanje Boc zaščitne skupine z uporabo acetil klorida	61
5.1.4.2.	Odstranjevanje Boc zaščitne skupine z uporabo 4 M HCl v dioksanu ...	62
5.1.5.	Komentar neuspešnih sintez.....	62
5.2.	Rezultati biokemijskih testiranj	64
6.	Sklep	72
7.	Literatura:	74

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavni principi delovanja protivirusnih učinkovin.....	2
Slika 2: Mehanizmi intrinzične odpornosti na primeru β -laktamskih antibiotikov..	3
Slika 3: Mehanizmi pridobljene odpornosti preko neposrednega vpliva na strukturo antibiotika ali preko spremembe tarče..	4
Slika 4: Vloga bakterijskih topoizomeraz.....	6
Slika 5: Strukture izbranih zaviralcev GyrB/ParE in oroidina.....	7
Slika 6: Strukture izbranih zaviralcev Hsp90.	11
Slika 7: Primerjava strukture vezavnega mesta za ATP DNA-giraze in Hsp90.....	12
Slika 8: Načrt optimizacije izhodne spojine in prikaz vezave v vezavnem mestu Hsp90... <td>14</td>	14
Slika 9: Sintezna shema prve serije spojin.....	14
Slika 10: Načrtovani substituenti na mestu 2 za prvo serijo spojin.....	15
Slika 11: Sintezna shema druge serije spojin.	15
Slika 12: Načrtovani substituenti na mestu 2 za drugo serijo spojin.....	15
Slika 13: Mehanizem uvedbe Boc zaščite na amino skupino.	55
Slika 14: Mehanizem uvedbe Boc zaščite na amino skupino z uporabo katalizatorja DMAP.	57
Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi s sklopitvenima reagentoma EDC in HOBr.....	58
Slika 16: Mehanizem alkalne hidrolize spojine 22a.....	60
Slika 17: Mehanizem odstranjevanja Boc zaščitne skupine s klorovodikovo kislino	61
Slika 18: Reakcija nastanka HCl iz acetil klorida in metanola.	62

POVZETEK

Naraščajoč pojav mikroorganizmov odpornih proti zdravilnim učinkovinam predstavlja resno grožnjo za javno zdravje, zaradi česar je razvoj novih protimikrobnih učinkovin izredno pomemben. ATP-vezavni mesti bakterijske DNA-giraze in šaperona Hsp90 sta potencialni novi tarči za zdravljenje okužb z mikroorganizmi. Oba proteina zaradi topološke podobnosti ATP-vezavnega mesta uvrščamo v naddružino GHKL ATPaz/kinaz. Zaviralci bakterijske DNA-giraze, fluorokinoloni, se že dolgo časa nahajajo na tržišču kot uspešne protibakterijske učinkovine, vendar pa se njihova učinkovitost zaradi pojava odpornih bakterij manjša. ATP-vezavno mesto na tem encimu predstavlja alternativno tarčo v razvoju novih protibakterijskih učinkovin, s katero se lahko izognemo navzkrižni odpornosti proti fluorokinolonom. Hsp90 je že dolgo časa poznan kot potencialna tarča v razvoju protitumornih učinkovin, nedavno pa tudi kot potencialna nova tarča protivirusnih učinkovin. Ker pri zaviranju Hsp90 ciljamo celični faktor, potreben za razmnoževanje virusov, in ne neposredno virusnih proteinov, je razvoj odpornih virusov manj verjeten.

Pri eksperimentalnem delu te magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali potencialne nove ATP-kompetitivne zaviralce teh dveh proteinov, izhajali pa smo iz tipa zaviralcev z (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamidnim skeletom. Štirinajstim sintetiziranim spojinam smo določili zaviralno aktivnost na DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli* in njihovo protibakterijsko delovanje na različnih bakterijskih sevih. Kot najbolj aktivna spojina v encimskem testu se je izkazala spojina **30**, ki je glicinski derivat z zaščiteno amino skupino in dikloro substitucijo na pirolamidnem delu, vendar pa se ta spojina ni izkazala tudi za spojino z najaktivnejšim protibakterijskim delovanjem. Testirane spojine delujejo protibakterijsko predvsem na po Gramu pozitivnih bakterijah, najbolj je rast bakterij zavrla spojina **42**, ki sicer na encimskem testu ni kazala zaviralne aktivnosti proti DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Nadaljnje raziskave so potrebne, da ugotovimo, če je delovanje spojine **42** sploh povezano z zaviranjem DNA-giraze, ali pa je za protibakterijsko delovanje odgovoren drug mehanizem. Testiranje vezave spojin na Hsp90 in testiranje na protivirusno delovanje še vedno poteka, zato teh rezultatov nismo vključili v magistrsko nalogu.

Ključne besede: protibakterijska učinkovina, protivirusna učinkovina, odpornost, DNA-giraza, Hsp90

ABSTRACT

The increasing emergence of drug-resistant microorganisms represents a major public health threat, which makes the discovery of novel antimicrobial drugs exceptionally important. ATP-binding sites of bacterial DNA gyrase and chaperone Hsp90 are potential new targets for the treatment of infectious diseases. Because of the similarity of ATP-binding sites of both proteins they belong to the same GHKL ATPase/kinase superfamily. DNA gyrase inhibitors fluoroquinolones are antibacterial agents that have been in clinical use for a long time but with the emergence of resistant bacteria their effectiveness is decreasing. ATP-binding site of DNA gyrase represents an alternative target in the discovery of antibacterial drugs that allows us to avoid cross-resistance with the fluoroquinolones. Hsp90 is a long known target in the discovery of antitumor drugs but recently it has also been recognised as a potential target in the discovery of new antiviral drugs. By inhibiting Hsp90 we are targeting a cell factor that is important for viral replication and not viral proteins directly, which makes it harder for viruses to acquire resistance.

In the experimental part of this Master's thesis we designed and synthesized potential new ATP-competitive DNA gyrase and Hsp90 inhibitors based on the (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazol-6-yl)-4,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide scaffold. Fourteen synthesized compounds were tested for their inhibitory activity on *Escherichia coli* DNA gyrase and for their antibacterial activity on different bacterial strains. Compound **30**, a glycine derivative with protected amine group and dichloro substitution on the pyrrolamide moiety, shows the most potent inhibitory activity, but it does not also show the most potent antibacterial activity. Tested compounds mostly show antibacterial activity against Gram positive bacteria. Compound **42** that showed no inhibitory activity on enzyme testing turned out to have the most potent antibacterial activity. Further research is necessary to find out if antibacterial activity of compound **42** is connected to DNA gyrase inhibition or if there is a different mechanism responsible for its antibacterial activity.

Testing on human Hsp90 and for antiviral activity of final compounds is still on-going so these results are not included in this Master's thesis.

Keywords: antibacterial drug, antiviral drug, resistance, DNA gyrase, Hsp90

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
ATR	oslabljen popolni odboj (<i>attenuated total reflection</i>)
Boc	<i>terc</i> -butoksikarbonil
CC ₅₀	srednja citotoksična koncentracija
CHIKV	virus chikungunye
d	dublet
dd	dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMAP	4-dietilaminopiridin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
GHKL	encimski kompleks giraza , Hsp90 , histidin kinaza in Mut L
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
HATU	1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin 3-oksid heksafluorofosfat
HCV	virus hepatitisa C
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
HOBr	1-hidroksibenzotriazol hidrat
Hsp	protein toplotnega šoka (<i>heat shock protein</i>)
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitevna konstanta
K _d	disociacijska konstanta
m	multiplet
M	mol/L
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
M _r	molekulska masa

MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>methicillin-resistant S. aureus</i>)
MS	masna spektrometrija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
ParC	podenota C topoizomeraze IV
ParE	podenota E topoizomeraze IV
ppm	delcev na milijon
RA	rezidualna aktivnost
R _f	retencijski faktor
RNA	ribonukleinska kislina
SARS	virus akutnega sindroma oteženega dihanja (<i>severe acute respiratory syndrome</i>)
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>thin-layer chromatography</i>)

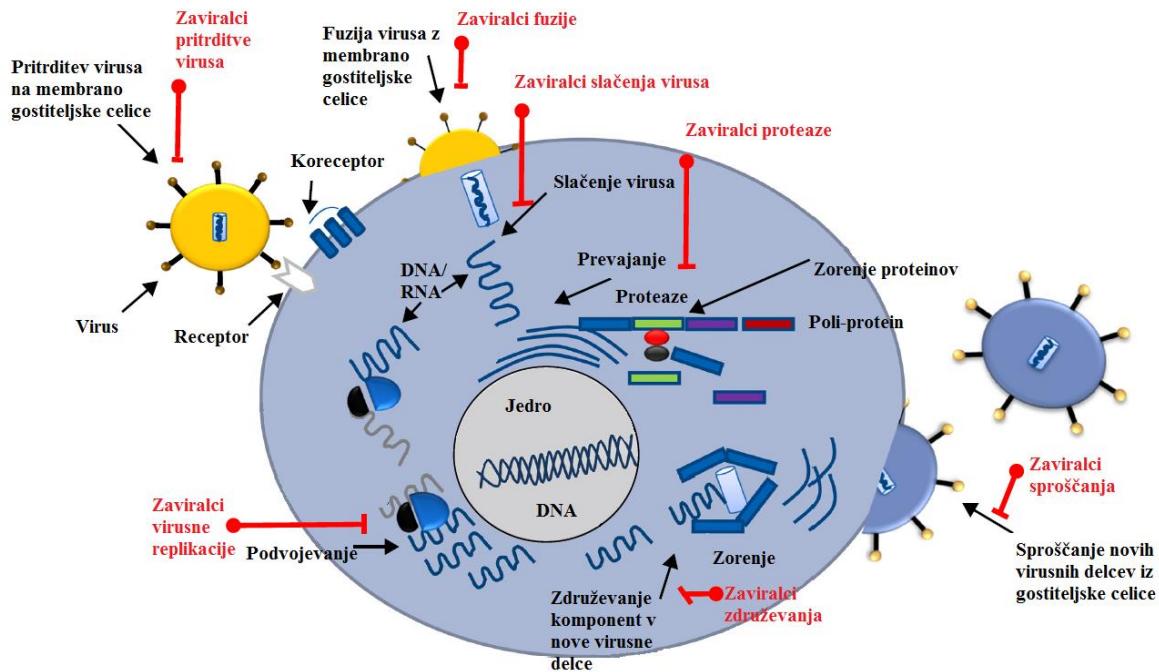
1. UVOD

1.1. Zgodovina protimikrobnih zdravil

Protimikrobna zdravila ljudje v najrazličnejših oblikah uporabljamo že na tisoče let. Začetki so prestavljeni predvsem uporabo naravno dostopnih možnosti, na primer zdravljenje z zelišči, medom, živalskimi iztrebki in plesnivim kruhom ali sirom. Kot prvo moderno protimikrobno učinkovino štejemo salvarsan, uspešno zdravilo za zdravljenje sifilisa, ki ga je leta 1909 odkril Paul Ehrlich. Z odkritjem penicilina leta 1929 in sulfonamidov leta 1935 se je začela zlata doba odkrivanja antibiotikov. Strokovnjaki so bili zaradi hitrega odkrivanja novih zdravil in uspešne uporabe cepiv optimistični, da je boj proti nalezljivim boleznim že končan. V poznih sedemdesetih pa se je s ponovnim širjenjem nekaterih že pozabljenih bolezni ter s pojavom novih bolezni to mnenje spremenilo. Med glavne krivce za to štejemo pojav bakterij, odpornih proti protibakterijskim učinkovinam. Infekcijske bolezni tako še danes ostajajo eden izmed najpogostejših vzrokov smrti. (1-5)

V nasprotju z razvojem protibakterijskih zdravil je razvoj protivirusnih zdravil potekal zelo počasi. Prve protivirusne učinkovine so se pojavile v petdesetih letih, največjo težavo v razvoju pa je prestavljala premajhna selektivna toksičnost potencialnih učinkovin. Virusi so namreč znotrajcelični paraziti, ki pri svojem podvojevanju izrabljajo celične mehanizme gostiteljske celice, zaradi tega kakršenkoli poskus napada virusnega metabolizma vpliva tudi na gostiteljske celice. Glavni procesi v razmnoževanju virusov, ki jih lahko ciljamo s protivirusnimi učinkovinami, so prikazani na sliki 1. Prva visoko selektivna protivirusna učinkovina, aciklovir, je bila odkrita šele leta 1971. Težave s selektivno toksičnostjo so delno omejili z uvedbo kombinacijskih terapij v klinično prakso. Po pojavu prvih primerov okužb z virusom HIV se je število raziskav na področju iskanja novih protivirusnih učinkovin močno povečalo, a še vedno obstajajo virusne okužbe, za katere ni na voljo nobene terapije ali pa je standardna terapija v veliko primerih neuspešna. Prvi primer je okužba z virusom chikungunye (CHIKV), ki povzroča življensko ogrožajoč artritis, in se je od leta 2005 močno razširil predvsem v Afriki in Aziji, pojavit pa se je tudi že v Evropi in Ameriki. Terapije za zdravljenje okužb s tem virusom trenutno še ni. Drugi primer je okužba z virusom hepatitisa C (HCV), s katerim je trenutno okuženih preko 170 milijonov ljudi, kar je približno štirikrat več kot je število okuženih z virusom HIV. Kot standardna

terapija se uporablja kombinacija ribavirina in pegiliranega interferona, ki pa je veliko pacientov ne prenaša dobro, zaradi česar je razvoj novih učinkovin še kako pomemben. Glavni razlog za pogosto neuspešnost protivirusne terapije je, podobno kot pri zdravljenju bakterijskih okužb, razvoj virusov, odpornih proti protivirusnim učinkovinam. (6-8)



Slika 1: Glavni mehanizmi delovanja protivirusnih učinkovin. Prirejeno po (6).

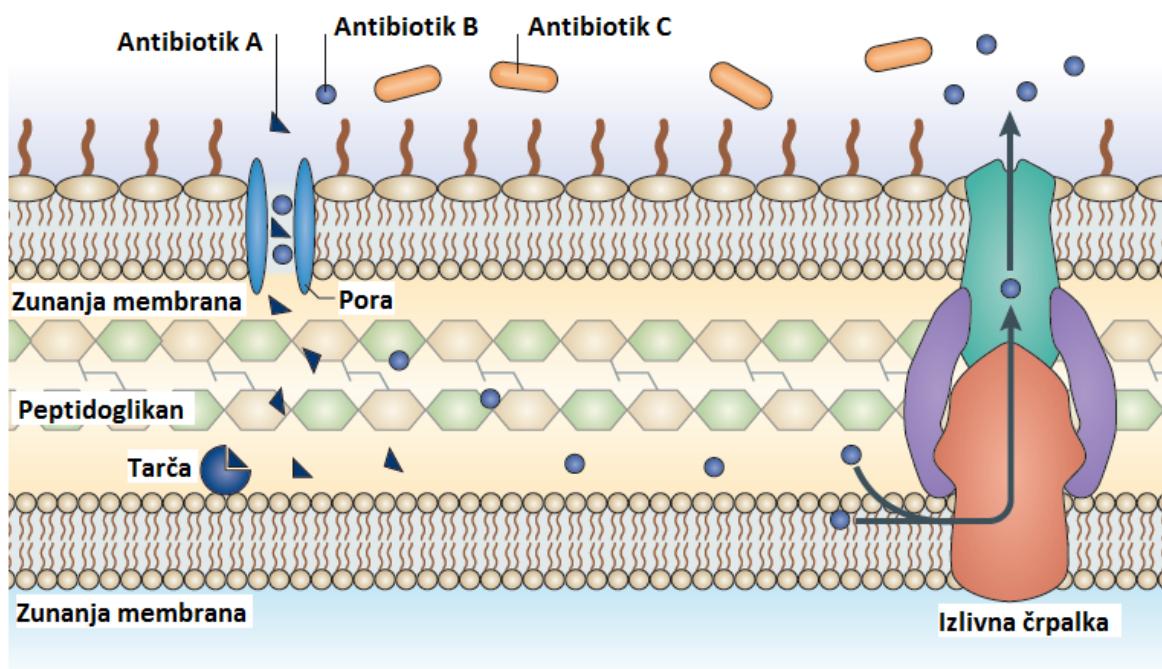
1.2. Odpornost mikroorganizmov proti zdravilnim učinkovinam

Že v poznih tridesetih letih so strokovnjaki opazili pojav bakterij, odpornih proti sulfonamidom, prav tako pa so kmalu po uvedbi penicilinov v klinično prakso izolirali sev bakterije *Staphylococcus aureus*, ki je proizvajala encim β -laktamazo. Ta encim razgraje peniciline in tako zniža njihovo učinkovitost. Leta 1960 so to težavo delno rešili z zdravljenjem z meticilinom, vendar pa so se kmalu pojavili tudi proti meticilinu odporni sevi *S. aureus* (MRSA). (9) Odpornost pa ni lastnost, značilna le za bakterije, temveč so jo opazili tudi pri virusih, glivah in celo tumorjih. (5)

1.2.1. Intrinzična bakterijska odpornost

Intrinzična odpornost je lastnost celotne bakterijske vrste in je lahko posledica odsotnosti dovezetne tarče v bakteriji, črpanja antibiotika iz bakterijske celice s pomočjo črpalk ali pa

nezmožnosti prehoda antibiotika v bakterijsko celico zaradi lastnosti celične stene (slika 2). Glede na sestavo celične stene delimo bakterije na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne. Zaradi dodatne zunanje membrane je celična stena po Gramu negativnih bakterij za večino protibakterijskih učinkovin slabše prehodna, poleg tega pa se na njej nahaja veliko izlivnih črpalk, ki črpajo učinkovine, ki so prešle celično steno, ven iz celice predno te lahko dosežejo svojo tarčo. Omenjeni lastnosti predstavljata dodaten izziv v razvoju protibakterijskih učinkovin proti po Gramu negativnim organizmom. (9-11)



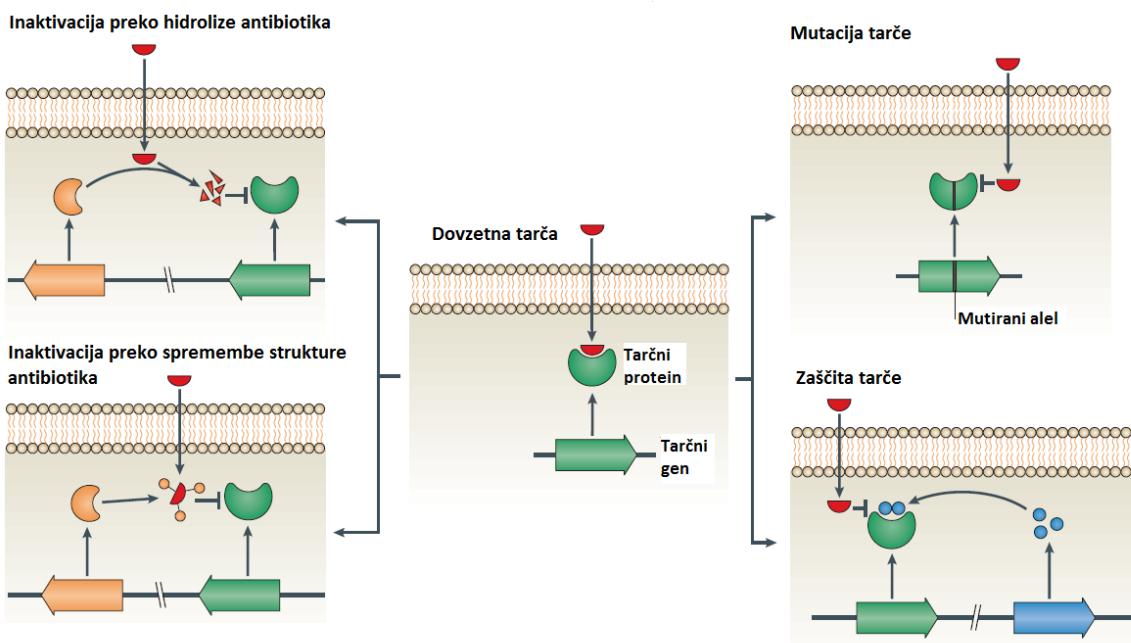
Slika 2: Mehanizmi intrinzične odpornosti na primeru β -laktamskih antibiotikov. Antibiotik A prehaja zunanjo membrano in uspešno pride do tarče, kjer inhibira sintezo peptidoglikana. Tudi antibiotik B prehaja zunanjo membrano, a ga iz celice odstranijo izlivne črpalke predno doseže svojo tarčo. Antibiotik C ne prehaja zunanje membrane. Prirejeno po (11).

1.2.2. Pridobljena bakterijska odpornost

Pridobljena odpornost bakterij je posledica spremembe njihovega genetskega zapisa. Čeprav je pogostost spontanih mutacij v povprečju le 1 na 1100 milijonov organizmov, je zaradi ogromnega števila bakterij v človeškem telesu absolutno število mutacij vseeno precej visoko. Če je gen za odpornost zapisan na krožnem kromosomu, se ta v bakterijski populaciji širi relativno počasi. Gre za tako imenovan vertikalni prenos (iz generacije v

generacijo). Če pa je gen za odpornost zapisan na plazmidu, se ta v bakterijski populaciji razširi precej hitreje, saj imajo plazmidi sposobnost prehajanja iz bakterije v bakterijo. V tem primeru govorimo o horizontalnem prenosu. Obstaja več mehanizmov pridobljene odpornosti, ki jih delimo v tri glavne skupine (slika 3):

- Zmanjšanje znotrajcelične koncentracije protibakterijske učinkovine kot rezultat slabšega prehoda celične stene ali izlivanja iz celice preko črpalk.
- Sprememba tarče preko mutacije ali posttranslacijske modifikacije.
- Inaktivacija protibakterijske učinkovine preko njene hidrolize ali modifikacije njene strukture. (9, 10)



Slika 3: Mehanizmi pridobljene odpornosti preko neposrednega vpliva na strukturo protibakterijske učinkovine ali preko spremembe tarče. Prirejeno po (11).

Naraščajoča pojavnost odpornih bakterij prestavlja resno grožnjo za javno zdravje. Protibakterijske učinkovine, ki se trenutno nahajajo na tržišču, bodo namreč v prihodnosti postale manj oziroma povsem neučinkovite. Veliko bolezni bi tako lahko postalo neozdravljivih in neobvladljivih. Kljub temu pa razvoj na področju odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin v farmacevtski industriji miruje. Tudi podjetja, ki so aktivna na tem področju, večinoma razvijajo nove derivate že obstoječih skupin protibakterijskih učinkovin, kar pa zaradi pojava navzkrižne odpornosti lahko pomeni neučinkovitost proti sevom, ki so že razvili odpornost proti strukturno podobni učinkovini. Zato je pomemben

razvoj novih skupin antibiotikov, ki niso sorodni s trenutno obstoječimi, in zato ne izkazujejo navzkrižne odpornosti. (10, 12)

1.2.3. Virusna odpornost

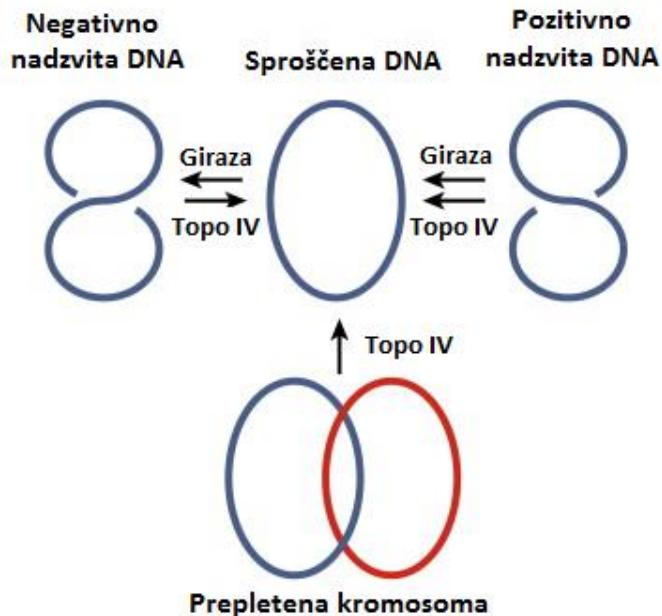
Kljub temu, da se pojav odpornih virusov precej manj omenja kot pojav odpornih bakterij, ta predstavlja velik izziv v razvoju protivirusnih učinkovin. RNA virusi posedujejo največjo kapaciteto za hitro evolucijo med vsemi organizmi, kar je posledica izredno kratkega generacijskega časa, velike pojavnosti mutacij, velikih populacij in kompaktnega genoma. To jim omogoča izredno prilagodljivost na razmere v okolini in hkrati tudi hiter razvoj odpornosti proti protivirusnim učinkovinam. Ta se še posebej hitro pojavi pri učinkovinah, ki ciljajo virusne proteine, saj je v tem primeru tarča pod nadzorom samega virusa in je zato možnost njene mutacije izredno velika. Po drugi strani pa virusi precej težje razvijejo odpornost proti učinkovinam, ki ciljajo celične faktorje, potrebne za njihovo razmnoževanje. V tem primeru morajo virusi opustiti funkcijo, ki jo prizadene protivirusna učinkovina, ali pa najti alternativno celično pot za nadalnje opravljanje funkcije. Vendar pa so tudi pri učinkovinah, ki ciljajo celične faktorje, že opazili pojav odpornih virusov. (13, 14)

1.3. Topoizomeraze

DNA-topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembe v topološkem stanju DNA. Najdemo jih v vseh celicah in so nujne za preživetje. Sposobne so pretvarjanja med nadzvito in sproščeno obliko DNA s pomočjo začasne prekinitev ene (tip I) ali obeh verig (tip II) DNA. (15, 16)

Bakterijske topoizomeraze so že uveljavljene tarče za odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin. Mednje spadata bakterijska DNA-giraza in topoizomeraza IV, ki sta topoizomerazi tipa II. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot A in dveh podenot B (GyrA in GyrB). Prva je odgovorna za prekinitev verige DNA, na drugi pa se nahaja vezavno mesto za ATP. Vse topoizomeraze so sposobne relaksacije nadzvite DNA, DNA-giraza pa je edina, ki je sposobna zvijanja sproščenje oblike v negativno nadzvito obliko, pri čemer porablja energijo, pridobljeno s hidrolizo ATP. Topoizomeraza IV, DNA-girazi soroden encim, je sestavljena iz dveh podenot C in dveh podenot E (ParC in ParE). Prva je homologna GyrA, druga pa GyrB. Vloga tega encima je razpletanje hčerinskih verig na

koncu podvajanja DNA, kot je prikazano na sliki 4. Zaradi podobnosti vezavnih mest oben encimov, je v večini bakterij možno zaviranje obeh hkrati. Posledica tega je, da bakterije težje razvijejo odpornost, saj mora za dosego le-te priti v njihovem genomu do mutacije na dveh mestih hkrati. To daje zaviralcem GyrB/ParE kot potencialnim protibakterijskim učinkovinam še dodatno vrednost. (15, 16)

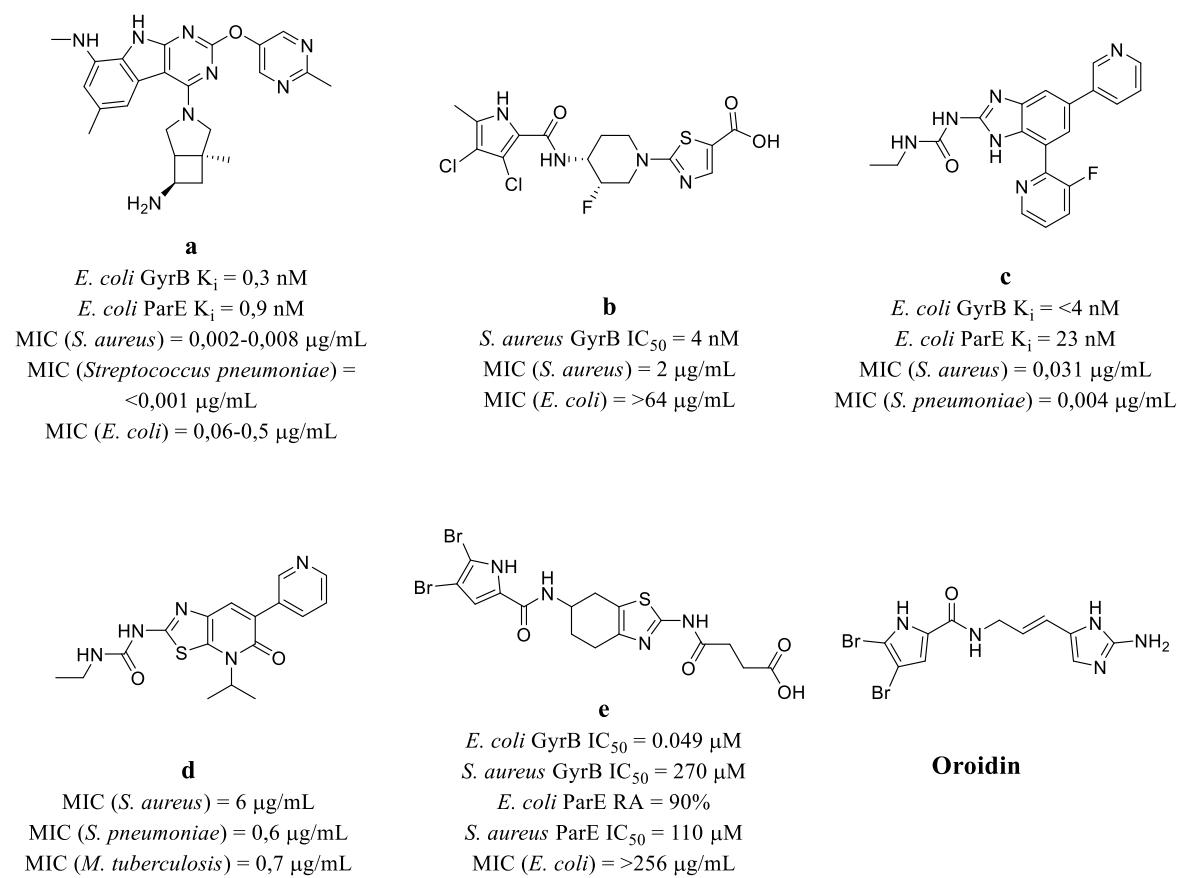


Slika 4: Vloga bakterijskih topoizomeraz. Pritejeno po (17).

1.3.1. Znane učinkovine, ki ciljajo bakterijske topoizomeraze

Fluorokinoloni so protibakterijske učinkovine, ki se vežejo na GyrA in ParC. Delujejo tako, da stabilizirajo kompleks med DNA-girazo in bakterijsko DNA ter tako preprečijo njeno podvajanje. Izhajajo iz nalidiksne kisline, ki je bila po naključju odkrita kot stranski produkt sinteze klorokina. Razvoj fluorokinolonov je potekal preko več generacij, od nalidiksne in oksolinske kisline (prva generacija), preko norfloksacina, ciprofloksacina (druga generacija) in levofloksacina (tretja generacija) pa do moksifloksacina in gemifloksacina (četrta generacija). Postali so do tega trenutka klinično in komercialno daleč najuspešnejše protibakterijske učinkovine, ki ciljajo bakterijske topoizomeraze. Zaradi naraščajočega pojavljanja odpornih bakterij proti fluorokinolonom pa se njihova klinična uporabnost manjša in gre razvoj v smeri iskanja nove skupine učinkovin, ki bodo ciljale druga vezavna mesta na encimu, in se tako izognila navzkrižni odpornosti proti fluorokinolonom. (15, 16)

Aminokumarini se vežejo na ATP-vezavno mesto podenot GyrB in ParE ter tako blokirajo vezavo molekule ATP. Glavna predstavnika te skupine učinkovin sta novobiocin in klorobiocin, naravna derivata, izolirana iz *Streptomyces spp.*, ki pa ju zaradi njune toksičnosti in neučinkovitosti trenutno na tržišču ne najdemo. Vezavno mesto za ATP GyrB in ParE tako ostaja zanimiva tarča za odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin. Raziskovanje na tem področju intenzivno poteka. V zadnjih letih so odkrili veliko novih kemijskih razredov zaviralcev GyrB/ParE, na primer derivate pirimidinoindola (**a**), pirolamida (**b**), benzimidazol sečnin (**c**), tiazolpiridon sečnin (**d**) in tetrahidrobenzotiazola (**e**). Zadnji so bili odkriti na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani in izhajajo iz strukture morskega alkaloida oroidina, pri čemer je ostal dibromopirolamidni fragment te spojine ohranjen, saj se je izkazalo, da je ta pomemben za vezavo v ATP-vezavno mesto GyrB in ParE. Strukture izbranih zaviralcev GyrB/ParE in oroidina so prikazane na sliki 5. (15, 16, 18, 19)



Slika 5: Strukture izbranih zaviralcev GyrB/ParE in oroidina. Prirejeno po (16) in (18).

Do sedaj odkriti GyrB/ParE zaviralci večinoma kažejo dobro selektivnost glede na človeške encime z vezavnimi mesti za ATP (na primer kinaze in človeška topoizomeraza II). Farmacevtska podjetja so že odkrila nekaj potencialnih kliničnih kandidatov, vendar pa so razvoj zaradi slabih fizikalno-kemijskih ali farmakokinetičnih lastnosti učinkovin in pa zaradi nenaklonjene ekonomije na področju odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin, večinoma opustili. V boju z bakterijsko rezistenco pa so nove raziskave še kako pomembne. (16)

1.4. Šaperoni

Homeostaza proteinov v celicah je zaradi pogostega napačnega zvitja proteinov in posledične agregacije neprestano ogrožena. Zato se v celici nahaja veliko število proteinov, imenovanih šaperoni, ki ohranjajo aktivno konformacijo ostalih proteinov, uravnavajo ponovno zvitje ali uničenje napačno zvitih proteinov, sodelujejo pri njihovem zorenju, olajšujejo njihov medcelični transport ter združujejo ali razdružujejo makromolekularne komplekse. Večinoma pri tem porabljajo energijo, ki jo pridobijo s hidrolizo ATP. Šaperone delimo na proteine toplotnega šoka (heat shock protein, Hsp), košaperone in šaperonine. (14, 20)

1.4.1. Hsp90

Hsp90 je velika družina evolucijsko ohranjenih molekularnih šaperonov. Gre za najbolj zastopan protein v sesalskih celicah, v katerih se nahaja v štirih izoformah. V citoplazmi najdemo inducibilno izražen Hsp90 α in konstitutivno izražen Hsp90 β , v endoplazmatskem retikulumu Grp94 (tudi gp96), v mitohondriih pa TRAP1. Proteini družine Hsp90 so ATPaze in se večinoma nahajajo v obliki homodimernih kompleksov, pri čemer je C-končna domena odgovorna za dimerizacijo, notranja domena ponuja mesta za interakcije s substrati oziroma proteini klienti, γ -fosfatom molekule ATP in potencialnimi zaviralci, na N-končni domeni pa se nahaja vezavno mesto za ATP. Še eno vezavno mesto za ATP najdemo tudi na C-končna domeni, vloga tega pa je alosterična regulacija vezave molekule ATP na N-končno domeno. Hsp90 je zelo povezan s svojimi košaperoni, vloga katerih je modulacija ATPaznega cikla, izbira klientov in povezava z ostalimi šaperonskimi sistemi. V citoplazmi Hsp90 regulira aktivacijo, zorenje, lokalizacijo in razgradnjo velikega števila klientov. Med te spadajo proteini, vključeni v procese prepisovanja, prevajanja, mitohondrijsko funkcijo in celični cikel. Hsp90 je že dolgo časa poznan kot tarča v razvoju

novih protitumornih učinkovin, v zadnjem času pa tudi kot potencialna tarča v razvoju novih protivirusnih učinkovin in učinkovin za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, kot so Alzheimerjeva, Huntingtonova in Parkinsonova bolezen. (14, 21)

1.4.1.1. Vloga Hsp90 pri razmnoževanju virusov

Zaradi majhnega genoma se morajo virusi pri svojem razmnoževanju zanašati na biosinteze mehanizme gostiteljske celice. Tako ni presenetljivo, da so virusi odvisni tudi od funkcije šaperonov gostiteljske celice, saj ti skrbijo za pravilno zvitje, zorenje in sestavljanje virusnih proteinov. Hsp90 igra pomembno vlogo v razmnoževanju velikega števila DNA in RNA virusov, nekaj primerov je podanih v preglednici I. Večina do sedaj testiranih virusov je na zaviralce Hsp90 občutljiva že pri koncentracijah, ki ne vplivajo na gostiteljsko celico. Za to obstaja več možnih razlogov. Eden izmed njih je, da so zaradi majhnega virusnega genoma virusni proteini velikokrat multifunkcionalni, kar pomeni kompleksne sekundarne strukture teh proteinov in zato veliko odvisnost od šaperonov. Še posebej to velja za prekurzorje virusne kapside, ki so zaradi njene izredne kompleksnosti in strukturnih zahtev še dodatno občutljivi na napačno zvitje. Poleg tega veliko virusov proizvaja proteine s tako hitrostjo, da zasedejo polno kapaciteto šaperonskih sistemov v celici in so zato še toliko bolj občutljivi na kakršnokoli zmanjšanje šaperonske aktivnosti. Ena izmed razlag je tudi, da zaradi visoke pojavnosti mutacij pri RNA virusih, ki jim sicer omogoča hitro pridobitev odpornosti proti protivirusnim učinkovinam, nastane velika populacija mutiranih virusnih proteinov, ki so za dosego aktivne konformacije še dodatno odvisni od šaperonov. (14)

Preglednica I: Nekaj primerov virusov, ki so pri razmnoževanju odvisni od Hsp90. (14)

Virus	Virusni protein	Proces, odvisen od Hsp90
Herpes simpleks	DNA polimeraza UL30	Lokalizacija polimeraze
Poliovirus	Kapsidni protein P1	Cepitev proteina P1
Rinovirus	Kapsidni protein P1	Cepitev proteina P1
Hepatitis C	Proteaza in helikaza NS3	Cepitev prekurzorja
	Multifunkcijski protein NS5A	Nastanek podvojevalnega kompleksa
Hepatitis B	Reverzna transkriptaza	Sprožitev delovanja reverzne transkriptaze

1.4.1.2. Zaviralci Hsp90 kot protivirusne učinkovine

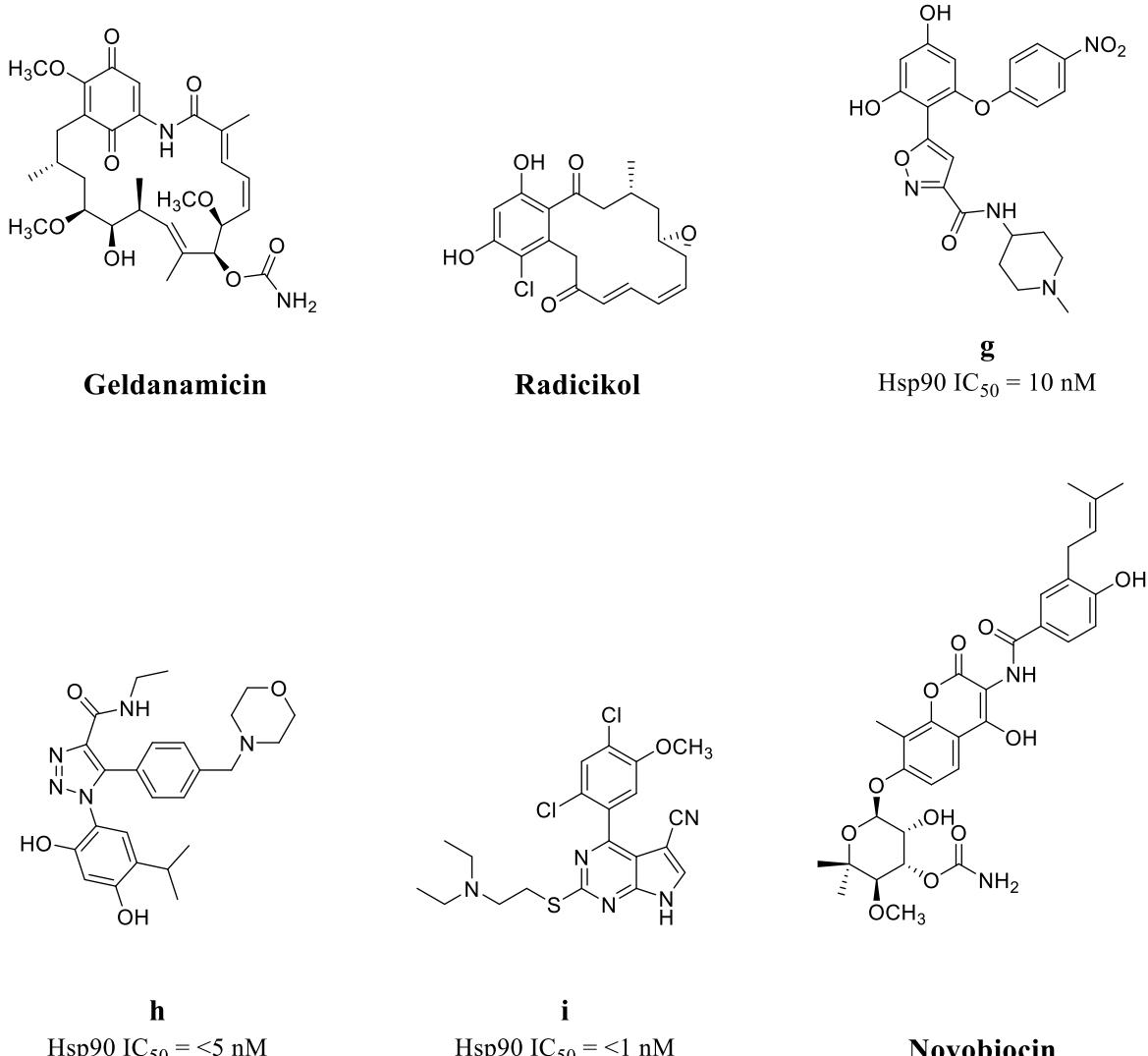
Hsp90 predstavlja obetavno tarčo v razvoju protivirusnih učinkovin. Do sedaj so v celičnih kulturah pokazali protivirusno aktivnost zaviralcev Hsp90 proti mnogim virusom, med drugim proti poliovirusu, rino virusu, virusu influence, virusu hepatitisa C, ebola virusu, virusu SARS, virusu HIV, citomegalovirusu, virusu herpesa simpleksa in virusu chikungunya. Zaradi širokega spektra delovanja so zaviralci Hsp90 potencialno primerne učinkovine za zdravljenje virusnih okužb, za katere trenutno terapija ne obstaja, in za zdravljenje okužb z novimi virusi. Prav tako do sedaj še ni bilo odkritega pojava odpornosti virusov proti zavircem Hsp90, zaradi česar bi le-ti lahko bili izredno uporabni za zdravljenje kroničnih virusnih okužb in zdravljenje okužb z RNA virusi, pri katerih se problem odpornosti največkrat pojavi. Zaviralci Hsp90 izražajo tudi protivnetno delovanje, kar jim daje dodatno vrednost pri zdravljenju okužb, pri katerih je v patologijo bolezni vključen vnetni proces. Li in sodelavci so v modelu replikona HCV pokazali, da zaviralci Hsp90 delujejo sinergistično v kombinaciji z interferonom, kar odpira še dodatne možnosti klinične uporabe teh učinkovin. (14, 22, 23)

1.4.1.3. Znani zaviralci Hsp90

Večina zaviralcev Hsp90 deluje na principu tekmovanja z molekulo ATP za vezavo v vezavnem mestu za ATP na N-končnem delu proteina. Po vezavi zaviralca ne more priti do hidrolize ATP, preko katere sicer protein dobi potrebno energijo za izvajanje svoje funkcije kot šaperon. Prvi znani zaviralec, ki zavira Hsp90 prek vezave na N-končni del proteina, je benzokinonski derivat geldanamicin. Kemična in metabolna nestabilnost ter toksičnost geldanamicina je spodbudila sintezo novih derivatov z izboljšanimi farmacevtskimi (drug-like) lastnostmi. Druga velika skupina N-končnih zaviralcev so derivati še ene naravne spojine, radicikola. Primeri N-končnih zaviralcev Hsp90 z močno vezavo so izoksazol-3-karboksamidni (**g**) in triazolni (**h**) derivati radicikola ter nekateri purinski analogi (**i**). Primeri struktur teh spojin so prikazani na sliki 6. (14, 21, 24)

Nekateri zaviralci Hsp90 se vežejo tudi v ATP-vezavno mesto na C-končnem delu. Primer take učinkovine s sicer precej šibko vezavo je novobiocin, dobro znan inhibitor DNA-giraze. Obstajajo tudi spojine, ki Hsp90 zavirajo preko alosterične modulacije, primer je naravni produkt sansalvamid A. (14, 21, 24)

Zaviralci Hsp90 so v kliničnem razvoju že od leta 1999. Kot protitumorne učinkovine so del več kliničnih študij, a zaenkrat še nobena učinkovina ni prešla iz kliničnih testiranj na trg. Razlog tiči v omejeni učinkovitosti teh spojin ali pojavu neželenih učinkov, hkrati pa tudi v težavah s farmacevtsko lastnino in komercializacijo. Raziskovanje na tem področju še vedno intenzivno poteka. (21)

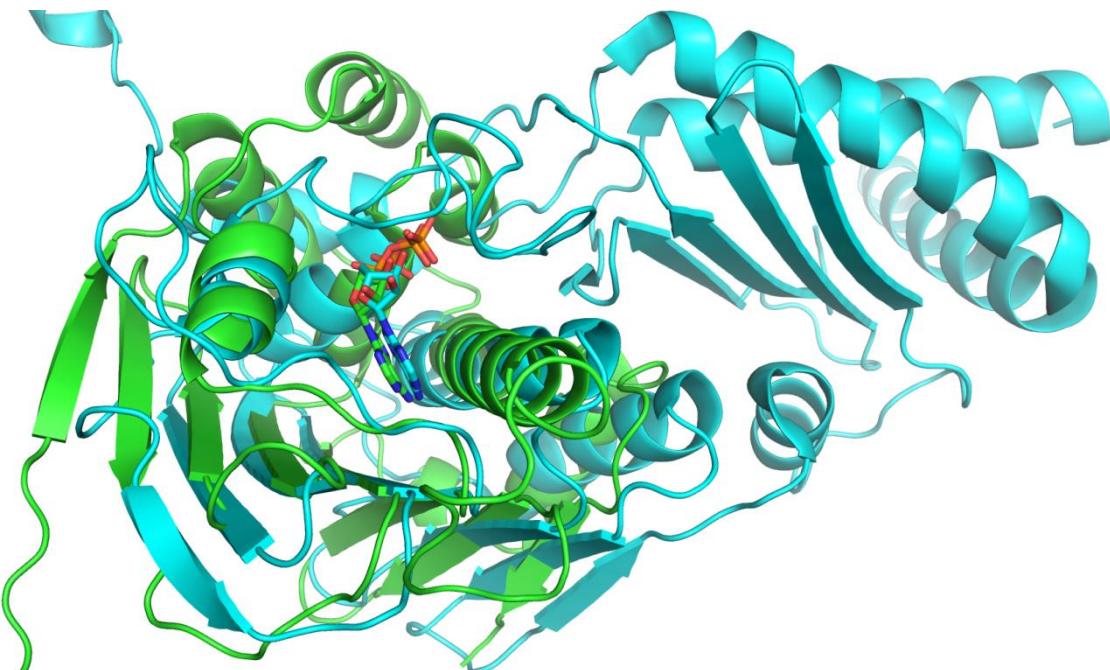


Slika 6: Strukture izbranih zaviralcev Hsp90. Pritejeno po (21).

1.5. ATP vezavno mesto GHKL ATPaz/kinaz

DNA-giraza, Hsp90, proteini skupine MutL, ki sodelujejo pri popravljanju napak, nastalih med podvojevanjem DNA, in histidin kinaze so proteini, ki na prvi pogled nimajo nič skupnega, saj v celicah opravljajo popolnoma različne funkcije. Tudi homologija primarnega zaporedja aminokislin med temi proteini je zelo nizka (nižja od 15%), vseeno

pa podrobnejši pogled v njihovo strukturo pokaže, da so ATP-vezavna mesta teh proteinov topološko izredno podobna, kar je na primeru DNA-giraze in Hsp90 prikazano na sliki 7. Zaradi tega jih skupaj uvrščamo v naddružino GHKL ATPaz/kinaz. ATP-vezavna mesta teh proteinov sestavlja poseben strukturni element, imenovan Bergeratovo zvitje, katerega ogrodje prestavlja tri alfa vijačnice in štiriverižna beta ravnina, aminokislinski ostanki, pomembni za vezavo ATP, pa se večinoma nahajajo na zankah, ki povezujejo te elemente. Podobnost v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze in Hsp90 nam daje možnost preoblikovanja že znanih zaviralcev DNA-giraze v nove zaviralce Hsp90 in obratno. (24, 25)



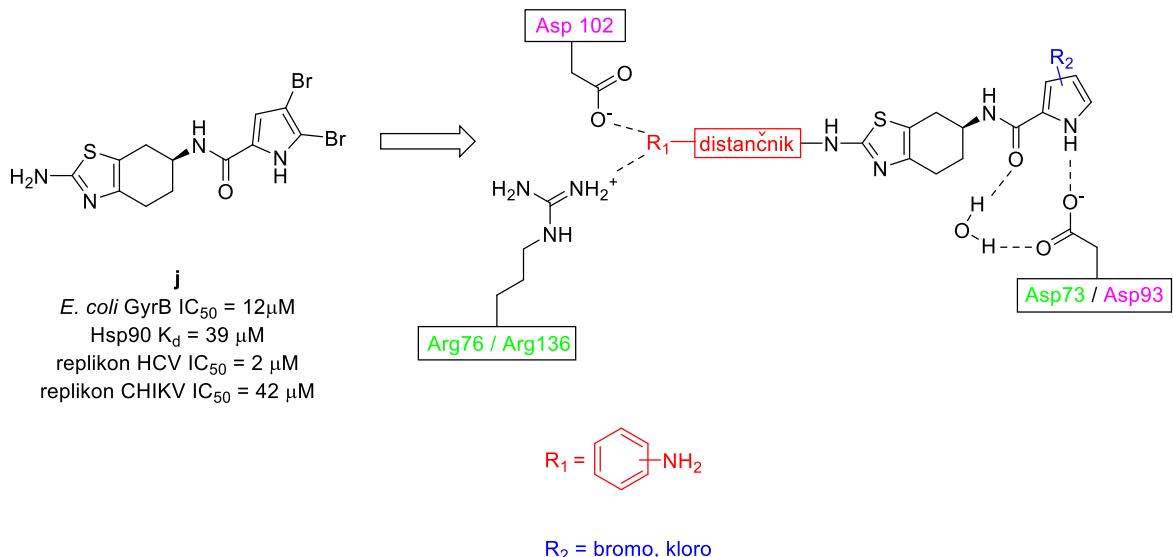
Slika 7: Prekrivanje strukture DNA-giraze *E. coli* (sinje modro) in človeškega Hsp90 (zeleno) v kompleksu z ADP (paličasta struktura). Prirejeno po (26).

2. NAČRT ZA DELO

Pri eksperimentalnem delu bomo načrtovali in sintetizirali potencialne nove ATP-kompetitivne zaviralce DNA-giraze in Hsp90. Sintetizirali bomo nove derivate znanih zaviralcev DNA-giraze z (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamidnim skeletom, ki so bili odkriti in sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Nekateri med njimi izkazujejo poleg protibakterijskega delovanja tudi protivirusno delovanje v modelih replikona HCV in CHIKV, kar je najverjetnejše posledica zaviranja Hsp90.

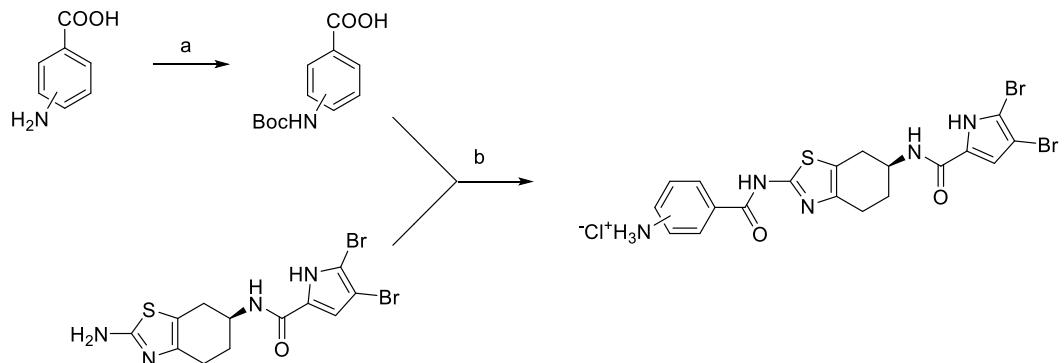
Na podlagi predvidene vezave spojine **j** v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze in Hsp90 ter na podlagi do sedaj znanega odnosa med strukturo in delovanjem, je substituiran pirolamidni del zaviralca ključen za aktivnost, saj tvori 2 vodikovi vezi z asparaginsko kislino (Asp73 v primeru DNA-giraze iz bakterije *E. coli* in Asp93 v primeru Hsp90) in dodatne hidrofobne interakcije, zato bomo ta del ohranili. Primerne aminokisline za dodatne interakcije, s katerimi bi izboljšali jakost vezave in potencialno tudi aktivnost, so Arg76 in/ali Arg136 v vezavnem mestu DNA-giraze ter Asp102 v vezavnem mestu Hsp90. Interakcijo s temi aminokislinami bomo skušali doseči z uvajanjem ustreznih funkcionalnih skupin na amino skupino na mestu 2. Predvidena tvorba vodikovih vezi načrtovanih spojin v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze in Hsp90 je prikazana na sliki 8.

Sintetizirali bomo dve seriji spojin, prva bodo derivati 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida, druga pa derivati 4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida. Na amino skupino na mestu 2 bomo preko tvorbe amidne vezi uvedli različne aromatske substituente z možnostjo tvorbe vodikovih vezi. Po sintezi prve serije spojin bomo sintetizirali še analogne derivate druge serije, tako da bomo lahko neposredno primerjali, kako substitucija na pirolamidnem delu vpliva na aktivnost spojin. Drugo serijo spojin bomo nato še razširili z nekaj dodatnimi derivati (slika 12). Sintetiziranim spojinam bomo nato ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na DNA-girazi, njihovo vezavo na Hsp90 ter njihovo protibakterijsko in protivirusno delovanje.

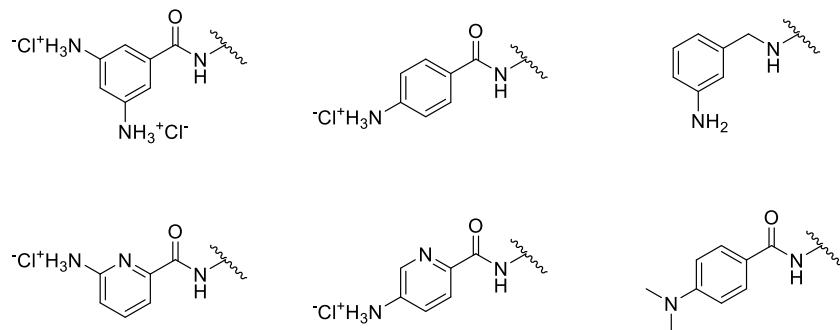


Slika 8: Načrt optimizacije spojine **j** in prikaz vezave v vezavnem mestu Hsp90 (aminokisline označene vijolično) in DNA-giraze B (aminokisline označene zeleno).

Za prvo serijo spojin bomo najprej pripravili zaščitene derivate ustreznih kislin in jih nato uvedli na amino skupino na mestu 2 spojine **j**. Končne spojine bomo dobili z odščito tako pripravljenih derivatov. (Slika 9)

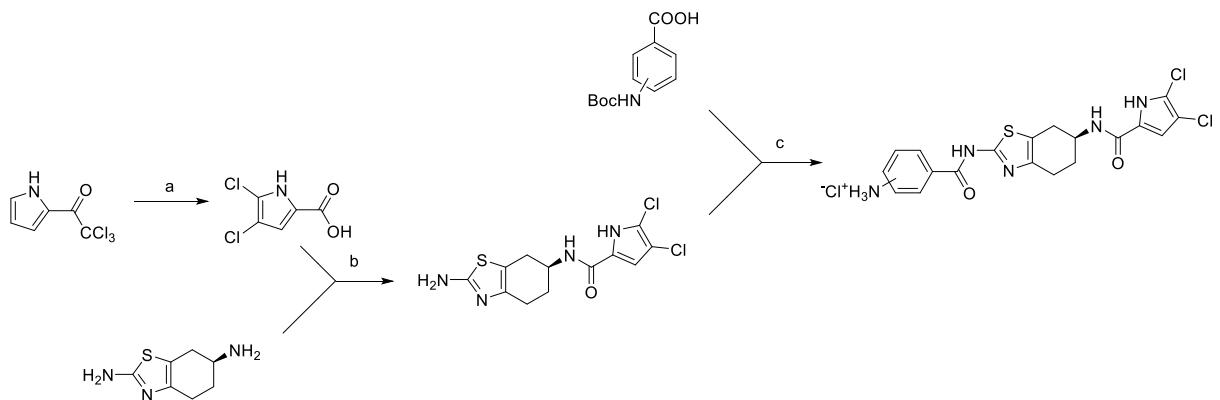


Slika 9: Sintezna shema prve serije spojin. Reagenti in pogoji: a) i) Boc₂O, baza, sobna temperatura, 24 ur; ii) HCl; b) i) EDC, HOBr, NMM, DMF, sobna temperatura, 12 ur; ii) acetil klorid, metanol, 0 °C, 12 ur, nato raztopina zaščitene spojine, sobna temperatura, 18 ur.

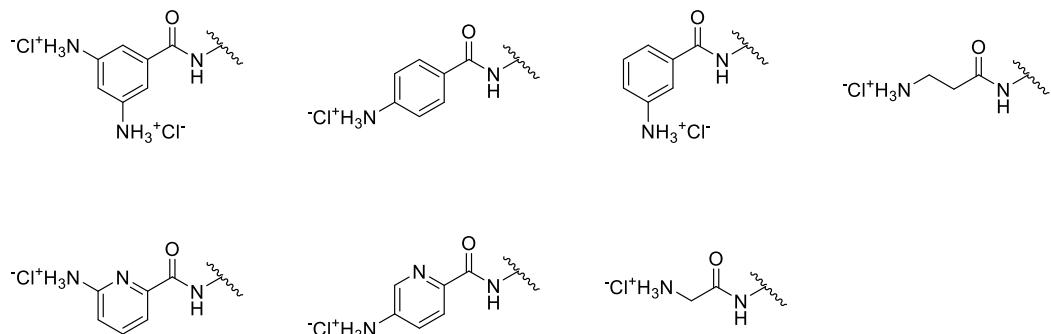


Slika 10: Načrtovani substituenti na mestu 2 za prvo serijo spojin.

Drugo serijo spojin bomo pripravili na podoben način, le z dodatnima stopnjama na začetku, saj smo morali najprej sintetizirati (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamid.



Slika 11: Sintezna shema druge serije spojin. Reaktivi in pogoji: a) i) SO_2Cl_2 , CHCl_3 ; ii) NaOH , THF ; b) EDC, HOBT, NMM, sobna temperatura, 12 ur; c) i) EDC, HOBT, NMM, DMF, sobna temperatura, 12 ur; ii) acetil klorid, metanol, 0°C , 12 ur, nato raztopina zaščitene spojine, sobna temperatura, 18 ur



Slika 12: Načrtovani substituenti na mestu 2 za drugo serijo spojin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Merck, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluka, in TCI.

3.2. Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje spojin po IUPAC nomenklaturi, risanje strukturnih formul spojin in za risanje sinteznih shem smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 15.1 proizvajalca CambridgeSoft.

3.3. Kromatografske metode

3.3.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastno kromatografijo smo uporabili za spremljanje poteka reakcij, za izbiro najustreznejše mobilne faze pri »flash« kolonski kromatografiji in za spremljanje uspešnosti izolacije produktov. Kot stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, kot mobilno fazo pa smo uporabljali diklorometan in metanol ali etilacetat in heksan v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm ali 366 nm in orositveni reagent ninhidrin.

3.3.2. »Flash« kolonska kromatografija

»Flash« kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje produktov. Odvisno od mase vzorca, nanesenega na kolono, smo izbrali različne velikosti steklenih kolon. Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 - 0,063 mm, kot mobilno fazo pa smo uporabljali diklorometan in metanol ali etilacetat in heksan v različnih razmerjih.

3.3.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili za določevanje čistote produktov. Analize smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, termostatom G1316A in vzorčnikom G1313A. Uporabili smo

kolono Agilent Eclipse Plus C18 ($5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 150 \text{ mm}$). Kot mobilno fazo smo uporabili 0,1% trifluoroocetno kislino v vodi (A) in acetonitril (B) (2 minuti 95% A, 90% A do 10% A v 12 minutah, 10% A do 5% A v 1 minuti in nato 10 minut 5% A). Volumen injiciranja je bil $10 \mu\text{L}$, pretok pa $1,0 \text{ mL/min}$.

3.4. Spektroskopske metode

3.4.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Jedrska magnetna resonanca je glavna metoda, ki smo jo uporabili za identifikacijo spojin. ^1H NMR spektre smo posneli na spektrometu Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili $\text{DMSO}-d_6$ ali CDCl_3 , za interni standard pa TMS. Spektre smo procesirali s pomočjo programa MestRe-C proizvajalca Mestrelab Research.

3.4.2. Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrometu Nicolet Nexus 470 FT-IR z uporabo ATR tehnike na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.4.3. Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre so posneli na masnem spektrometu VG-Analytical AutoSpec Q z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

3.5. Določanje temperature tališča

Tališča smo določali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.6. Biokemijska testiranja

3.6.1. Testiranje encimske zaviralne aktivnosti na DNA-girazi

Testiranje encimske zaviralne aktivnosti spojin na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani s pomočjo testa nadzvite DNA (*DNA gyrase supercoiling assay*). Rezultati so podani v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima ali vrednosti IC_{50} . (16)

3.6.2. Testiranje vezave na Hsp90

Testiranje vezave spojin na rekombinantni človeški protein Hsp90 β so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem. Protein so označili z rdečim fluorescentnim barvilkom NT-647-HNS. Vzorce testiranih spojin so pripravili v različnih koncentracijah (0,03-100 μM), kot topilo pa so uporabili etanol. Testiranje so izvedli z metodo mikroskalne termoforeze, pri čemer so uporabili instrument NanoTemper Monolith NT.115 proizvajalca NanoTemper Technologies GmbH. Kot kontrolo so uporabili derivat geldanamicina 17-D MAG. Za vsako testirano spojino so izvedli tri ločene meritve, rezultati pa so podani v obliki disociacijskih konstant (K_d).

3.6.3. Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko aktivnost spojin so testirali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem. Testirane spojine so razredčili do koncentracije 50 μM in določili njihovo aktivnost proti dvema po Gramu negativnima (*E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*) in dvema po Gramu pozitivnima sevoma (*Enterococcus faecalis* in *S. aureus*). Kot pozitivno kontrolo so uporabili ciprofloksacin. Rezultati so podani v obliki % zaviranja rasti pri 50 μM ali v obliki minimalne zaviralne koncentracije spojin (MIC). (16)

3.6.4. Protivirusna aktivnost

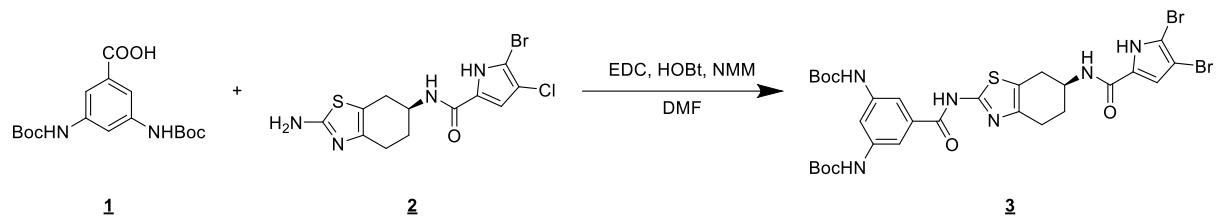
Protivirusno aktivnost spojin so testirali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem. Testiranje so izvedli na celični liniji Huh-7, ki izraža replikon HCV. Testne spojine so raztopili v DMSO, jih ustrezeno redčili ter dodali na pripravljeno mikrotitrsko ploščico s celično gostoto 30000 na vdolbinico. Kot pozitivno kontrolo so uporabili ribavirin. Čez 24 ur so luminiscenčno določili izražanje markerja kresnične luciferaze in na podlagi te meritve določili IC₅₀ testiranih spojin. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, so določili še citotoksičnost spojin na isti celični liniji. Pri tem testu so kot pozitivno kontrolo uporabili polimiksin B, rezultate pa podali kot CC₅₀. Primerjava vrednosti IC₅₀ in CC₅₀ nam daje informacijo o selektivnosti testiranih spojin.

3.6.5. Molekulske sidranje

Vezavo končnih spojin v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije *E. coli* smo preučevali s pomočjo molekulskega sidranja s programom FlexX (LeadIT, BioSolveIT). Sidranje je izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza di-terc-butil (5-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen)(S)-dikarbamata

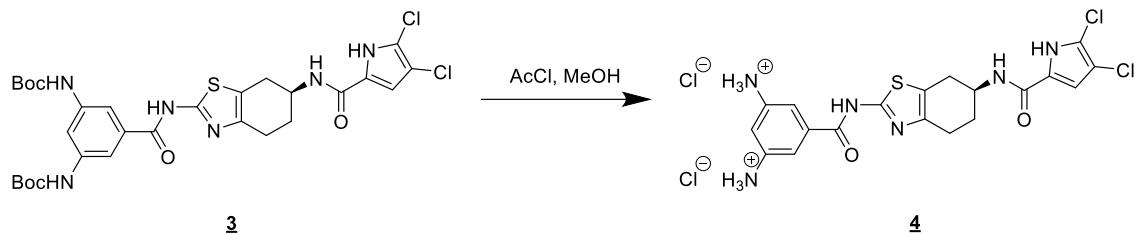


Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **1** (75 mg, 0,213 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (49 mg, 0,255 mmol, 1,2 ekv.), HOBt (42 mg, 0,278 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (47 µL, 0,425 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **2** (89 mg, 0,213 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 85 mg spojine **3**.

di-terc-butil (5-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen)(S)-dikarbamat (3)	
Molekulska formula: C ₂₉ H ₃₄ Br ₂ N ₆ O ₆ S	M _r : 754,50 g/mol
Izgled: svetlo rjav prašek	Izkoristek: 52,9%
T _{tal} : / (razpad pri 180 °C)	R _f : 0,35 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,47 (s, 18H, 2x -C-(CH ₃) ₃), 1,82-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,62-2,81 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 15,4 Hz, J ₂ = 4,4 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,28 (m, 1H, -CH ₂ -NH-), 7,01 (d, 1H, J = 2,5 Hz, pirol-CH), 7,65 (s, 2H, Ar-H-2,6), 7,78 (s, 1H, Ar-H-4), 8,12 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 9,53 (s, 2H, 2x NH-Boc), 12,40 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,71 (d, 1H, J = 2,0 Hz, -pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2979, 2589, 2361, 1698, 1602, 1522, 1418, 1392, 1366, 1227, 1150, 1083, 969, 863, 826, 750, 614, 539, 512

HR-MS (ESI) izmerjena masa: 751,0558; izračunana masa: 751,0549

4.2. Sinteza (S)-5-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)-benzen-1,3-diaminijevega klorida

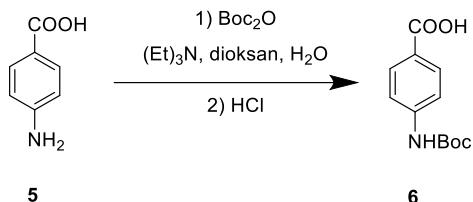


Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (105 µL, 1,48 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **3** (56 mg, 0,0742 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi. Po 18 urah smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo in videli, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo postopek ponovili. Na ledeni kopeli smo v novo bučko odmerili 2 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (105 µL, 1,48 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Prvotno reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do volumna približno 3 mL, jo injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa 72 ur na sobni temperaturi. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 45 mg spojine **4**.

(S)-5-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)-benzen-1,3-diaminijev klorid (4)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₂₀ Br ₂ Cl ₂ N ₆ O ₂ S	M _r : 627,18 g/mol
Izgled: svetlo rjavkasto-oranžen prašek	Izkoristek: 96,7%
T _{tal} : / (razpad pri približno 230 °C)	R _f : 0,0 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,84-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,62-2,80 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,02 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,8 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,18-4,26 (m, 1H, -CH-NH-), 6,76 (t, 1H, <i>J</i> = 1,9 Hz, Ar-H-4), 7,02 (d, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz, pirol-CH), 7,18 (s, 2H, Ar-H-2,6), 8,20 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, pirol-CO-NH-), 12,75 (d, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH in 2xNH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo

IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2783, 2361, 1695, 1626, 1558, 1522, 1430, 1394, 1311, 1218, 1163, 1084, 970, 847, 750, 669, 549, 512
HPLC	t _r = 11,22 min; čistoča: 95,6%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 550,9490; izračunana masa: 550,9500

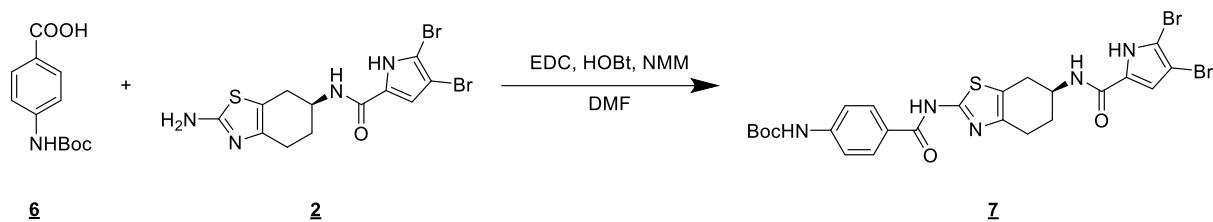
4.3. Sinteza 4-((terc-butilkarbonil)amino)benzojske kislina



Spojino **5** (5,021 g, 36,61 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 75 mL dioksana in 35 mL vode, dodali trietilamin (10 mL, 73,23 mmol, 2 ekv.) in počakali 5 minut, nato pa smo dodali di-*terc*-butil dikarbonat (15,982 g, 73,23 mmol, 2 ekv.) in pustili mesati 24 ur na sobni temperaturi. Sledila je izolacija; najprej smo pod znižanim tlakom uparili dioksan in nato preostalo vodno raztopino nakisali z 1 M HCl (na ledeni kopeli) do pH=1. Nastala je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali, spirali s hladno vodo in posušili v sušilniku (60 °C, 18 ur). Dobili smo 7,683 g spojine **6**.

4-((terc-butilkarbonil)amino)benzojska kislina (6)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	M _r : 237,26 g/mol
Izgled: svetlo rjava oborina	Izkoristek: 88,5%
T _{tal} : 177-180 °C	R _f : 0,57 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,49 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 7,51-7,60 (m, 2H, Ar-H), 7,81-7,88 (m, 2H, Ar-H), 9,75 (s, 1H, NH-Boc), 12,57 (s, 1H, -COOH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3452, 3366, 3271, 3061, 2981, 2866, 1751, 1731, 1676, 1608, 1524, 1506, 1448, 1410, 1390, 1369, 1338, 1311, 1230, 1158, 1056, 1013, 944, 907, 849, 834, 801, 772, 759, 685, 652, 625, 605, 549, 508

4.4. Sinteza terc-butil (S)-(4-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata

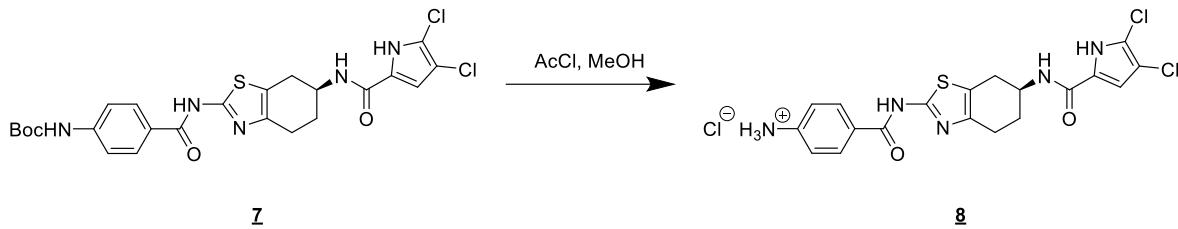


Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **6** (85 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (82 mg, 0,428 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (71 mg, 0,464 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (79 µL, 0,714 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **2** (150 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi. Čez 24 ur je TLC kromatogram pokazal, da so v reakcijski zmesi prisotne še znatne količine izhodnih snovi, zato smo nadaljevali z reakcijo pri povisani temperaturi. Po eni uri segrevanja na oljni kopeli pri 50 °C ni bilo sprememb, zato smo nadaljevali z izolacijo. V reakcijsko zmes smo dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 63 mg spojine **7**.

terc-butil (S)-(4-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamat (7)	
Molekulska formula: C ₂₄ H ₂₅ Br ₂ N ₅ O ₄ S	M _r : 639,36 g/mol
Izgled: rumen prašek	Izkoristek: 27,6%
T _{tal} : 188-191 °C	R _f : 0,38 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 1,63 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,96-2,09 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 2,09-2,20 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,68-2,88 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,23 (d, 1H, J = 15,9 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,51-4,68 (m, 1H, -CH-NH-), 5,93 (d, 1H, J = 8,2 Hz, pirol-CO-NH-), 6,58 (t, 1H, J = 1,9 Hz, NH-Boc), 6,81 (d, 1H, J = 2,5 Hz, pirol-CH), 7,47-7,60 (m, 2H, Ar-H), 7,83-7,97 (m, 2H, Ar-H), 10,04 (s, 1H, Ar-CO-NH- ali pirol-NH), 10,38 (s, 1H, Ar-CO-NH- ali pirol-NH)

IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3415, 3342, 3204, 2953, 1709, 1656, 1583, 1568, 1518, 1433, 1353, 1334, 1271, 1192, 1151, 1053, 1023, 972, 930, 899, 842, 808, 788, 754, 701, 676, 647, 618, 583, 551, 537, 510, 501
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 635,9915; izračunana masa: 635,9916

4.5. Sinteza (*S*)-4-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)-benzenaminijevega klorida

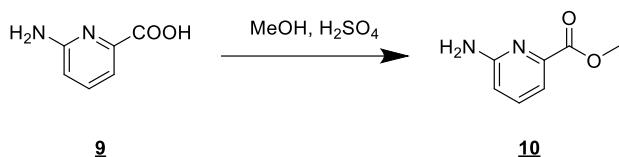


Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (111 μ L, 1,56 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **7** (50 mg, 0,0782 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi. Po 18 urah smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo in videli, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo postopek ponovili. Na ledeni kopeli smo v novo bučko odmerili 2 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (111 μ L, 1,56 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Prvotno reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do volumna približno 3 mL, jo injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa 24 ur na sobni temperaturi. V bučki smo opazili manjšo količino oborine, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem, a se je po spiranju z minimalno količino metanola raztopila. Matičnico smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 38 mg spojine **8**.

(S)-4-((6-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-benzenaminijev klorid (8)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₁₈ Br ₂ ClN ₅ O ₂ S	M _r : 575,70 g/mol
Izgled: rumeno-rjav prašek	Izkoristek: 84,4%
T _{tal} : / (razpad pri 262 °C)	R _f : 0,0 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,83-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,62-2,82 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,0 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 6,70 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-

	H), 7,02 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, pirol-CH), 7,87 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 8,19 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, pirol-CO-NH-), 12,07 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,75 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, pirol-NH); signala za -NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo, signal za CH-NH se prekriva s signalom za vodo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3064, 2033, 1662, 1625, 1563, 1521, 1427, 1382, 1304, 1265, 1206, 1096, 1073, 995, 957, 821, 764, 739, 590, 519
HPLC	t _r = 12,46 min; čistoča: 100,0%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 535,9388; izračunana masa: 535,9391

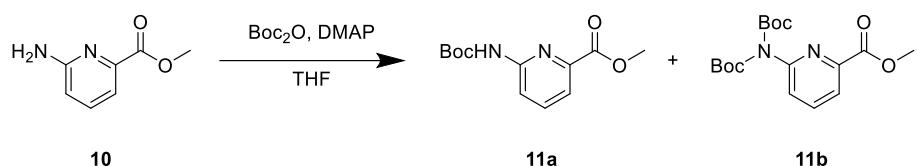
4.6. Sinteza metil 6-aminopikolinata



Spojino **9** (3,003 g, 21,74 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL metanola, dodali 3 mL H₂SO₄ in pustili mešati pod refluksom 48 ur. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, odstranili metanol pod znižanim tlakom in počasi na ledeni kopeli dodali 150 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Dobljeno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (2x100 mL), združeni organski fazi posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,576g spojine **10**.

metil 6-aminopikolinat (10)	
Molekulska formula: C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	M _r : 152,15 g/mol
Izgled: svetlo rumen prašek	Izkoristek: 77,9%
T _{mel} : 85-86 °C	R _f : 0,43 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 3,80 (s, 3H, -COOCH ₃), 6,31 (s, 2H, -NH ₂), 6,54 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, Ar-H-3/5), 7,19 (dd, 1H, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, Ar-H-3/5), 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz, $J_2 = 7,3$ Hz, Ar-H-4)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3470, 3275, 3174, 2955, 1740, 1723, 1626, 1482, 1444, 1426, 1364, 1312, 1259, 1197, 1176, 1154, 1099, 1057, 998, 986, 906, 818, 800, 761, 735, 675, 652, 584, 524, 519

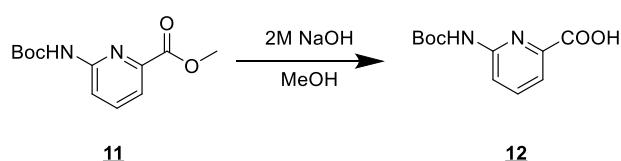
4.7. Sinteza metil 6-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinata



Spojino **10** (2,490 g, 16,36 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL THF, dodali di-*terc*-butil dikarbonat (3,931 g, 18,01 mmol, 1,1 ekv.) in katalizator DMAP (200 mg, 1,64 mmol, 0,1 ekv.) ter pustili mešati na sobni temperaturi. Čez 24 ur glede na TLC kromatogram reakcija še ni potekla do konca, zato smo reakcijsko zmes pustili mešati še 72 ur pri povišani temperaturi (60 °C). Ko je reakcija potekla, smo produkt izolirali s pomočjo kolonske kromatografije (mobilna faza DKM : MeOH = 20 : 1) in dobili 3,391 g produkta. Glede na NMR spekter produkt ni bil čist, kot nečistoča je bila prisotna še spojina **11b**.

6-((terc-butoxycarbonyl)amino)pyridine-2-carboxylate (11a)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	M _r : 252,27 g/mol
Izgled: umazano bel prašek	Izkoristek: 88,2%
T _{tal} : /	R _f : 0,74 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,47 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 3,86 (s, 3H, -COOCH ₃), 7,71 (t, 1H, J = 0,9 Hz, Ar-H), 7,91-8,11 (m, 2H, Ar-H), 10,17 (s, 1H, NH-Boc)

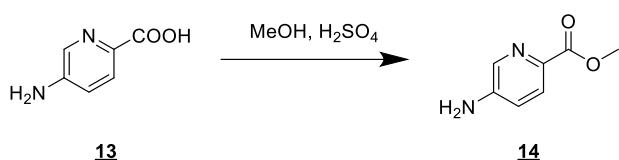
4.8. Sinteza 6-((terc-butoxycarbonyl)amino)pyrolinske kisline



Spojino **11** (2,092 g, 8,29 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL metanola, dodali 2 M vodno raztopino NaOH (12,4 mL, 24,88 mmol, 3 ekv.) in spremljali reakcijo s tankoplastno kromatografijo. Po eni uri je reakcija že popolno potekla. Produkt smo izolirali tako, da smo najprej uparili metanol pod znižanim tlakom in preostalo vodno raztopino nakisali z 1 M vodno raztopino HCl do pH=3. Izpadlo je malo oborine, ki smo jo posušili v sušilniku (12h, 60 °C). Matičnico smo ekstrahirali z etilacetatom (2x100 mL), posušili združeni organski fazi nad brezvodnim Na₂SO₄ in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,257 g spojine **12**.

6-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinska kislina (<u>12</u>)	
Molekulska formula: C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	M _r : 238,24 g/mol
Izgled: bel prašek	Izkoristek: 63,6%
T _{tal} : 139-144 °C	R _f : 0,0 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,47 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 7,67 (dd, 1H, J ₁ = 7,4 Hz, J ₂ = 1,0 Hz, Ar-H-3/5), 7,90 (dd, 1H, J ₁ = 8,3 Hz, J ₂ = 7,5 Hz, Ar-H-4), 8,00 (dd, 1H, J ₁ = 8,4 Hz, J ₂ = 1,0 Hz, Ar-H-3/5), 10,04 (s, 1H, NH-Boc), 13,11 (s, 1H, -COOH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3210, 3051, 2387, 2033, 1763, 1724, 1706, 1616, 1583, 1546, 1471, 1398, 1361, 1313, 1284, 1240, 1178, 1128, 1088, 1080, 1043, 991, 926, 884, 835, 799, 762, 738, 721, 657, 617

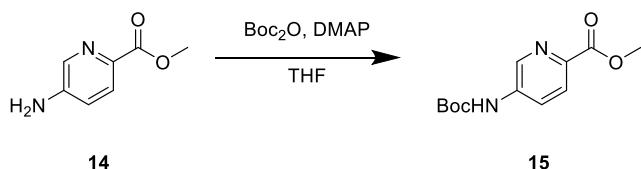
4.9. Sinteza metil 5-aminopikolinata



Spojino 13 (1,000 g, 7,24 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL metanola, dodali 1 mL H₂SO₄ in pustili mešati pod refluksom 24 ur. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, uparili metanol pod znižanim tlakom in počasi na ledeni kopeli dodali 50 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Dobljeno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (5x40 mL), združene organske faze posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 705 mg spojine 14.

metil 5-aminopikolinat (<u>14</u>)	
Molekulska formula: C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	M _r : 152,15 g/mol
Izgled: oranžno-rjav prašek	Izkoristek: 64,0%
T _{tal} : 114-119 °C	R _f : 0,33 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 3,77 (s, 3H, -COOCH ₃), 6,20 (s, 2H, -NH ₂), 6,92 (dd, 1H, J ₁ = 8,6 Hz, J ₂ = 2,8 Hz, Ar-H-4), 7,75 (dd, 1H, J ₁ = 8,5 Hz, J ₂ = 0,5 Hz, Ar-H-3), 7,97 (dd, 1H, J ₁ = 2,8 Hz, J ₂ = 0,6 Hz, Ar-H-6)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3418, 3341, 3205, 3051, 2949, 2582, 2246, 1708, 1656, 1582, 1488, 1432, 1350, 1332, 1294, 1266, 1191, 1150, 1127,

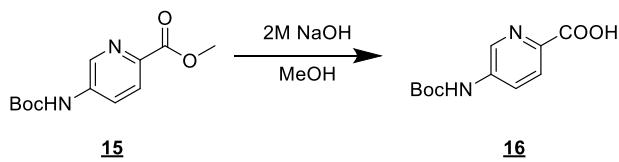
4.10. Sinteza metil 5-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinata



Spojino **14** (705 mg, 4,63 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL THF, dodali di-*tert*-butil dikarbonat (1,111 g, 5,10 mmol, 1,1 ekv.) in pustili mešati ob segrevanju na oljni kopeli (60 °C) 24 ur. Nato smo produkt izolirali s pomočjo kolonske kromatografije (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1), in dobili 601 mg spojine **15**.

metil 5-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinat (15)	
Molekulska formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$	M_r : 252,27 g/mol
Izgled: svetlo rumeno strjeno olje	Izkoristek: 51,4%
T _{tal} : /	R _f : 0,58 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, <i>DMSO-d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,50 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 3,84 (s, 3H, -COOCH ₃), 8,00 (d, 1H, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H-3), 8,07 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, Ar-H-4), 8,71 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 2,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,6 Hz, Ar-H-6), 10,03 (s, 1H, NH-Boc)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3205, 3001, 1724, 1591, 1544, 1485, 1456, 1437, 1396, 1372, 1323, 1298, 1268, 1251, 1224, 1191, 1116, 1054, 1018, 965, 927, 900, 874, 845, 816, 773, 757, 706, 661, 631

4.11. Sinteza 5-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinske kisline

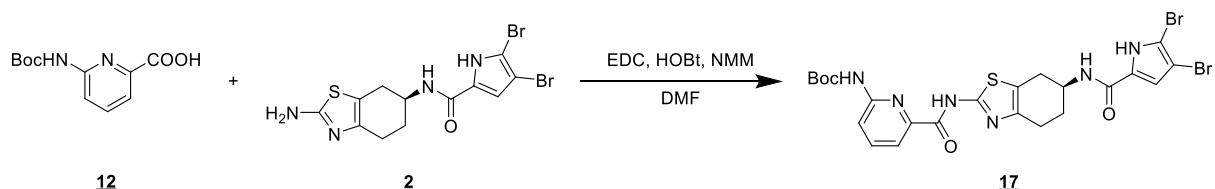


Spojino **15** (510 mg, 2,02 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL metanola, dodali 2 M vodno raztopino NaOH (3,0 mL, 6,06 mmol, 3 ekv.) in spremljali reakcijo s tankoplastno kromatografijo. Po eni uri je reakcija že popolno potekla. Produkt smo izolirali tako, da smo najprej uparili metanol pod znižanim tlakom, preostalo vodno raztopino nakisali z 1 M vodno raztopino HCl do pH=1,5 in jo nato ekstrahirali z etilacetatom (6x15 mL). Združene

organske faze smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄ in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 145 mg spojine **16**.

5-((terc-butoksikarbonil)amino)pikolinska kislina (16)	
Molekulska formula: C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	M _r : 238,24 g/mol
Izgled: umazano bel prašek	Izkoristek: 30,1%
T _{tal} : 152-156 °C	R _f : 0,0 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,50 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 7,99 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H-3), 8,06 (dd, 1H, J ₁ = 8,6 Hz, J ₂ = 2,5 Hz, Ar-H-4), 8,72 (dd, 1H, J ₁ = 2,5 Hz, J ₂ = 0,6 Hz, Ar-H-6), 10,02 (s, 1H, NH-Boc); signala za COOH skupino v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 3018, 2435, 1724, 1677, 1625, 1584, 1556, 1483, 1428, 1382, 1333, 1238, 1203, 1130, 1049, 1019, 902, 864, 844, 779, 705, 677, 653, 631, 541

4.12. Sinteza *terc*-butil (*S*)-(6-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamata

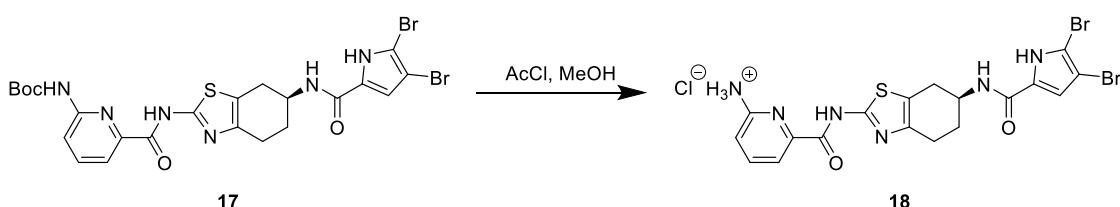


Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **12** (85 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (82 mg, 0,428 mmol, 1,2 ekv.), HOEt (71 mg, 0,464 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (79 μL, 0,714 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **2** (150 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z vodo (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 148 mg spojine **17**.

<i>terc</i>-butil (<i>S</i>)-(6-((6-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamat (17)	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ Br ₂ N ₆ O ₄ S	M _r : 640,35 g/mol

Izgled: rjav prašek	Izkoristek: 64,7%
T _{tal} : 164-166 °C	R _f : 0,65 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,51 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,85-1,94 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,69-2,80 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,06 (dd, 1H, J ₁ = 15,7 Hz, J ₂ = 5,0 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,15-4,30 (m, 1H, -CH-NH-), 7,02 (s, 1H, pirol-CH), 7,76 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 3,1 Hz, Ar-H), 8,01-8,06 (m, 2H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, J = 7,6 Hz, pirol-CO-NH-), 9,92 (s, 1H, NH-Boc), 11,47 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,71 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 2820, 2361, 1694, 1625, 1558, 1552, 1430, 1394, 1311, 1220, 1163, 1084, 970, 852, 749, 668, 553, 513
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 636,9879; izračunana masa: 636,9868

4.13. Sinteza (*S*)-6-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-2-aminijevega klorida

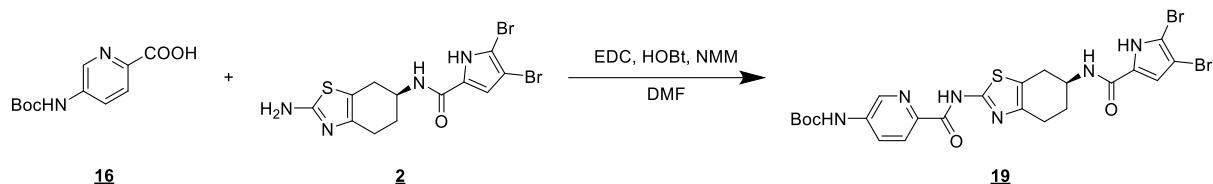


Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 4 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (244 µL, 3,44 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **17** (110 mg, 0,172 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi 18 ur. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in dobili 38 mg spojine **18**.

(<i>S</i>)-6-((6-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-2-aminijevega klorida (18)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₁₇ Br ₂ ClN ₆ O ₂ S	M _r : 576,69 g/mol
Izgled: rumen prašek	Izkoristek: 38,4%
T _{tal} : 181-184 °C	R _f : 0,21 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,83-1,96 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,60-2,74 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,99 (dd, 1H, J ₁ = 15,8 Hz, J ₂ = 4,9 Hz -CH ₂ -H _B -4), 4,15-4,28 (m, 1H, -CH-NH-),

	7,02 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, pirol-CH), 7,09 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,55 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, Ar-H), 7,95 (t, 1H, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 8,18 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, pirol-CO-NH-), 12,75 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH in NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3501, 3064, 1693, 1663, 1626, 1563, 1523, 1409, 1383, 1307, 1265, 1242, 1205, 1095, 1073, 1050, 995, 957, 822, 798, 740, 720, 605, 536
HPLC	t _r = 11,58 min; čistoča: 97,9%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 536,9333; izračunana masa: 536,9344

4.14. Sinteza terc-butil (S)-(6-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamata

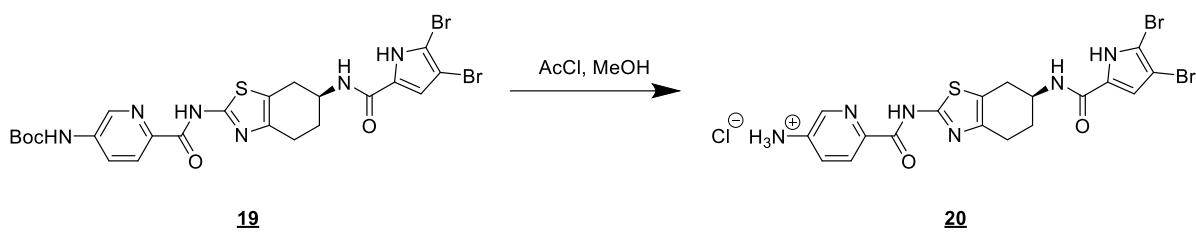


Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **16** (85 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (82 mg, 0,428 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (71 mg, 0,464 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (79 µL, 0,714 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **2** (150 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z vodo (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 20 : 1). Dobili smo 78 mg spojine **19**.

terc-butil (S)-(6-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamat (19)	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ Br ₂ N ₆ O ₄ S	M _r : 640,35 g/mol
Izgled: rjavkasto-rumen prašek	Izkoristek: 34,1%
T _{dal} : 153-156 °C	R _f : 0,54 (DKM : MeOH = 9 : 1)

¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,51 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,85-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,70-2,81 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,05 (dd, 1H, J_1 = 15,5 Hz, J_2 = 5,1 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,29 (m, 1H, -CH-NH-), 7,02 (d, 1H, J = 2,4 Hz, pirol-CH), 8,08-8,18 (m, 3H, 2x Ar-H in pirol-CO-NH-), 8,75 (dd, 1H, J_1 = 2,4 Hz, J_2 = 0,6 Hz, Ar-H-6), 9,92 (s, 1H, NH-Boc), 11,61 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,71 (d, 1H, J = 1,9 Hz, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2990, 2589, 2361, 2016, 1698, 1633, 1557, 1525, 1417, 1336, 1304, 1217, 861, 749, 562, 524
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 636,9854; izračunana masa: 636,9868

4.15. Sinteza (*S*)-6-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-3-aminijevega klorida

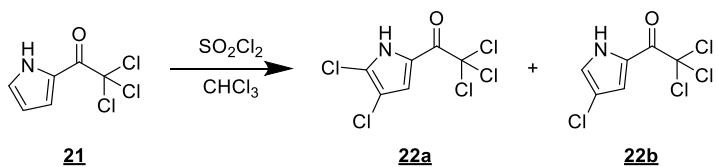


Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (129 μ L, 1,81 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **19** (58 mg, 0,0906 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi. Po 18 urah smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo in videli, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo postopek ponovili. Na ledeni kopeli smo v novo bučko odmerili 3 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (129 μ L, 1,81 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Prvotno reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do volumna približno 3 mL, jo injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa 48 ur na sobni temperaturi. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 52 mg spojine **20**.

(<i>S</i>)-6-((6-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)-piridin-3-aminijev klorid (20)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₁₇ Br ₂ ClN ₆ O ₂ S	M _r : 576,69 g/mol

Izgled: rumen prašek	Izkoristek: 99,6%
T _{tal} : 187-182 °C	R _f : 0,12 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,86-1,94 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,04 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,66-2,77 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,0 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,20-4,26 (m, 1H, -CH-NH-), 7,02 (d, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz, pirol-CH), 7,26 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, Ar-H-4), 7,98-8,05 (m, 2H, 2x Ar-H), 8,21 (d, 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 12,76 (d, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH in NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3456, 3271, 2956, 1726, 1629, 1605, 1556, 1520, 1434, 1357, 1336, 1297, 1284, 1236, 1155, 1080, 1028, 1005, 976, 931, 898, 845, 831, 799, 755, 725, 707, 665, 650, 619, 592, 573, 542, 525
HPLC	t _r = 12,06 min; čistoča: 95,4%
HR-MS (ESI)	izmerjena masa: 536,9333; izračunana masa: 536,9344

4.16. Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etan-1-onă in 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-1H-pirol-2-il)etan-1-onă

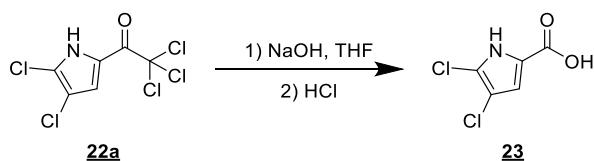


Spojino **21** (5,004 g, 23,54 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 110 mL kloroforma in prepihalni z argonom. Bučko smo postavili na ledeno kopel, po kapljicah (v približno 10 minutah) dodali sulfuril klorid (4,0 mL, 49,42 mmol, 2,1 ekv.), še enkrat prepihalni z argonom in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi. Po treh urah smo dodali 100 mL nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 20 mL nasičene raztopine natrijevega klorida, ločil fazi in vodno fazo ekstrahirali s 100 mL kloroforma. Organski fazi smo združili in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije (mobilna faza etilacetat : heksan = 1 : 20) in dobili 3,811 g spojine **22a**. S pomočjo kolonske kromatografije smo izolirali še nečistočo, ki je glede na NMR spekter spojina **22b**. Dobili smo 1,016 g te spojine.

2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etan-1-on (22a)	
Molekulska formula: C ₆ H ₂ Cl ₅ NO	M _r : 281,34 g/mol
Izgled: bel prašek	Izkoristek: 57,5%
T _{tal} : 122-127 °C	R _f : 0,45 (EA : HEX = 1 : 4)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 7,42 (s, 1H, CH), 13,86 (s, 1H, NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3261, 3140, 2470, 1652, 1589, 1543, 1456, 1417, 1372, 1262, 1232, 1197, 1169, 1114, 1017, 951, 838, 805, 719, 682, 631, 613, 594, 535

2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-1H-pirol-2-il)etan-1-on (<u>22b</u>)	
Molekulska formula: C ₆ H ₃ Cl ₄ NO	M _r : 246,90 g/mol
Izgled: umazano bel prašek	Izkoristek: 17,5%
T _{tal} : 85-88 °C	R _f : 0,37 (EA : HEX = 1 : 4)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 7,28 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 2,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, CH), 7,55 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, CH), 12,83 (s, 1H, NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3308, 3142, 2033, 1972, 1653, 1459, 1430, 1359, 1243, 1198, 1132, 1043, 948, 938, 842, 823, 806, 775, 718, 688, 666, 590

4.17. Sinteza 4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksilne kisline

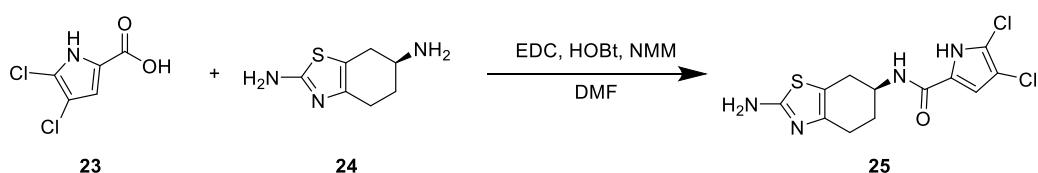


Spojino **22a** (3,805 g, 13,51 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL THF, dodali NaOH (20,3 mL, 40,52 mmol, 3 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 18 ur. Nato smo odstranili THF pod znižanim tlakom, preostalo vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH=2 in nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 2,430 g spojine **23**.

4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilna kislina (<u>23</u>)	
Molekulska formula: C ₅ H ₃ Cl ₂ NO ₂	M _r : 179,98 g/mol

Izgled: rjav prašek	Izkoristek: 100,0%
T _{tal} : >300 °C	R _f : 0,07 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6,82 (d, 1H, J = 2,8 Hz, CH), 13,03 (s, 1H, NH); signala za COOH skupino v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 3063, 1692, 1662, 1626, 1563, 1520, 1474, 1427, 1383, 1359, 1304, 1264, 1208, 1095, 1073, 1050, 1019, 995, 957, 822, 763, 740, 679, 586, 517

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

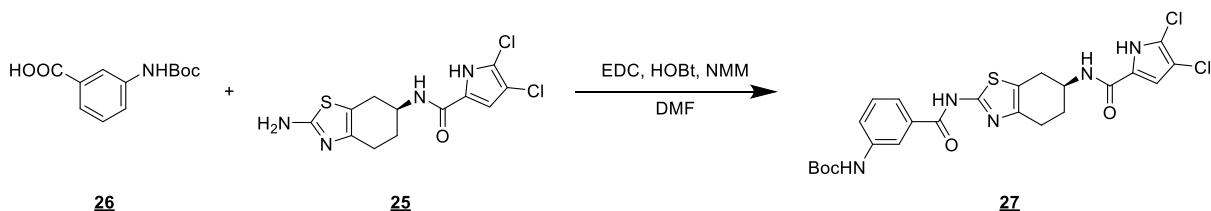


Na ledeni kopeli smo v 30 mL DMF raztopili spojino **23** (1,003 g, 5,57 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (1,281 g, 6,67 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (1,110 g, 7,22 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (1,22 mL, 11,11 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **24** (940 mg, 5,56 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo DMF odstranili pod znižanim tlakom, dodali 150 mL etilacetata ter spirali z 1% citronsko kislino (1x100 mL in 1x50 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x75 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x75 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Pri tem smo dobili 1,002 g spojine **25**. Glede na TLC kromatogram je v 1% citronski kislini ostalo nekaj produkta, zato smo združili fazi s citronsko kislino, ekstrahirali z etilacetatom (1x100 mL in 2x75 mL) in te združene organske faze spirali še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x100 mL). Dobljeno organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Po ekstrakciji produkta iz citronske kisline smo dobili 498 mg **25**, skupaj torej 1,500 g.

(<i>S</i>)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid (25)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ OS	M _r : 331,22 g/mol
Izgled: opečnati kristali	Izkoristek: 81,5%

T _{tal} : 102-107 °C	R _f : 0,15 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 1,72-1,85 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,88-1,96 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,43-2,53 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,79 (dd, 1H, J ₁ = 15,0 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,08-4,19 (m, 1H, -CH-NH-), 6,68 (s, 2H, -NH ₂), 6,96 (s, 1H, pirol-CH), 8,08 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 12,73 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 3457, 3364, 3279, 3062, 2963, 2924, 2186, 1729, 1669, 1614, 1513, 1440, 1427, 1371, 1340, 1312, 1219, 1165, 1044, 1015, 943, 850, 817, 801, 751, 653, 626, 584, 554, 501

4.19. Sinteza terc-butil (S)-(3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata

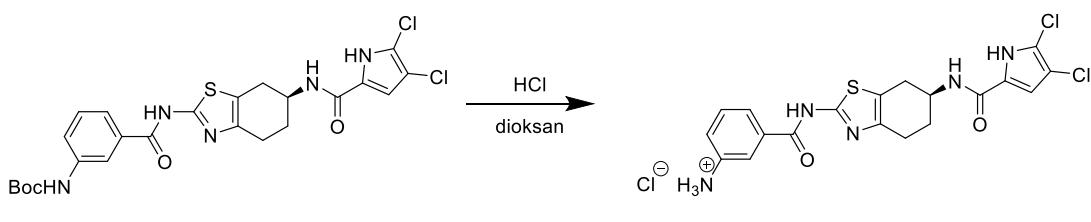


Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **26** (143 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (139 mg, 0,725 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (120 mg, 0,785 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (133 µL, 1,21 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **25** (200 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi. Čez 24 ur glede na TLC kromatogram reakcija še ni potekla do konca, zato smo reakcijsko zmes segrevali na oljni kopeli (50 °C, 2,5 ure). Ko je reakcija potekla, smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 200 mg spojine **27**.

terc-butil (S)-(3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamat (27)	
Molekulska formula: C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	M _r : 550,46 g/mol
Izgled: svetlo rjava-rumen prašek	Izkoristek: 60,1%

T _{tal} : 171-175 °C	R _f : 0,46 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,50 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,84-1,96 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,08 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,63-2,82 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,03 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,8 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,15-4,32 (m, 1H, -CH-NH-), 6,98 (s, 1H, pirol-CH), 7,40 (t, 1H, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H-5), 7,61 (d, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 7,70 (d, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 8,15 (d, 2H, <i>J</i> = 7,8 Hz, Ar-H), 9,59 (s, 1H, NH-Boc), 12,44 (s, 1H, Ar-CO-NH- ali pirol-NH), 12,76 (s, 1H, Ar-CO-NH- ali pirol-NH)
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 3070, 2690, 2173, 1957, 1702, 1641, 1568, 1525, 1489, 1434, 1403, 1381, 1307, 1257, 1212, 1160, 1107, 1150, 1018, 996, 916, 839, 809, 742, 710, 684, 624, 585, 555
HR-MS (ESI)	izmerjena masa: 548,0925; izračunana masa: 548,0926

4.20. Sinteza (S)-3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijeveaga klorida

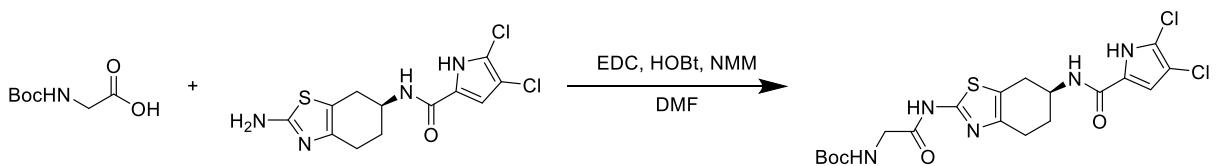


Spojino **27** (165 mg, 0,300 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 8 mL dioksana, dali na ledeno kopel in zaprli bučko s septumom. V bučko smo injicirali 4 M HCl v dioksanu (750 µL, 3,00 mmol, 10 ekv.), pustili mešati 20 minut na ledeni kopeli in nato 24 ur na sobni temperaturi. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem, a je bila glede na NMR spekter to izhodna snov. Postopek smo še enkrat ponovili z drugim topilom, tokrat smo spojino **27** (135 mg, 0,245 mmol, 1 ekv.) raztopili v metanolu, dali na ledeno kopel in zaprli bučko s septumom. V bučko smo injicirali 4 M HCl v dioksanu (613 µL, 2,45 mmol, 10 ekv.), pustili mešati 20 minut na ledeni kopeli in nato 24 ur na sobni temperaturi. Glede na TLC kromatogram tudi tokrat reakcija ni potekla, zato smo dali reakcijsko zmes segrevati na oljno kopel, najprej 1 uro na 40 °C, nato 1 uro na 55 °C in 1 uro na 75 °C (pri tej temperaturi se je vsa oborina raztopila). Glede na TLC kromatogram je reakcija potekla do konca, zato smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo nečist produkt, zato

smo zmes najprej raztopili v 50 mL vode in ekstrahirali z etilacetatom (1x25 mL). Dodali smo še 10 mL nasičene raztopine NaCl in pustili 18 ur, da sta se fazi ločili. Pri tem je nastala oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in dobili 29 mg spojine **28**.

(S)-3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijev klorid (28)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ O ₂ S	M _r : 486,80 g/mol
Izgled: rjava oborina	Izkoristek: 24,3%
T _{tal} : 176-180 °C	R _f : 0,37 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,84-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,64-2,81 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 15,8 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,29 (m, 1H, -CH-NH-), 6,99 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-CH), 7,40 (t, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H-5), 7,61 (dd, 1H, J ₁ = 8,0 Hz, J ₂ = 1,4 Hz, Ar-H), 7,68-7,73 (m, 1H, Ar-H), 8,21 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 9,60 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,79 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-NH); signala za NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3064, 1662, 1625, 1562, 1520, 1427, 1383, 1304, 1265, 1207, 1095, 1073, 1050, 995, 957, 821, 763, 740, 679, 590, 536
HPLC	t _r = 11,59 min; čistoča: 96,5%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 448,0413; izračunana masa: 448,0402

4.21. Sinteza terc-butil (S)-(2-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata



29

25

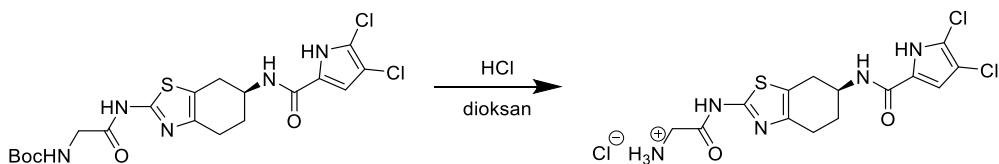
30

Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **29** (106 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (139 mg, 0,725 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (120 mg, 0,785 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (133 µL, 1,21 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **25** (200 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi

24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 1% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 225 mg spojine **30**.

<i>terc</i>-butil (S)-(2-((6-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamat (30)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₂₃ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	M _r : 488,38 g/mol
Izgled: rjav prašek	Izkoristek: 76,3%
T _{tal} : 139-141 °C	R _f : 0,37 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,39 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,79-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,57-2,74 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J ₁ = 15,6 Hz, J ₂ = 5,5 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,80 (d, 2H, J = 6,2 Hz, -NH-CH ₂ -CO-), 4,13-4,25 (m, 1H, -CH-NH), 6,97 (s, 1H, pirol-CH), 7,14 (t, 1H, J = 6,1 Hz, NH-Boc), 8,12 (d, 1H, J = 8,0 Hz, pirol-CO-NH-), 11,94 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,75 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 2980, 2777, 2361, 2154, 2017, 1701, 1633, 1562, 1525, 1433, 1394, 1367, 1338, 1252, 1161, 941, 853, 756, 696, 627, 573, 545, 521, 509
HPLC	t _r = 13,07 min; čistoča: 98,4%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 486,0767; izračunana masa: 486,0770

4.22. Sinteza (S)-2-((6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida



30

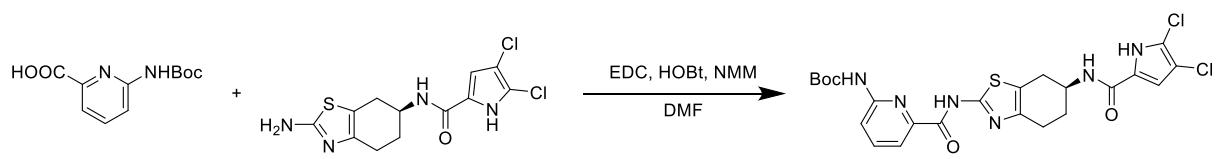
31

Spojino **30** (185 mg, 0,379 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL dioksanu, dali na ledeno kopel in zaprli bučko s septumom. V bučko smo injicirali 4 M HCl v dioksanu (947 µL, 3,79 mmol, 10 ekv.), pustili mešati 20 minut na ledeni kopeli in nato 24 ur na sobni

temperaturi. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem, ker pa je produkt očitno zelo hidroskopen, je na filter papirju nastala olju podobna substanca, ki smo jo raztopili v metanolu in nato matičnico uparili pod znižanim tlakom, pri čemer smo dobili 120 mg spojine **31**.

(S)-2-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijev klorid (31)	
Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₆ Cl ₃ N ₅ O ₂ S	M _r : 424,73 g/mol
Izgled: oranžno-rjav prašek	Izkoristek: 74,6%
T _{tal} : 201-203 °C	R _f : 0,00 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,83-1,94 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,95-2,05 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,63-2,76 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J ₁ = 15,7 Hz, J ₂ = 5,1 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,87 (k, 2H, J = 5,7 Hz, ¹ H ₃ N-CH ₂ -CO-), 4,13-4,24 (m, 1H, -CH ₂ -NH), 6,99 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-CH), 8,29 (d, 1H, J = 7,7 Hz, pirol-CO-NH-), 8,34 (t, 3H, J = 5,1 Hz, -NH ₃ ⁺), 12,82 (d, 1H, J = 2,7 Hz, pirol-NH); signala za Ar-CO-NH- v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3449, 3362, 3273, 2855, 1727, 1669, 1621, 1558, 1521, 1439, 1427, 1395, 1339, 1304, 1207, 1160, 1080, 1016, 898, 849, 828, 800, 755, 733, 653, 626, 538
HPLC	t _r = 10,64 min; čistoča: 100,0%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 386,0239; izračunana masa: 386,0245

4.23. Sinteza terc-butil (S)-(6-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamata

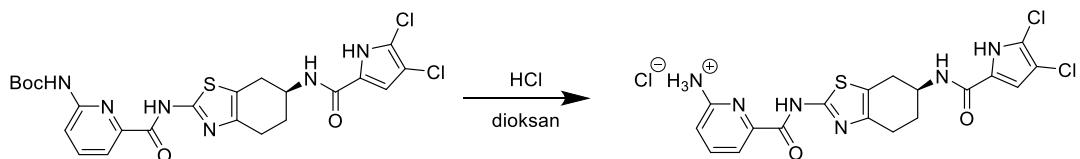


Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **12** (143 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (139 mg, 0,725 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (120 mg, 0,785 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (133 µL, 1,21 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali

spojino **25** (200 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z vodo (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 267 mg spojine **32**.

<i>terc</i>-butil (S)-(6-((6-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-il)karbamat (32)	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₄ S	M _r : 551,44 g/mol
Izgled: rjav prašek	Izkoristek: 80,2%
T _{tal} : 140-144 °C	R _f : 0,69 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,51 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,85-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,99-2,08 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,62-2,82 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,06 (dd, 1H, J ₁ = 15,6 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,14-4,33 (m, 1H, -CH-NH-), 6,99 (s, 1H, pirol-CH), 7,76 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 3,1 Hz, Ar-H), 8,00-8,06 (m, 2H, 2xAr-H ali 1x Ar-H in pirol-CO-NH-), 8,15 (d, 1H, J = 7,7 Hz, pirol-CO-NH- ali Ar-H), 9,92 (s, 1H, NH-Boc), 11,47 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,75 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 3120, 2387, 2180, 2158, 2033, 2005, 1734, 1671, 1631, 1579, 1509, 1472, 1431, 1398, 1335, 1303, 1260, 1217, 1149, 1075, 1044, 1017, 991, 951, 842, 821, 758, 683, 662, 625, 607, 590, 570, 550
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 549,0883; izračunana masa: 549,0879

4.24. Sinteza (S)-6-((6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-aminijevega klorida



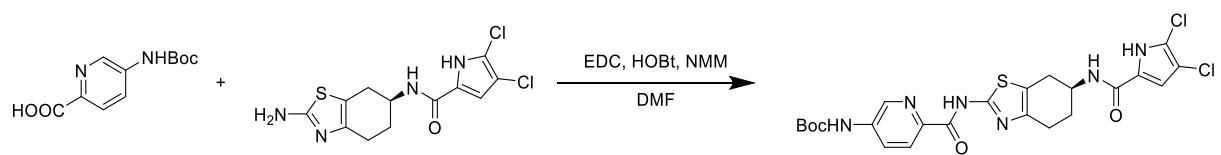
32

33

Spojino **32** (190 mg, 0,345 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 8 mL dioksana, dali na ledeno kopel in zaprli bučko s septumom. V bučko smo injicirali 4 M HCl v dioksanu (861 µL, 3,45 mmol, 10 ekv.), pustili mešati 20 minut na ledeni kopeli in nato 120 ur na sobni temperaturi. Ker reakcija glede na TLC kromatogram še ni potekla, smo reakcijsko zmes počasi segrevali na oljni kopeli do 95 °C. Ko je reakcija potekla smo oborino odfiltrirali s presesavanjem in dobili 133 mg spojine **33**.

(S)-6-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-2-aminijev klorid (33)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₁₇ Cl ₃ N ₆ O ₂ S	M _r : 487,78 g/mol
Izgled: rumeno-zelena oborina	Izkoristek: 79,1%
T _{dal} : 150-153 °C	R _f : 0,28 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,83-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,61-2,81 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,97 (dd, 1H, J ₁ = 16,4 Hz, J ₂ = 4,7 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,20-4,30 (m, 1H, -CH-NH-), 7,01 (d, 1H, J = 2,8 Hz, pirol-CH), 7,18 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 7,59 (d, 1H, J = 6,7 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 8,01 (t, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H-4), 8,34 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 12,87 (d, 1H, J = 2,2 Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH- in NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3095, 2958, 2852, 2016, 1662, 1621, 1581, 1513, 1430, 1401, 1327, 1254, 1202, 1117, 1081, 1046, 1016, 997, 956, 889, 871, 848, 817, 762, 707, 681, 613
HPLC	t _r = 11,42 min; čistoča: 97,9%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 449,0350; izračunana masa: 449,0354

4.25. Sinteza terc-butil (S)-(6-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamata



15

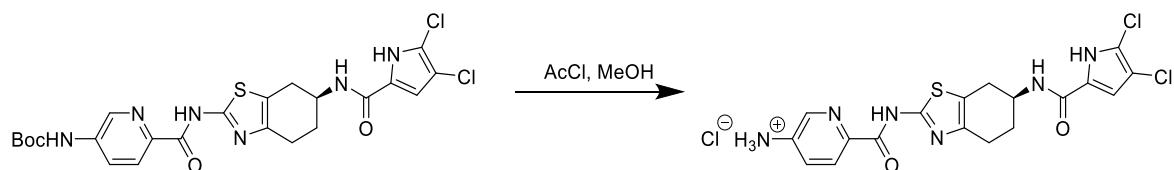
25

34

Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **15** (40 mg, 0,168 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (39 mg, 0,201 mmol, 1,2 ekv.), HOBt (33 mg, 0,218 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (37 µL, 0,336 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **25** (56 mg, 0,168 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z vodo (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 49 mg spojine **34**.

<i>terc</i>-butil (S)-(6-((6-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-il)karbamat (34)	
Molekulska formula: C ₂₃ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₄ S	M _r : 551,44 g/mol
Izgled: oranžen prašek	Izkoristek: 52,9%
T _{tal} : 148-151 °C	R _f : 0,47 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,52 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,82-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,07 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,66-2,78 (m, 1H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,05 (dd, 1H, J ₁ = 15,7 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,28 (m, 1H, -CH-NH-), 6,98 (d, 1H, J = 2,7 Hz, pirol-CH), 8,08-8,18 (m, 3H, 2x Ar-H in pirol-CO-NH-), 8,75 (dd, 1H, J ₁ = 2,4 Hz, J ₂ = 0,6 Hz, Ar-H-6), 10,09 (s, 1H, NH-Boc), 11,61 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,76 (d, 1H, J = 2,6 Hz, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3023, 2388, 2159, 2016, 1963, 1735, 1668, 1586, 1506, 1435, 1382, 1332, 1300, 1249, 1211, 1153, 1128, 1052, 1016, 918, 900, 837, 812, 781, 692, 661, 623, 587
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 549,0876; izračunana masa: 549,0879

4.26. Sinteza (S)-6-((6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-aminijevega klorida



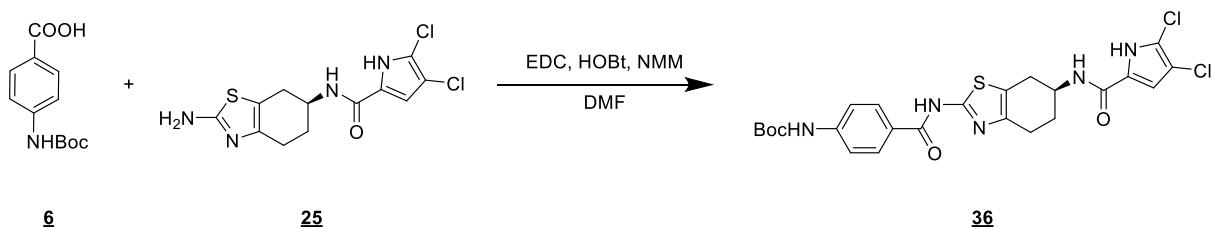
34

35

Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 4 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (85 µL, 1,20 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **34** (33 mg, 0,0598 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi. Po 18 urah smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo in videli, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo postopek ponovili. Na ledeni kopeli smo v novo bučko odmerili 2 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (85 µL, 1,20 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Prvotno reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do volumna približno 3 mL, jo injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa 24 ur na sobni temperaturi. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 29 mg spojine **35**.

(S)-6-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)piridin-3-aminijev klorid (35)	
Molekulska formula: C ₁₈ H ₁₇ Cl ₃ N ₆ O ₂ S	M _r : 487,78 g/mol
Izgled: rumeno-rjav prašek	Izkoristek: 99,4%
T _{tal} : 169-173 °C	R _f : 0,00 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,84-1,96 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,97-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,59-2,77 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J ₁ = 15,8 Hz, J ₂ = 5,1 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,18-4,26 (m, 1H, -CH-NH-), 6,99 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-CH), 7,20-7,29 (m, 1H, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 8,00 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 8,04 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H-6), 8,25 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H ali pirol-CO-NH-), 12,81 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH- in NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3101, 2770, 1689, 1625, 1555, 1526, 1431, 1306, 1219, 1080, 1003, 848, 755, 665, 582, 540
HPLC	t _r = 11,89 min; čistoča: 95,5%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 449,0351; izračunana masa: 449,0354

4.27. Sinteza terc-butil (S)-(4-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamata



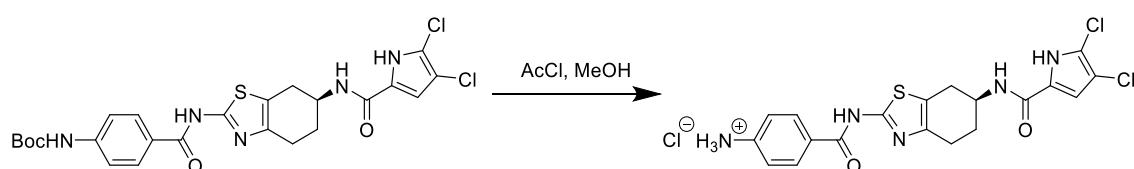
Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **6** (143 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (139 mg, 0,725 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (120 mg, 0,785 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (133 µL, 1,21 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **25** (200 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 90 mg spojine **36**.

terc-butil (S)-(4-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)karbamoil)fenil)karbamat (36)	
Molekulska formula: C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	M _r : 550,46 g/mol
Izgled: oranžen prašek	Izkoristek: 27,1%
T _{tal} : 169-172 °C	R _f : 0,38 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,50 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,82-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,09 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,66-2,76 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 15,8 Hz, J ₂ = 5,0 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,17-4,27 (m, 1H, -CH-NH-), 6,99 (d, 1H, J = 2,6 Hz, pirol-CH), 7,59 (d, 2H, J = 8,9 Hz, Ar-H), 7,97-8,07 (m, 2H, Ar-H), 8,15 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 9,78 (s, 1H, NH-Boc), 12,30 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,76 (d, 1H, J = 2,3 Hz, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3490, 3064, 2034, 1693, 1662, 1625, 1562, 1518, 1427, 1409, 1383, 1304, 1264, 1241, 1207, 1095, 1073, 1050, 995, 957, 821, 763, 740, 591, 531, 522

HR-MS (ESI⁻)

izmerjena masa: 548,0912; izračunana masa: 548,0926

4.28. Sinteza (*S*)-4-((6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijevega klorida

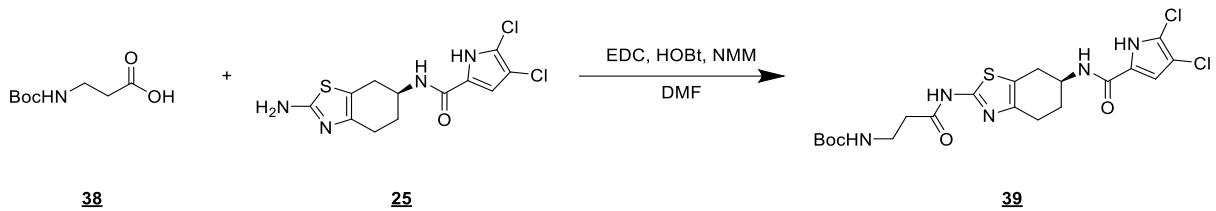


Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (129 µL, 1,82 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **36** (50 mg, 0,0908 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi 90 ur. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 46 mg spojine **37**.

(<i>S</i>)-4-((6-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)karbamoil)benzenaminijev klorid (37)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ O ₂ S	M _r : 486,80 g/mol
Izgled: rjavo-oranžen prašek	Izkoristek: 104,3%*
T _{tal} : 139-144 °C	R _f : 0,00 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,83-1,95 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,98-2,06 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,61-2,72 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J ₁ = 15,7 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,16-4,27 (m, 1H, -CH-NH-), 6,77 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 6,99 (d, 1H, J = 2,9 Hz, pirol-CH), 7,89 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8,22 (d, 1H, J = 7,7 Hz, pirol-CO-NH-), 12,80 (d, 1H, J = 2,8 Hz, pirol-NH); signalov za Ar-CO-NH- in NH ₃ ⁺ v NMR spektru ne vidimo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2853, 1687, 1614, 1558, 1525, 1434, 1394, 1328, 1256, 1216, 1185, 1084, 1018, 905, 840, 744, 730, 677, 626, 584, 553, 537, 506
HPLC	t _r = 12,29 min; čistoča: 95,3%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 448,0397; izračunana masa: 448,0402

*Produkt pri tehtanju še ni bil popolnoma suh.

4.29. Sinteza terc-butil (S)-(3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropil)karbamata

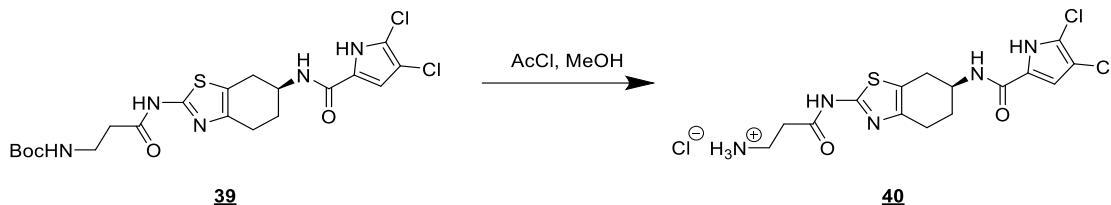


Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **38** (114 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (139 mg, 0,725 mmol, 1,2 ekv.), HOBt (120 mg, 0,785 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (133 μ L, 1,21 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **25** (200 mg, 0,604 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 1% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 30 : 1). Dobili smo 160 mg spojine **39**.

<i>terc</i>-butil (<i>S</i>)-(3-((6-(4,5-dikloro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropil)karbamat (39)	
Molekulska formula: C ₂₀ H ₂₅ Cl ₂ N ₅ O ₄ S	M _r : 502,41 g/mol
Izgled: svetlo rumen prašek	Izkoristek: 52,7%
T _{tal} : 141-145 °C	R _f : 0,34 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,37 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,80-1,90 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,94-2,03 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,55 (t, 2H, <i>J</i> = 6,7 Hz, -CO-CH ₂ -CH ₂ -NH-) 2,58-2,72 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,98 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,2 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,21 (k, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, -CO-CH ₂ -CH ₂ -NH-), 4,13-4,25 (m, 1H, -CH-NH), 6,89 (t, 1H, <i>J</i> = 5,5 Hz, NH-Boc), 6,96 (s, 1H, pirol-CH), 8,11 (d, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, pirol-CO-NH-), 11,91 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,75 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3178, 2937, 2033, 1686, 1630, 1515, 1434, 1396, 1367, 1334, 1250, 1160, 1058, 1017, 981, 851, 806, 751, 721, 695, 677, 625, 571, 555, 536, 501

HPLC	$t_r = 13,13 \text{ min}$; čistoča: 98,0%
HR-MS (ESI)	izmerjena masa: 500,0921; izračunana masa: 500,0926

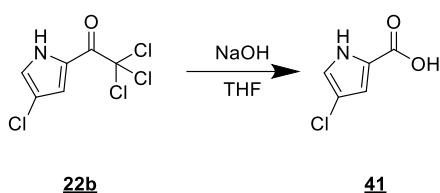
4.30. Sinteza (S)-3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropan-1-aminijevega klorida



Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (340 µL, 4,78 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **39** (120 mg, 0,239 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa na sobni temperaturi 18 ur. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 104 mg spojine **40**.

(S)-3-((6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropan-1-aminijev klorid (40)	
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ O ₂ S	M _r : 438,75 g/mol
Izgled: svetlo rjav prašek	Izkoristek: 99,2%
T _{tal} : 203-207 °C	R _f : 0,00 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,81-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,05 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,61-2,76 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,82 (t, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, -CO-CH ₂ -CH ₂ -NH-), 3,00 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,09 (k, 2H, <i>J</i> = 6,5 Hz, -CO-CH ₂ -CH ₂ -NH-), 4,12-4,23 (m, 1H, -CH-NH), 6,99 (d, 1H, <i>J</i> = 2,9 Hz, pirol-CH), 7,97 (s, 3H, -NH ₃ ⁺), 8,27 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, pirol-CO-NH-), 12,17 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 12,82 (d, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2976, 2820, 2023, 1712, 1625, 1561, 1526, 1432, 1400, 1336, 1304, 1251, 1190, 1016, 843, 755, 725, 626, 572, 530, 526, 512
HPLC	t _r = 10,72 min; čistoča: 100,0%
HR-MS (ESI)	izmerjena masa: 400,0397; izračunana masa: 400,0402

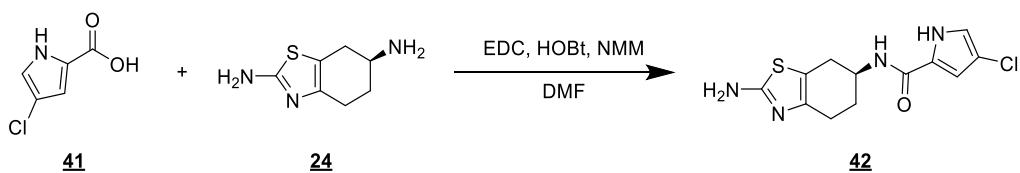
4.31. Sinteza 4-kloro-1H-pirol-2-karboksilne kislina



Spojino **22b** smo raztopili v 20 mL THF, dodali 2 M vodno raztopino NaOH (4,9 mL, 9,72 mmol, 3 ekv.) in pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo THF odstranili pod znižanim tlakom in nakisali vodno fazo z nasičeno raztopino HCl do pH=1, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo posušili v sušilniku (60 °C, 12h). Dobili smo 471 mg spojine **41**.

4-kloro-1H-pirol-2-karboksilna kislina (41)	
Molekulska formula: C ₅ H ₄ ClNO ₂	M _r : 145,54 g/mol
Izgled: svetlo rjava oborina	Izkoristek: 99,9%
T _{tal} : 148-153 °C	R _f : 0,05 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm] = 6,69 (dd, 1H, J ₁ = 2,7 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, CH), 7,09 (dd, 1H, J ₁ = 3,1 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, CH), 12,07 (s, 1H, NH), 12,64 (-COOH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3359, 3255, 3142, 2638, 1654, 1588, 1557, 1456, 1420, 1371, 1327, 1246, 1208, 1117, 1100, 1085, 1017, 963, 940, 890, 839, 806, 760, 722, 680, 631, 606, 593, 580, 537

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



Na ledeni kopeli smo v 15 mL DMF raztopili spojino **41** (400 mg, 2,75 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (632 mg, 3,30 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (547 mg, 3,57 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (0,60 mL, 5,50 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **24** (465 mg, 2,75 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo DMF uparili pod znižanim tlakom, dodali 50 mL etilacetata ter spirali z 1% citronsko kislino (2x25 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x25 mL) in nasičeno

raztopino NaCl (1x25 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Glede na TLC kromatogram je v 1% citronski kislini ostalo nekaj produkta, zato smo združili fazi s citronsko kislino, ekstrahirali z etilacetatom (4x25 mL) in te združene organske faze spirali še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x50 mL). Dobljeno organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 20 : 1). Produkt je v mobilni fazi slabo topen, zato smo pred nanosom na kolono odstranili oborino s filtriranjem s presesavanjem, pri čemer smo dobili 345 mg čiste spojine **42**, iz kolone pa smo eluirali še 97 mg te spojine, skupno torej 442 mg.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-4-kloro-1H-pirol-2-karboksamid (42)	
Molekulska formula: C ₁₂ H ₁₃ ClN ₄ OS	M _r : 296,77 g/mol
Izgled: bel prašek	Izkoristek: 54,2%
T _{tal} : 170-173 °C	R _f : 0,22 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,72-1,84 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,88-1,97 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,43-2,55 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,78 (dd, 1H, J ₁ = 14,7 Hz, J ₂ = 5,2 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,08-4,19 (m, 1H, -CH-NH-), 6,69 (s, 2H, -NH ₂), 6,86 (dd, 1H, J ₁ = 2,7 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 6,96 (dd, 1H, J ₁ = 3,0 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 8,03 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 11,77 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3855, 3737, 3475, 3303, 2846, 2592, 2224, 2163, 2126, 1932, 1774, 1686, 1609, 1565, 1527, 1458, 1442, 1398, 1366, 1340, 1312, 1264, 1219, 1185, 1139, 1092, 1074, 937, 878, 846, 814, 801, 777, 748, 628, 601, 591, 538, 505
HPLC	t _r = 11,16 min; čistoča: 82,8%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 295,0425; izračunana masa: 295,0420

4.33. Sinteza terc-butil (S)-(2-((6-(4-kloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamata

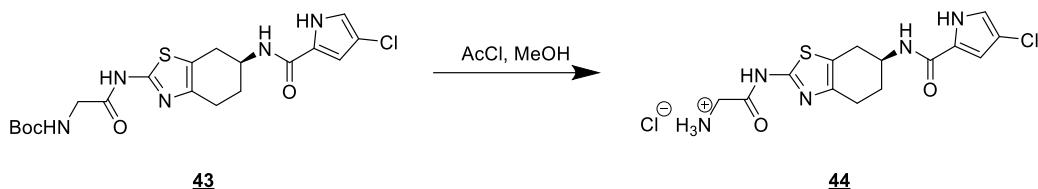


Na ledeni kopeli smo v 8 mL DMF raztopili spojino **28** (118 mg, 0,674 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (155 mg, 0,809 mmol, 1,2 ekv.), HOBr (134 mg, 0,876 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (148 µL, 1,35 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **42** (200 mg, 0,674 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 20 mL etilacetata ter spirali z 1% citronsko kislino (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surov produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 20 : 1). Dobili smo 45 mg spojine **43**.

terc-butil (S)-(2-((6-(4-kloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetil)karbamat (43)	
Molekulska formula: C ₁₉ H ₂₄ ClN ₅ O ₄ S	M _r : 453,94 g/mol
Izgled: bel prašek	Izkoristek: 14,7%
T _{tal} : 163-165 °C	R _f : 0,34 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,39 (s, 9H, -C-(CH ₃) ₃), 1,80-1,92 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,04 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,57-2,78 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 2,98 (dd, 1H, J ₁ = 15,6 Hz, J ₂ = 5,5 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 3,81 (d, 2H, J = 6,2 Hz, -NH-CH ₂ -CO-), 4,13-4,25 (m, 1H, -CH-NH), 6,87 (dd, 1H, J ₁ = 2,7 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 6,97 (dd, 1H, J ₁ = 3,0 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 7,14 (t, 1H, J = 6,1 Hz, NH-Boc), 8,07 (d, 1H, J = 7,8 Hz, pirol-CO-NH-), 11,79 (s, 1H, Ar-CO-NH-), 11,94 (s, 1H, pirol-NH)
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3420, 3342, 3180, 3071, 2936, 1698, 1682, 1628, 1553, 1517, 1445, 1392, 1369, 1334, 1272, 1252, 1222, 1163, 1100, 1055, 987, 936, 872, 862, 829, 802, 771, 752, 693, 651, 601, 557,

	542
HPLC	$t_r = 12,47 \text{ min}$; čistoča: 95,4%
HR-MS (ESI ⁻)	izmerjena masa: 452,1149; izračunana masa: 452,1159

4.34. Sinteza (S)-2-((6-(4-kloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijevega klorida



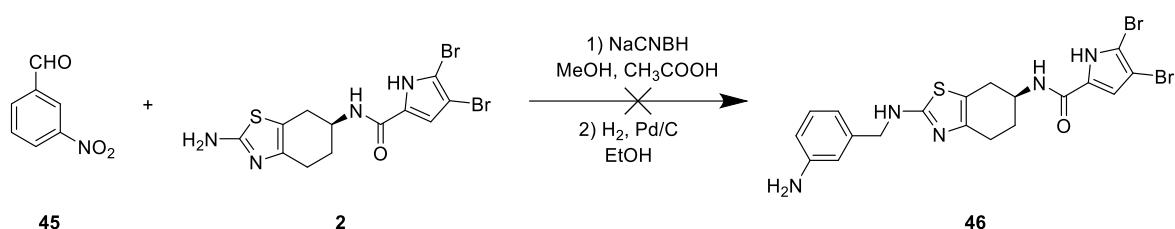
Na ledeni kopeli smo v bučko odmerili 5 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (122 µL, 1,72 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Nato smo spojino **43** (39 mg, 0,0859 mmol, 1 ekv.) raztopili v 2 mL metanola, dobljeno raztopino injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli eno uro, nato pa na sobni temperaturi. Po 18 urah smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo in videli, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo postopek ponovili. Na ledeni kopeli smo v novo bučko odmerili 2 mL metanola, zaprli s septumom, injicirali acetil klorid (122 µL, 1,72 mmol, 20 ekv.) in pustili mešati 30 minut. Prvotno reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do volumna približno 3 mL, jo injicirali v bučko in pustili mešati na ledeni kopeli še eno uro, nato pa 18 ur na sobni temperaturi. Reakcija je potekla do konca, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom in dobili 33 mg spojine **44**.

(S)-2-((6-(4-kloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrabenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-2-oksoetan-1-aminijev klorid (44)

Molekulska formula: C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₅ O ₂ S	M _r : 390,28 g/mol
Izgled: svetlo rumen prašek	Izkoristek: 98,4%
T _{tal} : 195-199 °C	R _f : 0,00 (DKM : MeOH = 9 : 1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm] = 1,82-1,93 (m, 1H, -CH ₂ -H _A -7), 1,96-2,05 (m, 1H, -CH ₂ -H _B -7), 2,62-2,77 (m, 3H, -CH ₂ -H-5, -CH ₂ -H _A -4), 3,00 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,3 Hz, -CH ₂ -H _B -4), 4,13-4,26 (m, 1H, -CH ₂ -NH), 6,88 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 2,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 6,97 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, pirol-CH), 8,20 (d, 1H, <i>J</i> = 7,9 Hz, pirol-CO-NH-), 8,34 (s, 3H, -NH ₃ ⁺), 12,85 (s, 1H, pirol-NH); signala za

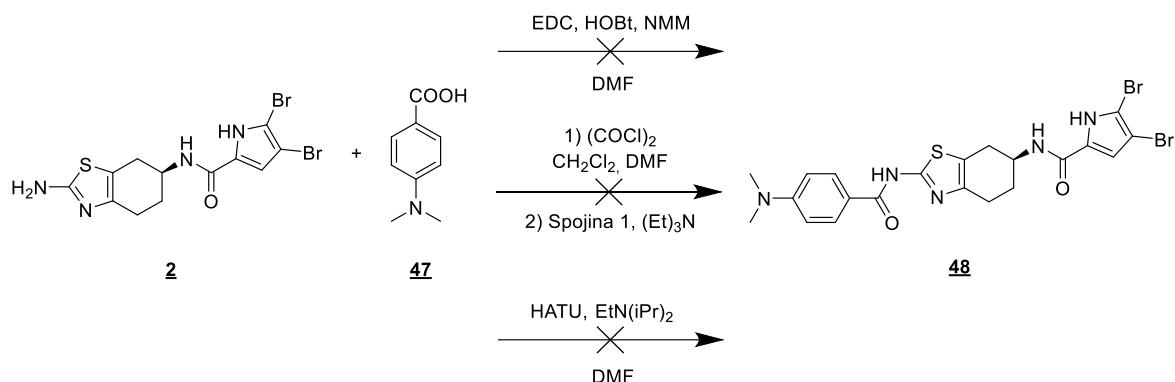
	Ar-CO-NH- v NMR spektru ne vidimo, signal za CH ₂ skupino se prekriva s signalom za vodo
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 3420, 3343, 2984, 2165, 2027, 2014, 1976, 1963, 1700, 1626, 1561, 1518, 1447, 1391, 1369, 1334, 1289, 1250, 1206, 1165, 1054, 936, 862, 802, 771, 753, 733, 692, 650, 603, 542, 528
HPLC	t _r = 9,95 min; čistoča: 95,6%
HR-MS (ESI ⁺)	izmerjena masa: 352,0634; izračunana masa: 352,0635

4.35. Neuspešen poskus sinteze (S)-N-(2-((3-aminobenzil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo(1,2-d)tiazol-6-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida



Spojino **2** (200 mg, 0,476 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL metanola, dodali spojino **45** (72 mg, 0,476 mmol, 1 ekv.) in kapljico ocetne kisline ter segrevali na oljni kopeli 24 ur (60 °C). Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo, dodali NaCNBH₃ (39 mg, 0,619 mmol, 1,3 ekv.) in pustili mešati še 24 ur na sobni temperaturi. Izpadla je manjša količina oborine, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in posušili v sušilniku (24 ur, 60 °C). V naslednji stopnji smo oborino raztopili v 3 mL etanola, prepihalo z argonom, dodali za konico spatule Pd/C in prepihalo z vodikom. Pustili smo, da reakcija poteka 1 uro pod vodikovo atmosfero, nato pa smo Pd/C odfiltrirali s presesavanjem in matičnici odstranili topilo pod znižanim tlakom. Dobljena spojina glede na NMR spekter ni bila spojina **46**.

4.36. Neuspešni poskusi sinteze (S)-4,5-dibromo-N-(2-(4-(dimetilamino)benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida



Prvi poskus:

Na ledeni kopeli smo v 5 mL DMF raztopili spojino **47** (59 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) ter dodali EDC (82 mg, 0,428 mmol, 1,2 ekv.), HOBT (71 mg, 0,464 mmol, 1,3 ekv.) in NMM (79 µL, 0,714 mmol, 2 ekv.). Po 20-ih minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali spojino **2** (150 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) in pustili, da reakcija poteka pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo v reakcijsko zmes smo dodali 20 mL etilacetata ter spirali z destilirano vodo (2x10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x10 mL). Organsko fazo smo posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali, odstranili topilo pod znižanim tlakom in surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza DKM : MeOH = 20 : 1). Glede na NMR spekter izolirana spojina ni bila spojina **48** ampak aktiviran ester spojine **47**.

Drugi poskus:

Spojino **47** (59 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL diklorometana, dodali kapljico DMF kot katalizatorja, postavili na ledeno kopel in prepigli z argonom. Čez 15 minut smo s pipeto dodali oksalil klorid (61 µL, 0,714 mmol, 2 ekv.), takoj zaprli s septumom in pustili mešati na sobni temperaturi 18 ur. Nato smo diklorometan odstranili pod znižanim tlakom, preostanek raztopili v dietiletru in nato še tega odstranili pod znižanim tlakom. Ta postopek smo ponovili trikrat. Suh preostanek smo raztopili v 5 mL dioksana, dodali trietylamin (149 µL, 1,07 mmol, 3 ekv.) in pustili, da reakcija poteka 24 ur. Spojine **48** zaradi velikega števila prisotnih nečistoč v reakcijski zmesi nismo uspeli izolirati.

Tretji poskus:

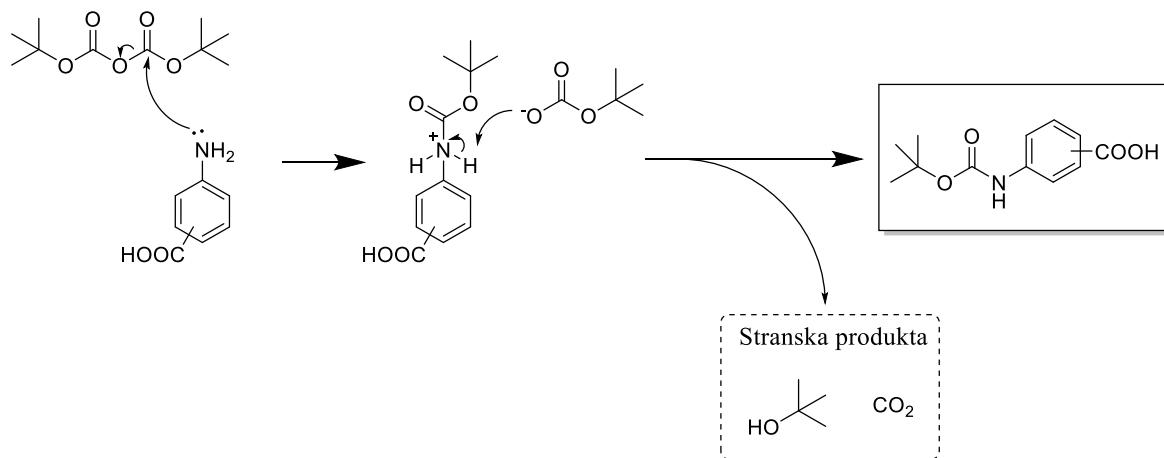
Spojino **47** (59 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL DMF, dali na ledeno kopel ter dodali HATU (137 mg, 0,428 mmol, 1,2 ekv.) in *N*-etildiizopropilamin (122 µL, 0,714 mmol, 2 ekv.). Čez 20 minut smo dodali spojino **2** (150 mg, 0,357 mmol, 1 ekv.) in pustili mešati na sobni temperaturi. Čez 24 ur smo potek reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo, analiza lis na TLC kromatogramu z masno spektroskopijo pa je pokazala, da reakcija ni potekla.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Komentar sintez

5.1.1. Uvajanje Boc zaščitne skupine

Pred sklopitvenimi reakcijami smo morali nekatere spojine z več reaktivnimi funkcionalnimi skupinami zaščititi, da smo dosegli selektivnost v naslednjih stopnjah sinteze. Na prosto amino skupino spojin **2**, **25** in **42** smo uvajali reagente, ki so v svoji strukturi vsebovali karboksilno in amino funkcionalno skupino. Za selektivno sklopitev smo torej potrebovali kislinske derivate z zaščiteno amino skupino. Nekatere take reagente smo imeli že na voljo, pri ostalih pa smo morali najprej izvesti reakcijo zaščite. Izbrali smo *tert*-butiloksikarbamatno (Boc) zaščitno skupino, za katero je značilno enostavno uvajanje z di-*tert*-butil dikarbonatom (Boc_2O), dobra stabilnost pri šibko bazičnih pogojih, pri katerih smo izvajali reakcije sklopitev, ter enostavna in selektivna odstranitev v kislih pogojih.



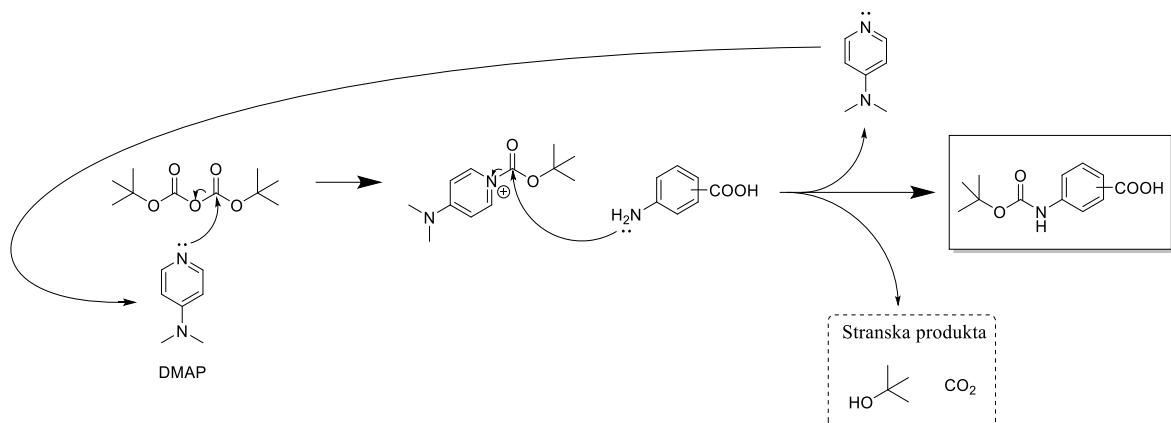
Slika 13: Mehanizem uvedbe Boc zaščite na amino skupino. Pritejeno po (27).

Sintezo spojine **6** smo izvedli v bazičnem mediju, ki smo ga dosegli z dodatkom trietilamina. Tako je bila bazična amino skupina izhodne spojine (**5**) neprotonirana in posledično v primerni obliki za nukleofilni napad na elektrofilno karbonilno skupino di-*tert*-butil dikarbonata, kisla karboksilna skupina pa je bila ionizirana, kar je povečalo topnost izhodne spojine in produkta v polarnem topilu (voda/dioksan) in tako omogočalo boljši potek reakcije. Pri izolaciji smo po uporitvi dioksana reakcijsko zmes nakisali, pri

čemer se je karboksilat protoniral. To je zmanjšalo topnost produkta v vodi, zaradi česar se je ta izboril in smo ga lahko enostavno odfiltrirali.

Nekoliko več težav smo zaradi slabe topnosti izhodnih spojin (**9** in **13**) imeli pri zaščiti piridinskih derivatov (sintezi spojin **12** in **16**). To težavo smo rešili tako, da smo najprej s kislinsko katalizirano esterifikacijo izhodnih spojin ti dve pretvorili v derivat metilnega estra. Metanol je imel pri tej reakciji dvojno vlogo, saj je deloval kot nukleofil in topilo, žveplova kislina pa je delovala kot katalizator. Zaradi kislega okolja pri reakciji esterifikacije smo produkta prvotno dobili v obliki soli, po uparitvi topila in dodatku nasičene raztopine NaHCO_3 pa smo dobili spojini **10** in **14** v neprotonirani obliki, ki smo ju pri ekstrakciji uspešno ekstrahirali iz vodne faze v diklorometan. Nadaljevali smo z zaščito aminske skupine z uporabo di-*terc*-butil dikarbonata. Tokrat zaradi modifikacije izhodnih spojin nismo imeli težav z njihovo topnostjo v THF. Pri sintezi spojine **11** smo v upanju na boljši potek reakcije dodali še katalizator 4-dietilaminopiridin (DMAP) (mehanizem prikazan na sliki 14). Zaradi hitrega nastanka CO_2 smo prvih nekaj ur pustili reakcijo potekati v odprtem sistemu, ki je omogočal nemoteno izhajanje plina, šele nato smo bučko z reakcijsko zmesjo zaprli s pokrovčkom. NMR spekter po izolaciji je pokazal, da smo pri reakciji dobili zmes pričakovanega produkta (**11a**) in produkta, na katerega se je Boc zaščitna skupina vezala dvakrat (**11b**). Nastanek stranskega produkta smo pripisali prisotnosti DMAP v reakcijski zmesi, ali pa dolgemu segrevanju reakcijske zmesi na $60\text{ }^\circ\text{C}$ (72 ur). Produkta nismo dodatno čistili, saj smo ocenili, da prisotnost spojine **11b** ne bo bistveno vplivala na potek reakcij v naslednjih stopnjah. Vseeno pa pri sintezi spojine **15** v reakcijsko zmes DMAP nismo dodali. Tokrat je nastal samo glavni produkt, zaradi česar smo sklepali, da prisotnost DMAP v reakcijski zmesi poveča verjetnost za potek stranskih reakcij. Ne smemo pa zanemariti tudi vpliva časa poteka reakcije na nastanek stranskih produktov, saj smo tokrat reakcijsko zmes segrevali krajši čas (24 ur). Odsotnost DMAP pri sintezi spojine **15** pa se je pokazala tudi v slabšem izkoristku reakcije, in sicer 51,4% v primerjavi z 88,2% pri sintezi spojine **11**, vendar pa je treba upoštevati, da del odstotka pri sintezi spojine **11** predstavlja tudi dvakrat zaščiten produkt z višjo molekulsko maso. Ker smo za sklopitveno reakcijo v naslednji stopnji potrebovali derivate karboksilnih kislin, smo izvedli še alkalno hidrolizo spojin **11** in **15**. Po hidrolizi smo dobili kislinske derivate v obliki soli, ki smo jih z dodatkom kisline pretvorili v neionizirano obliko in ekstrahirali iz vodne faze v etilacetat. NMR spekter spojine **12** je pokazal, da smo dobili čist produkt

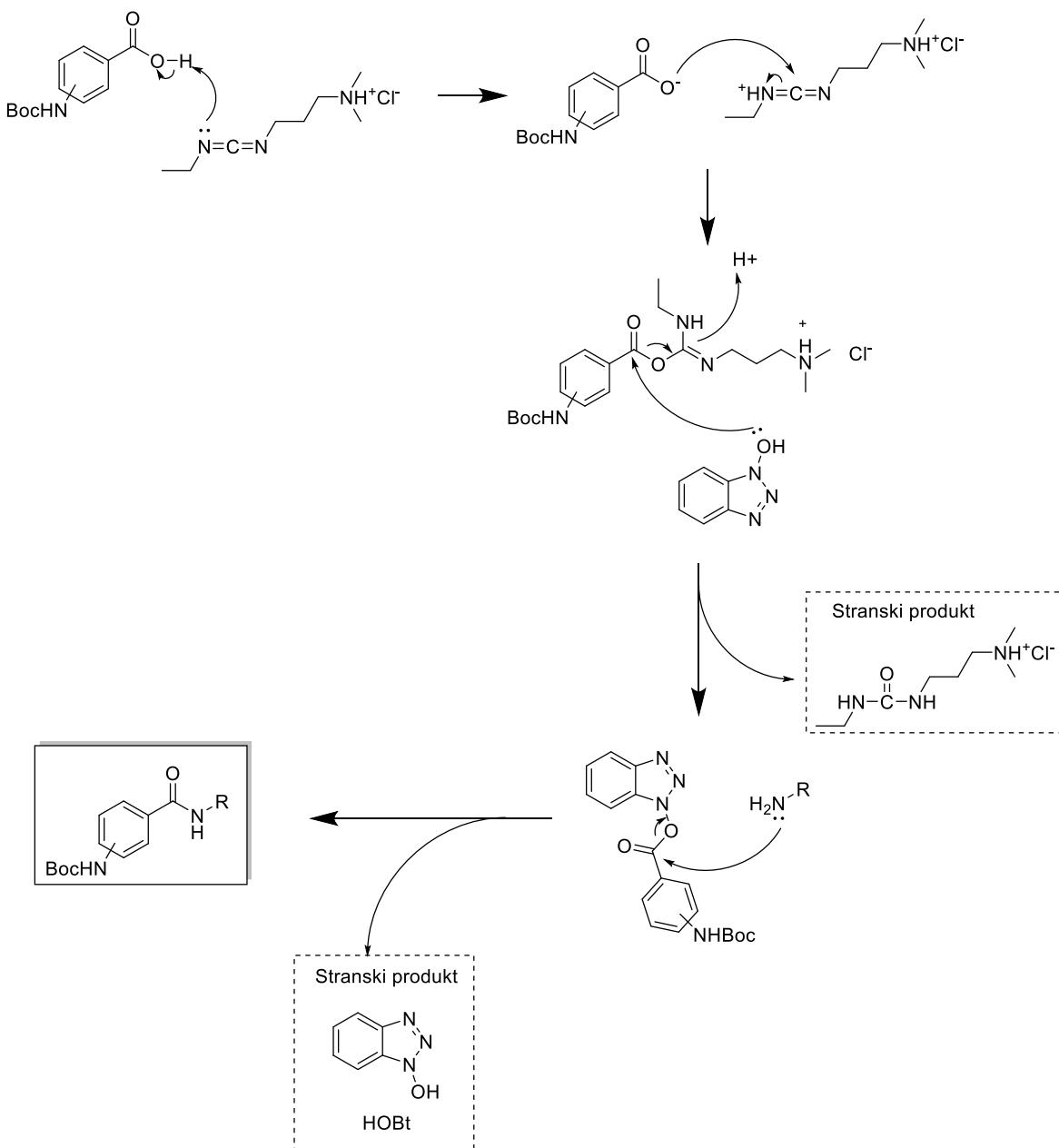
brez nečistoč v obliki dvakrat zaščitenega amina. Kot kaže se je med alkalno hidrolizo ena Boc skupina dvakrat zaščitenega derivata hidrolizirala.



Slika 14: Mehanizem uvedbe Boc zaščite na amino skupino z uporabo katalizatorja DMAP. Prirejeno po (28).

5.1.2. Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov EDC in HOBT

V naslednji stopnji smo derivate kislin z zaščiteno amino skupino sklopili s prosto amino skupino osnovnega skeleta prve oziroma druge serije spojin (spojini 2 in 25). Za potek reakcije smo morali karboksilno skupino aktivirati, kar v splošnem naredimo tako, da jo spremenimo v derivat z dobro izstopajočo skupino. To smo dosegli z uporabo sklopitvenih reagentov EDC in HOBT, mehanizem aktivacije je prikazan na sliki 15.



Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi s sklopitvenima reagentoma EDC in HOBr.
Prirejeno po (29).

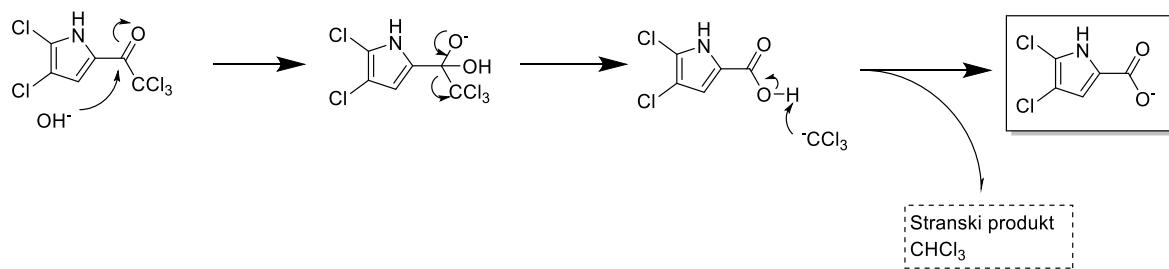
Reakcijo smo izvajali tako, da smo najprej ob hlajenju na ledeni kopeli v topilu raztopili izhodno kislino, sklopitvena reagenta in NMM. Vloga NMM je bila, da je kot baza odcepil proton s karboksilne skupine, pri čemer je nastal nukleofilni karboksilat, ki je napadel elektrofilni ogljikov atom karbodiimidne skupine na EDC. Pri tem je nastal reaktivni O-acilsečninski derivat, ki pa je nato reagiral še s HOBr, pri čemer je nastal še reaktivnejši aktiviran ester. Počakali smo 20 minut, da je bila tvorba aktiviranega estra večinoma končana, nato pa smo dodali še izhodni amin in reakcijsko zmes odstranili z ledene kopeli.

Sintezi spojin **7** in **27** sta na sobni temperaturi slabo potekali, zato smo reakcijski zmesi segrevali na oljni kopeli ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$), s čimer smo reakciji pospešili. Čiščenja produktov smo se lotili z ekstrakcijo. Pri ekstrakciji z 10% citronsko kislino smo se znebili nečistoč z bazičnimi lastnostmi: preostalega EDC in njegovega sečninskega derivata, ki pri reakciji nastaja kot stranski produkt, NMM, DMF in izhodnega amina, ki pa je zaradi šibke bazičnosti v veliko primerih delno ostal v organski fazi. Pri ekstrakciji z nasičeno raztopino NaHCO_3 smo se znebili nečistoč s kislimi lastnostmi: nezreagirane izhodne kisline in HOBr. V primeru sinteze derivatov piridina (**17**, **19**, **32** in **34**) smo namesto 10% citronske kisline uporabili destilirano vodo, saj nismo želeli tvegati izgube produkta v citronsko kislino zaradi bazičnih lastnosti piridina. Podobno smo v primeru sinteze glicinskih in β -alaninskega derivata (**30**, **39** in **43**) namesto 10% uporabili 1% citronsko kislino in tako zmanjšali tveganje za odstranitev Boc zaščitne skupine, ki v primeru alifatskih aminov poteče hitreje kot pri aromatskih aminih. Če bi med ekstrakcijo prišlo do odstranitve zaščitne skupine, bi odščiten produkt izgubili v vodno fazo, saj bi pri tem nastala sol. V primeru ekstrakcije z destilirano vodo oziroma 1% citronsko kislino pa je bilo posledično nekoliko manj uspešno odstranjevanje bazičnih nečistoč, predvsem nezreagiran izhodni amin je večinoma ostal v organski fazi, glede na NMR spektre pa je v določenim primerih, predvsem ko smo za ekstrakcijo uporabili le vodo, v organski fazi ostala tudi manjša količina DMF. Pri spojinah **17**, **30** in **32** smo že po ekstrakciji dobili spajine ustrezne čistosti, pri ostalih pa smo spajine še dodatno očistili s kolonsko kromatografijo. Z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 30 : 1 smo v večini primerov produkt uspeli dobro ločiti od nečistoč, ki sta jih v večini primerov predstavljala nezreagiran izhodni amin ali aktiviran ester.

5.1.3. Sinteza osnovnega skeleta za drugo serijo spojin

Medtem ko smo imeli osnovni skelet za prvo serijo spojin že pripravljen, smo morali osnovni skelet za drugo serijo spojin še sintetizirati. Najprej smo klorirali in nato hidrolizirali spojino **21**. Kloriranje smo izvedli z reagentom sulfuri kloridom, ki je zelo reaktivni, zaradi česar smo reakcijo izvajali v inertni argonovi atmosferi, reagent pa smo dodajali počasi po kapljicah in med tem reakcijsko zmes ohlajali na ledeni kopeli. Reakcijo smo ustavili z dodatkom natrijevega hidrogenkarbonata, ki je reagiral s preostalim sulfuri kloridom in nevtraliziral pri reakciji nastalo klorovodikovo kislino. Z ekstrakcijo produkta nismo uspeli dovolj dobro očistiti, zato smo poskusili še s kristalizacijo iz heksana, a tudi

tako nismo uspeli očistiti produkta. Pri kolonski kromatografiji smo izolirali pričakovani produkt (**22a**) in tudi nečistočo, ki je glede na NMR spekter monokloriran produkt (**22b**). Mesto substitucije s klorom pri spojini **22b** smo predvidevali na podlagi elektronskih vplivov heteroatoma in elektronegativnega substituenta na mestu 2. Pirolni dušik usmerja substituente predvsem na mesto 5 zaradi večje možne delokalizacije pozitivnega naboja in posledično večje resonančne stabilizacije, vendar pa močno elektronegativni substituenti na mestu 2 (kot v našem primeru) zaradi deaktivacije mest 3 in 5 kljub vplivu heteroatoma favorizirajo predvsem elektrofilno substitucijo na mesto 4. (30) Predvideno substitucijo na mestu 4 je potrdil tudi NMR spekter, saj sta sklopitveni konstanti CH pirolnih vodikov nižji kot bi pričakovali pri substituciji na mestu 5 ($J_{1a} = 2,8$ Hz, $J_{2a} = 1,5$ Hz, $J_{1b} = 3,4$ Hz in $J_{2b} = 1,5$ Hz - pri tem predvidevamo, da se vidi sklopitev med CH pirolnima vodikoma in sklopitev CH pirolnih vodikov z NH pirolnim vodikom). Odločili smo se, da bomo sintetizirali še en derivat končne spojine z monokloro substituiranim piroлом (spojava **44**), saj nam bo to dalo dodatne informacije o tem, kako substituenti na pirolu vplivajo na aktivnost spojin. Naslednja stopnja je bila alkalna hidroliza spojine **22a** in **22b**, pri čemer smo dobili derivata karboksilne kisline v obliki soli, po uparitvi THF pa smo z nakisanjem vodne faze spojini pretvorili v neionizirano obliko (spojini **23** in **41**). To je zmanjšalo njuno topnost v vodi, zaradi česar sta se izoborili in smo ju odstranili s filtriranjem. Mehanizem hidrolize je prikazan na sliki 16.

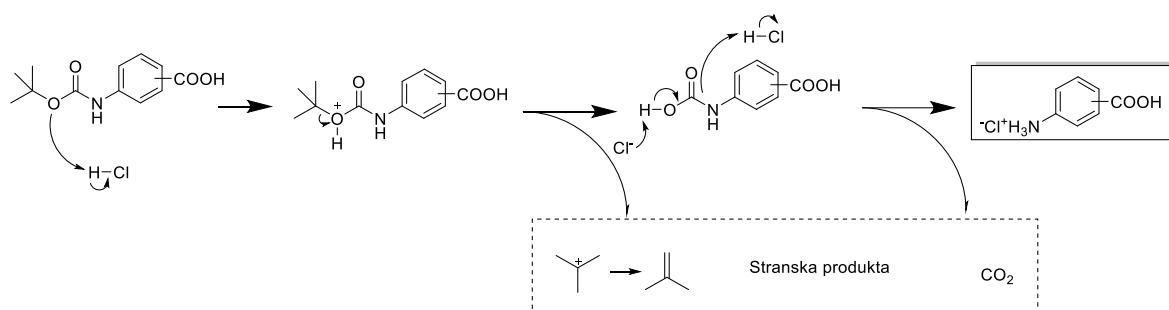


Slika 16: Mehanizem alkalne hidrolize spojine **22a**. Pritejeno po (31).

Kislini smo v naslednji stopnji sklopili z 2,6-diamino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolom po klasičnem postopku z EDC in HOBr, ki je opisan v prejšnjem podpoglavlju. Kljub prisotnosti dveh amino skupin smo sintezo uspeli izvesti selektivno, saj je alifatska amino skupina na mestu 6 precej boljši nukleofil kot aromatska amino skupina na mestu 2, ki ima v neposredni bližini dva elektronegativna heteroatoma, ki znižujeta njeno nukleofilnost.

5.1.4. Odstranjevanje Boc zaščitne skupine

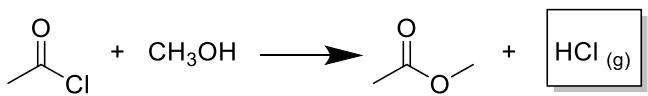
Odstranjevanje zaščitnih skupin je bila zadnja stopnja v sintezi končnih spojin. Boc zaščitne skupine smo odstranili z reakcijo acidolize, ki smo jo izvajali z dvema različnima postopkoma, in sicer z uporabo acetil klorida in z uporabo 4 M HCl v dioksanu. Obe reakciji potekata po istem mehanizmu, prikazanem na sliki 17. Pri reakciji kot stranska produkta nastajata ogljikov dioksid in *terc*-butilni kation, ki se večinoma pretvori v 2-metilpropen, ki je tako kot ogljikov dioksid pri sobni temperaturi plin. Nastanek plinastih stranskih produktov je izredno ugoden s stališča lažje izolacije produkta. V primeru prisotnosti nukleofilov v reakcijski zmesi pa lahko iz *terc*-butilnega kationa nastajajo tudi drugi stranski produkti.



Slika 17: Mehanizem odstranjevanja Boc zaščitne skupine s klorovodikovo kislino. Prizjeno po (32).

5.1.4.1. Odstranjevanje Boc zaščitne skupine z uporabo acetil klorida

Pri tej reakciji pride ob dodatku acetil klorida v metanol do *in situ* nastajanja plinastega HCl, ki nato sodeluje pri odstranitvi zaščitne skupine. Reakcija, s katero smo generirali HCl, je prikazana na sliki 18. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli, saj je topnost plinaste klorovodikove kisline v metanolu boljša pri nižjih temperaturah, in v zaprtem sistemu, da klorovodikova kislina ni izhajala iz bučke. Po dodatku acetil klorida smo počakali pol ure, da se je HCl v celoti generirala, nato pa smo dodali metanolno raztopino zaščitene spojine, pustili na ledeni kopeli še eno uro in nato na sobni temperaturi. V večini primerov reakcija po 24-ih urah še ni potekla do konca, zato smo v drugi bučki še enkrat ponovili generiranje klorovodikove kisline z acetil kloridom in nato dodali reakcijsko zmes iz prve bučke. Tako smo povečali prebitek klorovodikove kisline in pospešili reakcijo, ki je nato popolnoma potekla v 24-72 urah. Izolacija končnih spojin je bila zelo enostavna, saj so bili vsi nastali stranski produkti plini ali lahko hlapne snovi, zato smo le odstranili topilo pod znižanim tlakom.



Slika 18: Reakcija nastanka HCl iz acetil klorida in metanola.

5.1.4.2. Odstranjevanje Boc zaščitne skupine z uporabo 4 M HCl v dioksanu

Ta postopek je v primerjavi s postopkom z uporabo acetil klorida enostavnejši in hitrejši, saj ni bilo potrebno čakati, da se HCl generira, temveč smo zaščiteno spojino le raztopili v dioksanu in nato dodali ustrezno količino že pripravljene 4 M raztopine HCl v dioksanu. Tudi to reakcijo smo izvajali v zaprtem sistemu, da smo preprečili izhajanje HCl iz bučke. Reakcije so po tem postopku precej slabše potekale kot pri postopku z acetil kloridom. Predvidevamo, da je glavni razlog za to slaba topnost izhodnih zaščitenih spojin v dioksanu. Izjema je bila sinteza spojine **31**, pri kateri ni bilo težav s topnostjo izhodne spojine (**30**) in je reakcija popolnoma potekla v 24-ih urah. Zanimivo je, da so se tudi izhodne spojine (**27**, **32** in **34**) pri sintezah spojin **28**, **33** in **35** najprej brez težav raztopile v dioksanu, po dodatku HCl pa so se izborile, kar je preprečevalo nadaljnji potek reakcije. V primeru spojin **32** in **34**, ki sta derivata piridina in zato vsebujeta bazični center, bi to lahko razložili tako, da je ob dodatku HCl prišlo do ionizacije in posledično do slabše topnosti v dioksanu. Spojina **27** pa v svoji strukturi nima nobenega bazičnega centra, ki bi ga HCl lahko protonirala, zato ostaja spremembra topnosti ob dodatku HCl nepojasnjena. To sintezo smo skušali izvesti še z drugim topilom, in sicer smo izhodno spojino **27** raztopili v metanolu, nato pa smo dodali 4 M HCl v dioksanu. Na naše presenečenje se spojina **27** ni raztopila niti v metanolu, posledično pa reakcija ponovno ni potekla. Zaradi opisanih težav smo se pri sintezah spojin **28**, **33** in **35** odločili, da bomo reakcijo skušali pospešiti s segrevanjem. V prvih dveh primerih smo bili uspešni, spojina **35** pa tudi po segrevanju reakcijske zmesi na 95 °C ni nastala. Odločili smo se, da bomo to reakcijo skušali izvesti še s postopkom z acetil kloridom, ki se je izkazal za uspešnega, glavnega razlog za to pa je najbrž dobra topnost izhodne spojine v metanolu.

5.1.5. Komentar neuspešnih sintez

Sintezo spojine **46** smo skušali izvesti s pomočjo reduktivnega aminiranja in sledeče redukcije nitro skupine s katalitskim halogeniranjem. Najprej smo iz izhodnega aldehyda (**45**) in amina (**2**) ob prisotnosti ocetne kisline kot katalizatorja sintetizirali iminski derivat, ki smo ga nato reducirali do aminskega derivata z NaCHBH₃. V naslednji stopnji smo

skušali s katalitskim hidrogeniranjem reducirati nitro skupino do amino skupine. Bučko smo najprej prepihali z inertnim argonom in tako iz nje izgnali zrak, reakcijo pa smo izvajali pod vodikovo atmosfero. S katalizatorjem Pd/C smo ravnali zelo previdno, saj se paladij lahko ob stiku z zrakom vžge. Reakcijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in jo po eni uri, ko je na TLC kromatogramu lisa izhodne spojine izginila, prekinili. Kot možno stransko reakcijo smo pričakovali odstranitev benzilnega fragmenta iz spojine **46**, saj je občutljivost te skupine na katalitsko hidrogeniranje dobro znana. Pri reakciji glede na NMR spekter ni nastala spojina **46** in tudi ne spojina, ki smo jo pričakovali kot stranski produkt. Identiteta nastale spojine nam ostaja neznana.

Sintezo spojine **48** smo skušali izvesti s tremi različnimi postopki, a so bili vsi neuspešni. Najprej smo sintezo skušali izvesti s sklopitvenima reagentoma EDC in HOBr, ki smo ju uporabljali tudi za ostale sklopitvene reakcije, a je potekla samo aktivacija kisline, nastali aktiviran ester pa ni reagiral z amino skupino spojine **2**. Aktiviran ester smo izolirali in še enkrat nastavili reakcijo ter jo skušali pospešiti s segrevanjem na oljni kopeli (72 ur, 60 °C), a tudi tokrat reakcija ni potekla. Amino skupina spojine **2** je šibek nukleofil, saj gre za aromatsko amino skupino, njeno nukleofilnost pa še dodatno znižujeta dva elektronegativna heteroatoma v neposredni bližini, a je reakcija z aktiviranim estrom v vseh ostalih primerih vseeno potekla. Razlog za to, da ta reakcija ni potekla, je torej najbrž v slabši elektrofilnosti nastalega aktiviranega estra. Podobno je potekal tudi tretji poskus sinteze, ki smo ga izvedli s pomočjo drugega sklopitvenega reagenta (HATU). Tudi tokrat je aktiviran ester nastal, a ta ni reagiral s spojino **2**. Pri drugem poskusu sinteze spojine **48** pa nismo uporabili sklopitvenih reagentov, temveč smo kislinski derivat pretvorili v bolj reaktivni kislinski klorid. Za tvorbo kislinskega klorida smo uporabili oksalil klorid ob prisotnosti DMF kot katalizatorja. Oksalil klorid smo zaradi njegove reaktivnosti dodali med hlajenjem reakcijske zmesi na ledeni kopeli, nato pa smo pustili, da je reakcija potekala na sobni temperaturi. Reakcijo smo izvajali v zaprtem sistemu in pod inertno argonovo atmosfero, saj je nastali kislinski klorid zelo reaktivni, prisotnost zračne vlage pa bi reakcijo pomaknila v smer tvorbe reaktanta. Izolacija je potekala tako, da smo topilo odstranili pod znižanim tlakom, preostanek raztopili v dietiletru in nato še tega odstranili pod znižanim tlakom. Ta postopek smo ponovili trikrat. Tako smo se znebili večine HCl, ki je nastala pri reakciji tvorbe kislinskega klorida. Nato smo dodali še spojino **2** in trietilamin kot bazo za nevtralizacijo HCl. Pri reakciji je nastalo veliko število stranskih

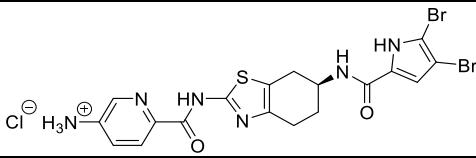
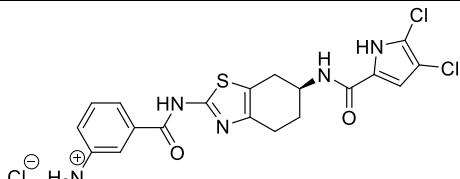
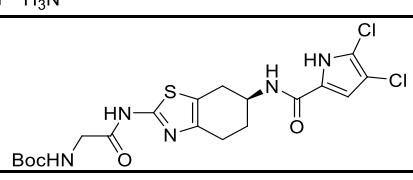
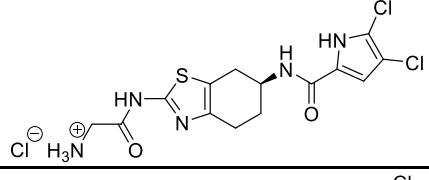
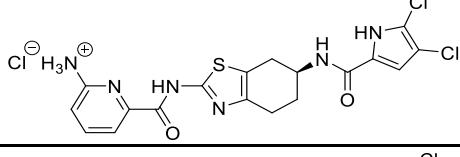
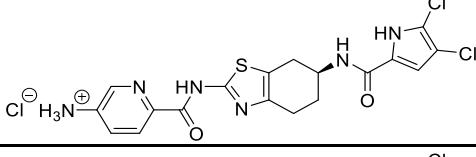
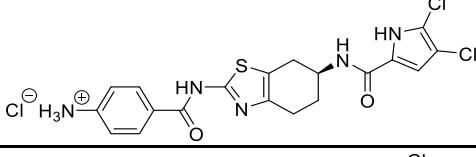
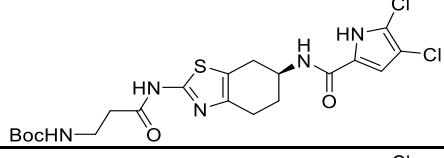
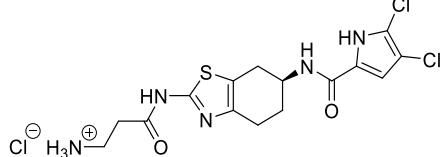
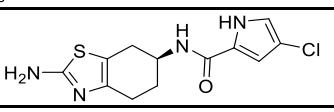
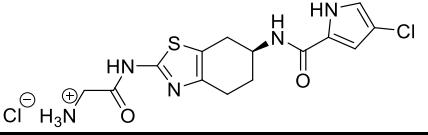
produktov, zato spojine **48** iz reakcijske zmesi nismo uspeli izolirati. Med poskusom izolacije z ekstrakcijo je nastala manjša količina oborine, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. NMR spekter oborine je pokazal, da je to naš produkt, a na žalost ni bil čist. Po treh neuspešnih poskusih smo sintezo spojine **48** opustili.

5.2. Rezultati biokemijskih testiranj

Na rekombinantnem encimu DNA-girazi iz bakterije *E. coli* je bilo testiranih štirinajst sintetiziranih spojin, in sicer spojine **4**, **8**, **18**, **20**, **28**, **30**, **31**, **33**, **35**, **37**, **39**, **40**, **42** in **44**. Rezultati so podani v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima pri koncentraciji 1 µM ali srednje zaviralne koncentracije (IC₅₀). Rezidualna aktivnost pri koncentraciji 1 µM je bila določena vsem testiranim spojinam in nam pove kolikšna je izguba aktivnosti encima zaradi prisotnosti zaviralca v določeni koncentraciji. Pri tem RA = 100% pomeni aktivnost encima brez prisotnosti zaviralca, RA = 0% pa pomeni, da je delovanje encima popolnoma zavirano. Nižja rezidualna aktivnost torej pomeni, da je spojina boljši zaviralec. Srednja zavirala koncentracija je bila določena samo eni spojini (spojava **8**) in nam pove, pri kateri koncentraciji zaviralca aktivnost encima pada na polovico. Rezultati testiranj so prikazani v preglednici II. Za lažjo primerjavo vpliva substitucije na pirolamidnem delu smo v tabelo dodali še rezultate testiranj spojin TLK-4, TLK-5 in TLK-6, ki so jih sintetizirali in testirali predhodniki.

Preglednica II: Zavirala aktivnost spojin na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* podana v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima pri koncentraciji 1 µM ali vrednosti IC₅₀.

Oznaka	Struktura	RA (1 µM)	IC ₅₀ (µM)
4		73%	/
8		37%	2,07 ± 0,14
18		58%	/

20		51%	/
28		87%	/
30		17%	/
31		77%	/
33		90%	/
35		87%	/
37		91%	/
39		73%	/
40		89%	/
42		107%	/
44		113%	/

TLK-4		26%	0,686
TLK-5		62%	1,11
TLK-6		55%	0,875

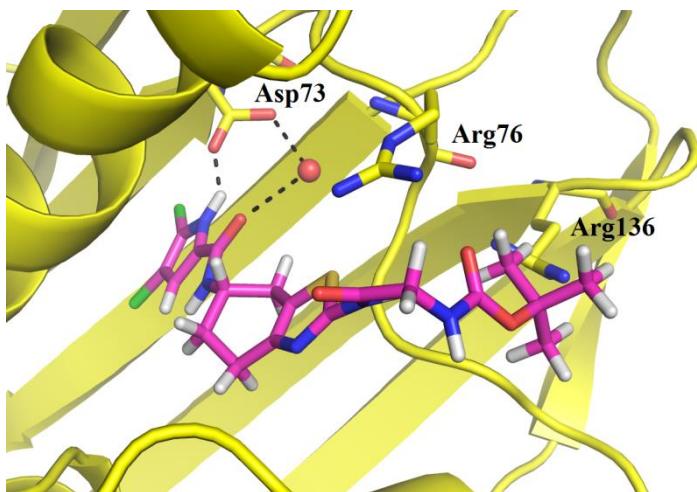
/ = ni bil določen

Primerjava RA kaže, da na zaviralno aktivnost spojin pomembno vpliva substitucija na pirolamidnem fragmentu. Primerjava parov z enako substitucijo na amino skupini na mestu 2 (**8-37**, **18-33**, **20-35**, **30**-TLK-4, **31**-TLK-5 in **40**-TLK-6) kaže, da so derivati dibromopirolamida boljši zavirci kot derivati dikloropirolamida. Izjema je spojina **30**, ki ima pri koncentraciji 1 µM nižjo rezidualno aktivnost od analognega dibromopirolamidnega derivata. Testirana monokloropirolamidna derivata ne izkazuje nobene zaviralne aktivnosti, kar kaže na to, da je za aktivnost spojin na mestu 5 pirolamida nujno potrebna prisotnost skupine, ki je sposobna tvoriti hidrofobne interakcije.

Na zaviralno aktivnost spojin močno vpliva tudi substitucija na amino skupini na mestu 2. Največjo zaviralno aktivnost med testiranimi spojinami izkazuje glicinski derivat (spojina **30**). To je še posebej presenetljivo, ker ta spojina ni ena izmed načrtovanih končnih spojin, temveč njen zaščiten deravat. Pozitiven vpliv prisotnosti zaščitne skupine na zaviralno aktivnost opazimo pri vseh alifatskih substituentih na amino skupini na mestu 2. Ta vpliv je najbolj izrazit pri spojini **31** in njenem zaščitenem derivatu spojini **30**, nekoliko manj pa pri spojini **40** in zaščitenem derivatu **39** ter spojini TLK-5 in zaščitenem derivatu TLK-4. Ta ugotovitev je presenetljiva, saj bi pričakovali, da voluminozna zaščitna skupina predstavlja sterično oviro pri vezavi spojine v vezavno mesto, vendar kot kaže ponuja možnosti za dodatne interakcije z vezavnim mestom. Primerjava zaščitenih spojin **30** in **39** kaže, da dodaten C atom pri β-alaninskem derivatu v primerjavi z glicinskim derivatom pomeni precejšnje znižanje zaviralne aktivnosti. Nasprotno pa ta vpliv ni izražen pri nezaščitenih derivatih, saj je zaviralna aktivnost parov spojin **31** in **40** ter TLK-5 in TLK-6 podobna. Zaščitenih derivatov spojin, ki imajo na amino skupini na mestu 2 aromatske

substituente, nismo testirali, saj smo pričakovali, da bi slabša topnost teh spojin predstavljala težavo pri testiranju. Zato ne moremo oceniti, če prisotnost zaščitne skupine poveča zaviralno aktivnost le pri glicinskih in β -alaninskih derivatih ali tudi pri sterično večjih aromatskih derivatih.

Vezavo končnih spojin v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz bakterije *E. coli* smo preučevali s pomočjo molekulskega sidranja s programom FlexX (LeadIT, BioSolveIT). Program je napovedal vezavo pirolamidnega dela spojin v hidrofobni žep, v katerega se sicer veže adeninski obroč molekule ATP, pri čemer NH skupina pirola tvori vodikovo vez s stransko verigo Asp73, medtem ko karbonilna skupina amida tvori vodikovo vez preko kristalne molekule vode z istim aminokislinskim ostankom. Substituenti na amino skupini na mestu 2 osnovnega skeleta pa tvorijo dodatne interakcije z Arg136, ali pa so usmerjeni proti topilu. Predvidena vezava spojine **30** je prikazana na sliki 19. Ker program ne predvidi nobene dodatne interakcije Boc-Ala dela spojine z vezavnim mestom, ne moremo na osnovi sidranja razložiti opažene najboljše aktivnosti te spojine v encimskem testu pri 1 μM .



Slika 19. Predvidena vezava spojine **30** v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze iz bakterije *E. coli* (encim: rumena; zaviralce: vijolična; vodikove vezi: črna).

Drugo najvišjo zaviralno aktivnost na encimu kaže spojina **8**, ki je poleg spojine **30** edina testirana spojina, ki je pri koncentraciji 1 μM znižala aktivnost encima na manj kot 50%. Spojini **8** je bila določena tudi srednja zaviralna koncentracija, ki je nekoliko višja od pričakovane glede na določeno rezidualno aktivnost pri koncentraciji 1 μM . Primerjava spojine **8** s spojinama **18** in **20** kaže, da nadomestitev benzena s piridinom zmanjša

zaviralno aktivnost spojin. Pri dikloropirolamidnih derivatih (spojine **28**, **33**, **35** in **37**) pa kot kaže ta zamenjava ne vpliva na aktivnost. Težko je oceniti, če je ta razlika res posledica substitucije na pirolamidnem delu, ali pa je določena rezidualna aktivnost pri spojini **8** nekoliko prenizka, na kar nakazuje tudi za to spojino določena srednja zaviralna koncentracija. Za večjo zanesljivost bi morali ponovno določiti rezidualno aktivnost za spojino **8** pri koncentraciji 1 µM ali pa določiti srednjo zaviralno koncentracijo še pri ostalih spojinah. Primerjava aromatskih derivatov z različno substitucijo amino skupine na aromatskem obroču (**18-20**, **28-37** in **33-35**) kaže, da ta ne vpliva bistveno na zaviralno aktivnost, medtem ko uvedba dodatne amino skupine (spojina **4**) negativno vpliva na le-to.

O uporabnosti sintetiziranih spojin nam več kot testiranje na encimu pove testiranje na protibakterijsko aktivnost. Testiranje je bilo izvedeno na Fakulteti za farmacijo v Helsinkih. Vsem spojinam, ki so bile testirane na encimu, in spojini **43**, ki jo je za testiranje na encimu zmanjkalo, so najprej določili delež zaviranja rasti bakterij na bakterijski sevih *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* in *P. aeruginosa* ter na dveh mutiranih sevih *E. coli*. Prvi mutiran sev je imel izbit gen tolC, ki je pomemben za normalno funkcijo izlivnih črpalk, drugi pa gen lpxC, ki je pomemben za normalno delovanje zunanjega membrane bakterij. Rezultati so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Delež zaviranja rasti bakterij pri koncentraciji inhibitorja 50 µM po 24-ih urah. Deleži višji od 80% so označeni s krepko pisavo.

Oznaka	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> tolC	<i>E. coli</i> lpxC
4	38,7%	37,4%	0,0%	26,3%	100,4%	8,3%
8	13,8%	17,9%	0,0%	35,2%	99,3%	4,8%
18	39,1%	11,4%	0,0%	7,8%	0,0%	8,5%
20	26,1%	7,5%	0,0%	22,1%	98,1%	9,0%
28	9,9%	23,0%	0,0%	12,1%	97,2%	13,5%
30	30,1%	39,6%	9,1%	13,4%	100,7%	23,9%
31	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%	39,3%	0,0%
33	46,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
35	21,9%	0,0%	0,0%	15,2%	17,4%	0,0%

<u>37</u>	3,4%	2,2%	0,0%	19,5%	99,8%	0,0%
<u>39</u>	24,5%	28,6%	0,4%	11,4%	98,2%	20,7%
<u>40</u>	9,5%	25%	0,0%	8,7%	5,8%	0,0%
<u>42</u>	73,5%	100,0%	0,0%	16,1%	100,0%	6,9%
<u>43</u>	11,6%	12,8%	0,0%	14,6%	9,5%	9,1%
<u>44</u>	4,0%	4,3%	0,0%	0,6%	0,0%	0,1%

Rezultati kažejo, da so naše spojine večinoma bolje aktivne proti po Gramu pozitivnima bakterijama *E. faecalis* in *S. aureus* kot proti po Gramu negativnima bakterijama *P. aeruginosa* in *E. coli*. Proti slednji so se testirane spojine izkazale kot povsem neaktivne, saj ni nobena zavrla rasti bakterij za več kot 10%. Glede na rezultate testiranja na mutiranih sevih *E. coli* je glavni razlog za to črpanje spojin iz bakterijskih celic preko izlivnih črpalk, saj je kar 8 testiranih spojin (**4, 8, 20, 28, 30, 37, 39 in 42**) skoraj popolnoma zavrlo rast bakterij *E. coli* z izbitim genom tolC, medtem ko aktivnost spojin proti *E. coli* z izbitim genom lpxC ni bila bistveno povečana glede na *E. coli* z ohranjenim genom.

Spojina, ki je izkazala največje protibakterijsko delovanje proti nemutiranim organizmom, je spojina **42**, ki je zavrla rast *E. faecalis* za 73,5% in popolnoma zavrla rast *S. aureus*. To je nekoliko presenetljivo, saj je ta spojina derivat monokloropirolamida s prosto amino skupino na mestu 2 in pri testiranju na DNA-girazi pri koncentraciji 1 µM ni izkazala nobene zaviralne aktivnosti. To lahko pojasnimo tako, da smo morda na encimskem testu spojine **42** uporabili prenizko koncentracijo, da bi pokazali zaviralno aktivnost spojine, pri testiranju na bakterijah pa je bila le-ta prisotna v dovolj visoki koncentraciji, da je delovala protibakterijsko preko zaviranja DNA-giraze. Upoštevati pa moramo tudi, da so bili encimski testi izvedeni na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* in ne iz *S. aureus*, spojine pa lahko izkazujejo različne zaviralne aktivnosti na teh dveh encimih. Zanimivo bi bilo izvesti dodatna testiranja na DNA-girazi in topoizomerazi IV iz *S. aureus*, ki bi nam morda pomagala razjasniti vzrok za protibakterijsko delovanje spojine **42**. Alternativna možnost je, da ta spojina protibakterijsko deluje po drugem mehanizmu. Substitucija na amino skupini na mestu 2 spojine **42** negativno vpliva na protibakterijsko aktivnost, saj ostala testirana derivata monokloropirolamida nista aktivna. Primerjava spojin **30** in **31** ter **39** in **40** kaže, da sta zaščitena derivata **30** in **39** bolj aktivna, kar se sklada z zaviralno

aktivnostjo spojin na DNA-girazi. Zanimivo je, da se derivata piridina, spojini **18** in **20**, kljub veliki podobnosti v strukturi in podobni zaviralni aktivnosti DNA-giraze, močno razlikujeta v protibakterijski aktivnosti proti *E. coli* z izbitim genom za tolC, saj je prva neaktivna, druga pa pri koncentraciji 50 µM skoraj popolnoma zavre rast teh bakterij. Spojini **33** in **35**, ki sta tudi derivata piridina, sta neaktivni proti *E. coli* z izbitim genom za tolC.

Spojinam, ki so pri koncentraciji 50 µM po 24-ih urah zavre rast bakterij za vsaj 80%, sta bili določeni še minimalna zaviralna koncentracija (MIC) in minimalna baktericidna koncentracija (MBC). Minimalna zaviralna koncentracija je bila določena kot najnižja koncentracija spojine, ki zavre rast mikroorganizma za vsaj 90%, minimalna baktericidna koncentracija pa kot najnižja koncentracija spojine, ki ubije vsaj 99,9% mikroorganizmov. Rezultati so zbrani v preglednici IV. Testiranje je potekalo na intervalu koncentracij 0,78 µM do 75 µM.

Preglednica IV: Vrednosti MIC in MBC izbranih spojin za bakteriji *S. aureus* in *E. coli* z izbitim genom tolC, podane v µM.

Oznaka	<i>S. aureus</i> MIC [µM]	<i>S. aureus</i> MBC [µM]	<i>E. coli</i> tolC MIC [µM]	<i>E. coli</i> tolC MBC [µM]
4	/	/	12,5	75
8	/	/	12,5	50
20	/	/	50	> 75
28	/	/	50	> 75
30	/	/	50	> 75
37	/	/	12,5	25
39	/	/	50	50
42	50	> 75	25	> 75

/ = ni bila določena

MIC in MBC na *S. aureus* sta bili določeni le za spojino **42**. Vrednost MIC za to spojino znaša 50 µM, vrednost MBC pa je višja od zgornje vrednosti intervala za določanje, ki znaša 75 µM. Ta dva rezultata kažeta, da spojina **42** deluje protibakterijsko le pri relativno visokih koncentracijah, za boljše protibakterijsko delovanje je torej potrebno spojino še

optimizirati. MIC in MBC na *E. coli* z izbitim genom tolC sta bili določeni osmim spojinam (**4**, **8**, **20**, **28**, **30**, **37**, **39** in **42**). Najnižja MIC je bila določena spojinam **4**, **8** in **37**. Vse tri spojine imajo podobno strukturo, prva je derivat diaminobenzena, ostali dve pa sta derivata anilina. Spojina **28**, ki je prav tako derivat anilina, a z drugačno substitucijo kot spojini **8** in **37**, kaže slabšo protibakterijsko aktivnost proti *E. coli* z izbitim genom tolC kot spojini **8** in **37**. Mesto substitucije kot kaže vpliva na aktivnost, čeprav encimski test te razlike ni pokazal. Štirim testiranim spojinam je bila določena MBC pod 75 µM, med njimi najnižja spojini **37**. Ta je derivat dikloropirolamida in kaže baktericidni učinek pri nižji koncentraciji kot njen analogni dibromopirolamidni derivat, spojina **8**, čeprav slednji kaže večjo zaviralno aktivnost na encimu. Obema spojinama pa je bila določena enaka vrednost MIC.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali serijo derivatov (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida kot potencialnih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze in Hsp90. Pri sintezah nismo imeli večjih težav, z izjemo sinteze spojin **46** in **48**, pri katerih nismo uspeli izolirati želenega produkta kljub uporabi različnih sinteznih metod. Pri določenih reakcijah smo imeli težave s topnostjo izhodnih spojin v topilu. V primeru zaščite derivatov aminopiridinkarboksilne kisline smo to težavo rešili tako, da smo predhodno esterificirali karboksilni skupini spojin **9** in **13** in tako povečali njuno topnost v THF ter izboljšali potek reakcije zaščite. V ostalih primerih smo težave s topnostjo rešili s segrevanjem in uporabo ultrazvočne kadičke, v primeru neuspešnosti teh metod pa smo poskušali najti bolj ustrezno topilo.

Rezultati testiranja so pokazali, da je spojina z največjo zaviralno aktivnostjo na izoliranem encimu DNA-girazi spojina **30**, ki je glicinski derivat z zaščiteno amino skupino in dikloro substitucijo na pirolamidnem delu. Tudi v ostalih primerih so se zaščiteni derivati izkazali kot boljši zaviralci kar je nekoliko presenetljivo, saj bi pričakovali, da sterično velika zaščitna skupina ovira vezavo v vezavnem mestu encima, a kot kaže nudi možnost dodatnih interakcij z vezavnim mestom. V večini primerov so se dibromopirolamidni derivati izkazali kot boljši zaviralci od dikloropirolamidnih analogov, izjema je le spojina **30**. Zanimalo nas je tudi, kakšna je zaviralna aktivnost piridinskih derivatov (spobine **18**, **20**, **33** in **35**) v primerjavi z derivati benzena (spobine **4**, **8**, **28** in **37**), saj piridinski dušik nudi dodatno možnost za tvorbo interakcij, a se je izkazalo, da ta zamenjava bistveno ne vpliva na zaviralno aktivnost, oziroma jo v nekaterih primerih celo zmanjša.

Zaviranje encima pa je le prvi pogoj, da ima spojina tudi protibakterijsko delovanje. Pomembno je tudi, da ima spojina ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, da preide celično steno bakterij, se izogne ostalim mehanizmom intrinzične odpornosti bakterij ter uspešno pride do tarče. Rezultati testiranja na protibakterijsko aktivnost kažejo, da najbolj obetavna spojina glede na encimsko testiranje, spojina **30**, nima tudi najaktivnejšega protibakterijskega delovanja. Testirane spobine kažejo boljšo protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivnim bakterijam kot proti po Gramu negativnim bakterijam. Pri koncentraciji 50 µM je rast po Gramu pozitivnih bakterij najbolj zavrla spojina **42**, ki pa pri encimskem testu na DNA-girazi iz bakterije *E. coli* pri koncentraciji 1 µM ni pokazala nobene zaviralne aktivnosti. Zanimivo bi bilo raziskati, če je to posledica tega, da spojina

42 protibakterijsko deluje po drugem mehanizmu in ne prek zaviranja DNA-giraze, ali pa je to neskladje le posledica tega, da spojina nima zaviralne aktivnosti na DNA-girazo iz bakterije *E. coli*, deluje pa zaviralno na DNA-girazo iz *S. aureus*. Spojini 42 sta bili določeni tudi MIC in MBC na *S. aureus*, ki pa sta relativno visoki. Spojino je torej potrebno optimizirati, da bo protibakterijsko delovanje izraženo pri nižji koncentraciji. Testirane spojine so še posebej slabo aktivne proti po Gramu negativni bakteriji *E. coli*. To je predvsem posledica črpanja spojin iz bakterijske celice s pomočjo izlivnih črpalk, saj spojine kažejo precej večjo protibakterijsko delovanje proti mutiranem sevu *E. coli* brez gena tolC, ki je potreben za normalno delovanje izlivnih črpalk.

Čeprav nismo odkrili nove spojine z visoko aktivnim protibakterijskim delovanjem, smo z rezultati, pridobljenimi v okviru te magistrske naloge, prispevali dodatne informacije, ki bodo pomagale pri nadaljnji optimizaciji pirolamidnega tipa zaviralcev DNA-giraze. V nadalnjem raziskovanju je pomembno predvsem najti spojine, ki bodo ob visoki zaviralni aktivnosti na DNA-girazo imele tudi ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, da se bodo lahko uspešno prebile do tarče v bakteriji, kar predstavlja velik izziv še posebej pri po Gramu negativnih bakterijah.

Testiranja na vezavo spojin na Hsp90 in na protivirusno delovanje še vedno potekajo na Fakulteti za farmacijo v Helsinki, zato ti rezultati niso mogli biti vključeni v to magistrsko naložbo.

7. LITERATURA:

1. Méthot P-O, Alizon S.: What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 2014; 5(8): 775-85.
2. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, dostopano na spletnem naslovu: http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_Report_Infectious_Diseases.pdf, 1.7.2016
3. Cohen TS, Parker D.: Microbial pathogenesis and type III interferons. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2016; 29: 45-51.
4. Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016; 71(3): 572-5.
5. Foye WO, Lemke TL, Williams DA.: Foye's principles of medicinal chemistry, 6. izdaja, Philadelphia, 2008: 1028-31.
6. Bryan-Marrugo OL, Ramos-Jiménez J, Barrera-Saldaña H, Rojas-Martínez A, Vidaltamayo R, Rivas-Estilla AM.: History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina Universitaria* 2015; 17(68): 165-74.
7. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA.: Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57 (4): 1147–1166.
8. Geller R, Taguwa S, Frydman J.: Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1823(3): 698-706.
9. Greener M.: Protecting the antibiotic miracle. *Nurse Prescribing* 2012; 10(6): 288-91.
10. Ness V, Price L, Currie K, Reilly J.: Antimicrobial resistance and prescribing behaviour. *Nurse Prescribing* 2014; 12(5): 248-53
11. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV.: Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2015; 13(1): 42-51.
12. Theuretzbacher U.: Review: Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013; 1: 63-9.
13. Frydman J, Andino-Pavlovsky R, Geller R: Methods of treating viral infection. United states patent, Patent number US 20100093824 A1, date of patent Apr 15, 2010
14. Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1823(3): 698-706

15. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology & Biotechnology* 2011; 92(3): 479-97.
16. Tomašič T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvão S., Tamella P., Banjanac M., Ergović G., Anderluh M., Peterlin Mašić L., Kikelj D.: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(14): 5501-21.
17. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV.: Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology* 2014; 22(8): 438-45.
18. Ehmann DE, Lahiri SD.: Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. *Current Opinion in Pharmacology* 2014; 18: 76-83.
19. Zidar N, Tomašič T, Macut H, Sirc A, Brvar M, Montalvão S, Tammela P., Solmajer T., Peterlin Mašić L., Ilaš J., Kikelj D.: New N-phenyl-4,5-dibromopyrrolamides and N-Phenylindolamides as ATPase inhibitors of DNA gyrase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 117: 197-211.
20. Nagy PD, Wang RY, Pogany J, Hafren A, Makinen K.: Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 2011; 411(2): 374-82.
21. Bhat R, Tummalaapalli SR, Rotella DP. Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57 (21): 8718-8728.
22. Das I, Basantray I, Mamidi P, Nayak TK, Pratheeck B. M., Chattopadhyay S, Chattopadhyay S: Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection. *PLoS One* 2014; 9(6): e100531
23. Shan GZ, Peng ZG, Li YH, Li D, Li YP, Meng SA, Gao LY, Jiang JD, Li ZR.: A novel class of geldanamycin derivatives as HCV replication inhibitors targeting on Hsp90: synthesis, structure-activity relationships and anti-HCV activity in GS4,3 replicon cells. *The Journal of Antibiotics* 2011; 64(2): 177-82.
24. Burlison JA, Neckers L, Smith AB, Maxwell A, Blagg BSJ. :Novobiocin: Redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of Hsp90. *Journal of the American Chemical Society* 2006; 128(48): 15529-36.

25. Dutta R, Inouye M.: Review: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. Trends in Biochemical Sciences 2000; 25: 24-8.
26. Tomašič T, neobjavljeni rezultati
27. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm, 11.7.2016
28. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Boc2O_DMAP_Mech.htm, 12.7.2016
29. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm, 12.7.2016
30. Tišler M.: Organska kemija, 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 1991: 282, 283
31. Zucco C, Lima CF, Rezende MC, Vianna JF, Nome F.: Mechanistic studies on the basic hydrolysis of 2,2,2-trichloro-1-arylethanones. The Journal of Organic Chemistry 1987; 52(24): 5356-9.
32. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm, 12.7.2016