UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDRAŽ PALANDAČIČ

POVEZAVA MED FIZIKALNO-KEMIJSKIMI LASTNOSTMI IN PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDRAŽ PALANDAČIČ

POVEZAVA MED FIZIKALNO-KEMIJSKIMI LASTNOSTMI IN PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE

CORRELATION BETWEEN PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF DNA GYRASE INHIBITORS AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču za strokovno pomoč in nasvete pri nastajanju magistrske naloge. Iskrena hvala tudi moji družini in vsem bližnjim.

Izjava

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

Andraž Palandačič

Ljubljana, 2016

VSEBINA

1 UVOD 1

1.1 Zgodovina razvoja protibakterijskih učinkovin 1

1.2 Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin 2

1.2.1 Zaviralci sinteze bakterijske celične stene 2

1.2.2 Antimetaboliti 2

1.2.3 Zaviralci sinteze proteinov 3

1.2.4 Zaviralci sinteze jedrnih kislin 3

1.2.5 Bakterijska odpornost 4

1.3 Bakterije 5

1.3.1 Po Gramu pozitivne bakterije 5

1.3.2 Po Gramu negativne bakterije 5

1.3.3 DNA-giraza 7

1.4 Zaviralci DNA-giraze 8

1.4.1 Zaviralci DNA-giraze A 8

1.4.2 Zaviralci DNA-giraze B 10

1.4.3 Zaviralci, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo (FFA zaviralci) 11

1.5 Fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin 12

2 NAMEN DELA 14

3 METODE 15

3.1 Zbiranje literature 15

3.2 Risanje spojin 15

3.3 Izračun molekulskih deskriptorjev 16

4 REZULTATI IN RAZPRAVA 17

4.1 Srednja inhibitorna koncentracija 17

4.1.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam 18

4.1.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam 18

4.1.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin 19

4.2 Molekulska masa 20

4.2.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam 20

4.2.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam 21

4.2.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *24*
4.3 Porazdelitveni koeficient ... 24
4.3.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *24*
4.3.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *25*
4.3.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *27*
4.4 Število akceptorjev vodikove vezi ... 28
4.4.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *28*
4.4.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *29*
4.4.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *31*
4.5 Število donorjev vodikove vezi ... 32
4.5.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *32*
4.5.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *33*
4.5.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *34*
4.6 Število aromatskih obročev ... 34
4.6.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *34*
4.6.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *35*
4.6.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *37*
4.7 Polarna površina molekule ... 38
4.7.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *38*
4.7.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *39*
4.7.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *41*
4.8 Prostornina molekule ... 41
4.8.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam ... *41*
4.8.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam ... *43*
4.8.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin ... *44*
4.9 Obetavne molekule zaviralcev DNA-giraze B ... 45
4.10 Pomanjkljivosti analize ... 47
5 SKLEP ... 49
6 LITERATURA ... 51
7 PRILOGA ... 57

POVZETEK

Porast bakterijske odpornosti v zadnjem desetletju terja raziskovalce v iskanje novih protibakterijskih učinkovin. Predvsem encim DNA-giraza se ponuja kot obetavna protibakterijska tarča, saj je prisotna pri popravljanju in podvojevanju DNA, tako da njena inhibicija prepreči rast bakterij. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot giraze A in dveh podenot giraze B. Prva omogoča cepitev in ponovno združitev molekule DNA, druga pa s hidrolizo molekul ATP zagotavlja potrebno energijo za encimsko reakcijo.

Z računalniško obdelavo strukturnih spojin zaviralcev DNA-giraze B smo izračunali nekatere fizikalno-kemijske lastnosti molekul (molska masa, porazdelitveni koeficient, število akceptorjev in donorjev vodikove vezi, prostornina in polarna površina molekule). Ob primerjavi le-teh pa smo ugotovili, da so za nove učinkovine zaželene točno določene lastnosti. V nasprotnem primeru se sicer mnoge spojine, ki imajo velik potencial kot odlični zaviralci DNA-giraze *in vitro*, v živih bakterijah ne izkažejo za dovolj učinkovite. Struktura mora vsebovati vsaj štiri aromatske obroče, da dosežemo konformacijo molekule, ki se prilega v vezavno mesto na podenoti B. Molekulska masa ne sme biti prevelika (<800 Da), da lahko molekula vstopa v celico tudi skozi majhne kanalčke (porine) v bakterijski steni. Zaželeno je, da ima molekula do 10 akceptorjev in do 4 donorje vodikove vezi, saj lahko tako v vezavnem mestu tvori številne interakcije in tako oponaša vezavo molekule ATP. Izračunane prostornine molekule so se nahajale v območju med 200 $Å^3$ in 400 $Å^3$. Dostop do vezavnega mesta na DNA-girazi B je oviran z ozkimi vrati, skozi katere lahko vstopajo le dovolj majhne molekule. Kar se tiče polarnosti molekule so najboljše rezultate dosegale spojine z logaritemsko vrednostjo porazdelitvenega koeficienta med 1 in 3. Preveč polarne spojine so podvržene hitremu črpanju iz celice zaradi posebnih bakterijskih izlivnih črpalk, premalo polarne pa težje prehajajo bakterijsko steno. Prav tako pa molekula s tarčo tvori tako hidrofobne interakcije in mora zato vsebovati nepolaren fragment, kot tudi vodikove vezi preko polarnih funkcionalnih skupin. Še posebej dobre rezultate pa dajejo spojine, ki so lahko tvorijo 'ion dvojček' in tiste z dvojnim delovanjem, ki lahko zavrejo tudi delovanje topoizomeraze IV.

Pridobljeni podatki bodo koristni za nadaljnjo optimizacijo in razvoj novih zaviralcev DNA-giraze B kot protibakterijskih učinkovin.

Ključne besede: DNA-giraza, molekulska masa, porazdelitveni koeficient, protibakterijske učinkovine, zaviralec

ABSTRACT

Increasing occurence of bacterial resistance in the last decade is the most important reason for continous need for development of new antibacterial drugs. One of the most promising targets for development of novel antibacterials is DNA gyrase, which is involved in replication and reparation processes of DNA and therefore its inhibition stops bacterial growth. The enzyme consists of two DNA gyrase A subunits, which are responsible for breakage and reunion of DNA double strand, and two DNA gyrase B subunits, which provide the energy for the enzymatic reaction by ATP hydrolysis.

Based on the analysis of physico-chemical properties of the known DNA gyrase B inhibitors we can conclude that there are certain patterns of how the structure of new, promising molecules should look like. A lot of molecules can be very potent inhibitors of DNA gyrase B *in vitro*, but when tested on bacterial strains they lack potent antibacterial activity, particularly against Gram negative strains. Molecular structure should contain at least four aromatic rings to adopt proper conformation that fits best the binding site of the enzyme. Furthermore, molecular weight should be lower than 800 Da, so that molecule can use small channels called porins in bacterial cell wall to penetrate into the cell. It is also desired for the inhibitor to possess up to 10 hydrogen bond acceptors and up to 4 hydrogen bond donors. Calculated volumes of molecules were between 200 $Å^3$ and 400 $Å^3$, which is related to the fact that the binding site is accessed through narrow gate, which allows only molecules small enough to enter. Regarding the partition coefficient, the best antibacterial activity is observed for molecules with logP values between 1 and 3. Molecules that are more polar are actively pumped out of the bacteria and hence lose their effect, while too lipophilic compounds have difficulties with penetration through the bacterial cell wall. DNA gyrase B inhibitors should also contain a hydrophobic fragment for formation of hydrophobic interactions with the binding site residues, as well as polar groups for hydrogen bond formation. Especially potent antibacterial activity was found for DNA gyrase B inhibitors acting like zwitterions and for dual inhibitors that are able to inhibit DNA gyrase and topoisomerase simultaneously.

Key words: antibacterial drugs, DNA gyrase, molecular weight, inhibitor, partition coefficient

SEZNAM OKRAJŠAV

Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
clogP	izračunan logaritem porazdelitvenega koeficienta
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E. coli	*Escherichia coli*
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
GyrA	podenota A DNA-giraze
GyrB	podenota B DNA-giraze
H-akc	akceptor vodikove vezi
H-don	donor vodikove vezi
His	histidin
IC_{50}	srednja inhibitorna koncentracija
Ile	izolevcin
Leu	levcin
Lys	lizin
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
M	molekulska masa
MV	molekulska prostornina
PSA	polarna površina molekule
RNA	ribonukleinska kislina
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
Thr	treonin
Tyr	tirozin
Val	valin

1 UVOD

1.1 Zgodovina razvoja protibakterijskih učinkovin

Odkritje antibiotikov na začetku 19. stoletja je zagotovo eden pomembnejših mejnikov v zgodovini farmacije. Različne bakterijske okužbe so bile v preteklosti težko ozdravljive in so se pogosto končale s smrtjo. Prav odkritje protibakterijskih učinkovin, ki bodisi uničujejo (baktericidi) ali zavirajo rast in razvoj (bakteriostatiki) mikroorganizmov, je tako doprineslo k boljšemu nadzoru nad bakterijskimi okužbami in posledično manjši smrtnosti. Začetnika na tem raziskovalnem področju, ki sta najbolj zaslužna za kasnejši bliskovit razvoj protibakterijskih učinkovin sta bila Paul Ehrlich in Alexander Fleming.

Ehrlich je med raziskovanjem anilina in ostalih sintetičnih barvil opazil, da le-ta obarvajo le nekatere mikrobe in ne ostalih. Tako je prišel na idejo o obstoju takoimenovane "magične krogle", ki bi selektivno delovala samo na mikroorganizme in ne bi škodovala celicam gostitelja. V iskanju zdravila za sifilis, ki je bil v tistem času neozdravljiva bolezen, je pričel s sintetiziranjem številnih podobnih spojin. Vse to z namenom najti tisto, katere delovanje bi bilo omejeno izključno na bakterijo *Treponema pallidum*, povzročiteljico sifilisa. Leta 1909 je takšno rešetanje spojin dalo prvi uspeh, saj je skupaj s svojimi sodelavci v skupini organoarzenovih derivatov odkril spojino arsfenamin, prvo sintezno protibakterijsko učinkovino.

Na podlagi Ehrlichovih testiranj se je s podobnim načinom dela pospešilo odkrivanje novih zdravilnih učinkovin. Velja omeniti sintezo prvih sulfonamidov leta 1935, za katere je zaslužen Gerhard Domagk, kemik nemške farmacevtske družbe Bayer. Pomemben doprinos k razvoju protibakterijskih učinkovin pa je prispeval tudi Alexander Fleming. Fleming je bil priznan raziskovalec, vendar ni prav veliko skrbel za čistočo v laboratoriju. Ko se je nekega dne po daljšem dopustu vrnil na delo, je opazil, da se je na kulturah stafilokokov, ki jih je shranil v kotu laboratorija, razvila plesen. Njegovo pozornost je pritegnilo dejstvo, da so bile bakterije v okolici predela, ki ga je napadla plesen, uničene. Fleming je leta 1929 začel gojiti nastalo plesen in iz njenega izločka izoliral spojino ter jo poimenoval penicilin. Kljub dobrim protibakterijskim lastnostim penicilin sprva ni kazal znakov, da bi ga lahko razvili v zdravilno učinkovino. Zagotavljanje primernih pogojev za razrast plesni in nadaljnja izolacija penicilina iz nje sta bili zahteven in dolgotrajen postopek. Poleg tega je bil Fleming prepričan, da bi bil penicilin zaradi njegove

nestabilnosti v telesu premalo učinkovit. Šele leta 1940 je uspelo kemikom na univerzi Oxford razviti spojino do te mere, da je bila klinično učinkovita in kmalu za tem tudi množično uporabljana proti različnim bakterijskim infekcijam. Iz osnovne kemijske strukture penicilina so se v prihodnosti razvile številne druge protibakterijske učinkovine, ki spadajo v skupino β–laktamskih antibiotikov. (1)

1.2 Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin

Kot že omenjeno, je bil eden od ciljev pri odkrivanju antibiotikov najti takšne učinkovine, ki bi bile selektivno toksične za bakterijo in hkrati netoksične za človeški organizem. Zato protibakterijske učinkovine delujejo na osnovi razlik med prokariontsko (bakterijsko) in evkariontsko (sesalsko) celico. Tako lahko učinkovine razdelimo na štiri skupine glede na njihovo tarčo in mehanizem delovanja (slika 1).

1.2.1 Zaviralci sinteze bakterijske celične stene

Ta skupina protibakterijskih učinkovin se je razvila iz penicilina, tako da so strukturno gledano to večinoma spojine z osnovnim β-laktamskim skeletom. Poleg penicilinov sodijo v to skupino med drugimi tudi cefalosporini, karbapenami in monobaktami. Vse te učinkovine delujejo tako, da se vežejo na penicilin-vezoče proteine v bakterijski steni. Tam delujejo kot inhibitorji encima transpeptidaza, ki povezuje peptidne verige v peptidoglikansko mrežo (evkariontske celice ne vsebujejo peptidoglikana) ter tako preprečijo sintezo celične stene. Končni baktericidni učinek pa je inaktivacija inhibitorja avtokatalitičnih encimov v celični steni bakterij, kar vodi v lizo celice.

1.2.2 Antimetaboliti

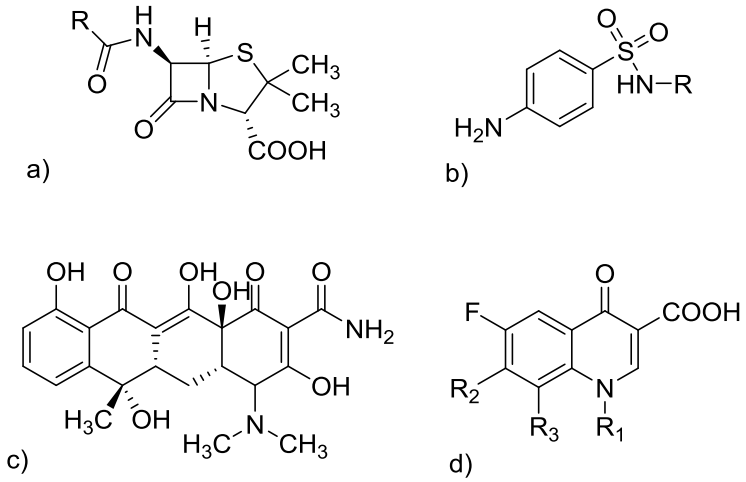
V to skupino štejemo sulfonamide in trimetoprim. Sulfonamidi so strukturni analogi *p*-aminobenzojske kisline (PABA), ki je esencialen prekurzor pri sintezi folata v bakterijah. Folat je potreben za sintezo prekurzorjev DNA in RNA (purinov in pirimidinov) tako pri bakterijah, kot tudi pri sesalcih. Razlika je v tem, da sesalci lahko folat pridobijo s prehrano, bakterije pa ga morajo sintetizirati same. Sulfonamidi tekmujejo za encim dihidropteroat sintetazo, zaradi česar se zmanjša sinteza folata. V istem procesu učinkuje tudi trimetoprim, ki pa inhibira encim dihidrofolat reduktazo. Slednji pretvarja folat v tetrahidrofolat, iz katerega se potem tvorijo purini in pirimidini.

1.2.3 Zaviralci sinteze proteinov

Predstavniki te skupine protibakterijskih učinkovin se vežejo na ribosom in tako preprečijo sintezo proteinov. Bakterijski ribosom je sestavljen iz dveh podenot, in sicer 30S, na katerega delujejo aminoglikozidi in tetraciklini, ter 50S, ki je tarča makrolidov, kloramfenikola in linezolida. Ribosomi v sesalskih celicah so za razliko od bakterijskih sestavljeni iz podenot 40S in 60S, kar je osnova selektivne toksičnosti.

1.2.4 Zaviralci sinteze jedrnih kislin

Najznačilnejši predstavniki inhibitorjev nukleinskih kislin so fluorokinoloni. To so sintezne protibakterijske učinkovine, ki inhibirajo bakterijsko DNA-girazo ter tako preprečujejo zvitje DNA in ločitev verig med podvojevanjem. (2, 3)



Slika 1: Splošna struktura predstavnika posameznega razreda protibakterijskih učinkovin: a) penicilini, b) sulfonamidi, c) tetraciklini, d) fluorokinoloni

Vsaka protibakterijska učinkovina ima poleg dobrih lastnosti tudi takšne, ki zmanjšujejo njeno uporabnost. Pri odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin pa so poglavitne lastnosti zaželene za "idealne" učinkovine:

- selektivnost (učinkovito delovanje na mikroorganizme, hkrati pa netoksičnost za človeka kot gostitelja),
- širok spekter delovanja (učinkovitost proti čim več sevom mikroorganizmov),
- dolga razpolovna doba v plazmi (daljši časovni presledki med jemanjem zdravila in manjša obremenitev za bolnika),
- dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor. (4)

1.2.5 Bakterijska odpornost

Dolgoletna množična in pogosto tudi nekritična uporaba protibakterijskih učinkovin je postopno privedla do razvoja številnih bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim protibakterijskim učinkovinam. Dandanes razvojni oddelki farmacevtskih družb spet namenjajo veliko truda odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin, saj se pri nekaterih bakterijskih sevih zaradi odpornosti proti večini protibakterijskih učinkovin že nevarno približujemo stanju pred odkritjem penicilina.

O naravni odpornosti bakterij proti protibakterijskim učinkovinam govorimo takrat, kadar posamezne bakterijske vrste ali rodovi nimajo tarčnih mest, na katere protibakterijske učinkovine delujejo. Na primer, sulfonamidi ne dosežejo svojega učinka pri bakterijah, ki jemljejo folno kislino iz okolja in je ne sintetizirajo same (npr. enterokoki in laktobacili).

Pridobljeno odpornost proti protibakterijskim učinkovinam pa imajo za razliko od naravne samo posamezni sevi neke bakterijske vrste. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice, predvsem s konjugacijo ali transformacijo. Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam:

- sprememba tarčnega mesta oziroma prijemališča protibakterijske učinkovine (npr. sprememba penicilin vezočih proteinov),
- encimska razgradnja protibakterijske učinkovine (npr. razgradnja betalaktamskih antibiotikov z laktamazami beta),
- neprepustnost oziroma zmanjšana prepustnost celične stene za protibakterijsko učinkovino (npr. zmanjšana prepustnost za betalaktamske antibiotike zaradi spremembe porinov v celični steni po Gramu negativnih bakterij),
- sprememba presnovne poti, na katero deluje protibakterijska učinkovina (npr. preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu),
- aktivno izčrpavanje protibakterijske učinkovine iz bakterijske celice z aktivnim prenosom (npr. odpornost po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij proti tetraciklinom).

Za preprečevanje širjenja odpornosti je potrebna preudarna uporaba protibakterijskih učinkovin s pravilno izbiro učinkovine, doziranja in trajanja zdravljenja, preprečevanje

prenosa odpornih sevov in okužb z ustreznimi higienskimi ukrepi ter razvoj novih cepiv, še posebej proti multi-rezistentnim bakterijam, s katerimi bi se izognili okužbam. Tudi to pa ne more rešiti težav, ki se pojavljajo zaradi razvoja odpornosti, saj se bodo bakterije nenehno prilagajale protibakterijskim učinkovinam in bo za to potreben nenehen razvoj novih protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja. (4)

1.3 Bakterije

Bakterije delimo glede na razlike v njihovi celični steni. Slednje pridejo do izraza pri barvanju po Gramu, pri katerem uporabljamo metilvijolično barvilo. Tiste bakterije, ki zadržijo modrovijolično barvilo in jih z organskim topilom ne moremo razbarvati, imenujemo po Gramu pozitivne, tiste, ki so se razbarvale, pa po Gramu negativne. Slednje navadno za potrebe mikroskopskih raziskav kasneje obarvamo rdeče. Celična stena bakterijam zagotavlja trdnost in obstojnost, saj bi brez nje bakterijsko celico zaradi velikega notranjega osmotskega tlaka razneslo.

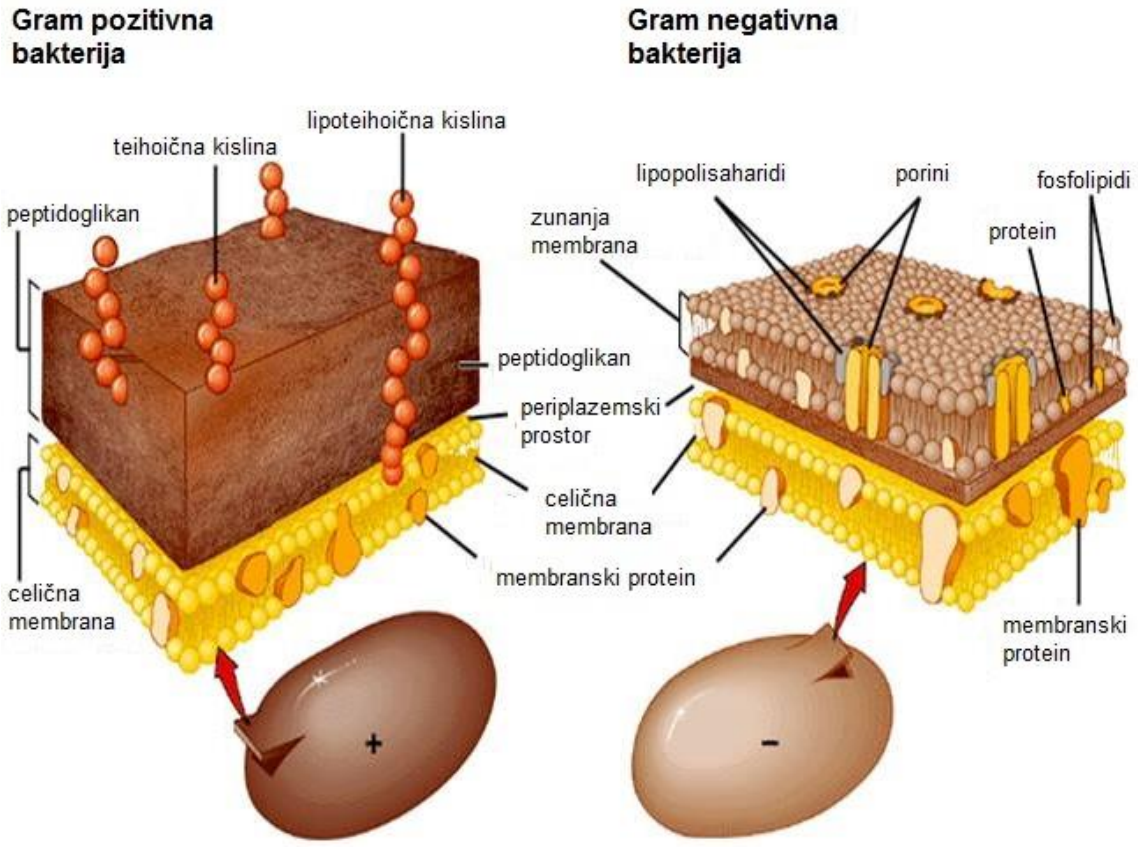
1.3.1 Po Gramu pozitivne bakterije

Bakterijska stena po Gramu pozitivnih bakterij je zgrajena predvsem iz peptidoglikana, ki tvori do 50% mase bakterijske stene (slika 2). Peptidoglikan je kompleksen polimer, katerega osnovna gradnika sta *N*-acetilglukozamin in *N*-acetilmuraminska kislina. Ti dve molekuli sta izmenično povezani v dolgo polisaharidno verigo, posamezne polisaharidne verige pa so s kratkimi peptidi povezane v trdno mrežo, ki ovija bakterijsko celico. Zaradi premreženosti je bakterijski peptidoglikan ena sama, velikanska molekula. Poleg peptidoglikana pa bakterijska stena vsebuje še polisaharidne molekule, lipoteihoično kislino, ki je kovalentno povezana z glikolipidi citoplazemske membrane in teihoično kislino. Slednja ovija peptidoglikan in tvori zunanjo plast bakterijske stene. Zaradi te svoje zunanje lege je pomembna pri pritrjevanju bakterij na gostiteljske celice, obenem pa je proti njej usmerjena tudi večina protiteles, ki nastajajo proti po Gramu pozitivnim bakterijam.

1.3.2 Po Gramu negativne bakterije

Po Gramu negativne bakterije vsebujejo veliko tanjšo plast celične stene, ovite so le z enojno ali dvojno plastjo peptidoglikana (5 do 10% mase) (slika 2). Bakterijska stena pa

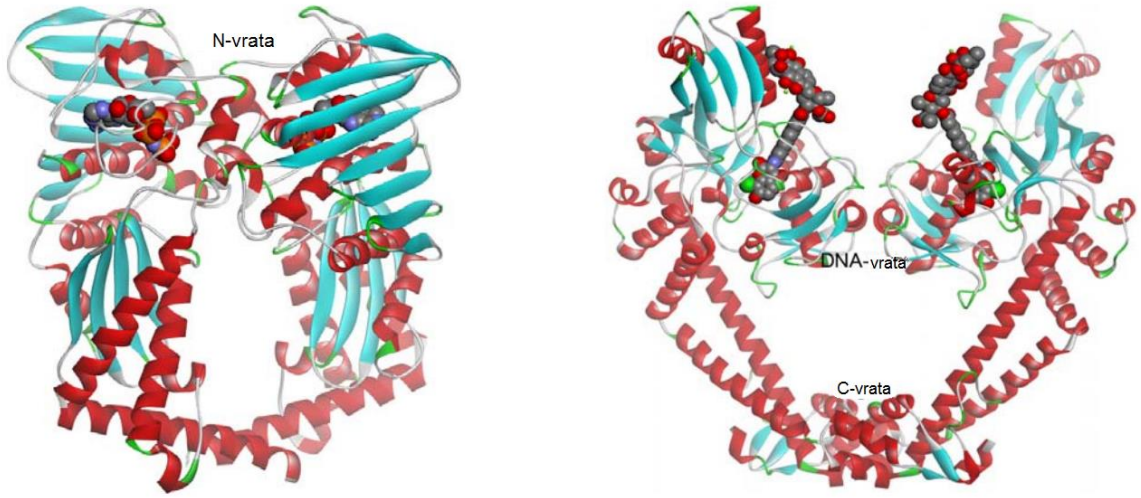
vsebuje dve dodatni plasti, ki navzven obdajata peptidoglikan. To sta zunanja membrana in vmesni, periplazemski prostor. Zunanja membrana je zgrajena kot asimetrični lipidni dvosloj, v katerega so vgrajeni proteini, med katerimi so zlasti pomembni porini, ki omogočajo prehajanje snovi skozi zunanjo membrano. Notranji lipidni sloj je sestavljen iz fosfolipidov, zunanjega pa sestavljajo lipopolisaharidi. Lipopolisaharid je sestavljen iz lipidne molekule, na katero je vezan središčni polisaharid, iz katerega navzven štrlijo terminalne polisaharidne verige. Prav pri terminalnih polisahardnih verigah obstajajo velike razlike med po Gramu negativnimi bakterijami, saj so sestavljene iz osnovnih tri-, tetra- ali pentasaharidnih enot, ki se lahko do 25-krat ponovijo. Zaradi svoje lege, pri kateri štrlijo izven bakterijske stene, sprožijo močan imunski odziv. Lipoproteinske molekule so s proteinskim koncem vezane na peptidoglikan in tako stabilizirajo periplazemski prostor. V tem prostoru so poleg njih vezane tudi beljakovine za različna hranila (aminokisline, sladkorje, vitamine), hidrolitični encimi za razgradnjo visokomolekularnih hranil in najpomembnejše, tudi encimi, ki inaktivirajo različne protibakterijske učinkovine in s tem povzročajo odpornost (β-laktamaze, aminoglikozidfosforilaze). (4, 5)



Slika 2: Zgradba celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (povzeto po 2)

1.3.3 DNA-giraza

Bakterijske topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembe v topologiji DNA. Razvrščamo jih v dve podskupini. Topoizomeraze tipa I prekinejo eno verigo v DNA vijačnici, topoizomeraze tipa II pa prekinejo obe verigi hkrati. V drugo skupino spada tudi encim DNA-giraza, ki je ključnega pomena za obstoj bakterije, saj sodeluje pri procesih, kot so podvojevanje, popravljanje in razdruževanje verige DNA. DNA-giraza deluje tako, da vključuje negativna dodatna zvitja v DNA tik pred replikacijskimi vilicami in tako zmanjša torzijsko napetost in olajša podvojevanje DNA. Prokariontski encim ima heterotetramerno strukturo z dvema različnima podenotama, medtem ko je evkariontski encim homodimeren, kar pomeni, da je DNA-giraza dobra tarča za delovanje protibakterijskih učinkovin, saj omogoča selektivno toksičnost. Sestavljena je iz dveh GyrA in dveh GyrB podenot (A_2B_2) (slika 3). Podenota A vsebuje aktivno mesto za cepitev in ligacijo DNA, podenota B pa vsebuje vezavno mesto za vezavo in hidrolizo ATP, iz katere se pridobiva energija za potek encimske reakcije. Natančna strukture celotne bakterijske DNA-giraze še ni znana, ugotovili pa so, da v strukturi obstaja troje vrat, ki se odpirajo in zapirajo skladno z uvajanjem negativnega zavoja v verigo DNA. Takoimenovana N-vrata se nahajajo med podenotama B, DNA-vrata in C-vrata pa sta v predelu podenot A (slika 3).



Slika 3: Kristalna struktura *E. coli* $GyrB_2$ (levo) in *E. coli* $GyrA_2$ (desno) (povzeto po 7)

Znano je tudi, da v GyrB obstajata dve domeni, ki obdajata vezavno mesto za ATP. Domena I je sestavljena iz osmih β-ravnin in petih α-vijačnic, domena II pa iz štirih β-ravnin in štirih α-vijačnic. Med obema domenama je 20 Å velik prostor, obdan z argininskimi ostanki, ki predstavljajo vrata za vstop DNA, kot tudi za vstop potencialnega zaviralca encima. Podrobnejša analiza kristalne strukture GyrB je razkrila, da je molekula ATP v vezavnem mestu stabilizirana z mnogimi vodikovimi vezmi, poleg tega pa tudi s koordinacijskimi vezmi fosfatnih skupin z magnezijevim ionom. Vodikove vezi med adeninom in aminokislinskimi ostanki asparaginske kisline, glicina in treonina so dodatno stabilizirane z molekulami kristalne vode. Stranske verige izolevcina in valina pa tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo iz molekule ATP. (6, 7)

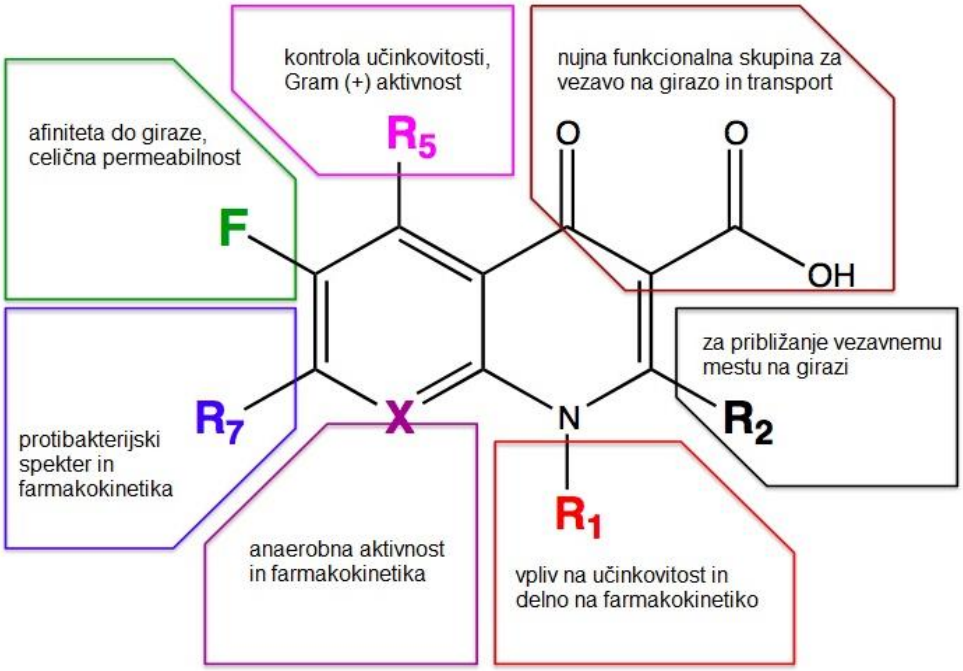
1.4 Zaviralci DNA-giraze

DNA-giraza je dobra tarča za razvoj protibakterijskih učinkovin zaradi mnogih razlogov:

- nujna je za preživetje bakterije, saj je prisotna pri procesih podvojevanja in popravljanja DNA,
- zaviranje njenega delovanja ima baktericidni učinek,
- strukturna specifičnost, saj se razlikuje od sesalskih encimov,
- znotraj encima obstajajo različna tarčna mesta,
- iste učinkovine poleg zaviranja DNA-giraze lahko vplivajo zaviralno tudi na strukturno podobno topoizomerazo IV, ki sodeluje pri istih procesih, tako da s tem dosežemo dvojno delovanje. (7, 8)

1.4.1 Zaviralci DNA-giraze A

Fluorokinoloni so protibakterijske učinkovine s širokim spektrom delovanja, delujejo pa predvsem proti po Gramu negativnim bakterijam. Svoj protibakterijski učinek dosežejo z vezavo na encim DNA-girazo (na podenoto A) in tako ustavijo proces uvajanja dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNA.



Slika 4: Odnos med kemijsko strukturo in delovanjem fluorokinolonov

Njihov osrednji skelet je 6-fluorokinolin-4-on (slika 4) s karboksilno skupino na mestu 3 ter različnimi možnimi substituenti predvsem na dušiku na mestu 1 in ogljiku na mestu 7.
Po njihovem odkritju v šestdesetih letih prejšnjega stoletja so strukturo kinolonov optimizirali do te mere, da so postali učinkoviti tako proti po Gramu pozitivnim kot tudi po Gramu negativnim bakterijam. Iz generacije v generacijo so se izboljšale tudi njihove farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti. Zaradi njihove prekomerne uporabe pa so bakterije že razvile številne mehanizme, s katerimi povečujejo odpornost proti fluorokinolonom. Odkrili so denimo mutacije v genih bakterij, ki rahlo spremenijo strukturo GyrA, s čimer se zmanjša afiniteta učinkovin do encima, nekatere bakterije sintetizirajo encime, ki modificirajo fluorokinolonski obroč, da le-ta izgubi aktivnost, spet druge pa so sposobne aktivno črpati učinkovino iz svojih celic. V teku so številne raziskave s ciljem odkriti nove inhibitorje GyrA. Piperidini, 4-aminopiperidini in cikloheksilamini imajo drugačno vezavno mesto kot fluorokinoloni, zato se izognejo odpornosti, a so žal številni izmed njih neprimerni za klinično uporabo, saj zavirajo gen, ki sodeluje pri sintezi kalijevih kanalov v srcu. S povečanjem polarnosti molekule se kardiotoksičnost zmanjša, vendar se obenem zmanjša tudi aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam. (7, 8)

1.4.2 Zaviralci DNA-giraze B

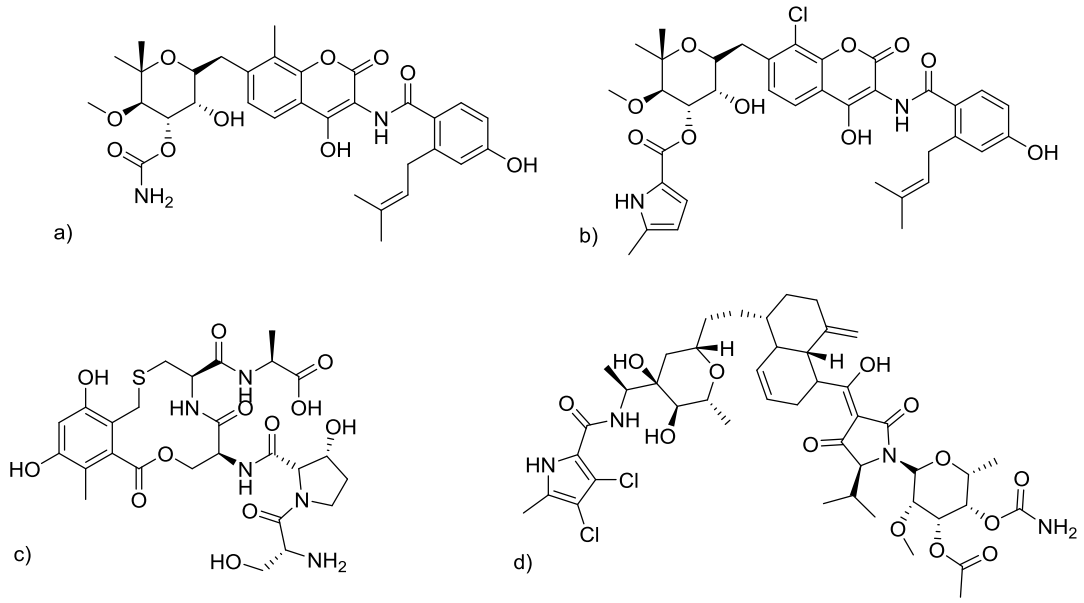
Podenota GyrB je zanimiva tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, saj je ta podenota odgovorna za hidrolizo ATP, s čimer bi se izognili navzkrižni odpornosti s fluorokinoloni, ki ciljajo na podenoto GyrA. Znano je, da se zaviralci GyrB prek dveh vodikovih vezi vežejo na stransko skupino aspartata v ATP vezavnem žepu encima. Torej morajo imeti potencialni inhibitorji vsaj dve funkcionalni skupini, ki lahko tvorita vodikovo vez. Tako kot je bil primer pri odkrivanju prvih protibakterijskih učinkovin, so tudi prve zaviralce GyrB našli v spojinah iz narave.

Aminokumarina novobiocin in klorobiocin (slika 5) sta bila izolirana iz družine bakterij *Streptomyces*. Njihovo vezavno mesto se delno prekriva z vezavnim mestom za ATP na podenoti GyrB, zaradi česar preprečijo vezavo ATP in tako delujejo kot kompetitivni zaviralci DNA-giraze B, šibko pa zavirajo tudi topoizomerazo IV (na podenoti ParE). Novobiocin je tudi edini aminokumarin, ki je bil nekaj časa v terapevtski uporabi, vendar so ga zaradi toksičnosti, razvoja rezistence in pojava učinkovitejših protibakterijskih učinkovin kasneje odpoklicali s trga. (7)

Med naravne zaviralce štejemo tudi ciklotialidine (slika 5), ki imajo, zaradi slabega prehajanja skozi bakterijsko steno, zelo šibko protibakterijsko delovanje. Zadnji poskusi izboljšanja farmakokinetičnih lastnosti teh spojin dajejo obetavne rezultate, predvsem na račun uvedbe bicikličnih dilaktam-lakton derivatov. (7)

Tudi kibdelomicin (slika 5) in predvsem amikolamicin sta spojini, ki se močno vežeta na GyrB in imata širok spekter protibakterijskega delovanja ter sta tako zanimivi kot spojini vodnici. Obenem se v adeninski žep vežeta na delno drugačen način kot ostale molekule, saj z vezavo v obliki črke U tvorita dodatne hidrofobne interakcije z encimom. Prav zaradi drugačnega načina vezave bi se lahko izognili težavam s toksičnostjo in razvojem rezistence, zaradi katerih aminokumarini niso več v uporabi. (7)

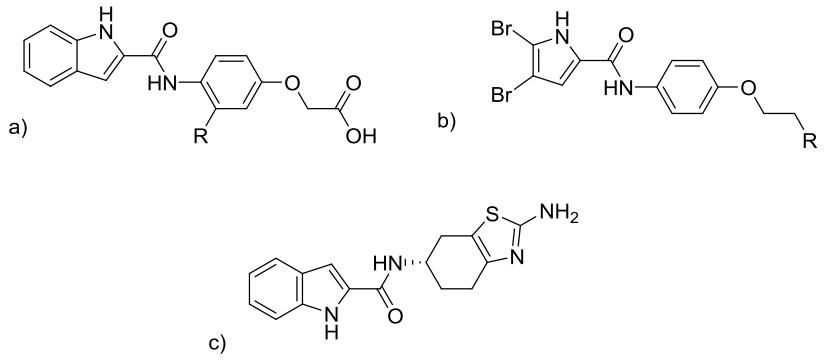
Prostora za nadaljnji razvoj zaviralcev GyrB je še veliko. Številne nove sintezne spojine močno zavirajo podenoto B in imajo tudi močno protibakterijsko delovanje *in vitro* ter tudi v *in vivo* živalskih modelih infekcij. Največja pomanjkljivost je zaenkrat v spektru delovanja, saj ima večina zaviralcev prešibko aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam, ali pa se vežejo tudi na druge proteinske strukture, denimo na hERG (ang. human Ether-à-go-go related gene) kanale in povzročajo toksične učinke. (7, 9)



Slika 5: Strukture zaviralcev GyrB: a) novobiocin, b) klorobiocin, c) ciklotialidin, d) kibdelomicin

1.4.3 Zaviralci, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo (FFA zaviralci)

V odkrivanje novih zaviralcev DNA-giraze B so se vključili tudi raziskovalci iz Katedre za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo. Njihove spojine spadajo med derivate treh različnih strukturnih razredov (slika 6), in sicer so to *N*-fenil-4,5-dibromopirolamidi, *N*-fenilindolamidi in 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazoli (slika 6). V hidrofobni žep encima se veže dibromopirolni, oziroma indolni fragment molekule, obenem pa dušik v pirolovem/indolovem obroču tvori vodikovo vez stransko verigo aspartata v vezavnem mestu za ATP. Na drugem koncu molekule pa mora biti funkcionalna skupina vezana na *para* mesto anilinskega obroča, oziroma pri skupini tiazolov je to amino skupina na mestu 2, sposobna tvoriti vodikove vezi s stranskimi verigami arginina.



Slika 6: Skupine FFA zaviralcev: a) *N*-fenilindolamidi, b) *N*-fenil-4,5-dibromopirolamidi in c) 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazoli

1.5 Fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin

Razvoj novega zdravila prinese s seboj izredno visoke stroške. Predvsem zaradi tega, ker ne vključuje le stroškov laboratorijskih poskusov, kliničnih testiranj in regulatornih zahtev, ampak tudi zato, ker številne nove molekule na koncu sploh ne pridejo do stopnje, na kateri bi postale tržno zanimive. Zato je ameriški kemik Christoper Lipinski leta 1997 postavil nekaj temeljnih pravil, kakšne fizikalno-kemijske lastnosti naj bi molekule, ki izkazujejo določen farmakološki potencial, imele, da bi obenem bila njihova biološka razpoložljivost čim boljša. Poimenoval jih je pravilo petic, vključuje pa naslednje lastnosti molekul:

- največ pet donorjev vodikove vezi
- največ deset akceptorjev vodikove vezi
- vrednost porazdelitvenega koeficienta oktanol/voda (logP) med 0 in 5
- molekulska masa manj kot 500 Da.

Vendar se ta pravila pri razvoju protibakterijskih učinkovin niso pokazala kot preveč zanesljiva. Predvsem skupina protibakterijskih učinkovin z delovanjem proti po Gramu pozitivnim bakterijam dosega precej višje molekulske mase (glikopeptidi, makrolidi), medtem ko so molekulske mase učinkovin aktivnih proti po Gramu negativnim bakterijam redko višje od 600 Da (izjemi sta azitromicin in polimiksin B). Razlog je v dejstvu, da so v steni po Gramu negativnih bakterij porini, ki omogočajo dovolj majhnim molekulam vstop v celico. Občutna je tudi razlika v polarnosti pri po Gramu negativnih bakterijah, ki v primerjavi s smernicami, ki jih je začrtal Lipinski, v povprečju dosegajo precej večjo

polarnost. Protibakterijske učinkovine namreč navadno vsebujejo veliko število polarnih funkcionalnih skupin (npr. hidroksilne, karboksilne). Zaradi istega razloga imajo protibakterijske učinkovine tudi veliko število donorjev in akceptorjev vodikovih vezi, ki so običajno udeleženi pri tvorbi interakcij s tarčami v bakterijah (slika 7). (10)

	po Gramu pozitivne protibakterijske učinkovine	po Gramu negativne protibakterijske učinkovine
molekulska masa [Da]	813	414
logP	2,1	-0,1
polarna površina molekule [$Å^2$]	243	165
donorji vodikove vezi	7,1	5,1
akceptorji vodikove vezi	16,3	9,4

Slika 7: Povprečne vrednost nekaterih lastnosti že registriranih protibakterijskih učinkovin (N=147)

2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo selekcija in računalniška obdelava literaturnih zaviralcev DNA-giraze, ki se vežejo v ATP vezavno mesto na podenoti B in iskanje tistih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki so ob močni zaviralni aktivnosti na izoliranem encimu odgovorne za prehod v citoplazmo bakterij in s tem za protibakterijsko delovanje.

Pri analizi rezultatov bomo primerjali fizikalno-kemijske lastnosti zaviralcev DNA-giraze (molekulska masa, porazdelitveni koeficient, število aromatskih obročev, polarna površina in prostornina molekule, število akceptorjev in donorjev vodikove vezi), ki so potrebne za protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnim (kot modelno bakterijo bomo izbrali *Staphylococcus aureus*) in proti po Gramu negativnim bakterijam (kot modelno bakterijo bomo izbrali *Escherichia coli*). Pričakujemo, da bomo odkrili pomembne razlike med fizikalno-kemijskimi lastnostmi močnih zaviralcev DNA-giraze B, ki delujejo na po Gramu pozitivne in tistimi, ki delujejo na po Gramu negativne bakterije.

Na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani se raziskovalci ukvarjajo z načrtovanjem in sintezo novih strukturnih razredov zaviralcev DNA-giraze B, ki zaenkrat izkazujejo močno zaviralno aktivnost na izoliranih encimih, ampak imajo le šibko protibakterijsko delovanje. S primerjavo njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti s tistimi spojinami, za katere je bilo že eksperimentalno ugotovljeno, da dajejo boljše rezultate, bomo poskušali ugotoviti ali se spojine, ki so jih sintetizirali na FFA, po katerem od parametrov razlikujejo od spojin iz objavljenih publikacij. Dobljeni rezultati bodo pomembno pripomogli pri načrtovanju zaviralcev DNA-giraze na Katedri za farmacevtsko kemijo.

3 METODE

Naše delo je zajemalo:

- zbiranje literature, pri čemer smo se osredotočili na novejše publikacije (od 2000 dalje)
- pregled člankov in selekcioniranje protibakterijskih spojin, ki dajejo najboljše vrednosti glede na MIC in IC_{50}
- risanje 2D struktur teh spojin v programu ChemBioDraw (del ChemBioOffice, CambrigeSoft)
- priprava knjižnice 3D struktur spojin (program Accelrys Discovery Studio) v formatu *.sdf
- izračun molekulskih deskriptorjev (clogP, M, število akceptorjev in donorjev H vezi, PSA, …) in urejanje v razrede glede na MIC vrednosti
- izračun deskriptorjev že pripravljene knjižnice zaviralcev DNA-giraze, ki so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo (FFA knjižnica)
- analiza rezultatov (Microsoft Excel)

3.1 Zbiranje literature

Preko spletnega iskalnika Web of Science smo iskali znanstvene članke, ki bi vsebovali podatke o zaviralcih DNA-giraze B. Ključni besedi pri brskanju sta bili inhibitor (ang. *inhibitor*) in giraza (ang. *gyrase*). Iz pridobljenih zadetkov smo izluščili tiste članke, ki so poleg strukturnih formul vsebovali tudi podatke o minimalnih inhibitornih koncentracijah (MIC) spojin in njihovi encimski zaviralni aktivnosti (IC_{50} ali K_i) na različnih sevih bakterij in izoliranih encimih iz teh bakterij. Pri po Gramu negativnih bakterijah smo si kot predstavnika izbrali bakterijo *Escherichia coli*, pri po Gramu pozitivnih pa bakterijo *Staphylococcus aureus*.

3.2 Risanje spojin

Za risanje strukturnih formul smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 14.0 (CambridgeSoft). Zatem smo strukturno formulo s programsko funkcijo pretvorili v SMILES zapis. SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Sistem) je enovrstični zapis strukture spojine, kjer so definirani samo vrsta atomov in povezave med njimi. Zapis

molekul v takšni obliki smo nadalje uporabili pri izračunu različnih molekulskih deskriptorjev s pomočjo programa Accelrys Discovery Studio 3.0.

3.3 Izračun molekulskih deskriptorjev

Molekulske deskriptorje smo računali s pomočjo programa Accelrys Discovery Studio 3.0. SMILES zapis struktur smo najprej pretvorili v 3D zapis, pri čemer smo strukture shranili v obliki sdf (ang. *structure data format*) formata, ki poleg tipov atomov in povezave med njimi vključuje tudi koordinate posameznih atomov. Tako smo s pomočjo računalniškega programa izračunali naslednje deskriptorje:

- **molekulska masa**, ki je vsota atomskih mas vseh gradnikov molekule,
- **število aromatskih obročev**, ki je vsota vseh aromatskih obročev, ki sestavljajo spojino,
- **število akceptorjev vodikove vezi**, ki je vsota elektronegativnih heteroatomov, najpogosteje kisika ali dušika, z vsaj enim neveznim elektronskim parom,
- **število donorjev vodikove vezi**, ki je vsota elektronegativnih heteroatomov z vsaj enim kovalentno vezanim vodikom, ki lahko tvori vodikovo vezi,
- **polarna površina molekule**, ki je definirana kot vsota površin vseh polarnih atomov. Izračunana je z metodo 2D aproksimacije,
- **prostornina molekule**, ki je prostornina, ki bi jo zavzeli atomi, ki sestavljajo molekulo, v kolikor bi bili ti atomi okrogli, sferični delci z van der Waalsovim polmerom. Izračunana je na podlagi 3D struktur posameznih molekul in uporabo znanih 3D koordinat,
- **clogP** izračun temelji na osnovi porazdelitvenega koeficienta med oktanolom in vodo z uporabo Ghose-Crippenove metode. Polarna površina posamezne molekule, ki je definirana kot vsota površin vseh polarnih heteroamtomov, je izračunana s pomočjo 2D aproksimacije.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Naša študija je zajemala 212 molekul iz 23 člankov (11-33), ki so zbrane v tabeli kot priloga k diplomski nalogi. Rezultate smo prikazali v dveh različnih skupinah. V prvi so rezultati učinkovin, ki izkazujejo protibakterijsko delovanje proti po Gramu pozitivnem *Staphylococcus aureus*, v drugi pa so rezultati tistih, ki delujejo proti po Gramu negativni *Escherichia coli*. Prva skupina vsebuje 191 spojin, ki smo jih razdelili v štiri razrede glede na vrednost njihove minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). MIC je najnižja koncentracija določenega protibakterijske učinkovine, ki še prepreči rast preiskovanega mikroorganizma. Spojine z MIC nižjim od 1 μg/mL imajo močno delovanje in so kot take kandidatke za nadaljnje študije. V drugem razredu so spojine z MIC med 1 μg/mL in 8 μg/mL. Te spojine še izkazujejo določeno aktivnost na bakterijah, vendar za spojine, ki delujejo proti po Gramu pozitivnim bakterijam, so te vrednosti previsoke, da bi bile primerne za nadaljnje vrednotenje. Denimo že ciprofloksacin, kot predstavnik druge generacije fluorokinolonov, ima vrednost MIC med 0,25 μg/mL in 0,5 μg/mL. V tretjem razredu se nahajajo spojine z MIC med 8 μg/mL in 64 μg/mL. Takšne vrednosti nakazujejo na šibko aktivnost, medtem ko četrti razred vsebuje neaktivne spojine, pri katerih je MIC višji od 64 μg/mL.

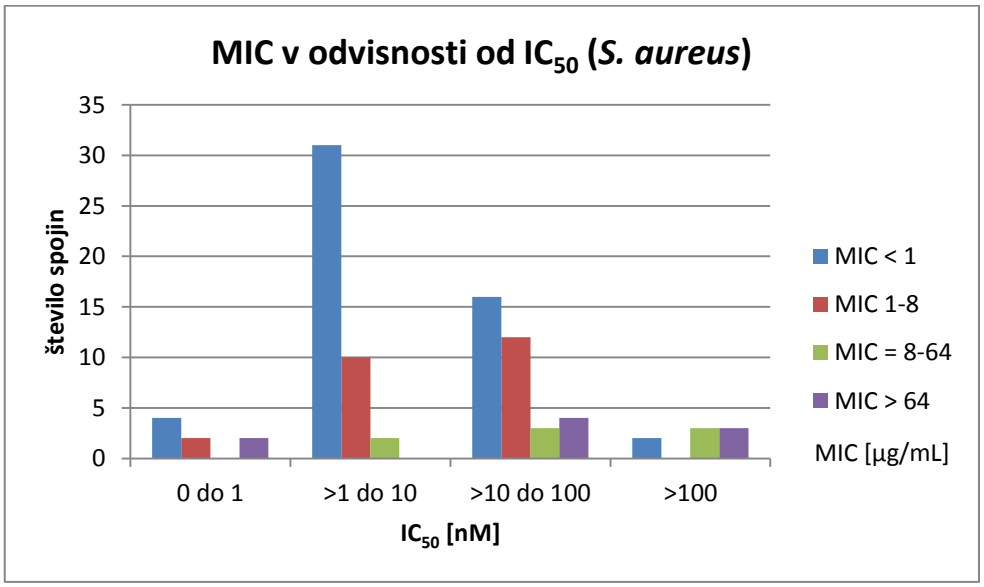
V skupini učinkovin s protibakterijskim delovanjem na po Gramu negativne bakterije smo obravnavali 163 spojin. V tem primeru pa smo kot spojine z dobrim protibakterijskim delovanjem obravnavali tako razred z MIC nižjim od 1 μg/mL, kot tudi razred zaviralcev, pri katerih je MIC med 1 μg/mL in 8 μg/mL. Kot bomo kasneje razložili, imajo po Gramu negativne bakterije številne mehanizme, ki slabšajo aktivnost protibakterijskih učinkovin, zato bi bil takšen izbor, kot smo ga uvedli v prvi skupini, preozek.

4.1 Srednja inhibitorna koncentracija

Srednja inhibitorna koncentracija (IC_{50}) je vrednost, ki nam pove, kolikšna koncentracija inhibitorja je potrebna, da za polovico zavre aktivnost specifične biološke tarče, v našem primeru DNA-giraze. Uporablja se predvsem za *in vitro* določanje zaviralne aktivnosti. Čim nižja je torej vrednost IC_{50}, boljšo zaviralno aktivnost ima spojina na tarčnem encimu, k čemur težimo pri sintezi novih protibakterijskih učinkovin.

4.1.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

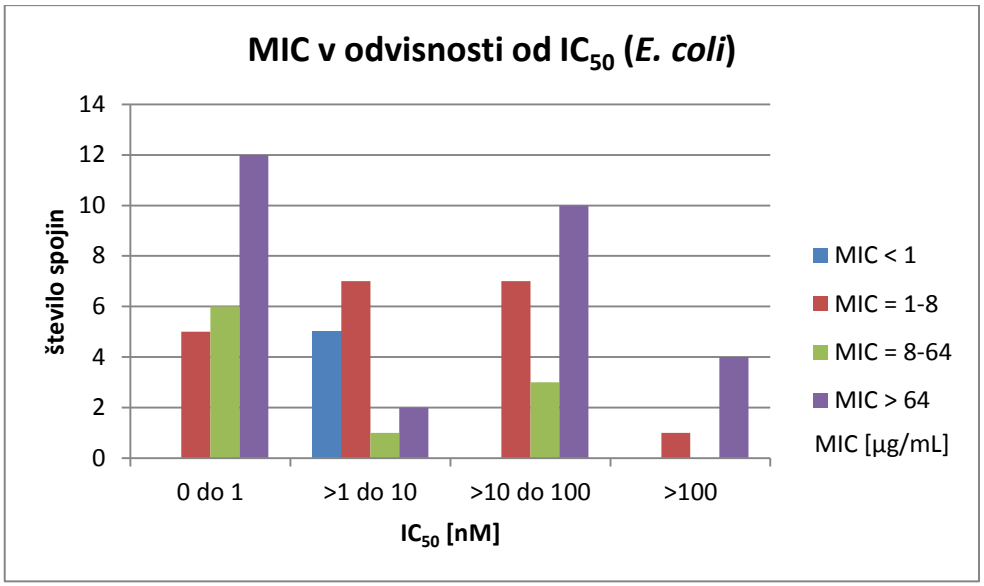
V skupini inhibitorjev z delovanjem proti *S. aureus* opazimo (slika 8), da pri nizkih vrednostih IC_{50} skoraj ni spojin v razredih s šibko protibakterijsko aktivnostjo (MIC > 8 µg/mL), ampak večina inhibitorjev izkazuje dobro aktivnost. Ko pa vrednosti IC_{50} začnejo naraščati in preidejo iz nanomolarnega velikostnega razreda proti mikromolarnim vrednostim, pa se začne število spojin z močnim protibakterijskim delovanjem nižati in povečevati delež šibko aktivnih oziroma neaktivnih spojin.



Slika 8: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od srednje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) (N = 94)

4.1.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

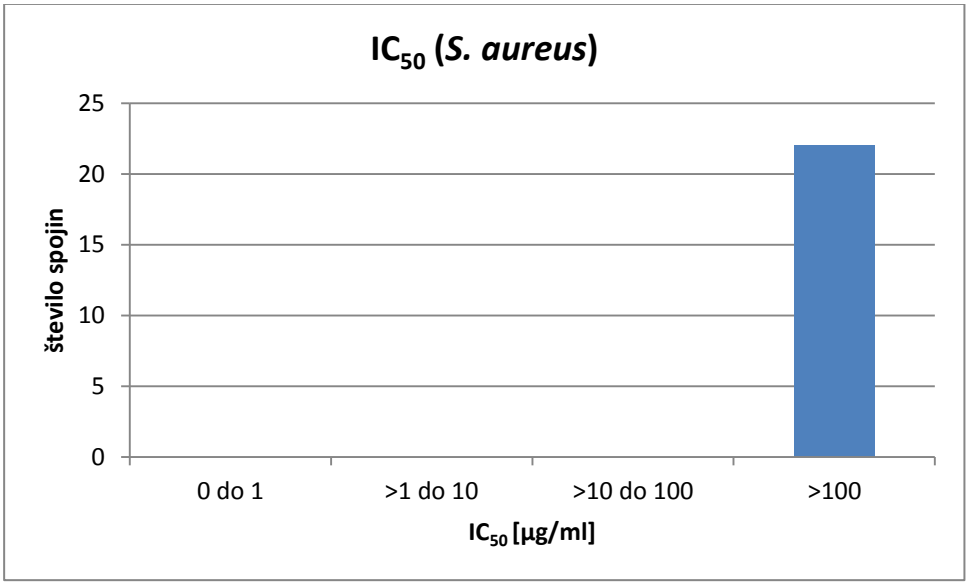
Pri spojinah, ki delujejo proti *E. coli* (slika 9), pa ne moremo povleči podobnih vzporednic. Zaradi izlivnih črpalk, dodatnega periplazemskega prostora in zunanje membrane, ki jih celice po Gramu negativnih bakterij vsebujejo, ni nujno, da bo spojina z nizko vrednostjo IC_{50} sploh izkazovala kakršnokoli protibakterijsko delovanje. Kot lahko razberemo iz grafa, je največ dobro aktivnih spojin v razredu z vrednostjo IC_{50} med 1 nM in 10 nM, medtem ko v najnižjem razredu IC_{50} prevladujejo neaktivne spojine. Vendar tudi v tej skupini velja, da se z višanjem vrednosti IC_{50} proti mikromolarnim koncentracijam, niža delež aktivnih spojin.



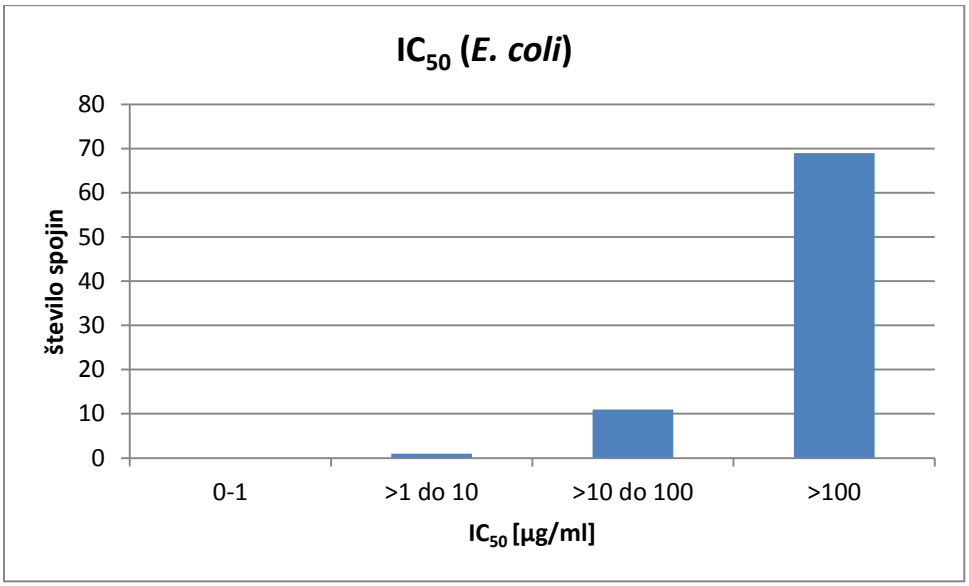
Slika 9: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od srednje inhibitorne koncentracije (IC_{50}) (N = 63)

4.1.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin

V knjižnici FFA spojin imamo pri aktivnosti na po Gramu pozitivnih (slika 10a) kot tudi po Gramu negativnih (slika 10b) bakterijah vrednosti IC_{50}, ki so bližje mikromolarnemu kot nanomolarnemu koncentracijskemu območju. Načrtovanje in sinteza nanomolarnih inhibitorjev namreč ni enostavna. Še vedno pa se tudi pri nekoliko višjih vrednostih IC_{50} najdejo kandidati z dobro protibakterijsko aktivnostjo, predvsem pri zaviralcih na po Gramu negativnih bakterijah, kjer ključno vlogo igra sposobnost, da molekula sploh uspe priti do mesta delovanja.



a)

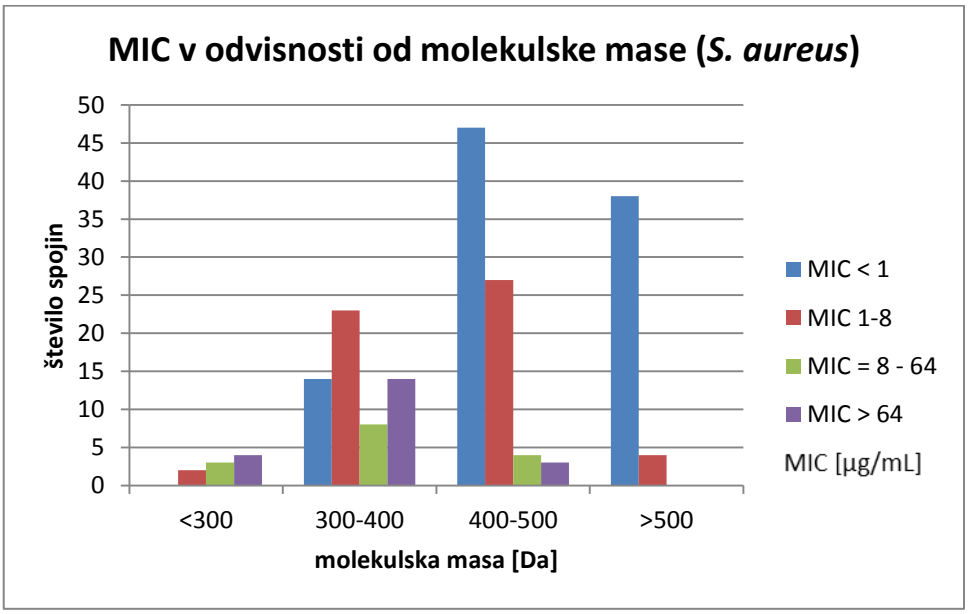
b) 

Slika 10: Porazdelitev spojin glede na vrednost IC50 na a) *S. aureus* DNA-girazi (N = 22) in b) *E. coli* DNA-girazi (N = 81) v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze

4.2 Molekulska masa

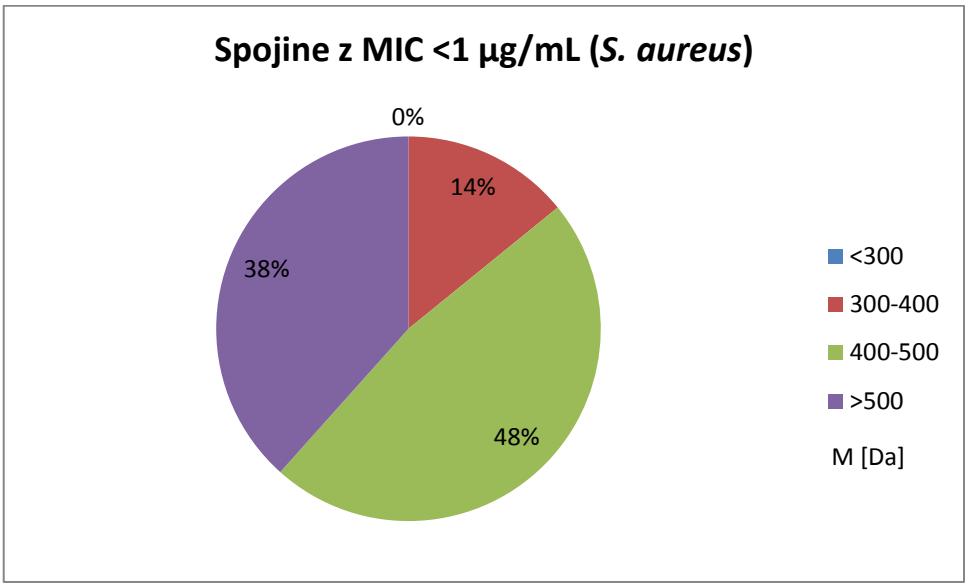
Prva od fizikalno-kemijskih lastnosti, katere vpliv na MIC bomo preučevali, je molekulska masa (M) (slika 11).

4.2.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam



Slika 11: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od molekulske mase (N = 191)

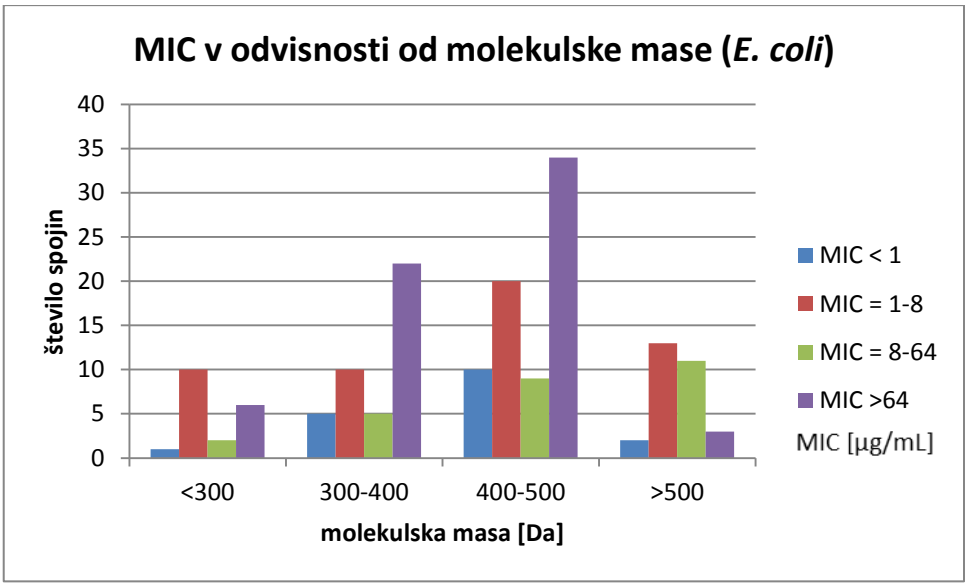
Ugotovili smo, da ima le majhen delež preiskovanih spojin molekulsko maso manjšo od 300 Da. V skupini zaviralcev z delovanjem proti *S. aureus* ima kar 48% spojin z minimalno inhibitorno koncentracijo nižjo od 1 µg/mL molekulsko maso med 400 in 500 Da. Le 14% pa je tistih, ki imajo M manjšo od 400 Da (slika 12). Razlog, da ima največ aktivnih spojin M večjo od 400 Da je v vezavnem mestu za ATP na DNA-girazi. Tako mora molekula vsebovati lipofilni fragment, ki lahko zapolni hidrofobni žep na encimu. Tak fragment je navadno preko nekega distančnika vezan na skelet molekule, ki mora v svoji strukturi vsebovati polarne funkcionalne skupine, ki so sposobne tvoriti vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu. Vse to privede do znatnega povečanja molekulske mase, tako da je praktično nemogoče načrtovati in razviti manjšo molekulo, ki bi izkazovala močno zaviralno aktivnost na izoliranem encimu.



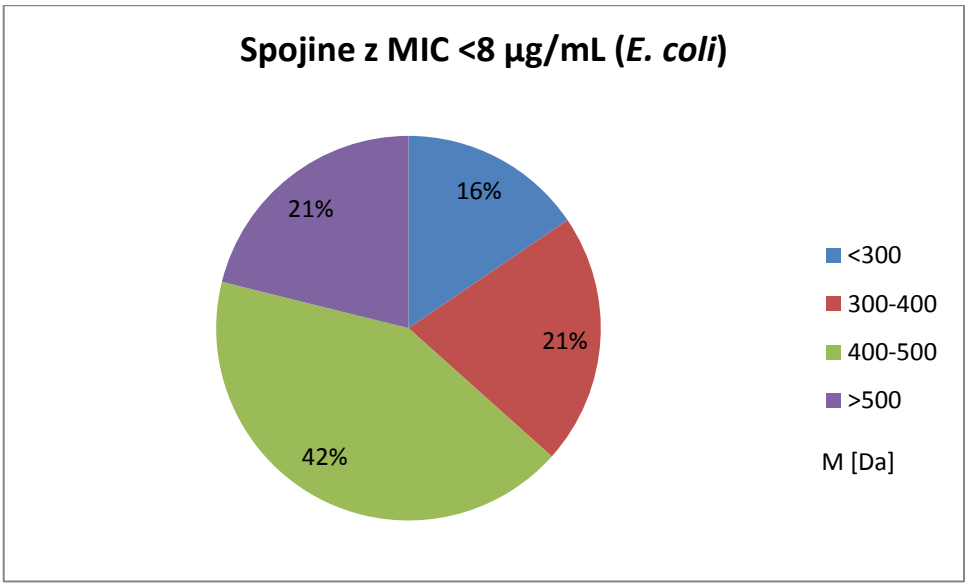
Slika 12: Porazdelitev spojin glede na molekulsko maso v razredu z MIC<1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

4.2.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

Podatki za protibakterijsko delovanje proti *E. coli* pa niso tako enostranski (slika 13). Sicer je tudi v tem primeru v razredu spojin z dobro protibakterijsko aktivnostjo (<8 µg/mL) največji delež spojin (42%) imel molekulsko maso med 400- in 500 Da, vendar je imela kar tretjina inhibitorjev M nižjo od 400 (slika 14).



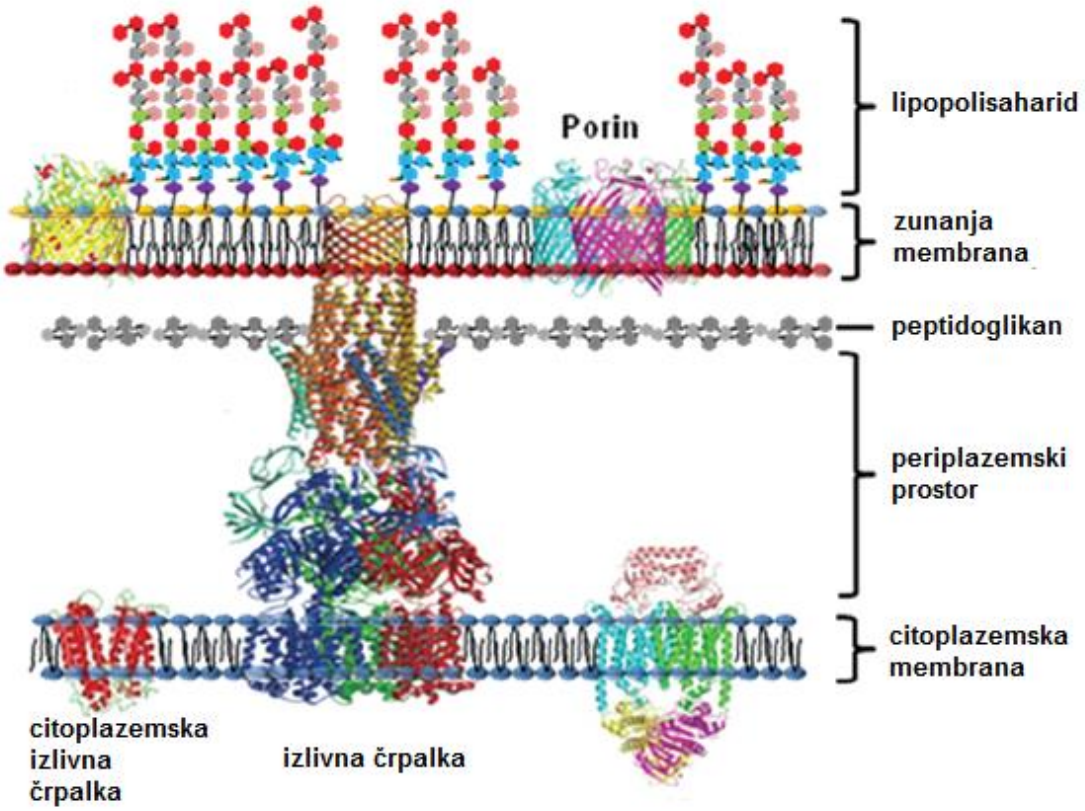
Slika 13: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od molekulske mase (N = 163)



Slika 14: Porazdelitev spojin glede na molekulsko maso v razredu z MIC<8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

Razloge gre iskati v sestavi bakterijske stene bakterije *Escherichia coli*, ki spada v skupino po Gramu negativnih bakterij. Slednje imajo v svojo zunanjo membrano vključene majhne kanalčke porine, preko katerih lahko molekule vstopajo v vmesni periplazemski prostor. V kolikor so molekule prevelike, je onemogočen ta dodaten transport preko porinov, zato je med zaviralci po Gramu negativnih bakterij tudi veliko molekul z relativno nizko

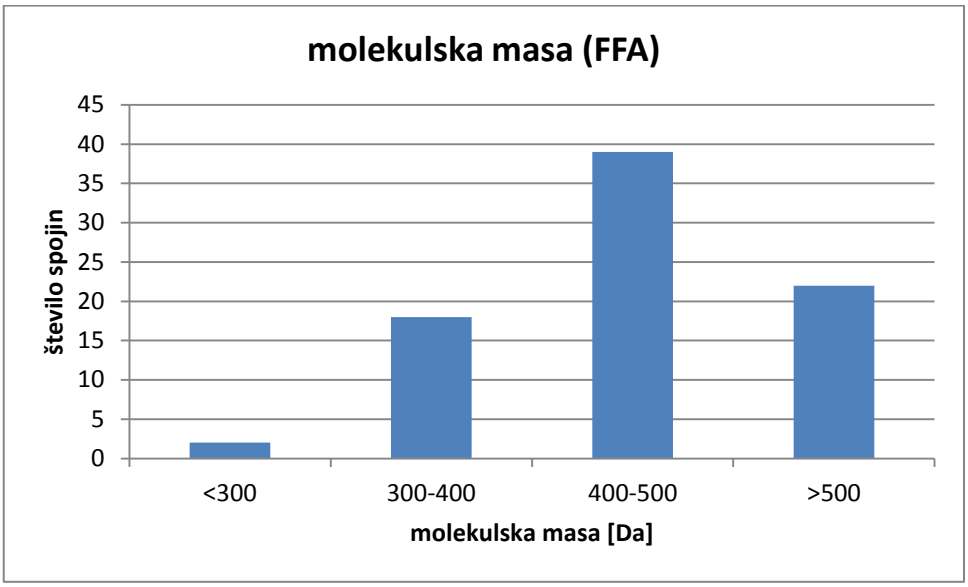
molekulsko maso. Obenem na manjše molekule manj vplivajo tudi izlivne membranske črpalke, ki se nahajajo na celični membrani in črpajo učinkovine iz celice (slika 15).



Slika 15: Shematski prikaz celične stene po Gramu negativnih bakterij, ki vsebuje številne izlivne črpalke in porine (povzeto po 37)

Tako lahko v tej skupini ugotovimo, da tudi spojine z molekulsko maso manjšo od 300 Da dosegajo vrednosti, ki sodijo v skupino z MIC nižjo od 8μg/mL. Zaradi različnih mehanizmov, ki jih imajo po Gramu negativne bakterije za prehod skozi zunanjo membrano in črpanje iz celice, molekulska masa nima velikega vpliva na protibakterijsko delovanje, saj so ugodne vrednosti MIC dosegalo tako najmanjše kot tudi največji molekule vključene v analizo. V obeh skupinah ni bilo molekule, ki bi bila večja od 800 Da. Pri večjih molekulskih masah bi namreč že opazili signifikantne razlike pri prehajanju membran in črpanju spojin iz celic. (36, 37)

4.2.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin



Slika 16: Porazdelitev spojin glede na molekulsko maso v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

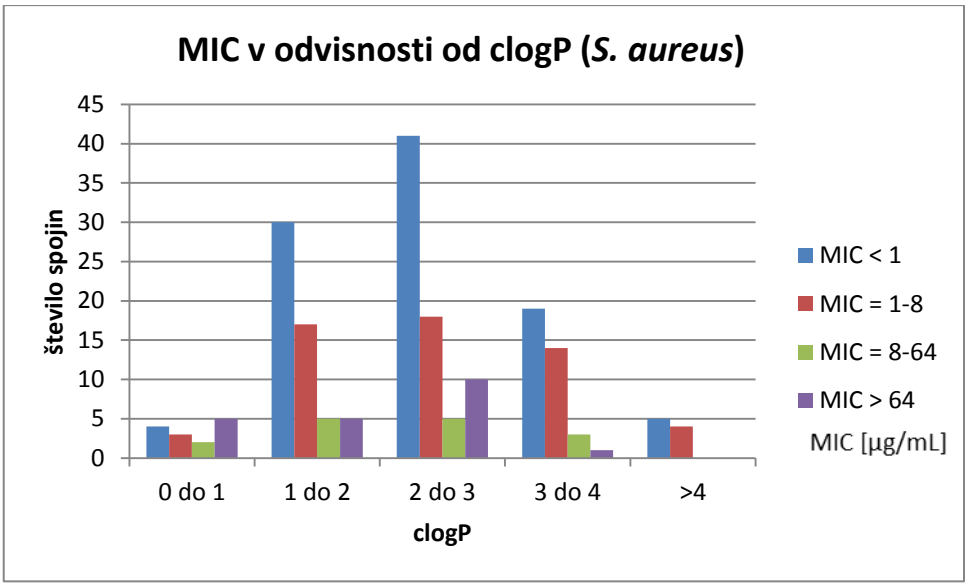
Porazdelitev molekul po molekulski masi pri že pripravljeni knjižnici FFA spojin je podobna rezultatom, ki smo jih pridobili z analizo v literaturi objavljenih spojin (slika 16). Še vedno pa niti največja molekula (563 Da) ni tako velika, da bi predstavljala težavo pri prehajanju skozi celično steno (<600 Da). (10)

4.3 Porazdelitveni koeficient

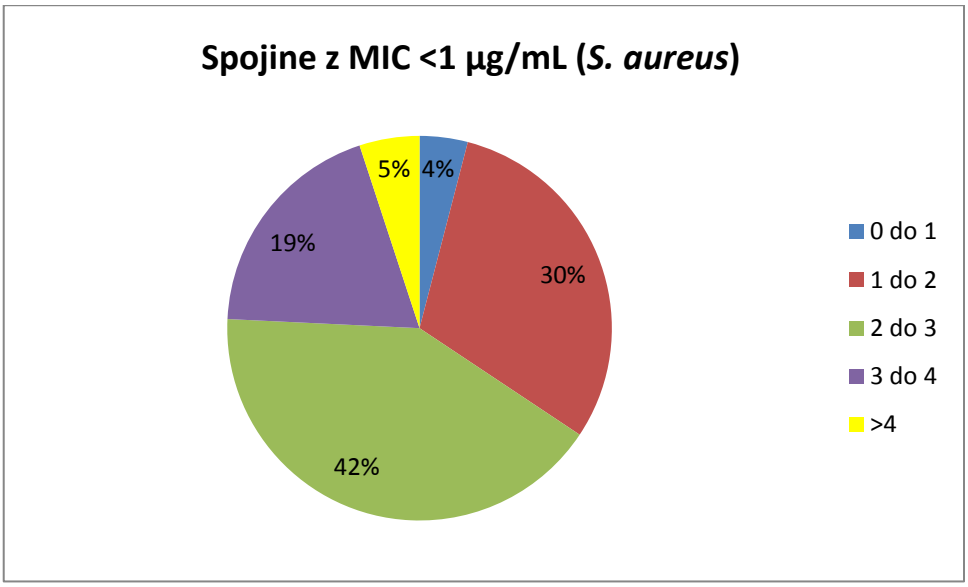
Porazdelitveni koeficient je izračunan kot logaritemsko razmerje koncentracij spojin v mešanici dveh topil, ki se ne mešata med seboj, običajno oktanola in vode. clogP je tako dober pokazatelj kako hidrofilna ali lipofilna je določena spojina, pri čemer velja - nižji kot je clogP bolj hidrofilna je spojina in obratno.

4.3.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

V skupini zaviralcev, ki delujejo na po Gramu pozitivne bakterije in imajo MIC nižji od 1 µg/mL, smo izračunali naslednje podatke. Le majhen delež spojin ima clogP nižji od 1 (4%), enako velja za clogP višji od 4 (5%). Največji delež spojin se nahaja v razredu med 2 in 3 (42%), sledita pa razreda od 1 do 2 (30%) in od 3 do 4 (19%) (slika 17, 18).



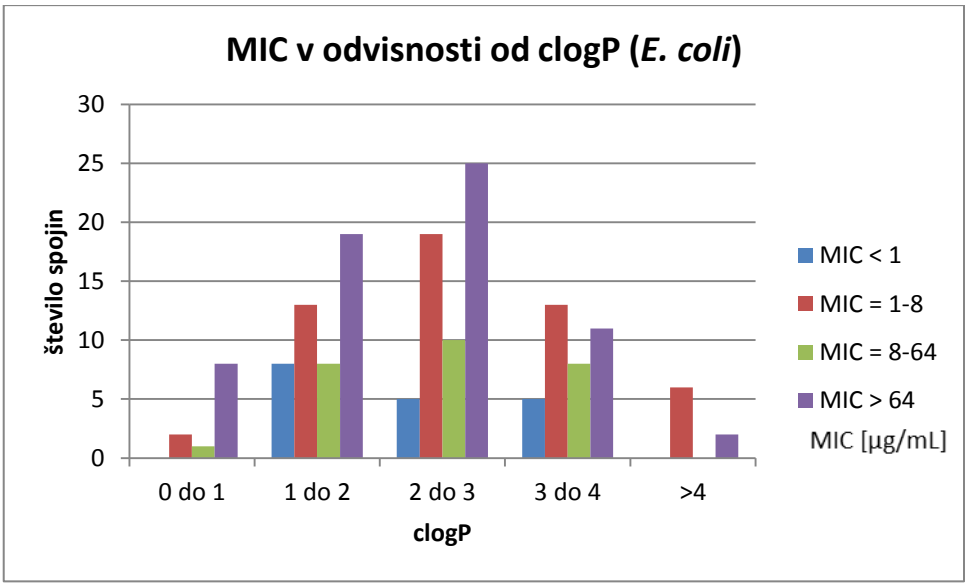
Slika 17: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od clogP (N = 191)



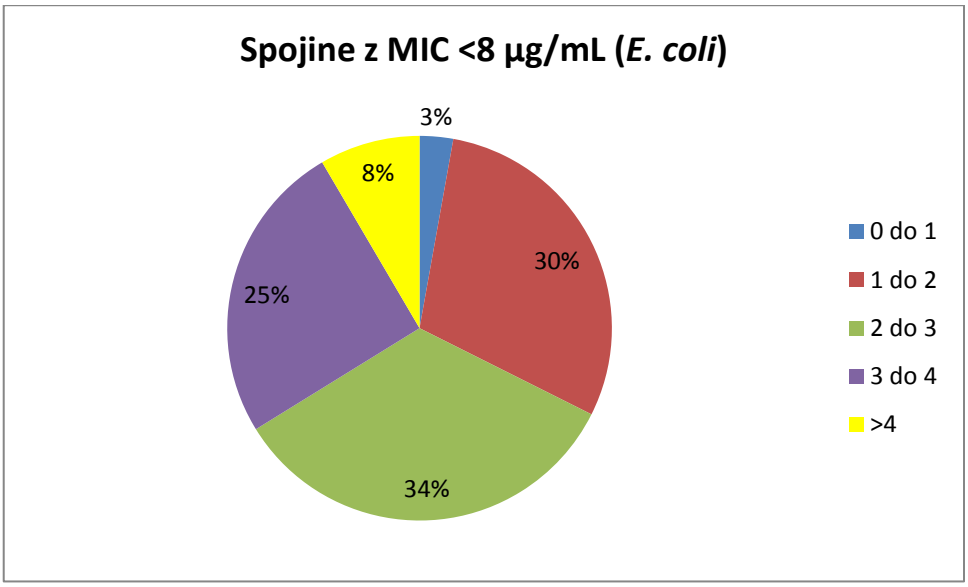
Slika 18: Porazdelitev spojin glede na clogP v razredu z MIC<1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

4.3.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

Zaviralci GyrB po Gramu negativnih bakterij z MIC nižjo od 8 µg/mL imajo v povprečju malenkost višje vrednosti clogP kot v zgornji skupini. Tako je v razredu od 3 do 4 (25%) vseh spojin in dodatnih 8% v razredu s clogP višjim od 4. Še vedno pa sta najbolj zastopana razreda od 1 do 2 (30%) in od 2 do 3 (34%) (slika 19, 20).



Slika 19: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od clogP (N = 163)



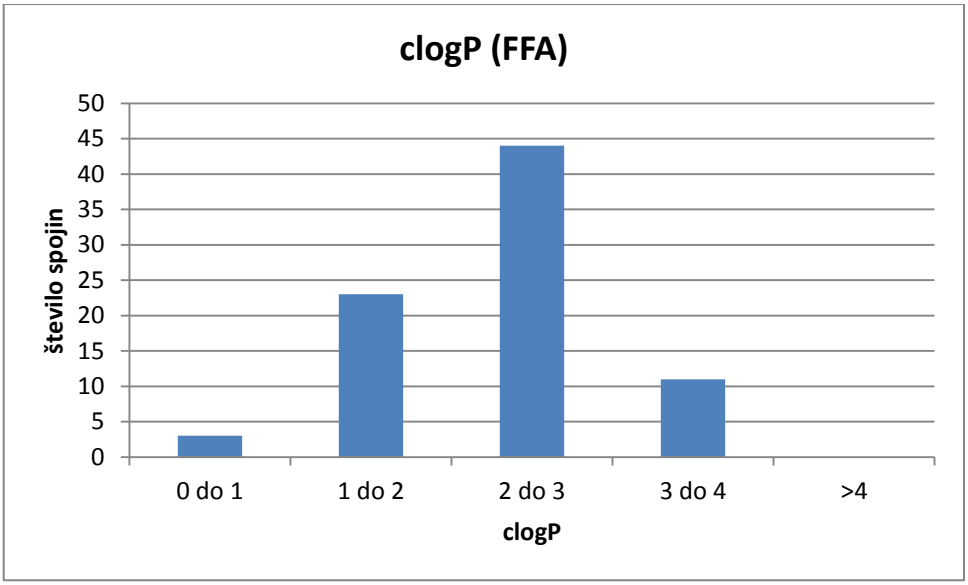
Slika 20: Porazdelitev spojin glede na clogP v razredu z MIC<8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

Vrednost porazdelitvenega koeficienta je zelo pomembna lastnost, ki vpliva na to, kako dobro bo spojina prehajala celične membrane. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah, ki nimajo tako kompleksne zgradbe bakterijske stene kot po Gramu negativne bakterije, je prehajanje lažje kot pri po Gramu negativnih. Zunanja membrana po Gramu negativnih bakterij je zelo polarna, zato njihovo steno bolje prehajajo spojine z nižjim logP. Poleg tega polarne spojine veliko lažje vstopajo v celico skozi porine in obenem na takšne spojine manj vplivajo izlivne črpalke na membrani, ki počasneje izplavljajo polarno

spojino iz citosola. Po drugi strani pa mora za močno zaviranje encimske aktivnosti molekula vsebovati tudi hidrofobni del, da se lahko uspešno veže v vezavno mesto na GyrB. Vendar pa spet bolj hidrofobne spojine bi težje prehajale bariere pri vstopu v bakterijsko celico, v organizmu bi se lahko v veliki meri vezale na transportne proteine, kar bi znižalo njihovo plazemsko koncentracijo. Tako da je potrebno najti optimalno razmerje med hidrofilnostjo in lipofilnostjo, kar je nekako največji izziv pri sintezi novih zaviralcev GyrB. Izredno dobre rezultate pa dosegajo takoimenovane 'zwitterionske' molekule, oziroma molekule, ki v svoji strukturi vsebujejo ion dvojček, torej tako anionski kot tudi kationski center. S spreminjanjem naboja glede na pH okolja lahko prilagajajo svojo polarnost do te mere, da so dovolj polarne za prehod preko zunanje membrane, v periplazemskem prostoru pa molekula postane manj polarna, kar je ugodneje za prehod preko citoplazemske membrane (38, 40, 41).

4.3.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin

Več kot polovica FFA spojin ima vrednost clogP med 2 in 3, le majhen delež spojin (13%) pa ima clogP višji od 3, kar je primerno, saj smo ugotovili, da smernice pri razvoju novih GyrB zaviralcev kažejo, da so bolj polarne spojine učinkovitejše (slika 21).



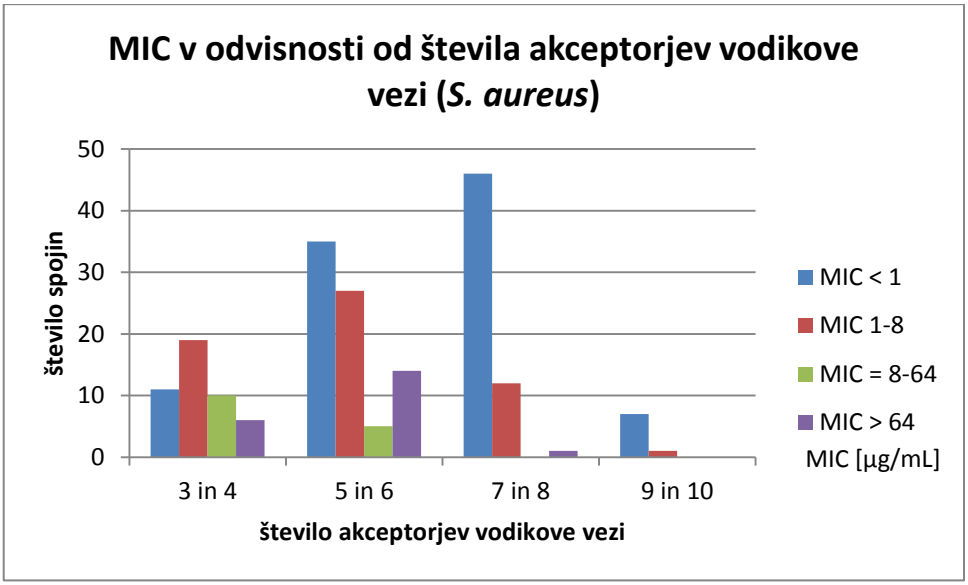
Slika 21: Porazdelitev spojin glede na vrednost clogP v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

4.4 Število akceptorjev vodikove vezi

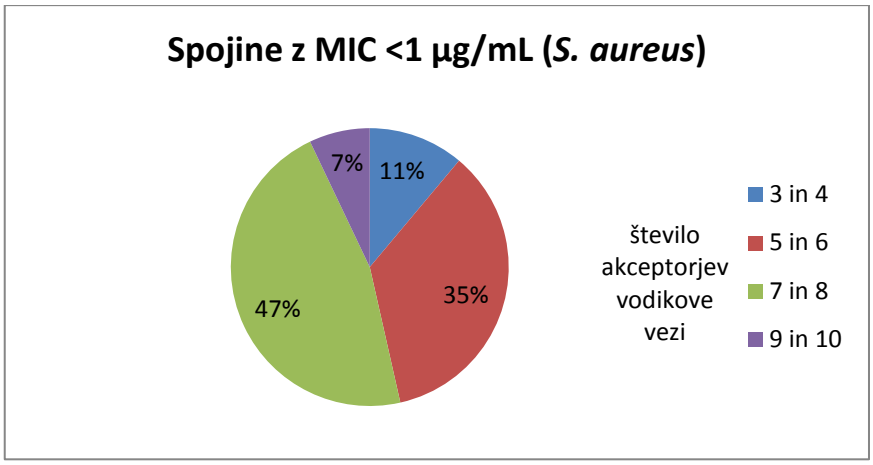
Akceptorji vodikove vezi so elektronegativni heteroatomi, najpogosteje kisika ali dušika, z vsaj enim neveznim elektronskim parom. Spojine z dobro aktivnostjo morajo biti sposobne v vezavnem mestu tvoriti številne vodikove vezi.

4.4.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

V skupini z delovanjem proti po Gramu pozitivnim bakterijam rezultati kažejo na to, da v razredih z več kot sedmimi akceptorji so skoraj vse spojine dobro aktivne (MIC<1 µg/mL). Tudi v razredu s petimi in šestimi akceptorji je precej aktivnih spojin (35), vendar je to še vedno manj kot je skupaj neaktivnih (14) in šibko aktivnih (32) spojin. Torej z večanjem števila akceptorjev vodikove vezi narašča verjetnost, da se bo spojina močno vezala v vezavno mesto in izkazovala močno encimsko zaviralno aktivnost ter posledično tudi dobro protibakterijsko aktivnost (slika 22, 23).



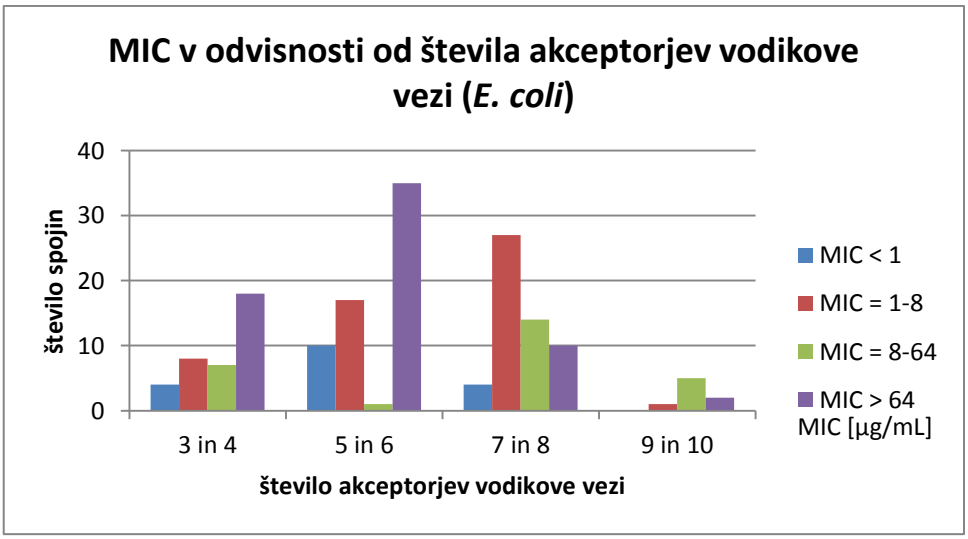
Slika 22: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od števila akceptorjev vodikove vezi (N = 191)



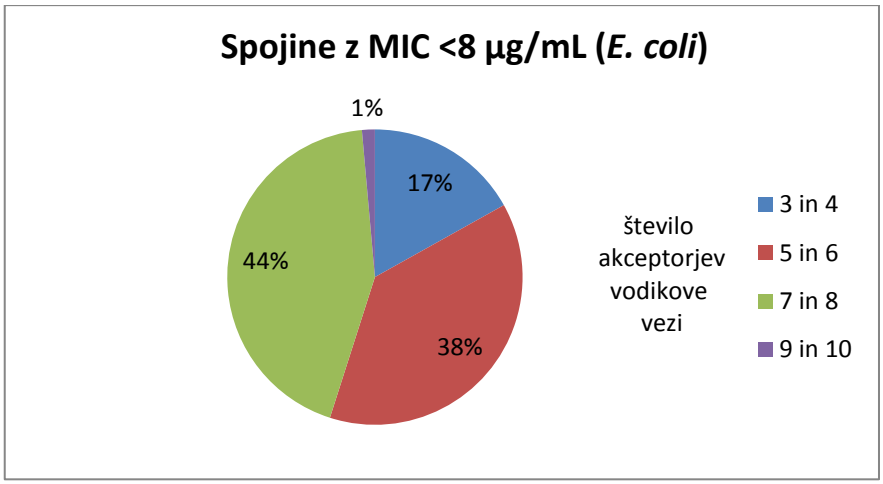
Slika 23: Porazdelitev spojin glede na število akeptorjev vodikove vezi v razredu z MIC <1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

4.4.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

V skupini z delovanjem proti po Gramu negativnim bakterijam pa razmerja niso tako očitno postavljena. Dejstvo je, da tudi spojine z odličnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, v tem primeru velikim številom akceptorjev, niso nujno najaktivnejše spojine zaradi preprostega dejstva, da veliko spojin sploh ne pride do mesta delovanja. Načeloma sta si strukturi DNA-giraze pri po Gramu negativnih kot tudi pri Gramu pozitivnih bakterijah zelo podobni in tudi tu je zaželena tvorba čim večjega števila vodikovih vezi. Vendar po drugi strani večje število elektronegativnih heteroatomov vpliva na polarnost spojine in posledično lahko poslabša prehajanje bakterijskih membran (slika 24, 25).

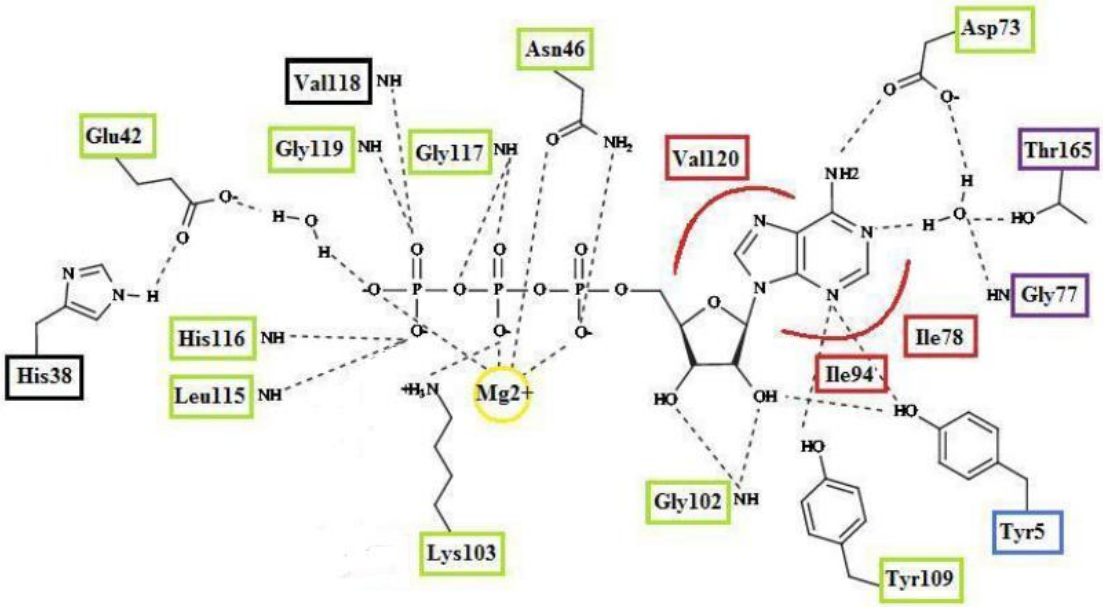


Slika 24: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od števila akceptorjev vodikove vezi (N = 163)



Slika 25: Porazdelitev spojin glede na število akeptorjev vodikove vezi v razredu z MIC <8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

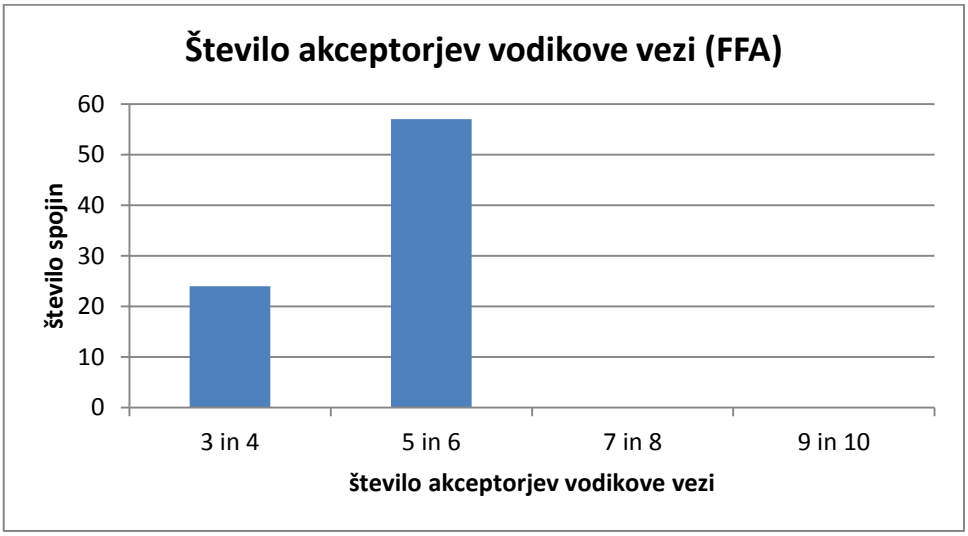
Molekula ATP je namreč v aktivnem mestu stabilizirana z mnogimi vodikovimi vezmi. Iz slike 26 lahko razberemo, da je takšnih povezav med aminokislinskimi ostanki, pri katerih je funkcionalna skupina na molekuli ATP akceptor vodikove vezi, kar deset (slika 26). Vendar večina preučevanih spojin oponaša vezavo ATP le deloma, oziroma natančneje, oponaša samo vezavo adenozinskega obroča, medtem ko se v del, kamor se veže trifosfat ne veže, s čimer poskušamo doseči selektivnost. Tako, da število vodikovih vezi, ki jih lahko tvori inhibitor močno pogojuje njegovo inhibitorno aktivnost. V našem primeru torej spojine z višjim številom akceptorjev (7 ali 8) izkazujejo močno encimsko zaviralno aktivnost in posledično tudi boljše protibakterijsko delovanje. V razredu z devetimi ali desetimi akceptorji vodikove vezi pa je le osem predstavnikov, kar je premalo, da bi lahko trdili o premosorazmerni korelaciji, ki se sama po sebi ponuja.



Slika 26: Prikaz interakcij med molekulo ATP in aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu *E. coli* GyrB. Neposredne vodikove vezi so označene z zeleno in modro, vodikove vezi preko molekule kristalne vode so označene z vijolično, hidrofobne interakcije pa z rdečo. (prirejeno po 43)

4.4.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin

Na sliki vidimo, da je število akceptorjev vodikove vezi v spojinah iz FFA knjižnice manjše od podanih ugotovitev v zgornjem poglavju. Morda bi bilo bolje v nadaljnje poiskusiti s sintezo spojin, ki bi vsebovale večje število akceptorjev (slika 27).



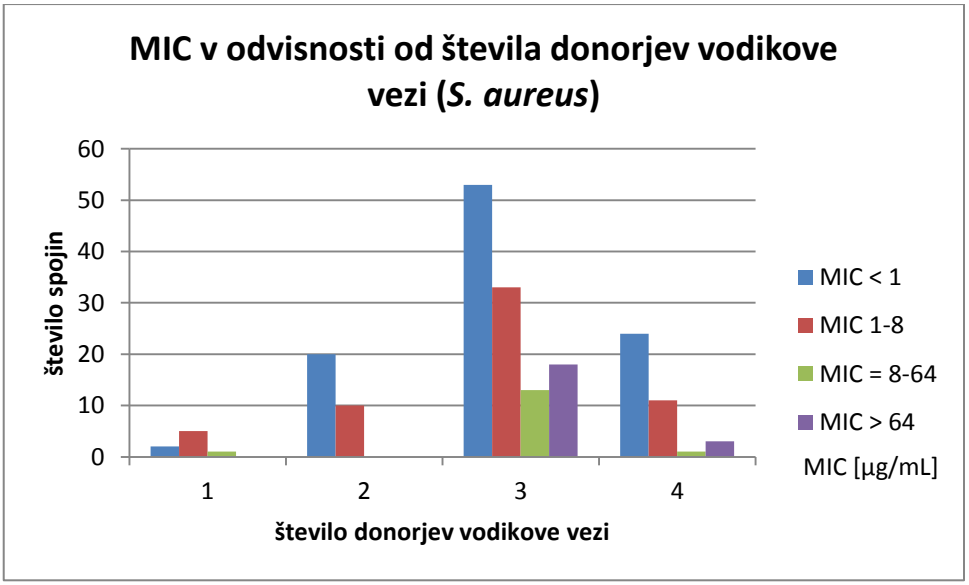
Slika 27: Porazdelitev spojin glede na število akceptorjev vodikove vezi v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

4.5 Število donorjev vodikove vezi

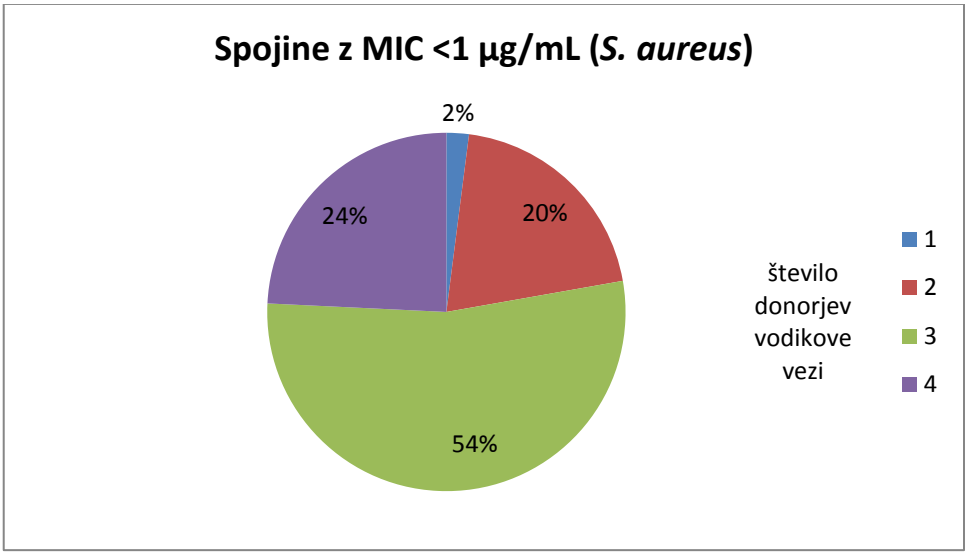
Donorji vodikove vezi so elektronegativni heteroatomi z vsaj enim kovalentno vezanim vodikom, ki lahko tvori vodikovo vez.

4.5.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

V skupini inhibitorjev z delovanjem proti po Gramu pozitivnim bakterijam vidimo, da imajo dobro aktivne spojine od dva do štiri donorje vodikove vezi (slika 28, 29). Kot lahko razberemo iz slike 26 lahko molekula ATP pri vezavi na GyrB tvori do tri donorske vodikove vezi, kar je tudi jasno razvidno iz rezultatov literaturnih spojin (slika 26).



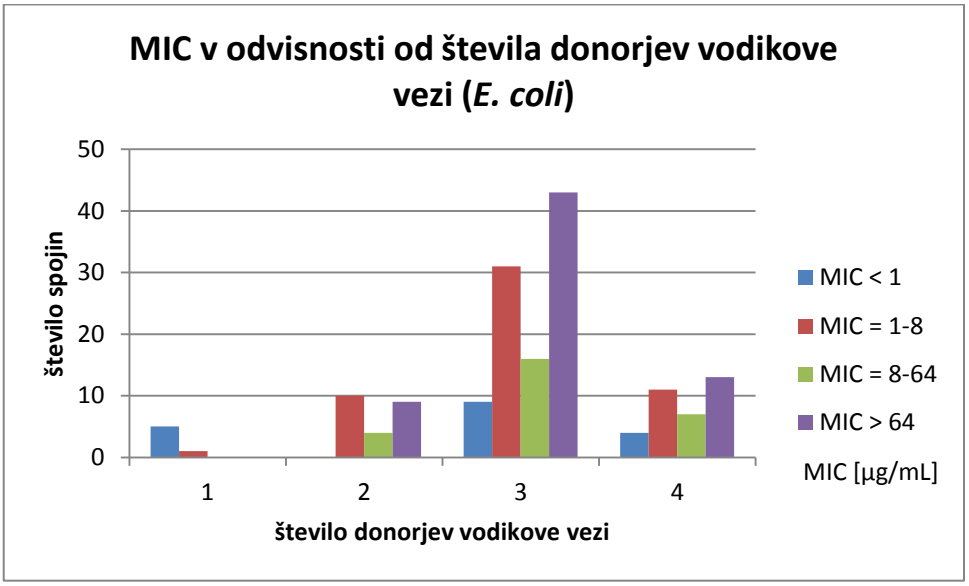
Slika 28: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od števila donorjev vodikove vezi (N = 191)



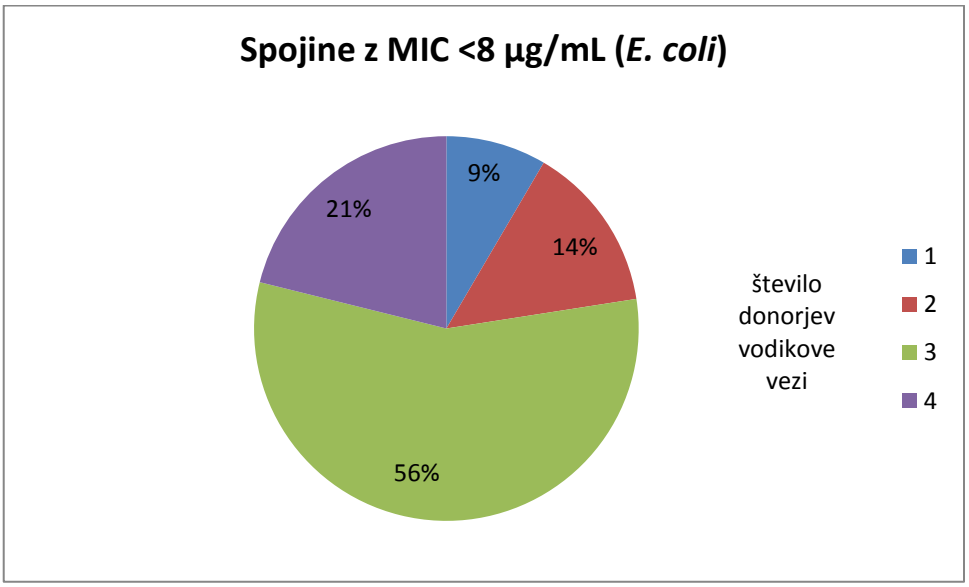
Slika 29: Porazdelitev spojin glede na število donorjev vodikove vezi v razredu z MIC <1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

4.5.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

Rezultati v skupini po Gramu negativnih bakterij so podobni kot pri prvi skupini. Preiskovane molekule lahko tvorijo do maksimalno štiri donorske vodikove vezi (slika 30, 31), kot pa smo omenili že v prejšnjem poglavju, je aktivnost v smislu MIC pogojena še s številnimi drugimi lastnostmi.



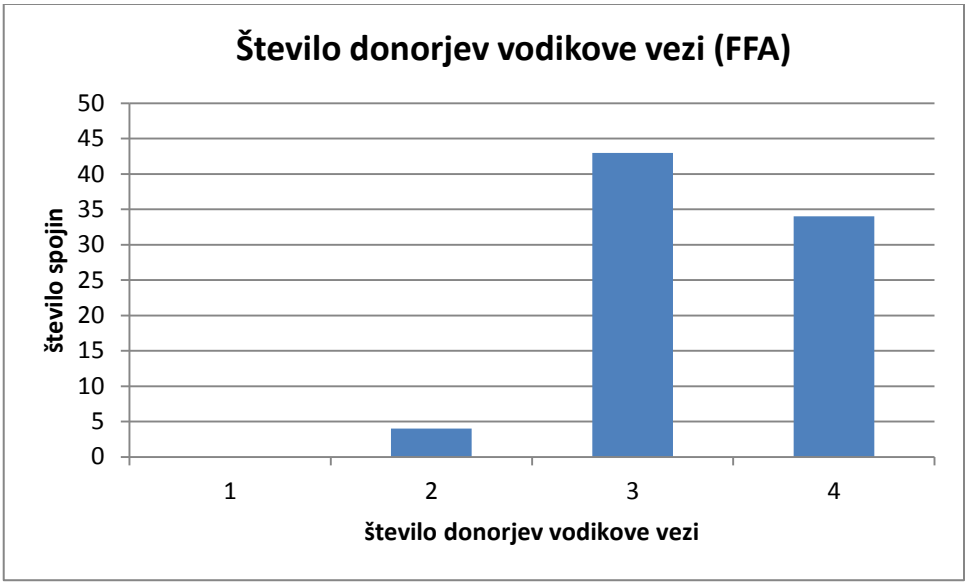
Slika 30: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od števila donorjev vodikove vezi (N = 163)



Slika 31: Porazdelitev spojin glede na število donorjev vodikove vezi v razredu z MIC <8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

4.5.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin

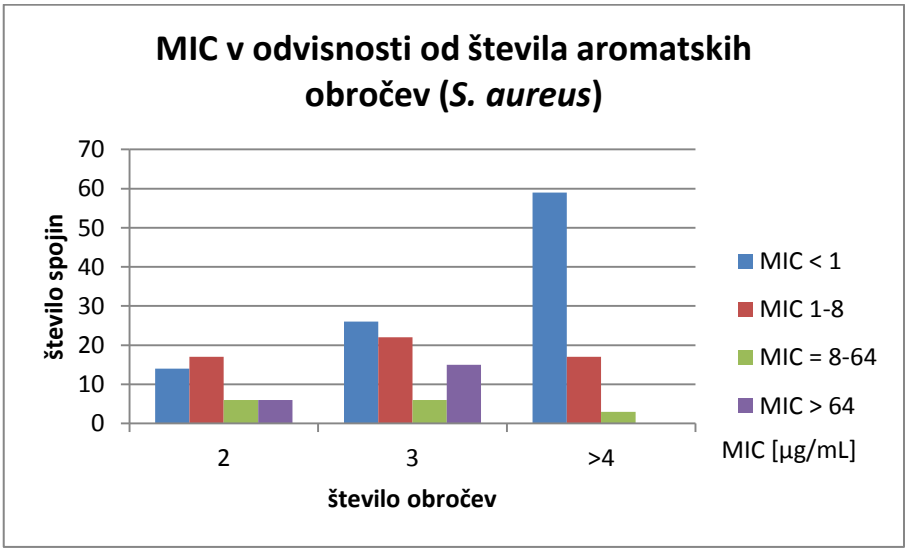
Večina spojin iz FFA knjižnice vsebuje 3 ali 4 donorje vodikove vezi, kar je dobro iz vidika, da lahko tvori na vezavnem mestu podobne interakcije kot molekula ATP (slika 32).



Slika 32: Porazdelitev spojin glede na število donorjev vodikove vezi v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

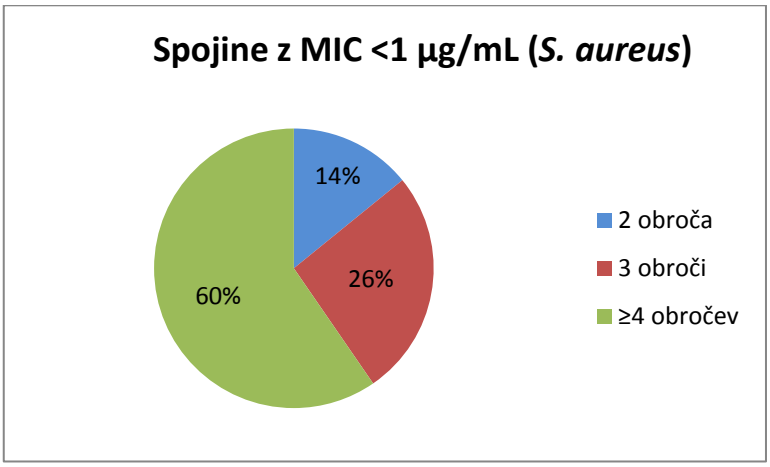
4.6 Število aromatskih obročev

4.6.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam



Slika 33: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od števila aromatskih obročev (N = 191)

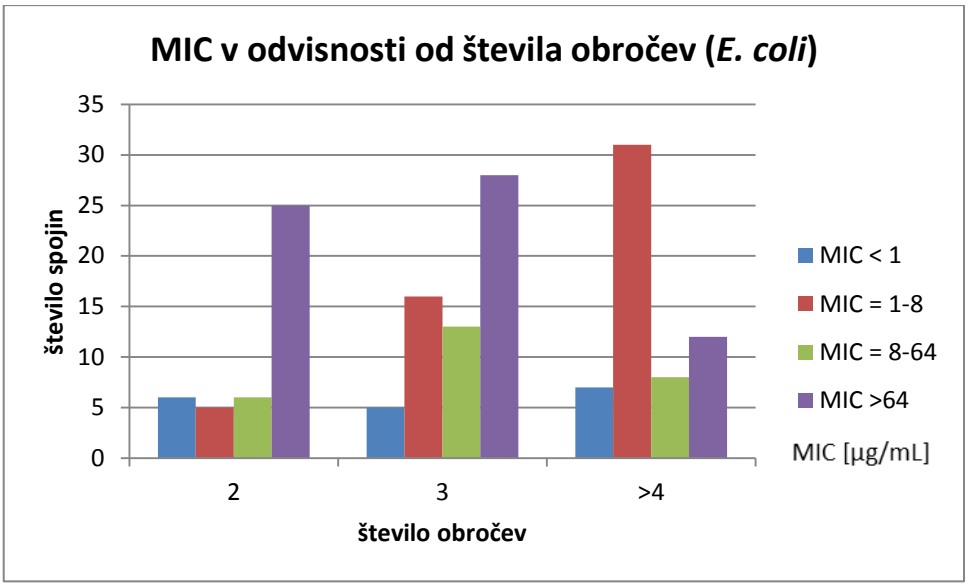
Več kot polovica (60%) dobro aktivnih spojin (MIC<1 µg/mL) proti *S. aureus* ima v svoji strukturi vsaj štiri aromatske obroče (slika 33, 34). Torej z naraščanjem števila obročev se tudi izboljšuje aktivnost spojine, saj morajo vsebovati zaviralci DNA-giraze na podenoti B strukturne elemente, ki posnemajo vezavo molekule ATP (ena od možnosti je pirimidoindolni obroč, ki oponaša vezavo adenozinskega obroča). Poleg tega je del vezavnega mesta tudi hidrofoben žep, katerega navadno zapolnimo s pripenjanjem nekega aromatskega obroča na osnovni skelet molekule. Zato molekule z nizkim številom aromatskih obročev navadno nimajo močne encimske zaviralne aktivnosti in posledično tudi protibakterijskega delovanja.



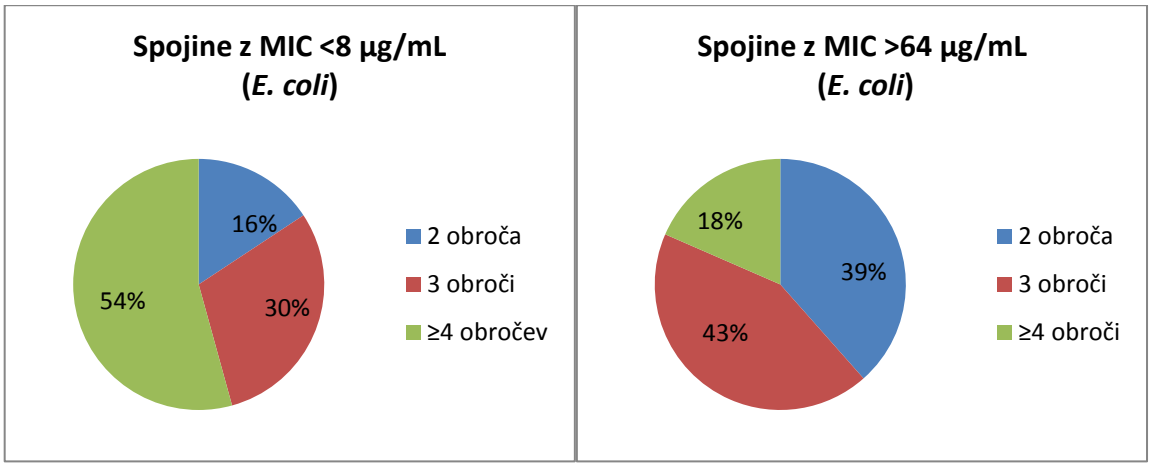
Slika 34: Porazdelitev spojin glede na število obročev v razredu z MIC<1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

4.6.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

Podobno je z dobro aktivnimi spojinami (MIC < 8 µg/mL), ki delujejo proti *E. coli* (slika 35), saj je tudi tukaj delež spojin z vsaj štirimi obroči kar 54% (slika 36a). Še bolj izstopajoč je podatek, da je pri tej skupini spojin kar 82% tistih, ki imajo v spojini le dva ali tri obroče neaktivnih, torej je njihova MIC višja od 64 µg/mL (slika 36b), kar pomeni da z naraščanjem števila obročev narašča tudi protibakterijska aktivnost spojin.



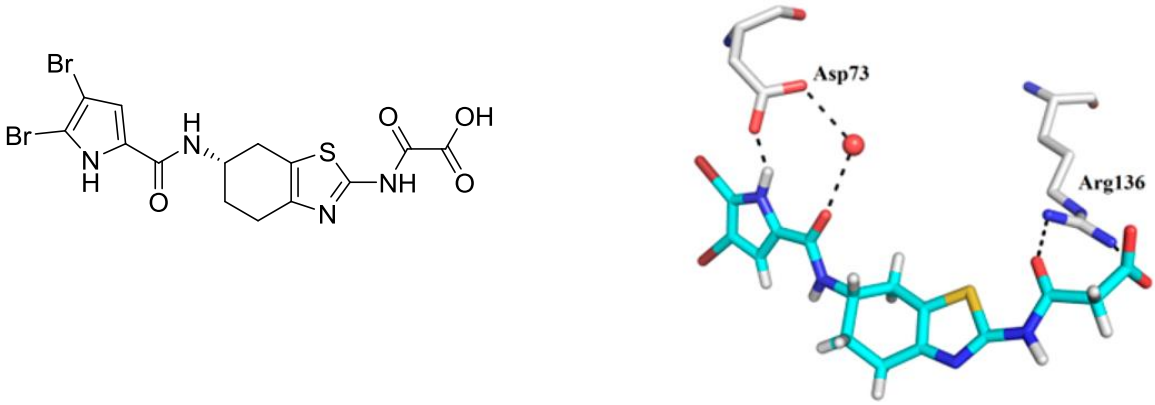
Slika 35: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od števila aromatskih obročev (N = 163)



Slika 36: Porazdelitev spojin glede na število obročev v razredu z a) MIC<8 µg/mL (N = 71) in b) MIC>64 µg/mL (N = 65)

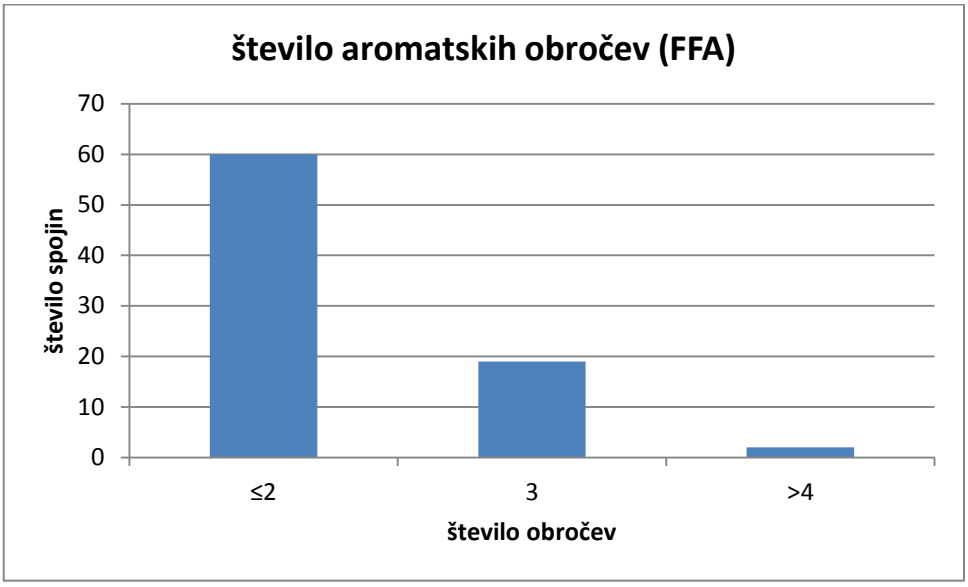
Znano je, da se ATP veže v vezavno mesto na GyrB tako, da tvori vodikove vezi prek svojega adeninskega obroča s stranskimi verigami asparaginske kisline, glicina in treonina. Zaviralci GyrB pa se vežejo tako, da tvorijo dve vodikovi vezi s stransko verigo asparaginske kisline, in sicer eno direktno, drugo pa preko strukturno ohranjene molekule vode in tako preprečijo vezavo molekule ATP. Obenem pa je zaželeno tudi, da ima molekula možnost tvorbe dodatnih vodikovih vezi, ki z vezavo na aminokislinski ostanek arginina še stabilizirajo umestitev inhibitorja v vezavno mesto encima ter možnost tvorbe hidrofobnih interakcij v vezavnem žepu za adenozin. Predvsem spojine, ki v svoji strukturi

vsebujejo denimo pirimidoindolni ali benzotiazolni obroč (slika 37) so obetavne z vidika, da lahko z različnimi substituenti na osnovnem obroču dosežemo obliko molekule, ki je zelo komplementarna z ATP vezavnim mestom GyrB. (34, 35).



Slika 37: Strukturna formula predstavnika 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnih inhibitorjev in prikaz ključnih interakcij z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu.

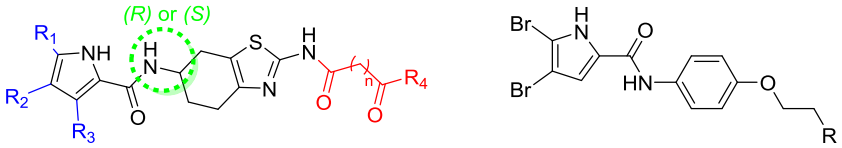
4.6.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin



Slika 38: Porazdelitev spojin glede na število aromatskih obročev v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

Popolnoma v nasprotju kot smo ugotovili iz literaturnih podatkov ima večina spojin, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo, v svoji strukturi največ dva aromatska

obroča (slika 38). Večina teh spojin je iz skupine 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolov in *N*-fenil-4,5-dibromopirolamidov, ki vsebujejo le dve aromatski strukturi (slika 39).



Slika 39: Splošni strukturni formuli zaviralcev iz FFA knjižnice

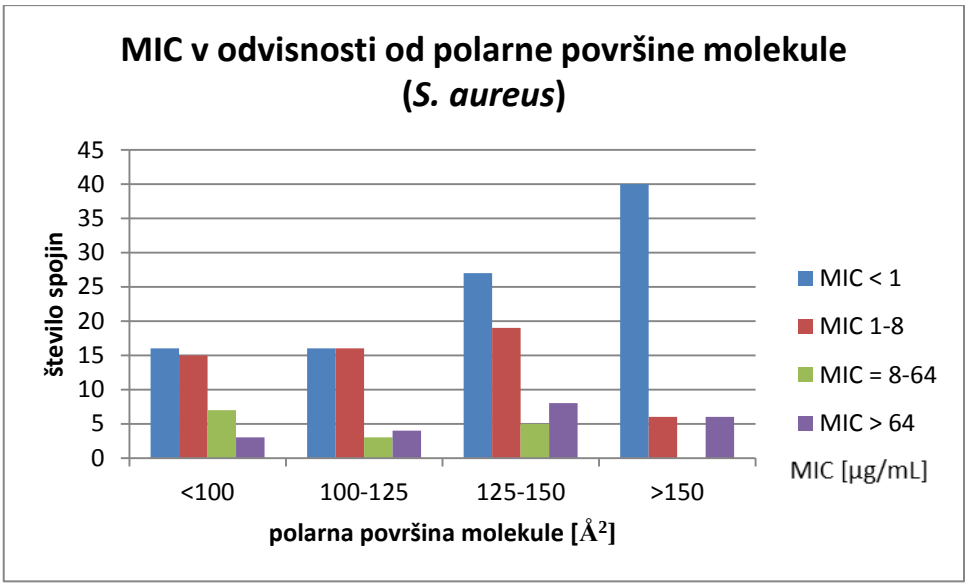
Tudi takšne molekule so lahko dobro aktivne z uvedbo primernih funkcionalnih skupin na mestih R. Kljub temu bi bilo verjetno koristno, da bi na teh mestih vključili dodaten aromatski obroč in se tako približali lastnostim, ki jih imajo dobro aktivne spojine iz literature.

4.7 Polarna površina molekule

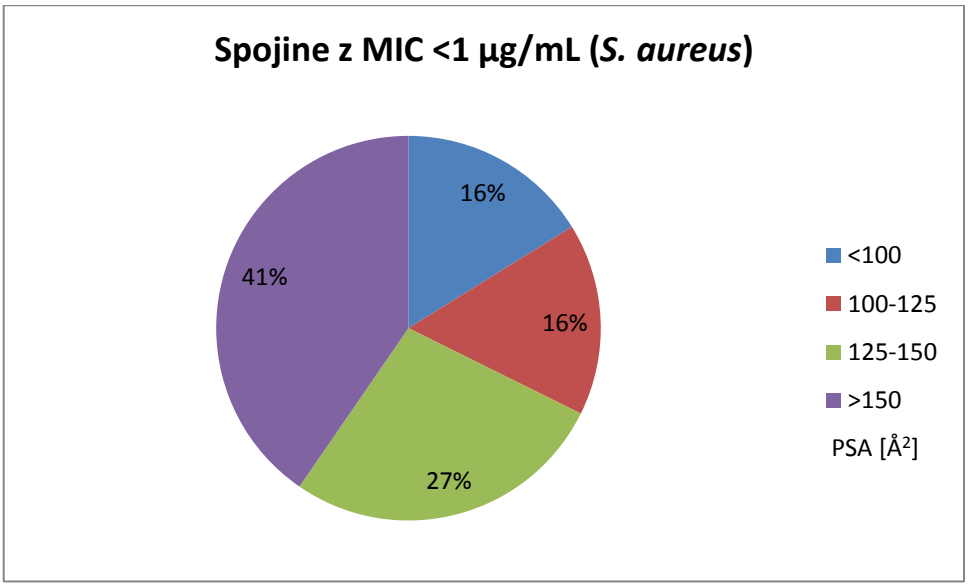
Polarna površina molekule je definirana kot vsota površin vseh polarnih atomov, običajno predvsem kisika in dušika, vključno z atomi vodika, ki so vezani na njih. Ta lastnost določa kako, če sploh, bo molekula prehajala celične membrane.

4.7.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah imajo spojine z dobro protibakterijsko aktivnostjo precej veliko polarno površino. Pri več kot dveh tretjinah (68%) površina presega 125 $Å^2$, od tega se jih v razredu od 125 $Å^2$-150 $Å^2$ nahaja 27%, v razredu nad 150 $Å^2$ pa kar 41% (slika 40, 41). Na tem mestu pa se pojavlja vprašanje, kako bo takšna razmeroma velika polarna površina vplivala na farmakokinetiko ob denimo peroralni aplikaciji, kjer je za prehajanje lipidnih membran zaželena manjša polarna površina molekule. Nekateri avtorji navajajo, da naj bo le-ta manjša od 140 $Å^2$. (44) Morebiti je to tudi eden od razlogov, da na trgu še ni registrirane zdravilne učinkovine, ki bi delovala zaviralno na DNA-girazo na podenoti B.



Slika 40: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od polarne površine molekule (N = 191)

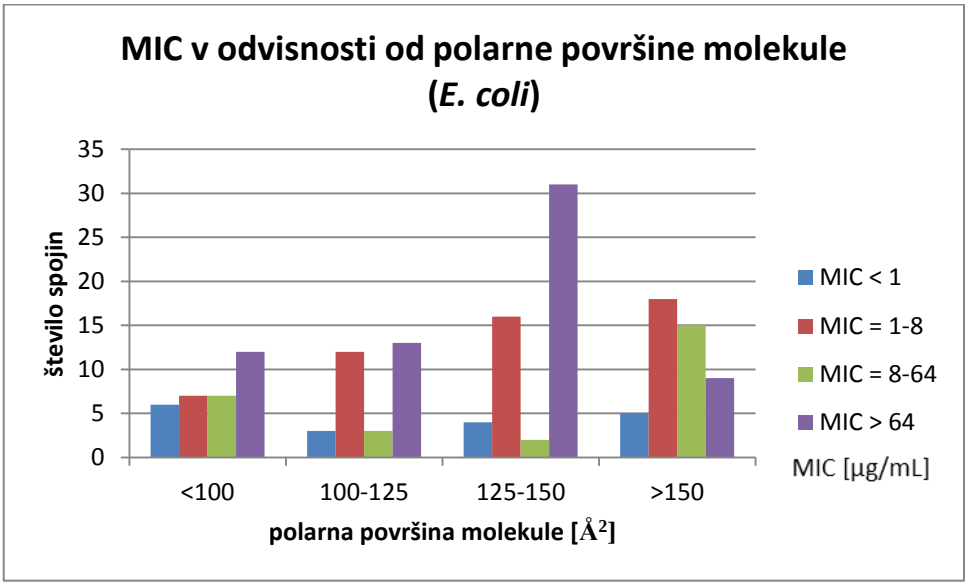


Slika 41: Porazdelitev spojin glede na polarno površino molekule v razredu z MIC<1 µg/mL (*S. aureus*) (N = 99)

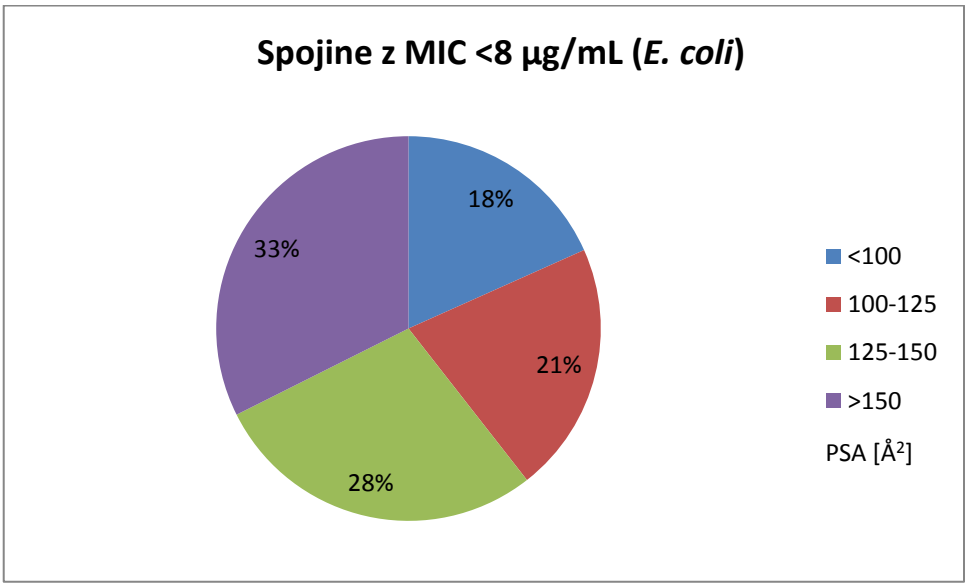
4.7.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

V skupini dobro aktivnih inhibitorjev, ki delujejo proti po Gramu negativnim bakterijam, so rezultati, kar se tiče polarne površine molekule, bolj uravnoteženi. Nekoliko višji je odstotek spojin v prvih dveh razredih. V razredu s površino manjšo od 100 $Å^2$ je ta delež 18%, v naslednjem med 100 $Å^2$ in 125 $Å^2$ pa 21% (slika 42, 43). Kot že omenjeno, temu botrujejo razlike v zgradbi celične stene. Manj polarne spojine so tudi manj podvržene

črpanju iz celice. Po drugi strani pa nekatere molekule vsebujejo dodatne šibko kisle in obenem polarne skupine (npr. ketokisline), ki v citosolu bakterije ionizirajo in se tako ujamejo v celici, kar je koristno, saj molekule z nabojem ne morejo prehajati nazaj iz celice. Takšne ionizirane spojine so tudi manj dovzetne za izločanje z izlivnimi črpalkami (38, 39).

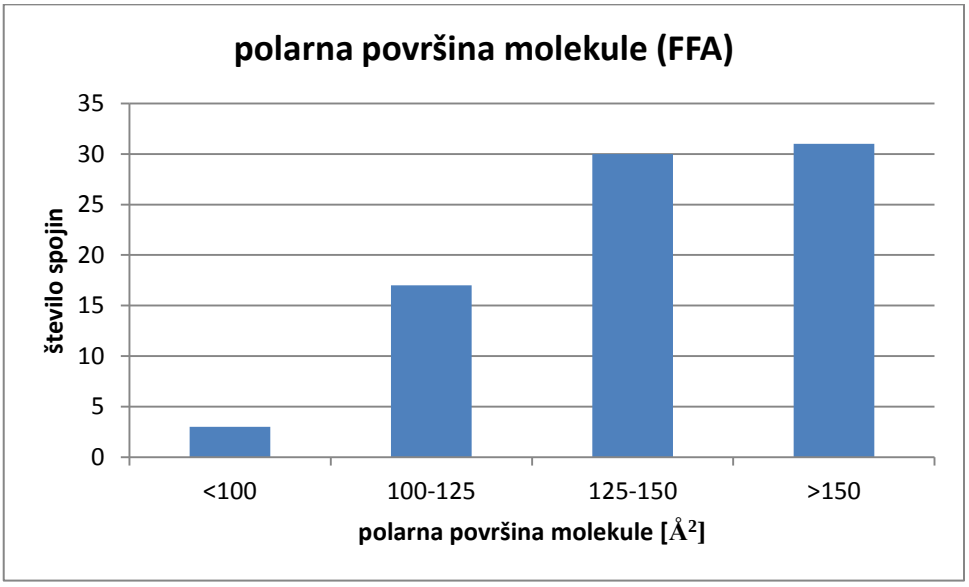


Slika 42: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od polarne površine molekule (N = 163)



Slika 43: Porazdelitev spojin glede na polarno površino molekule v razredu z MIC<8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

4.7.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin



Slika 44: Porazdelitev spojin glede na polarno površino molekule v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

Kar 75% spojin, ki smo jih obdelali v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze, ima polarno površino večjo od 125 $Å^2$ (slika 44). To se sklada z rezultati, ki smo jih izračunali za po Gramu pozitivne bakterije, medtem ko pri po Gramu negativnih večja polarnost ni nujno vedno koristna. Koristne so polarne skupine, ki v notranjosti bakterijske celice ionizirajo in s tem preprečujejo efluks iz celice, medtem ko prevelika polarna površina lahko tudi otežuje popolno prileganje v vezavnem mestu na GyrB, ki vsebuje tudi hidrofoben žep.

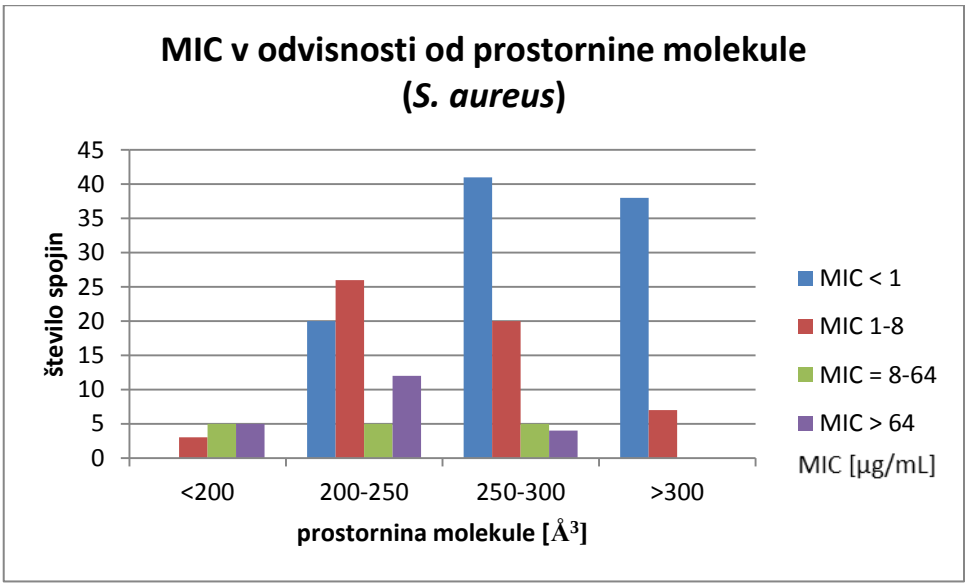
4.8 Prostornina molekule

Izraz prostornina molekule se nanaša na prostornino, ki bi jo zavzeli atomi, ki sestavljajo molekulo, v kolikor bi bili ti atomi okrogli, sferični delci z van der Waalsovim polmerom.

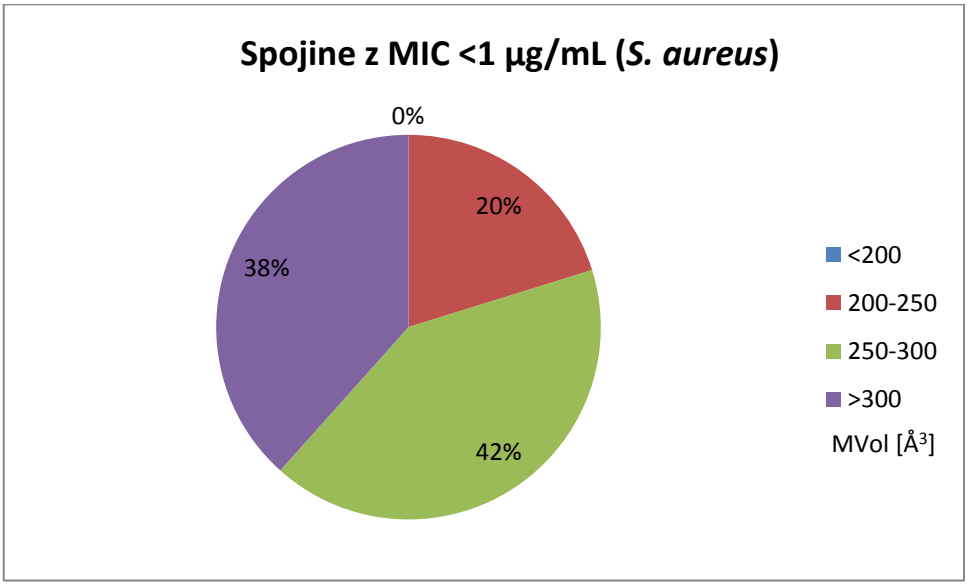
4.8.1 Spojine, ki delujejo proti Gram pozitivnim bakterijam

V množici spojin, ki so dobro učinkovite proti bakterijskim sevom *S. aureus*, ni nobene s prostornino manjšo od 200 $Å^{3.}$ Petina molekul se nahaja v razredu med 200 in 250 $Å^3$, ostale pa imajo prostornino večjo od 250 $Å^3$, vendar nobena od spojin ne presega prostornine 400 $Å^3$ (slika 45, 46). Prevelike molekule namreč ne bi našle poti do tarčnega mesta na GyrB, saj je mesto, kamor se veže ATP, dostopno skozi vrata, v katerih je razdalja med dvema β-ravninama le 20 Å. Pravtako bi prevelike molekule veliko težje

prehajale bakterijsko membrano. Po drugi strani pa spojina ne sme biti premajhna, saj v nasprotnem primeru ne bi bila sposobna tvoriti zadostnega števila interakcij z aminokislinskimi ostanki v vezavnem žepu oziroma ne bi zagotavljala prostorske komplementarnosti z vezavnim mestom.



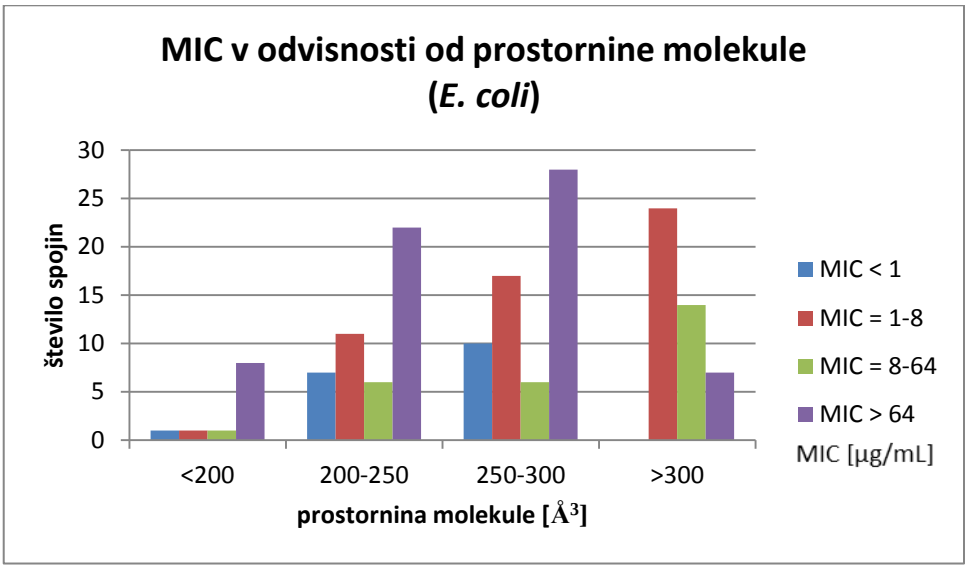
Slika 45: MIC (*S. aureus*) v odvisnosti od prostornine molekule (N = 191)



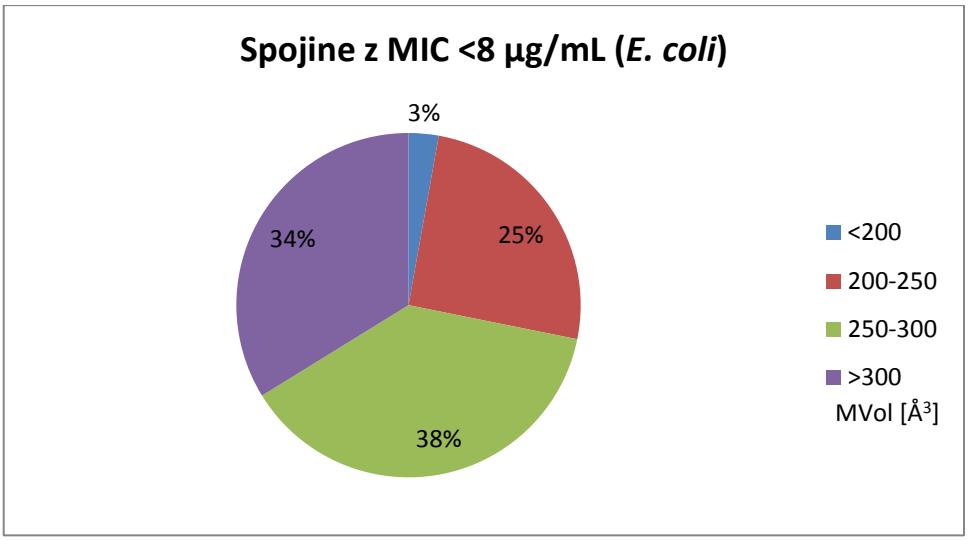
Slika 46: Porazdelitev spojin glede na prostornino molekule v razredu z MIC<1 µg/mL (*S. aureus)* (N = 99)

4.8.2 Spojine, ki delujejo proti Gram negativnim bakterijam

Glede na podatke, ki jih imamo za spojine z močnim protibakterijskim delovanjem na *E. coli*, je rezultat dokaj podoben. Več kot dve tretjini je spojin, katerih prostornina je večja od 250 $Å^3$. Od tega jih ima 38% prostornino v razredu med 250 $Å^3$ in 300 $Å^3$ ter 34% večjo od 300 $Å^3$ (slika 47, 48). Strukture GyrB se med različnimi družinami bakterij sicer nekoliko razlikujejo v zaporedju aminokislin. Tako imajo bakterije *E. coli* v žepu, kjer se sidra ATP, več stranskih verig valina namesto izolevcina, kar pomeni, da je žep nekoliko večji in je za optimalno prileganje potrebna malenkost večja prostornina molekule. Tudi v tem primeru pa bi prevelika prostornina pomenila nezmožnost prehajanja v bakterijo preko porinov. (7, 38, 39)

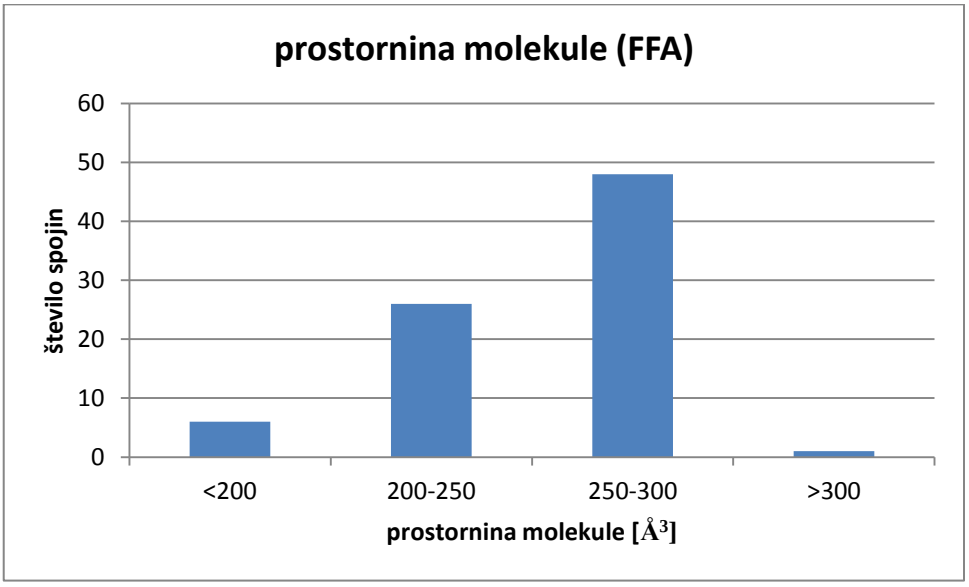


Slika 47: MIC (*E. coli*) v odvisnosti od prostornine molekule (N = 163)



Slika 48: Porazdelitev spojin glede na prostornino molekule v razredu z MIC<8 µg/mL (*E. coli*) (N = 71)

4.8.3 Primerjava s FFA knjižnico spojin

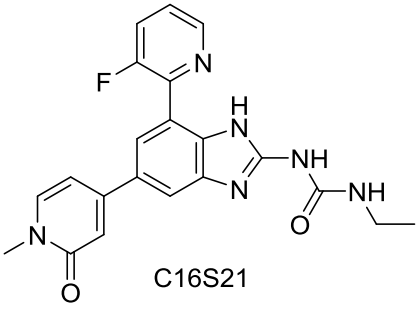


Slika 49: Porazdelitev spojin glede na prostornino molekule v FFA knjižnici zaviralcev DNA-giraze (N = 81)

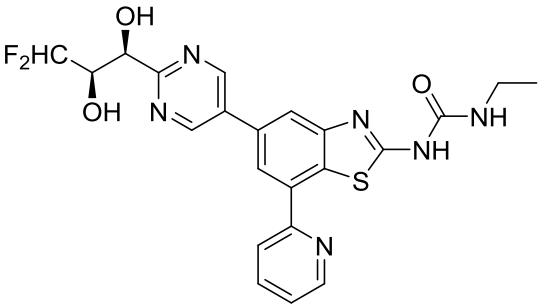
Podobno kot pri molekulski masi, tudi pri vprašanju o primerni prostornini molekule ugotavljamo, da se vrednosti spojin FFA ne razlikujejo bistveno od literaturnih izračunov. Redke so spojine s prostornino manjšo od 200 $Å^3$, medtem ko jih največ sodi v velikostni razred od 250 $Å^3$ do 300 $Å^3$ (slika 49).

4.9 Obetavne molekule zaviralcev DNA-giraze B

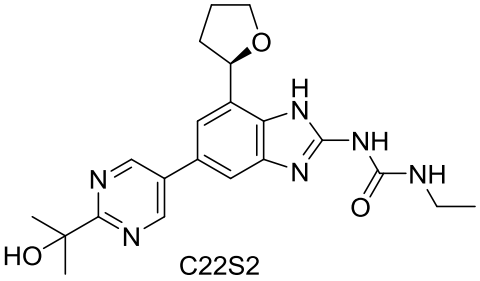
V številnih objavljenih člankih in raziskavah na temo zaviralcev GyrB je bilo objavljenih kar nekaj spojin, ki dosegajo zelo dobre rezultate glede na določene vrednosti kar se tiče IC_{50} in MIC tako na sevih po Gramu pozitivnih kot tudi po Gramu negativnih bakterij (slika 50).



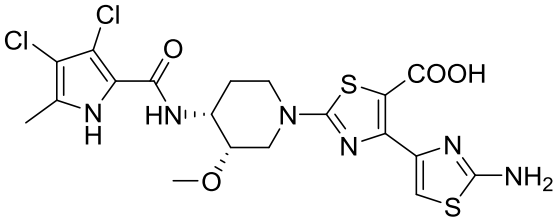
C16S21



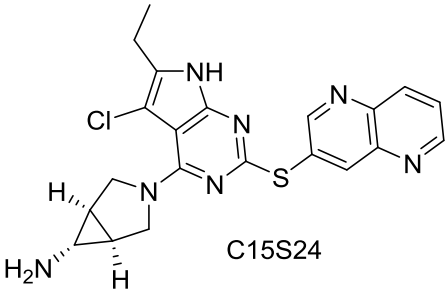
C11S34



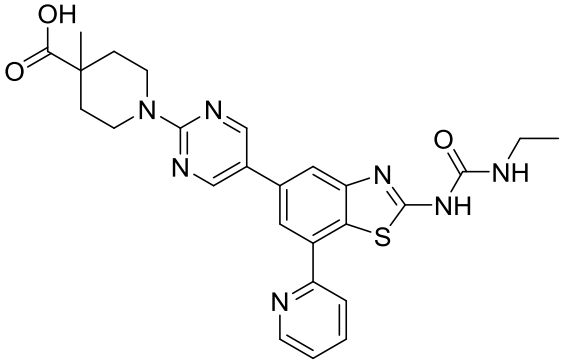
C22S2



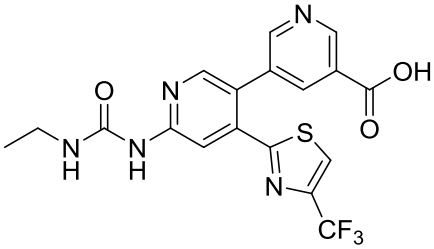
C3S90



C15S24



C21S2



C9S31

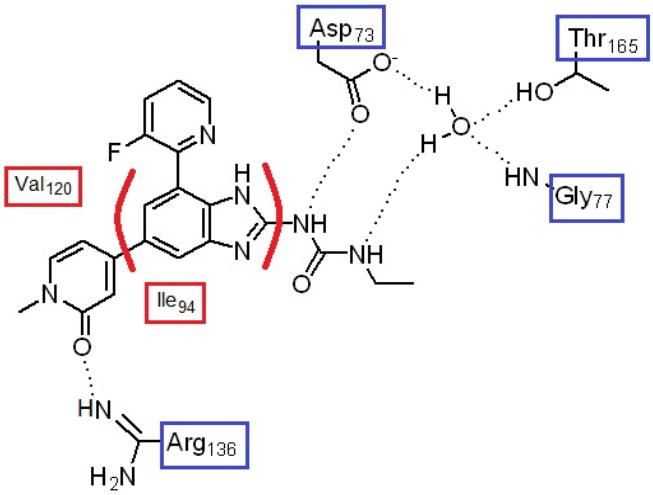
oznaka spojine	MIC (*S. aur*) [μg/mL]	IC_{50} (*S.aur*) [nM]	MIC (*E. coli*) [μg/mL]	IC_{50} (*E. coli*) [nM]	M (Da)	clogP	H akc	H don	MV (Å^3)	PSA (Å^2)	Ref.
C16S21	0,016	n.d.	0,125	n.d.	406,4	1,88	4	3	248,7	103,0	26
C11S34	0,06	8,2	0,25	n.d.	486,5	1,88	7	4	293,3	161,4	21
C22S2	0,03	n.d.	4	n.d.	428,5	1,67	6	4	272,0	125,1	32
C3S90	0,06	9,8	4	51	531,4	2,44	8	4	322,4	202,9	13
C15S24	0,13	n.d.	4	n.d.	437,9	2,96	7	2	284	121,9	25
C21S2	0,12	n.d.	2	3,3	517,6	3,04	8	3	331,3	161,5	31
C9S31	>64	<1	>64	<1	437,4	2,43	6	3	249,3	145,3	19
n.d. – ni določeno											

Slika 50: Strukturne formule inhibitorjev in njihove fizikalno-kemijske lastnosti

Za boljšo predstavo si oglejmo nekaj literatrnih spojin, ki imajo izpostavljene nekatere zanimive lastnosti. Molekula C3S90 (slika 50) ima v svoji strukturi tako kisle kot bazične funkcionalne skupine, zato lahko tvori ion dvojček, kar izjemno ugodno vpliva na prehajanje bakterijskih membran in protibakterijski učinek. Ta molekula izkazuje dobro aktivnost tako proti po Gramu pozitivnim, kot tudi po Gramu negativnim bakterijam. Molekuli C15S24 in C21S2 (slika 50) izkazujeta zelo dobro aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijam. Obe molekuli sta bolj lipofilni od ostalih prikazanih v tabeli, tako da očitno prehajata zunanjo membrano preko porinov in potem iz periplazemskega prostora zaradi svojega bolj lipofilnega značaja lažje prehajata preko citoplazemske membrane. Spojina C9S31 (slika 50) pa je zanimiva iz vidika, da kljub odlični *in vitro* aktivnosti na encimu, ki je celo nižja od 1 nM, ne izkazuje prav nikakršne protibakterijske aktivnosti na izbranih sevih.

Na primeru ene od molekul bomo predstavili, kateri fragmenti so odgovorni za interakcije z aktivnim mestom na encimu (slika 51). Centralni del spojine C16S21 je benzimidazolni obroč, ki omogoča hidrofobne interakcije z vezavnim mestom za ATP (preko izolevcina in valina). Sečninski fragment molekule tvori vodikove vezi s stranskimi verigami asparaginske kisline, treonina in glicina. Te vodikove vezi so dodatno stabilizirane preko molekul kristalne vode. Na benzimidazolu na mestu 5 je pripet *N*-metilpiridonski obroč. Preko kisikovega atoma se tvorijo pomembne vodikove vezi s stransko verigo arginina. Zelo polaren fluoropiridin, ki je na centralni obroč pripet na mestu 7, pa je namenjen

dvojnemu delovanju in omogočeni inhibiciji sorodnega encima topoizomeraze IV, s čimer dosežemo izjemno nizek MIC. (42)



Slika 51: Prikaz interakcij med molekulo C16S21 in aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu GyrB. Z rdečo so označene aminokisline, ki tvorijo hidrofobne interakcije z modro pa tiste, ki tvorijo vodikove vezi (vključno z molekulo kristalne vode)

4.10 Pomanjkljivosti analize

Najprej je treba omeniti dokaj majhen nabor preiskovanih spojin, ki bi ga bilo v nadaljnje potrebno razširiti in vanj vključiti še nove spojine iz literature, prav tako pa bi lahko vključili tudi druge strukturne razrede zaviralcev DNA-giraze B, ki so jih sintetizirali ma Katedri za farmacevtsko kemijo. Naslednja pomembna omejitev raziskave so podatki o zaviralnih aktivnostih spojin. V večini primerov so v raziskovalnih člankih podane vrednosti IC_{50}, ki so močno odvisne od samega testnega sistema, kar lahko vpliva na samo analizo. Vendar večina spojin, analiziranih pri našem delu, prihaja iz industrije in so zato rezultati verjetno verodostojni. Idealno bi bilo, če bi imeli podatke podane s konstantami inhibicije (K_i), vendar je bilo takšnih podatkov malo. Če spojine niso imele določene vrednosti IC_{50} na izbranem sevu (*S. aureus* in *E. coli*), smo pri nekaterih spojinah upoštevali konstante inhibicije (K_i), pri nekaterih pa smo uporabili vrednost IC_{50}, ki je bila določena na drugem sorodnem bakterijskem sevu (npr. *Streptococcus pneumoniae* namesto *S. aureus*). Podobno je bilo tudi pri vrednostih MIC, kjer smo za nekaj spojin z delovanjem proti po Gramu negativnim bakterijam izbrali bakterijo *Haemophilus influenzae*, za po Gramu pozitivne pa bakterijo *Streptococcus pneumoniae*, saj so te vrednosti načeloma dober približek vrednostimza *E. coli* oziroma *S. aureus*. Podobno smo nekaj MIC vrednosti

nadomestili z maksimalno neefektivno koncentracijo (MNEC). Velja omeniti še različne bakterijske testne sisteme, ki so jih uporabljali v raziskavah. Pri nekaterih so merili ATPazno aktivnost encima oziroma samo podenote B, pri drugih pa so uporabljali funkcijski test, ki daje bolj relevantne rezultate. Kot zadnjo pomankljivost naj omenimo ponovljivost poskusov, ki ob izvajanju raziskav v različnih laboratorijih po celem svetu ne more biti popolna.

5 SKLEP

Zbrali in analizirali smo preko 200 molekul, ki so jih raziskovalci, ki so v večini primerov iz industrije, sintetizirali z namenom, da se približajo odkritju nove protibakterijske učinkovine, ki bi pomenila pomembno odkritje v boju proti bakterijskim okužbam, saj zaradi naraščujoče bakterijske odpornosti pada učinkovitost široko uporabljanih protibakterijskih učinkovin. S to diplomsko nalogo smo poizkusili postaviti nekaj smernic, kakšne fizikalno-kemijske lastnosti naj bi zaviralci DNA-giraze imeli.

Molekulska masa molekule naj bo med 300 in 600 Da, logaritem porazdelitvenega koeficienta pa naj bo med 1 in 4. Če želimo imeti izboljšano aktivnost na po Gramu negativne bakterije, naj bo molekula manjša in bolj polarna. S tem maksimalno izkoristimo porine za vstop v bakterijo in tako ustvarimo pozitiven gradient v celico, saj je sposobnost črpanja spojine iz celice manjša kot je priliv vanjo. Druga možnost je, da ustvarimo večjo molekulo, ki pa ima v svoji strukturi funkcionalne skupine, ki omogočijo obnašanje molekule kot ion dvojček. Te ne morejo uporabljati porinov za prehajanje, vendar se zaradi naboja, ki ga ima spojina, ko je enkrat znotraj celice, tam ujame in ni podvržena izlivnim črpalkam. Preveč polarne molekule se ne bi dobro ujele v žep za ATP na GyrB, saj so za vsidranje pomembne tudi hidrofobne interakcije na stranskih verigah aminokislin izolevcina in valina. Preveč hidrofobne pa ne bi uspešno prehajale bakterijske stene. Da bi kar se da posnemali interakcije, ki jih tvori molekula ATP v vezavnem mestu, naj imajo spojine od 6 do 10 akceptorjev vodikove vezi in od 2 do 4 donorje vodikove vezi. Pomembna je tudi trodimenzionalna oblika molekule, ki mora spominjati na obliko črke U. To dosežemo z uvedbo raznih aromatskih obročev v molekulo. Vsaj trije oziroma štirje so v večini preiskovanih spojin poskrbeli za to, da se oblika inhibitorja dobro prilega vezavnemu mestu tarče. Prostornina molekule je pomembna tako iz vidika transporta skozi porine kot tudi prehajanja ozkih vrat v strukturi encima. Rezultati kažejo, da so najprimernejše vrednosti med 200 $Å^3$ in 400 $Å^3$. Večje molekule ne bi prispele do aktivnega mesta, saj je najmanjša ožina, ki jo mora molekula na poti premagati široka le 20 Å. Manjše spojine pa bi imele svoje funkcionalne skupine preveč oddaljene od mest na tarči, s katerimi morajo tvoriti vodikove vezi. Polarna površina molekule naj bo med 100 $Å^2$ in 180 $Å^2$. Višje vrednosti polarne površine kot je običajno pri ostalih zdravilnih učinkovinah so potrebne zato, da zmanjšamo izliv inhibitorja iz citosola zaradi številnih črpalk v notranjosti bakterije. Obenem pa so številne polarne funkcionalne skupine (npr.

keto skupina) potrebne za tvorbo vodikovih vezi z argininom, asparaginsko kislino in ostalimi stranskimi verigami v aminokislinskem zaporedju v vezavnem mestu na DNA-girazi B.

Knjižica zaviralcev DNA-giraze, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo, zaenkrat ni dajala vzpodbudnih rezultatov pri vrednotenju protibakterijskega delovanja. Kljub encimski zaviralni aktivnosti v nanomolarnem območju (50-500 nM) zaradi neugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti in dejstva, da so spojine verjetno substrati izlivne črpalke pri *E. coli*, večina spojin nima protibakterijske aktivnosti, ali pa je ta dokaj šibka (50-100 μM). Nadejamo se, da bodo določene modifikacije strukture obstoječih inhibitorjev v skladu z zapisanimi smernicami pomenile korak naprej v raziskavalnem delu na katedri in izboljšale protibakterijsko delovanje zaviralcev DNA-giraze.

6 LITERATURA

1. Aminov R: A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. Front Microbiol 2010; 1; 134.
2. Willey J M, Sherwood L M, Woolverton C J: Prescott, Harley and Klein's Microbiology, 7th Edition, McGraw-Hill, New York, 2008: 815-58.
3. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, Moore P K: Pharmacology, 5 Edition, Churchill Livingstone, London, 2003: 635-53.
4. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologijo z mikologijo in imunologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 427-46.
5. Silhavy T J, Kahne D, Walker S: The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2; 5.
6. Reese R J, Maxwell A, Wang J C: DNA Gyrase: Structure and function. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1991; 26: 335-75.
7. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. Curr. Top. Med. Chem. 2014; 14; 130-51.
8. Bradbury B J, Pucci M J: Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. Curr. Opin. Pharmacol. 2008; 8; 574-81.
9. Bissachi G S, Manchester J I: A new class antibacterial – almost. Lessons in drug discovery and development: A critical analysis of more than 50 years of effort toward ATPase inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. ACS Infect. Dis. 2015; 1; 4-41.
10. Houlton S: Breaking the rules. Chem. World 2008; 6; 58-62.
11. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-based disovery of substitued 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. J. Med. Chem. 2012; 55; 6413-26.
12. Basarab G, Hill P, Garner E, Hull K, Green O, Sherer B, Dangel B, Manchester J, Bist S, Hauck S, Zhou F, Uria-Nickelsen M, Illingworth R, Alm R, Rooney M, Eakin A: Optimization of pyrrolamide topoisomerase II inhibitors toward identification of an antibacterial clinical candidate (AZD5099). J. Med. Chem. 2014; 57; 6060-82.
13. East S, Bantry White C, Barker O, Barker S, Bennett J, Brown D, Boyd A, Brennan C, Chowdhury C, Collins I, Convers-Reignier E, Dymock B, Fletcher R, Haydon D,

Gardiner M, Hatcher S, Ingram P, Lancett P, Mortenson P, Papadopoulos K, Smee C, Thomaides-Brears H, Tye H, Workman J, Czaplewski L: DNA gyrase (GyrB)/topoisomerase IV (ParE) inhibitors: Synthesis and antibacterial activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009; 19; 894-9.

14. Starr J, Sciotti R, Hanna D, Huband M, Mullins L, Cai H, Gage J, Lockard M, Rauckhorst M, Owen R, Lall M, Tomilo M, Chen H, McCurdy S, Barbachyn M: 5-(2-pyrimidinyl)-imidazo[1,2-α]pyridines are antibacterial agents targeting the ATPase domains on DNA gyrase and topoisomerase IV. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009; 19; 5302-6.
15. Manchester J, Dussault D, Rose J, Boriack-Sjodin A, Uria-Nickelsen M, Ioannidis G, Bist S, Fleming P, Hull K: Discovery of a novel azaindole class of antibacterial agents targeting the ATPase domains of DNA gyrase and Topoisomerase IV. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012; 22; 5150-6.
16. Axford L, Agarwal P, Anderson K, Andrau L, Atherall J, Barker S, Bennett J, Blair M, Collins I, Czaplewski L, Davies D, Gannon C, Kumar D, Lancett P, Logan A, Lunniss C, Mitchell D, Offermann D, Palmer J, Palmer N, Pitt G, Pommier S, Price D, Rao N, Saxena R, Shukla T, Singh A, Singh M, Srivastava A, Steele C, Stokes N, Thomaides-Brears H, Tyndall E, Watson D, Haydon D: Design, synthesis and biological evaluation of –substituted isonipecotic acid benzothiazole analogues as potent bacterial type II topoisomerase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013; 23; 6598-603.
17. Sherer B, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch III J, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjodin A, Read J, DeGrace N, Uria-Nickelsen M, Illingworth R, Eakin A: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21; 7416-20.
18. Basarab G, Manchester J, Bist S, Boriack-Sjodin A, Dangel B, Illingworth R, Sherer B, Sririam S, Uria-Nickelsen M, Eakin A: Fragment-to-hit-to-lead discovery of a novel pyridylurea scaffold of ATP competitive dual targeting type II topoisomerase inhibiting antibacterial agents. J. Med. Chem. 2013; 56; 8712-35.
19. Yule I, Czaplewski L, Pommier S, Davies D, Narramore S, Fishwick C: Pyridine-3-carboxamide-6-yl-ureas as novel inhibitors of bacterial DNA grase: Structure based design, synthesis, SAR and antimicrobial activity. Europ. J. Med. Chem. 2014; 86; 31-8.

20. Palmer J, Axford L, Barker S, Bennett J, Blair M, Collins I, Davies D, Ford L, Gannon C, Lancett P, Logan A, Lunniss C, Morton C, Offermann D, Pitt G, Rao N, Singh A, Shukla T, Srivastava A, Stokes N, Thomaides-Brears H, Yadav A, Haydon D: Discovery and in vivo evaluation of alcohol-containing benzothiazoles as potent dual-targeting bacterial DNA supercoiling inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014; 24; 4215-22.
21. Uria-Nickelsen M, Neckermann G, Sriram S, Andrews B, Manchester J, Carcanague D, Stokes S, Hull K: Novel topoisomerase inhibitors: microbiological characterisation and in vivo efficacy of pyrimidines. Int. J. Antimicrob. Agents 2013; 41; 363-71.
22. Perola E, Stamos D, Grillot A-L, Ronkin S, Wang T, LeTiran A, Tang Q, Deininger D, Liao Y, Tia S-K, Drumm J, Nicolau D, Tessier P, Mani N, Grossman T, Charifson P: Successful application of serum shift prediction models to the design of dual targeting inhibitors of bacterial gyrase B and topoisomerase IV with improved in vivo efficacy. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014; 24; 2177-81.
23. Tari L, Trzoss M, Bensen D, Li X, Chen Z, Lam T, Zhang J, Creighton C, Cunningham M, Kwan B, Stidham M, Shaw K, Lightstone F, Wong S, Nguyen T, Nix J, Finn J: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase b (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part I: Structure guided discovery and optimization of dual targeting agents with potent, broad-spectrum enzymatic activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013; 23; 1529-36.
24. Trzoss M, Bensen D, Li X, Chen Z, Lam T, Zhang J, Creighton C, Cunninghem M, Kwan B, Stidham M, Nelson K, Brown-Driver V, Castellano A, Shaw K, Lightstone F, Wong S, Nguyen T, Finn J, Tari L: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase b (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part II: Development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013; 23; 1537-43.
25. Charifson P, Grillot A-L, Grossman T, Parsons J, Badia M, Bellon S, Dininger D, Drumm J, Gross C, LeTiran A, Liao Y, Mani N, Nicolau D, Perola E, Ronkin S, Shannon D, Swenson L, Tang Q, Tessier P, Tian S-K, Trudeau M, Wang T, Wei Y, Zhang H, Stamos D: Novel dual-targeting benzimidazole urea inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV possessing potent antibacterial activity: Intelligent

design and evolution through the judicious use of structure-guided design and structure-activity relationships. J. Med. Chem. 2008; 51; 5243-63.

26. Lübbers T, Anghern P, Gmünder H, Herzig S. Design, synthesis and structure-activity relationship studies of new phenolic DNA gyrase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007; 17; 4708-14.
27. Uria-Nickelsen M, Blodgett A, Kamp H, Eakin A, Sherer B, Green O: Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterisation of pyrrolamides. Int. J. Antimicrob. Agents 2013; 41; 28-35.
28. Grossman T, Bartels D, Mullin S, Gross C, Parsons J, Liao Y, Grillot A-L, Stamos D, Olson E, Charifson P, Mani N: Dual targeting of GyrB and ParE by a novel aminobenzimidazole class of antibacterial compounds. Antimicrob. Agents Chemoter. 2007; 51; 657-66.
29. Mani N, Gross C, Parsons J, Hanzelka B, Müh U, Mullin S, Liao Y, Grillot A-L, Stamos D, Charifson P, Grossman T: In vitro characterization of the antibacterial spectrum of novel bacterial type II topoisomerase inhibitors of the aminobenzimidazole class. Antimicrob. Agents Chemoter. 2006; 50; 1228-37.
30. Stokes N, Thomaides-Brears H, Barker S, Bennett J, Berry J, Collins I, Czaplewski L, Gamble V, Lancett P, Logan A, Lunniss C, Peasley H, Pommier S, Price D, Smee C, Haydon D: Biological evaluation of benzothiazole ethyl urea inhibitors of bacterial type II topoisomerases. Antimicrob. Agents Chemoter. 2013; 57; 5977-86.
31. Finn J: Evaluation of WO2012177707 and WO2012097269: Vertex's phosphate prodrugs of gyrase and topoisomerase antibacterial agents. Expert Opin. Ther. Patents 2013; 23; 1233-7.
32. Sun J, Peng-Cheng L, Yin Y, Yuan R-J, Ma J, Zhu H-L: Synthesis, structure and antibacterial activity of potent DNA gyrase inhibitors: N'-benzoyl-3-(4-bromophenyl)-1*H*-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives. Plos One 2013; 8; e69751.
33. Ronkin S, Badia M, Bellon S, Grillot A-L, Gross C, Grossman T, Mani N, Parsons J, Stamos D, Trudeau M, Wei Y, Charifson P: Discovery of pyrazolthiazole as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010; 20; 2828-31.
34. Tari L W, Li X, Trzoss M, Bensen D C, Chen Z, Lam T, Zhang J, Lee S J, Hough G, Phillipson D, Akers-Rodriguez S, Cunningham M L, Kwan B P, Nelson K J,

Castellano A, Locke J B, Brown-Driver V, Murphy T M, Ong V S, Pillar C M, Shinabarger D L, Nix J, Lightstone F C, Wong S E, Nguyen T B, Shaw K J, Finn J: Tricyclic GyrB/ParE (TriBE) inhibitors: A new class of broad-spectrum dual-targeting antibacterial agents. Plos One 2013; 8; 12.

35. Tomašić T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvao S, Tammela P, Banjanac M, Ergović G, Anderluh M, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP-binding site. J. Med. Chem. 2015; 58 (14); 5501-21.
36. O'Shea R, Moser H E: Physicochemical properties of antibacterial compounds: Implications for drug discovery. J. Med. Chem. 2008; 51 (10); 2871-8.
37. Manchester J I, Buurman E T, Bisacchi G S, McLaughlin R E: Molecular determinants of AcrB-mediated bacterial effluc implications for drug discovery. J. Med. Chem. 2012; 55; 2532-7.
38. Brown D G, May-Dracka T L, Gagnon M M, Tommasi R: Trends and exceptions of physical properties on antibacterial activity for Gram-positive and Gram-negative pathogens. J. Med Chem. 2014; 57 (23); 10144-61.
39. Mayer C, Janin Y L: Non-quinolone inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases: A feat of bioisosterism. Chem. Rev. 2014; 114; 2313-42.
40. Nikaido H: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003; 67; 593-656.
41. Nikaido H, Pages J M: Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 2012; 36; 340-63.
42. Charifson P, Grillot A L, Grossman T, Parsons J, Badia M, Bellon S, Dininger D, Drumm J, Gross C, LeTiran A, Liao Y, Mani N, Nicolau D, Perola E, Ronkin S, Shannon D, Swenson L, Tang Q, Tessier P, Tian S K, Trudeau M, Wang T, Wei Y, Zhang H, Stamos D: Novel dual-targeting benzimidazole urea inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV possessing potent antibacterial activity: Intelligent design and evolution through the judicious use of structure-guided design and structure-activity relationships. J. Med. Chem. 2008; 51; 5243-63.
43. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. Curr. Med. Chem. 2007; 14 (19); 2033-47.

44. Veber D, Johnson S, Cheng H Y, Smith B, Ward K, Kopple K: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J. Med. Chem. 2002; 45 (12); 2615-23.

7 PRILOGA

Oznaka je sestavljena iz številke referenčnega članka (Cx) in zaporedne številke v njem objavljene spojine (Sy).

oznaka	SMILES formula	IC_{50} [nM]				MIC [μg/mL]		ref
		E. coli DNA gyrase	*S. aureus* DNA gyrase	*E. coli* topo IV	*S. aureus* topoIV	*E. coli*	*S. aureus*	
C2S6	CC(N=C(NC(C)=O)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(C(O)=O)C=C3)=N2	5500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	256	2
C2S18	CC(N=C(NC(CC)=O)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(C(O)=O)C=C3)=N2	1100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>256	2
C2S19	CC(N=C(N)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(S(=O)(N)=O)C=C3)=N2	8200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>256	2
C2S20	CC(N=C(NC(C)=O)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(O)C=C3)=N2	30000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>256	2
C2S21	CC(N=C(N)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(C(O)=O)C(O)=C3)=N2	67000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	256	2
C2S22	CC(N=C(N)S1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(O)C=C3)=N2	125000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	2
C3S22	[H][C@@]1(CC(CC[C@H]1NC(C(NC(C)=C2Cl)=C2Cl)=O)C(S3)=NC=C3C(O)=O)OC	n.d.	<10	910	n.d.	>64	1	3
C3S41	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCC(CC32OCCCO3)C(S4)=NC=C4C(O)=O	n.d.	<10	200	n.d.	>64	4	3
C3S43	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCC(C[C@@]32OC[C@@H](CO3)OC)C(S4)=NC=C4C(O)=O	n.d.	<10	51	n.d.	>64	4	3
C3S44	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCC(CC32OCC(C)(C)CO3)C(S4)=NC=C4C(O)=O	n.d.	<10	130	n.d.	>64	0.5	3
C3S45	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCC(CC32OCC4(CC4)CO3)C(S5)=NC=C5C(O)=O	n.d.	<10	41	n.d.	>64	0.5	3
C3S46	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCC(CC(OC3)2OCC3=C)C(S4)=NC=C4C(O)=O	n.d.	<10	170	n.d.	>64	2	3
C3S23	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCN(C3=NC=C(C(O)=O)S3)C[C@@H]2OC	n.d.	<10	240	n.d.	64	0.5	3
C3S47	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCN(C3=NC(C)=C(C(O)=O)S3)C[C@@H]2OC	n.d.	<10	65	n.d.	>8	0.053	3
C3S48	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCN(C3=NC(C=CC=C4C(O)=O)=C4S3)C[C@@H]2OC	n.d.	<10	14	n.d.	8	0.031	3
C3S51	O=C(C(NC(C)=C1Cl)=C1Cl)N[C@@H]2CCN(C3=NC(C(NC)=O)=C(C(O)=O)S3)C[C@@H]2OC	n.d.	<10	72	n.d.	18	0.063	3
C3S55	COCC1=C(SC(N(CC2)C[C@H]([C@H]2NC(C3=C(Cl)C(Cl)=C(C)N3)=O)OC)=N1)C(O)=O	n.d.	<10	160	n.d.	>8	1	3
C3S58	CC1=C(SC(N(CC2)C[C@H]([C@H]2NC(C3=C(Cl)C(Cl)=C(C)N3)=O)OC)=N1)C(O)=O	n.d.	<10	370	n.d.	>8	0.13	3
C3S73	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=CN=CC=N4)=C3C(O)=O	n.d.	<10	54	n.d.	>8	0.018	3
C3S74	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=NC=NN4C)=C3C(O)=O	n.d.	<10	85	n.d.	32	0.04	3
C3S75	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=NC=CC=N4)=C3C(O)=O	n.d.	<10	68	n.d.	23	0.12	3
C3S76	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=NC=NC=C4)=C3C(O)=O	n.d.	<10	43	n.d.	16	0.031	3
C3S79	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(OCN4C=CN=C4C)=C3C(O)=O	n.d.	<10	0.7	n.d.	16	<0.06	3

C3S82	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=CN(C)C=N4)=C3C(O)=O	n.d.	<10	62	n.d.	16	0.13	3
C3S84	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=NC=CN4)=C3C(O)=O	n.d.	<10	0.12	n.d.	>64	1	3
C3S88	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=CC=CC=N4)=C3C(O)=O	n.d.	<9.8	40	n.d.	8	<0.06	3
C3S89	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=NC=CS4)=C3C(O)=O	n.d.	<9.8	45	n.d.	8	<0.06	3
C3S90	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C4=CSC(N)=N4)=C3C(O)=O	n.d.	<9.8	51	n.d.	4	<0.06	3
C3S62	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NCCOC)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	53	n.d.	24	0.089	3
C3S63	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(N[C@@H](C)COC)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	73	n.d.	24	0.057	3
C3S64	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NC[C@H](C)OC)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	43	n.d.	>8	0.031	3
C3S65	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NC(COC)COC)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	51	n.d.	23	0.049	3
C3S66	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NC(COC)(COC)COC)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	42	n.d.	29	0.031	3
C3S67	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NCC4OCCO4)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	36	n.d.	>8	0.1	3
C3S68	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)N[C@@H]2CCN(C[C@@H]2OC)C(S3)=NC(C(NCC4COC(C)(C)OC4)=O)=C3C(O)=O	n.d.	<10	100	n.d.	14	<0.06	3
C4S27	O=C(NCC)NC1=NN2C(C3=NC=CS3)=CC(C4=CC=CN=C4)=CC2=N1	42	n.d.	11000	n.d.	>128	1	4
C4S31	O=C(NCC)NC1=NN2C(N3C=CC=N3)=CC(C4=CC=CN=C4)=CC2=N1	54	n.d.	25000	n.d.	4	2	4
C4S36	O=C(NCC)NC1=NN2C(C(NC)=O)=CC(C3=CC=CN=C3)=CC2=N1	640	n.d.	n.d.	n.d.	8	8	4
C4S37	O=C(NCC)NC1=NN2C(C(NCC)=O)=CC(C3=CC=CN=C3)=CC2=N1	41	n.d.	40000	n.d.	8	8	4
C4S39	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CC=CN=C3)=CC(C4=NC=CC=C4)=C2N1	<4	n.d.	14	n.d.	n.d.	0.031	4
C4S40	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CC=CN=C3)=CC(C4=CN=CC=C4)=C2N1	6	n.d.	1300	n.d.	n.d.	4	4
C4S41	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CC=CN=C3)=CC(N4N=CC=C4)=C2N1	<4	n.d.	46	n.d.	n.d.	0.063	4
C4S42	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CC=CN=C3)=CC(C(NC)=O)=C2N1	5	n.d.	150	n.d.	n.d.	16	4
C5S9	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=CC=N3)=CC(C4=CC=CN=C4)=CC2=N1	n.d.	48	n.d.	447	n.d.	0.5	5
C5S14	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=C(Cl)C=N3)=CC(C4=CC=CN=C4)=CC2=N1	n.d.	149	n.d.	419	n.d.	0.25	5
C5S27	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=CC=N3)=CC(C4=CC=C(C)N=C4)=CC2=N1	n.d.	44	n.d.	119	n.d.	0.25	5
C5S35	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=C(C)C=N3)=CC(C4=CN=CN=C4)=CC2=N1	n.d.	36	n.d.	258	n.d.	0.25	5
C5S39	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=C(C)C=N3)=CC(C4=CC(N(CC)C=C4)=O)=CC2=N1	n.d.	51	n.d.	624	n.d.	0.25	5
C5S40	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=C(C)C=N3)=CC(C4=CC(N(CCC)C=C4)=O)=CC2=N1	n.d.	97	n.d.	1020	n.d.	0.125	5
C5S41	O=C(NCC)NC1=CN2C(C3=NC=C(C)C=N3)=CC(C4=CC(N(CCOC)C=C4)=O)=CC2=N1	n.d.	401	n.d.	1640	n.d.	0.06	5
C6S10	CCNC(C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=CC(C(O)=O)=C3)=C2N4C=CC(C(F)(F)F)=N4)=O	n.d.	5	n.d.	5	n.d.	>25	6
C6S13	O=C(NC1CC1)C2=CC3=C(N2)N=CC(C4=CN=CC(C(O)=O)=C4)=C3N5C=CC(C(F)(F)F)=N5	n.d.	39	n.d.	6	n.d.	>25	6

C6S15	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=CC(C(N)=O)=C3)=C2N4C=CC(C(F)(F)F)=N4	n.d.	9	n.d.	9	n.d.	25	6
C6S16	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=CC(C(NC)=O)=C3)=C2N4C=CC(C(F)(F)F)=N4	n.d.	11	n.d.	16	n.d.	6.25	6
C6S17	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=CC(C#N)=C3)=C2N4C=CC(C(F)(F)F)=N4	n.d.	23	n.d.	10	n.d.	3.13	6
C6S18	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=CC(C4=NNC(O4)=O)=C3)=C2N5C=CC(C(F)(F)F)=N5	n.d.	<1	n.d.	3	n.d.	0.40	6
C6S19	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=CN=C(OC)C(C4=NNC(O4)=O)=C3)=C2N5C=CC(C(F)(F)F)=N5	n.d.	4	n.d.	3	n.d.	0.78	6
C6S20	O=C(NCC)C1=CC2=C(N1)N=CC(C3=C(OC)N=CC(C4=NNC(O4)=O)=C3)=C2N5C=CC(C(F)(F)F)=N5	n.d.	2	n.d.	3	n.d.	0.098	6
C7S3	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCC(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	n.d.	10	n.d.	n.d.	2	0.12	7
C7S18	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCC(C)(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	n.d.	8	n.d.	n.d.	2	0.12	7
C7S19	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCC(CC)(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	n.d.	12	n.d.	n.d.	4	0.06	7
C7S20	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCC(CCC)(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	13	n.d.	n.d.	n.d.	>16	0.5	7
C7S25	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CC=C(N5CCC(C)(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	n.d.	12	n.d.	n.d.	2	0.12	7
C7S26	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=NC=C(N5CCC(C)(C(O)=O)CC5)N=C4)=C2	n.d.	20	n.d.	n.d.	8	0.5	7
C7S27	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CC(N5CCC(C)(C(O)=O)CC5)=CN=C4)=C2	n.d.	15	n.d.	n.d.	4	1	7
C7S29	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCCC5(C)C(O)=O)N=C4)=C2	n.d.	5	n.d.	n.d.	1	0.5	7
C7S31	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N(CCCC5)C5(C)C(O)=O)N=C4)=C2	7	n.d.	n.d.	n.d.	8	0.5	7
C7S32	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=CC=CC=N3)=CC(C4=CN=C(N5CCC(C(O)=O)(C)CCC5)N=C4)=C2	n.d.	6	n.d.	n.d.	8	0.12	7
C8S1	NC(C1=CC(N2CCC(NC(C3=CC(Br)=C(C)N3)=O)CC2)=NC(Cl)=C1)=O	n.d.	100	n.d.	n.d.	>64	32	8
C8S2	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)NC(CC2)CCN2C3=NC=C(C(O)=O)S3	n.d.	20	n.d.	n.d.	>64	8	8
C8S10	ClC1=C(C(NC2CCN(C3=CC(C(N)=O)=CC(Cl)=N3)CC2)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	30	n.d.	n.d.	>64	4	8
C8S12	ClC1=C(C(NC2CCN(C3=CC(C(O)=O)=CC(Cl)=N3)CC2)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	10	n.d.	n.d.	>64	2	8
C8S13	ClC1=C(C(NC2CCN(C3=NC(C(O)=O)=CS3)CC2)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	20	n.d.	n.d.	>64	8	8
C8S16	ClC1=C(C(NC2CCN(C3=NC=C(C(NOC)=O)S3)CC2)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	50	n.d.	n.d.	>64	8	8
C8S19	ClC1=C(C(NC2CCN(C3=NC=C(C(O)=O)S3)CC2F)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	<10	n.d.	n.d.	>64	2	8
C8S26	ClC1=C(C(N[C@@H]2CCN(C3=NC=C(C(O)=O)S3)C[C@@H]2F)=O)NC(C)=C1Cl	n.d.	4	n.d.	n.d.	>64	2	8
C9S18	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=CC=C(C(O)=O)C=C2)C=N1	1600	880	28000	n.d.	>64	>64	9
C9S19	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=CN=CC(C(O)=O)=C2)C=N1	1400	850	24000	n.d.	>64	>64	9
C9S20	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=NC=C(C(O)=O)S2)C=N1	240	270	8800	n.d.	>64	>64	9
C9S21	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=NC(C=CC=C3C(O)=O)=C3S2)C=N1	n.d.	100	2100	n.d.	>64	>64	9

C9S22	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=NC=C(C(N)=O)S2)C=N1	560	550	27000	n.d.	>64	64	9
C9S23	O=C(NCC)NC1=CC=C(C2=NC(C=CC=C3C(N)=O)=C3S2)C=N1	94	39	12000	n.d.	>64	>64	9
C9S29	O=C(NCC)NC1=CC(C2=CC=CC=C2)=C(C3=CC(C(O)=O)=CN=C3)C=N1	96	60	2000	n.d.	>64	>64	9
C9S30	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(C)(C)C)=CS2)=C(C3=CC(C(O)=O)=CN=C3)C=N1	12	30	2300	n.d.	>64	>64	9
C9S31	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CC(C(O)=O)=CN=C3)C=N1	<1	<1	510	n.d.	>64	>64	9
C9S32	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CC(C(N)=O)=CN=C3)C=N1	17	<1	960	n.d.	>64	2.7	9
C9S33	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=NC=C(C(O)=O)S3)C=N1	<1	<1	940	n.d.	>64	>64	9
C9S34	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=NC4=C(C(C(O)=O)=CC=C4)S3)C=N1	<1	<1	360	n.d.	>64	3.1	9
C9S35	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CN=CC(C(O4)=NNC4=O)=C3)C=N1	<1	<1	230	n.d.	>64	0.04	9
C9S36	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CN=CC(C4=NN=C(C)O4)=C3)C=N1	<1	<1	510	n.d.	>64	0.19	9
C9S37	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CN=CC(C4=NC(C)=NO4)=C3)C=N1	<1	52	1400	n.d.	>64	0.37	9
C9S39	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CN=CC(C#N)=C3)C=N1	<1	<1	1100	n.d.	>64	0.33	9
C9S41	O=C(NCC)NC1=CC(C2=NC(C(F)(F)F)=CS2)=C(C3=CN=CC(/C(N)=N\O)=C3)C=N1	32	73	2000	n.d.	>64	0.36	9
C10S12	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=CC=CC(Cl)=C2)=O)C=N1)=O	1600	n.d.	n.d.	n.d.	>64	16	10
C10S13	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=CC=CC=C2Cl)=O)C=N1)=O	2100	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S15	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=CC=CC(F)=C2)=O)C=N1)=O	3000	n.d.	n.d.	n.d.	>64	32	10
C10S16	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=CC=CC(C)=C2)=O)C=N1)=O	3400	n.d.	n.d.	n.d.	>64	32	10
C10S25	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=NC=CS2)=O)C=N1)=O	420	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S26	CCNC(NC1=CC=C(C(NC2=NC=C(C(O)=O)S2)=O)C=N1)=O	960	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S33	CCNC(NC1=CC(NC2=CC(C)=CC=C2)=C(C(NC3=CC=CC(C)=C3)=O)C=N1)=O	99	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	10
C10S42	CCNC(NC1=CC(NC2=CC(C)=CC=C2)=C(C(NC3=NC=CS3)=O)C=N1)=O	98	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S52	CCNC(NC1=CC(N2C=CN=C2)=C(C(NC3=CC(Cl)=CC=C3)=O)C=N1)=O	550	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S68	CCNC(NC1=CC(C2=CC=CN=C2)=C(C(NC3=NC=CS3)=O)C=N1)=O	560	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S72	CCNC(NC1=CC(C2=CC=CC=C2)=C(C(NC3=CC(Cl)=CC=C3)=O)C=N1)=O	810	n.d.	n.d.	n.d.	>64	>64	10
C10S73	CCNC(NC1=CC(N2N=CC=C2)=C(C(NC3=CC(Cl)=CC=C3)=O)C=N1)=O	2960	n.d.	n.d.	n.d.	>64	8	10
C10S77	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CC=C2)=C(C(NC3=CC=CC=C3)=O)C=N1)=O	40	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	10
C10S78	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CC=C2)=C(C(NC3=CC(C)=CC=C3)=O)C=N1)=O	140	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	10
C10S79	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CC=C2)=C(C(NC3=CC(Cl)=CC=C3)=O)C=N1)=O	150	n.d.	n.d.	n.d.	>64	0.5	10
C10S80	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CC=C2)=C(C(NC3=CN=CC=C3)=O)C=N1)=O	170	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	10
C10S86	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CN=C2)=C(C(NC3=CC=CC=C3)=O)C=N1)=O	430	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	10
C10S87	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=CN=C2)=C(C(NC3=CN=CC=C3)=O)C=N1)=O	93	n.d.	n.d.	n.d.	>64	8	10
C10S88	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=C(O)C=C2)=C(C(NC3=CN=CC=C3)=O)C=N1)=O	28	24	940	86	>64	8	10
C10S92	CCNC(NC1=CC(NC2=CC=C(OC)C=C2OC)=C(C(NC3=CN=CC=C3)=O)C=N1)=O	46	41	42000	800	>64	1	10
C11S3	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C(C)(C)O)N=C4)=C2	n.d.	13.8	n.d.	n.d.	1	0.06	11
C11S12	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C5(CCCC5)O)N=C4)=C2	n.d.	10.8	n.d.	n.d.	1	0.03	11
C11S15	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C5(CCSCC5)O)N=C4)=C2	n.d.	10.1	n.d.	n.d.	2	0.12	11
C11S16	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C5(CCS(CC5)(=O)=O)O)N=C4)=C2	n.d.	11.4	n.d.	n.d.	1	0.25	11
C11S20	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C5(COC5)O)N=C4)=C2	n.d.	13.4	n.d.	n.d.	0.5	0.06	11
C11S21	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C(CC)O)N=C4)=C2	n.d.	13.8	n.d.	n.d.	1	0.06	11

C11S25	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C(C(CO)O)N=C4)=C2	n.d.	13.7	n.d.	n.d.	0.5	0.12	11
C11S34	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C([C@@H]([C@H](C(F)F)O)O)N=C4)=C2	n.d.	8.2	n.d.	n.d.	0.25	0.06	11
C11S35	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C([C@@H]([C@H](C(F)(F)F)O)O)N=C4)=C2	n.d.	9.9	n.d.	n.d.	0.5	0.06	11
C11S37	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CN=C([C@@H]([C@@H](C(F)(F)F)O)O)N=C4)=C2	n.d.	7.9	n.d.	n.d.	0.5	0.12	11
C11S50	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC(CN4CC[C@@H](F)C4)=C3)=CC(C5=CN=C(C(O)(C)C)N=C5)=C2	n.d.	9.3	n.d.	n.d.	1	0.06	11
C11S53	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC(CNC4CC4)=C3)=CC(C5=CN=C(C(O)(C)C)N=C5)=C2	n.d.	11.9	n.d.	n.d.	2	0.12	11
C11S58	O=C(NCC)NC1=NC2=C(S1)C(C3=NC=CC(CN4CC(O)C4)=C3)=CC(C5=CN=C(C(O)(C)C)N=C5)=C2	n.d.	7.7	n.d.	n.d.	2	1	11
C12SA	ClC1=CC(NC2=NC(N3N=C(C(F)(F)F)C=C3)=C(C4=CN=CN=C4)C=N2)=CC=C1F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	0.125	12
C12SB	ClC1=CC(NC2=NC(N3N=C(C(F)(F)F)C=C3)=C(C4=CC=CC(/C=C/C(O)=O)=C4)C=N2)=CC=C1F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0.03	12
C12SE	ClC1=CC(NC2=NC(N3N=C(C(F)(F)F)C=C3C)=C(C4=CC=CC(/C=C/C(O)=O)=C4)C=N2)=CC=C1F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	0.03	12
C12SF	ClC1=CC(NC2=NC(N3N=C(C(F)(F)F)C=C3C)=C(C4=CC=C(C(O)=O)S4)C=N2)=CC=C1F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	0.25	12
C13S2	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.047	13
C13S3	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=N3)=CC(C4=CC(C=CC=C5)=C5N=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	13
C13S4	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3F)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.031	13
C13S8	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=N3)=CC(C4=CC=C(C(N)=O)N=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.064	13
C13S10	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3F)=CC(C4=CN=C(C(C)(C)O)N=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	13
C14S13	ClC1=C(CC)NC2=C1C(Cl)=NC(SC3=CC=CN=C3)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	14
C14S14	BrC1=C(CC)NC2=C1C(Cl)=NC(SC3=CC=CN=C3)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	14
C14S21	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](NC4)[C@H]4C3)=NC(SC5=CN=C(N=CC=N6)C6=C5)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S24	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3CC(C4N)C4C3)=NC(SC5=CN=C(N=CC=N6)C6=C5)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S44	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](N)CC3)=NC(SC4=CN=C(C=CC=N5)C5=C4)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S47	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](N)CC3)=NC(SC4=CC=C(C=CC(C(O)=O)=N5)C5=C4)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S49	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](N)CC3)=NC(SC4=CC=C(N=C(N)N=[N+]5[O-])C5=C4)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S53	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](N)CC3)=NC(SC4=CC=C(N=CNC5=O)C5=C4)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S55	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3C[C@H](N)CC3)=NC(SC4=CC=C(C=C(COC5=O)C5=N6)C6=C4)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S57	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3CC(C4N)C4C3)=NC(SC5=CN=C(C=CC=N6)C6=C5)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S62	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3CC(C4N)C4C3)=NC(OC5=CN=CN=C5)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C14S63	ClC1=C(CC)NC2=C1C(N3CC(C4N)C4C3)=NC(OC5=CN=C(C=CC=N6)C6=C5)=N2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14
C15S3	CCC1=C(Cl)C(C(NC[C@H](C)O)=N2)=C(N1)N=C2SC3=CC4=C(N=C3)N=CC=N4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	15
C15S4	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(O)C2)=N3)=C(N1)N=C3SC4=CC5=C(N=C4)N=CC=N5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	0.25	15
C15S5	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(N)C2)=N3)=C(N1)N=C3SC4=CC5=C(N=C4)N=CC=N5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	1	15
C15S11	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(NC3)C3C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	0.5	15

C15S12	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(NCC3)C3C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32	1	15
C15S14	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	0.13	15
C15S17	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(NC(C3CC3)=O)C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	1	15
C15S18	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(NC(COC)=O)C2)=N3)=C(N1)N=C3SC4=CC5=C(N=C4)N=CC=N5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	0.25	15
C15S19	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(NC(C3=CN=CC=N3)=O)C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	1	15
C15S20	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3NC(N)=N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	0.25	15
C15S21	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@@]3(N)C(N)=O)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	0.25	15
C15S22	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@@]3(N)CO)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64	0.25	15
C15S23	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(C=C5)N=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	<0.13	15
C15S24	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)C=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	<0.13	15
C15S26	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(C=C5)C=CC=[N]6[O]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	<0.13	15
C15S27	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4SC5=CC6=C(N=C5)C=CC=[N]6[O]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	0.03	15
C15S31	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(N)CC2)=N3)=C(N1)N=C3SC4=CC5=C(C=C4)C=CC(C(O)=O)=N5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	2	15
C15S34	CCC1=C(Cl)C(C(N2CC(N)CC2)=N3)=C(N1)N=C3SC4=CC5=C(C=C4)C(N)=NC(C)=N5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	2	15
C15S38	CCC1=C(Cl)C(C(N2C[C@@]([C@H]3N)([H])[C@@]3([H])C2)=N4)=C(N1)N=C4OC5=CC6=C(N=C5)C=CC=N6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	<0.06	15
C16S4	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C=CC(C3=CN=CN=C3)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	>16	16
C16S5	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C=C(F)C(N3C=C(C(NC4CC4)=O)N=C3)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	4	16
C16S6	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C=C(F)C(C3=CC=CN=C3)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16	4	16
C16S10	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C(OC)=O)=CC(C3=CC=CN=C3)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	0.063	16
C16S12	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(N3N=CC=C3)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0.063	16
C16S13	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	0.031	16
C16S15	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3F)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	0.031	16
C16S17	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C=C(OC)C(C3=CN=C(OC)N=C3)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	2	16
C16S18	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(N3N=CC=C3)=CC(C4=CN=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	0.031	16
C16S20	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3)=CC(N4C=C(C(NC5CC5)=O)N=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.125	0.063	16
C16S21	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3F)=CC(C(C=CN4C)=CC4=O)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.125	0.016	16
C17S17b	OC1=C2C(C(N3[C@]2([H])C[C@H](O)C4=C3C=CC(Cl)=C4)=O)=C(C)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	17
C17S22b	OC1=C2C(C(N3C2OCC4=C3C=CC=C4)=O)=C(Br)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	17
C17S22d	OC1=C2C(C(N3C2OCC4=C3C=CC(C)=C4)=O)=C(C)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32	17

C17S22e	OC1=C2C(C(N3C2OCC4=C3C=CC(C)=C4)=O)=C(Br)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	17
C17S22f	OC1=C2C(C(N3C2OCC4=C3C=CC=N4)=O)=C(C)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	17
C17S22g	OC1=C2C(C(N3C2OCC4=C3C=C(C=CC=C5)C5=N4)=O)=C(Br)C(OC)=C1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	17
C18S2	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)NC2CCN(C3=C(C=CC=C4)C4=NC(C(O)=O)=C3)CC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	0.5	18
C18S4	O=C(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)NC2CCN(C3=NC(C)=C(C(O)=O)S3)CC2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	1	18
C18S5	O=C(C1=CSC(N(CC[C@H]2NC(C(NC(C)=C3Cl)=C3Cl)=O)C[C@@H]2F)=N1)O	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.06	0.25	18
C19S1	COC1=NC=C(C2=CC(N=C(NC(NCC)=O)N3)=C3C=C2OC)C=N1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	2	19
C19S2	O=C(NCC)NC(N1)=NC2=C1C(C3=NC=CC=C3F)=CC(C4=CC=CN=C4)=C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	0.03	19
C21S1	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CN=C(N4CCC(C(O)=O)CC4)N=C3)=CC(C5=NC=CC=C5)=C2S1	3.9	n.d.	46	n.d.	4	0.12	21
C21S2	O=C(NCC)NC1=NC2=CC(C3=CN=C(N4CCC(C(O)=O)(C)CC4)N=C3)=CC(C5=NC=CC=C5)=C2S1	3.3	n.d.	24	n.d.	2	0.12	21
C22S1	CC(O)(C)C1=NC=C(C2=CC(N=C(NC(NCC)=O)N3)=C3C([C@@H]4OCCC4)=C2)C=N1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>8	0.03 – 0.5	22
C22S2	CC(O)(C)C1=NC=C(C2=CC(N=C(NC(NCC)=O)N3)=C3C([C@@H]4OCCC4)=C2F)C=N1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 - >8	0.008 – 0.06	22
C23S3d	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=CC=C(C)C=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	1500	n.d.	n.d.	50	3.66	23
C23S3e	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=CC=C(OC)C=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	3400	n.d.	n.d.	50	6.68	23
C23S3j	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=CC(C)=CC=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	130	n.d.	n.d.	50	1.12	23
C23S3k	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=CC(OC)=CC=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	150	n.d.	n.d.	50	0.78	23
C23S3p	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=C(C)C=CC=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	521	n.d.	n.d.	50	8.08	23
C23S3s	BrC1=CC=C(C2=NNC(C(NNC(C3=CC=CC=C3)=O)=O)=C2)C=C1	n.d.	325	n.d.	n.d.	12.5	10.56	23
C24S2b	O=C(OCC)C1=CC(C2=C(C3=CC=CC=C3)N=C(C4=CC=CC=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24
C24S2i	O=C(OCC)C1=CC(C2=C(C3CCCCC3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24
C24S2k	O=C(OCC)C1=CC(C2=C(C3=CC=CC=C3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24
C24S3c	O=C(NCC)C1=CC(C2=C(C3=CC=CC=C3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	8	24
C24S3d	O=C(NCC)C1=CC(C2=C([C@H]3CCCCN3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48	32	24
C24S3h	O=C(NCC)C1=CC(C2=C(C3=CC=C(Cl)C=C3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8	8	24
C24S4a	O=C(NOC)C1=CC(C2=C(C3CCCCN3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	n.d.	24
C24S4b	O=C(NOCC#C)C1=CC(C2=C(C3CCCCN3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	24
C24S4c	O=C(NOCC#CC)C1=CC(C2=C(C3CCCCN3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	n.d.	24
C24S4e	O=C(NOCC#CC)C1=CC(C2=C(C3CCCCC3)N=C(C4=CC=CN=C4)S2)=NN1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	>64	n.d.	24

Reference:

1. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. Curr. Top. Med. Chem. 2014; 14; 130-51.
2. Brvar M.; Perdih A.; Renko M.; Anderluh G.; Turk D.; Solmajer T. Structure-Based Disovery of Substitued 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors, J. Med. Chem. **2012**, *55*, 6413-6426.
3. Basarab G.; Hill P.; Garner E.; Hull K.; Green O.; Sherer B.; Dangel B.; Manchester J.; Bist S.; Hauck S.; Zhou F.; Uria-Nickelsen M.; Illingworth R.; Alm R.; Rooney M.; Eakin A. Optimization of Pyrrolamide Topoisomerase II Inhibitors Toward Identification of an Antibacterial Clinical Candidate (AZD5099), J. Med. Chem. **2014**, *57*, 6060-6082.
4. East S.; Bantry White C.; Barker O.; Barker S.; Bennett J.; Brown D.; Boyd A.; Brennan C.; Chowdhury C.; Collins I.; Convers-Reignier E.; Dymock B.; Fletcher R.; Haydon D.; Gardiner M.; Hatcher S.; Ingram P.; Lancett P.; Mortenson P.; Papadopoulos K.; Smee C.; Thomaides-Brears H.; Tye H.; Workman J.; Czaplewski L. DNA gyrase (GyrB)/topoisomerase IV (ParE) inhibitors: Synthesis and antibacterial activity, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2009**, *19*, 894-899.
5. Starr J.; Sciotti R.; Hanna D.; Huband M.; Mullins L.; Cai H.; Gage J.; Lockard M.; Rauckhorst M.; Owen R.; Lall M.; Tomilo M.; Chen H.; McCurdy S.; Barbachyn M. 5-(2-Pyrimidinyl)-imidazo[1,2-α]pyridines are antibacterial agents targeting the ATPase domains on DNA gyrase and topoisomerase IV, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2009**, *19*, 5302-5306.
6. Manchester J.; Dussault D.; Rose J.; Boriack-Sjodin A.; Uria-Nickelsen M.; Ioannidis G.; Bist S.; Fleming P.; Hull K. Discovery of a novel azaindole class of antibacterial agents targeting the ATPase domains of DNA gyrase and Topoisomerase IV, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2012**, *22*, 5150-5156.
7. Axford L.; Agarwal P.; Anderson K.; Andrau L.; Atherall J.; Barker S.; Bennett J.; Blair M.; Collins I.; Czaplewski L.; Davies D.; Gannon C.; Kumar D.; Lancett P.; Logan A.; Lunniss C.; Mitchell D.; Offermann D.; Palmer J.; Palmer N.; Pitt G.; Pommier S.; Price D.; Rao N.; Saxena R.; Shukla T.; Singh A.; Singh M.; Srivastava A.; Steele C.; Stokes N.; Thomaides-Brears H.; Tyndall E.; Watson

D.; Haydon D. Design, synthesis and biological evaluation of –substituted isonipecotic acid benzothiazole analogues as potent bacterial type II topoisomerase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2013**, *23*, 6598-6603.

8. Sherer B.; Hull K.; Green O.; Basarab G.; Hauck S.; Hill P.; Loch III J.; Mullen G.; Bist S.; Bryant J.; Boriack-Sjodin A.; Read J.; DeGrace N.; Uria-Nickelsen M.; Illingworth R.; Eakin A. Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2011**, *21*, 7416-7420.
9. Basarab G.; Manchester J.; Bist S.; Boriack-Sjodin A.; Dangel B.; Illingworth R.; Sherer B.; Sririam S.; Uria-Nickelsen M.; Eakin A. Fragment-to-Hit-to-Lead Discovery of a Novel Pyridylurea Scaffold of ATP Competitive Dual Targeting Type II Topoisomerase Inhibiting Antibacterial Agents, J. Med. Chem. **2013**, *56*, 8712-8735.
10. Yule I.; Czaplewski L.; Pommier S.; Davies D.; Narramore S.; Fishwick C. Pyridine-3-carboxamide-6-yl-ureas as novel inhibitors of bacterial DNA grase: Structure based design, synthesis, SAR and antimicrobial activity, Europ. J. Med. Chem., **2014**, *86*, 31-38.
11. Palmer J.; Axford L.; Barker S.; Bennett J.; Blair M.; Collins I.; Davies D.; Ford L.; Gannon C.; Lancett P.; Logan A.; Lunniss C.; Morton C.; Offermann D.; Pitt G.; Rao N.; Singh A.; Shukla T.; Srivastava A.; Stokes N.; Thomaides-Brears H.; Yadav A.; Haydon D.; Discovery and in vivo evaluation of alcohol-containing benzothiazoles as potent dual-targeting bacterial DNA supercoiling inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2014**, *24*, 4215-4222.
12. Uria-Nickelsen M.; Neckermann G.; Sriram S.; Andrews B.; Manchester J.; Carcanague D.; Stokes S.; Hull K. Novel topoisomerase inhibitors: microbiological characterisation and in vivo efficacy of pyrimidines, Int. J. Antimicrob. Agents, **2013**, *41*, 363-371.
13. Perola E.; Stamos D.; Grillot A.-L.; Ronkin S.; Wang T.; LeTiran A.; Tang Q.; Deininger D.; Liao Y.; Tia S.-K.; Drumm J.; Nicolau D.; Tessier P.; Mani N.; Grossman T.; Charifson P. Successful application of serum shift prediction models to the design of dual targeting inhibitors of bacterial gyrase B and topoisomerase IV with improved in vivo efficacy, Bioorg. Med. Chem. Lett. **2014**, *24*, 2177-2181.

14. Tari L.; Trzoss M.; Bensen D.; Li X.; Chen Z.; Lam T.; Zhang J.; Creighton C.; Cunningham M; Kwan B.; Stidham M.; Shaw K.; Lightstone F.; Wong S.; Nguyen T.; Nix J.; Finn J. Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase b (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part I: Structure guided discovery and optimization of dual targeting agents with potent, broad-spectrum enzymatic activity, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2013**, *23*, 1529-1536.
15. Trzoss M.; Bensen D.; Li X.; Chen Z.; Lam T.; Zhang J.; Creighton C.; Cunninghem M.; Kwan B.; Stidham M.; Nelson K.; Brown-Driver V.; Castellano A.; Shaw K.; Lightstone F.; Wong S.; Nguyen T.; Finn J.; Tari L. Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase b (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part II: Development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2013**, *23*, 1537-1543.
16. Charifson P.; Grillot A.-L.; Grossman T.; Parsons J.; Badia M.; Bellon S.; Dininger D.; Drumm J.; Gross C.; LeTiran A.; Liao Y.; Mani N.; Nicolau D.; Perola E.; Ronkin S.; Shannon D.; Swenson L.; Tang Q.; Tessier P.; Tian S.-K.; Trudeau M.; Wang T.; Wei Y.; Zhang H.; Stamos D. Novel Dual-Targeting Benzimidazole Urea Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV Possessing Potent Antibacterial Activity: Intelligent Design and Evolution through the Judicious Use of Structure-Guided Design and Structure-Activity Relationships, J. Med. Chem., **2008**, *51*, 5243-5263.
17. Lübbers T.; Anghern P.; Gmünder H.; Herzig S. Design, synthesis and structure-activity relationship studies of new phenolic DNA gyrase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, 17, 4708-4714.
18. Uria-Nickelsen M.; Blodgett A.; Kamp H.; Eakin A.; Sherer B.; Green O. Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterisation of pyrrolamides, Int. J. Antimicrob. Agents, 2013, 41, 28-35.
19. Grossman T.; Bartels D.; Mullin S.; Gross C.; Parsons J.; Liao Y.; Grillot A.-L.; Stamos D.; Olson E.; Charifson P.; Mani N. Dual Targeting of GyrB and ParE by a Novel Aminobenzimidazole Class of Antibacterial Compounds, Antimicrob. Agents Chemoter., **2007**, *51*, 657-666.

20. Mani N.; Gross C.; Parsons J.; Hanzelka B.; Müh U.; Mullin S.; Liao Y.; Grillot A.-L.; Stamos D.; Charifson P.; Grossman T. In Vitro Characterization of the Antibacterial Spectrum of Novel Bacterial Type II Topoisomerase Inhibitors of the Aminobenzimidazole Class, Antimicrob. Agents Chemoter., **2006**, *50*, 1228-1237.
21. Stokes N.; Thomaides-Brears H.; Barker S.; Bennett J.; Berry J.; Collins I.; Czaplewski L.; Gamble V.; Lancett P.; Logan A.; Lunniss C.; Peasley H.; Pommier S.; Price D.; Smee C.; Haydon D. Biological Evaluation of Benzothiazole Ethyl Urea Inhibitors of Bacterial Type II Topoisomerases, Antimicrob. Agents Chemoter., **2013**, *57*, 5977-5986.
22. Finn J. Evaluation of WO2012177707 and WO2012097269: Vertex's phosphate prodrugs of gyrase and topoisomerase antibacterial agents, Expert Opin. Ther. Patents, **2013**, *23*, 1233-1237.
23. Sun J.; Peng-Cheng L.; Yin Y.; Yuan R.-J.; Ma J.; Zhu H.-L. Synthesis, Structure and Antibacterial Activity of Potent DNA Gyrase Inhibitors: N'-Benzoyl-3-(4-Bromophenyl)-1*H*-Pyrazole-5-Carbohydrazide Derivatives. Plos One, **2013**, *8*, e69751.
24. Ronkin S., Badia M.; Bellon S.; Grillot A.-L.; Gross C.; Grossman T.; Mani N.; Parsons J.; Stamos D.; Trudeau M.; Wei Y.; Charifson P. Discovery of pyrazolthiazole as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2010**, *20*, 2828-2831.