

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEA SAJOVIC

**SINTEZA POTENCIALNIH TETRAHIDROKINAZOLINSKIH
ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

**SYNTHESIS OF POTENTIAL TETRAHYDROQUINAZOLINE INHIBITORS
OF DNA GYRASE B**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm., za sprejeto mentorstvo pri magistrski nalogi ter za strokovno pomoč, vodenje in nasvete pri izdelavi magistrskega dela.

Prav tako se zahvaljujem Žigu Hodniku, mag. farm., za potrpežljivost, pomoč in vodenje pri eksperimentalnem delu.

Zahvaljujem se tudi sošolkam Anji Kristan, Evi Šimunović, Špeli Voh za pomoč pri študiju in pisanju magistrske naloge.

Izjava

Spodaj podpisana Lea Sajovic izjavljam, da je predloženo magistrsko delo z naslovom Sinteza potencialnih tetrahidrokinazolinskih zaviralcev DNA giraze B avtorsko delo, izdelano pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja.

VSEBINA

1 UVOD	1
1.1 Topoizomeraza in DNA giraza	1
1.1.1 Delovanje topoizomeraze I	3
1.1.2 Delovanje topoizomeraze II.....	4
1.2 Inhibitorji giraze	6
1.3 Alkaloidi morskega izvora z 2-aminoimidazol-pirolamidno strukturo	10
1.3.1 Klatrodin	10
1.3.2 Oroidin.....	10
1.3.3 Himenidin	11
2 NAČRT ZA DELO	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Reagenti in topila.....	14
3.2 Kromatografske metode	15
3.3 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	16
3.4 Masna spektroskopija (MS).....	16
3.5 Infrardeča (IR) spektroskopija.....	16
3.6 Določanje temperature tališča	16
3.7 Poimenovanje in risanje spojin	16
4 EKSPERIMENTALNO DELO	17
4.1 Sinteza (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamida (2)	20
4.2 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamida (3)	21
4.3 Sinteza 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamina (4)	22
4.4 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida (5)	23
4.5 Sinteza metil 3-((6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2- il)amino)-3-oksopropanoata (6)	24
4.6 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2- karboksamida (8)	25
4.7 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4-bromo-1 <i>H</i> -pirol-2- karboksamida (9)	26

4.8 Sinteza <i>N</i>-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamida (10)	28
4.9 Sinteza metil 3-((6-(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (11)	29
5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
5.1 Komentar sinteznih postopkov	31
5.1.1 Sinteza (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamida (2).....	31
5.1.2 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamida (3)	31
5.1.3 Sinteza 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamina (4).....	31
5.1.4 Sinteza <i>N</i> -(2-amin-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida (5)	32
5.1.5 Sinteza metil 3-((6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (6).....	33
5.1.6 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (8).....	34
5.1.7 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4-bromo-1 <i>H</i> -pirol-2-.....	34
karboksamida (9).....	34
5.1.8 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (10)	35
5.1.9 Sinteza metil 3-((6-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (11).....	36
5.2 Modeliranje	36
5.3 Biološko testiranje spojin	38
6 SKLEP	41
7 LITERATURA.....	42

POVZETEK

V magistrski nalogi so predstavljeni analogi bioaktivnih snovi morskega izvora, ki bi bili lahko potencialne spojine vodnice za pripravo protibakterijskih učinkovin. Pri nekaterih analogih alkaloida morskega izvora *oroidina* so ugotovili, da inhibirajo encim DNA girazo B, ki v bakterijskih celicah sodeluje pri zvijanju DNA. Ta proces je zelo pomemben za delitev celice in posledično razmnoževanje bakterij. Inhibitorji giraze so torej protibakterijske učinkovine, ki preprečujejo razmnoževanje bakterij.

Predstavljena je sinteza tetrahidrokinazolinskih spojin, ki inhibirajo DNA girazo B. Za izhodišče v tem delu sintetiziranih spojin smo vzeli spojino 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamin, za katero je bila dokazana šibka zaviralna aktivnost na DNA girazo B. V magistrski nalogi smo sintetizirali šest derivatov te spojine, ki so bili nato testirani na inhibicijo DNA giraze B. Spojini metil 3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoat (**11**) in *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid (**10**) sta pokazali najboljše zaviralno delovanje na girazo B. Dobljeni rezultati bodo pomagali raziskovalni skupini pri usmeritvi za nadaljnje raziskovanje.

Ključne besede: DNA giraza B, topoizomeraza, spojine morskega izvora, sinteza, tetrahidrokinoloni, bakterija, encim.

ABSTRACT

Within this master's thesis bioactive marine alkaloids analogues, which could be potential lead compounds in synthesis of antibacterial active ingredients, are presented. Some analogues of marine alkaloid *oroidin* showed inhibition of DNA gyrase B. The enzyme DNA gyrase B introduces negative supercoils into DNA or relaxes positive supercoils, which is very important for DNA replication and, consequently, for the reproduction of bacteria. Inhibitors of DNA gyrase B are, therefore, antibacterial active ingredients and they act to prevent replication of bacteria.

The main objective of the thesis is the synthesis of tetrahydroquinazoline compounds that inhibit DNA gyrase B. A 5,6,7,8-tetrahydroquinazoline-2,6-diamine compound was used as a starting point. This compound was a poor inhibitor of DNA gyrase B. Six derivatives of this compound were synthesised and their activity was tested on this enzyme. The compounds methyl 3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamido)-5,6,7,8-tetrahydroquinazolin-2-yl)amino)-3-oxopropanoate (**11**) and *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinazolin-6-yl)-4,5-dibromo-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**10**) showed the best inhibitor activity on DNA gyrase B. These results will offer more insight and aid further research on the topic.

Key words: DNA gyrase B, topoisomerase, marine alkaloids, synthesis, tetrahydroquinolones, bacteria, enzyme.

SEZNAM SIMBOLOV IN OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
d	dublet
dd	dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMF DMA	dimetilformamid dimetilacetal
DMSO- <i>d</i> ₆	heksadevterodimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
HTS	high-throughput screening (rešetanje visoke zmogljivosti)
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, pri kateri se merjeni fiziološki odgovor zmanjša za polovico
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta

m	multiplet
MS	masna spektrometrija
MeOH	metanol
NMR	jedrska magnetna resonanca
s	singlet
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> - tetrametiluronijev tetrafluoroborat
δ	kemijski premik
ν	frekvenca

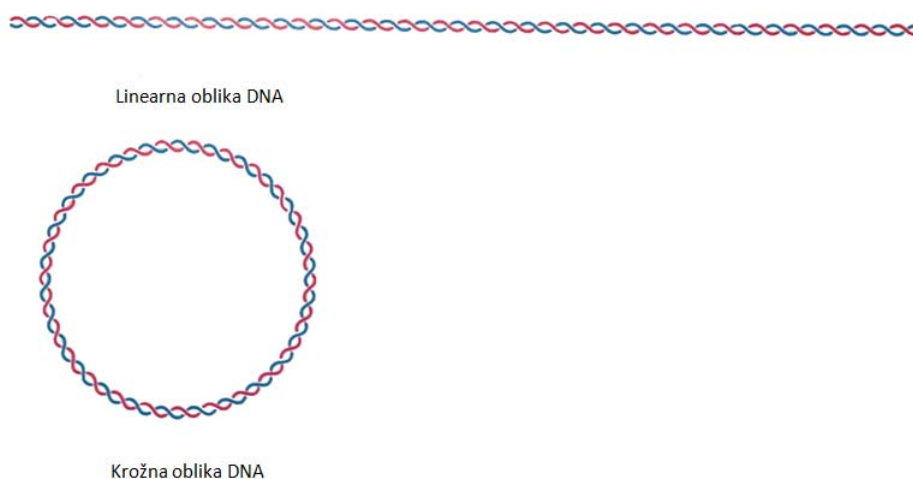
1 UVOD

Protibakterijske učinkovine so ključne za preventivo in zdravljenje bakterijskih infekcij, vendar njihova velika razširjenost lahko povzroči odpornost bakterij na učinkovine (1). Bakterijska odpornost je naravni odziv bakterij za preživetje proti zdravilom, namenjenim za njihovo uničenje. Nepremišljeno zdravljenje s protibakterijskimi učinkovinami lahko vodi do tega biološkega fenomena. Odpornost na protibakterijske učinkovine narašča, število novih antibiotikov, ki prihaja na trg, pa upada. Glavni razlog za odpornost tiči v količini predpisanih antibiotikov. Če imamo opravka z bakterijami, ki so odporne na določeno zdravilo, moramo nadaljevati zdravljenje z drugim zdravilom, kar podraži zdravljenje. Lahko se zgodi, da drugih zdravil ni na voljo. Pacienti, ki so okuženi z odpornimi mikroorganizmi, se dalj časa zdravijo ali pa zdravljenja ne preživijo (2). Vse večji pojav bakterijske odpornosti pa predstavlja grožnjo, da kmalu ne bo več primernih zdravil za zdravljenje osnovnih bakterijskih bolezni (3).

1.1 Topoizomeraza in DNA giraza

DNA je sestavljena iz nukleotidov. Ti so sestavljeni iz sladkorja, dušikove baze in fosfatne skupine. Sladkorji so med seboj povezani s fosfodiestersko vezjo (3' hidroksilna skupina sladkorja je povezana s 5' hidroksilno skupino sosednjega sladkorja) in tvorijo ogrodje nukleinske kisline. Dušikove baze so med seboj povezane v bazne pare z vodikovimi vezmi (adenin – timin, citozin – gvanidin). DNA ima obliko dvojne vijačnice, zavite okoli lastne osi. DNA verigi sta antiparalelni. Pri podvajanju DNA se morata verigi razpresti, pred tem pa se mora dvojni heliks odviti. Pri človeku je DNA linearna, pri nekaterih drugih organizmih pa krožna. Shema obeh oblik je prikazana na sliki 1. Pri enako dolgih DNA verigah je superzvita oblika kompaktnejša od relaksirane. Ključna lastnost krožne DNA molekule je število njenih navojev. Za nastanek superzvitja so odgovorni določeni encimi. Topološki izomeri (topoizomeri) so molekule, ki se razlikujejo le po številu navojev. Prehod iz enega topološkega izomera v drugega je možen le preko cepitve ene ali obeh verig dvojne

DNA vijačnice (4). Pri krožni molekuli DNA se podvojevanje začne na točno določenem mestu in se podvaja v obe smeri. Evkariontska molekula DNA je linearna in se podvaja na podoben način, le da ima več iniciacijskih mest (5).



Slika 1: Linearna in krožne oblika DNA (4)

Topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo topološke spremembe DNA tako, da cepijo in ponovno združujejo verige DNA, saj se mora le-ta pri prepisovanju in podvajanju razpreti tako, da se začasno prekine vez med sladkorjem in fosfatom. Pretrganje vezi s topomerazami poteka po mehanizmu nukleofilnega napada tirozina, ki se nahaja v aktivnem mestu encima, na fosfodiestersko vez. Tako nastane kovalentna vez med encimom in enim trakom verige DNA, posledica tega je začasno pretrgano ogrodje DNA. Topoizomeraza cepi verigo dvovijačne DNA, s tem pa se odvije supernavita DNA. Ko je vez pretrgana, se superzvit plazmid delno ali popolnoma razvije (4,6).

Evkariontske topoizomeraze so dveh tipov (tip I in tip II). Tip I prereže samo eno verigo DNA, tip II prereže obe verigi in se deli na podtipa IIA in IIB. Med topoizomeraze IIA spadajo DNA giraza, evkariontska topoizomeraza II in topoizomeraza IV (7).

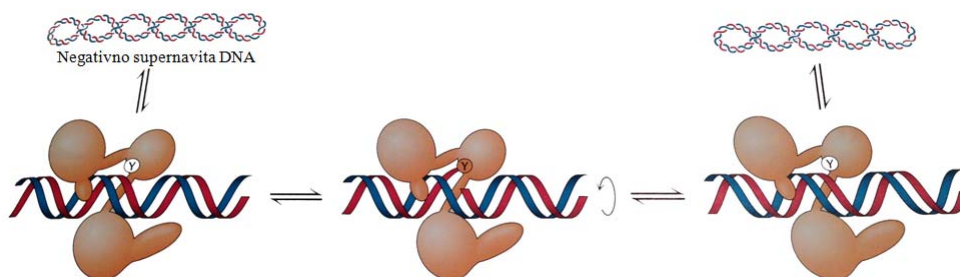
Prokariontske topoizomeraze so treh tipov (I, II, III). Topoizomeraza I se obnaša kot monomer in je običajno enoverižni polipeptid. Oba tipa topoizomeraze II (DNA giraza in topoizomeraza IV) sta pomembna za preživetje celice (7).

DNA giraza ima dve heterodimerni podenoti girazo A in girazo B. Za prekinitvev in ponovno združitvev verige DNA je odgovorna giraza A, medtem ko giraza B vsebuje ATP vezavno mesto in katalizira hidrolizo ATP (8, 9).

Topoizomeraze opravljajo različne naloge. Topoizomeraza I katalizira odvijanje supernavite DNA in tvori energetsko ugodnejšo relaksirano obliko. DNA giraza ima nasprotno delovanje, in sicer uvaja dodatne negativne navoje v krožno molekulo DNA, pri tem uporablja kot vir energije ATP (7).

1.1.1 Delovanje topoizomeraze I

Topoizomeraza I prekine en trak verige DNA tako, da tirozinska OH skupina encima napade fosfatno skupino na verigi. Med encimom in DNA se tvori fosfodieterska vez, na drugem koncu prekinjene verige pa ostane prosta hidroksilna skupina. Ko je veriga pretrgana, se odvijje, saj ima zaradi superzvitja shranjeno energijo. Encim nadzoruje odvijanje, da ne poteka prehitro. Reakcija je končana, ko se prosta hidroksilna skupina DNA zopet poveže s fosfatom ter se encim s tirozinom odcepi. Tako se verigi zopet združita in dobimo delno ali popolnoma relaksirano obliko (4). To delovanje je prikazano na sliki 2.

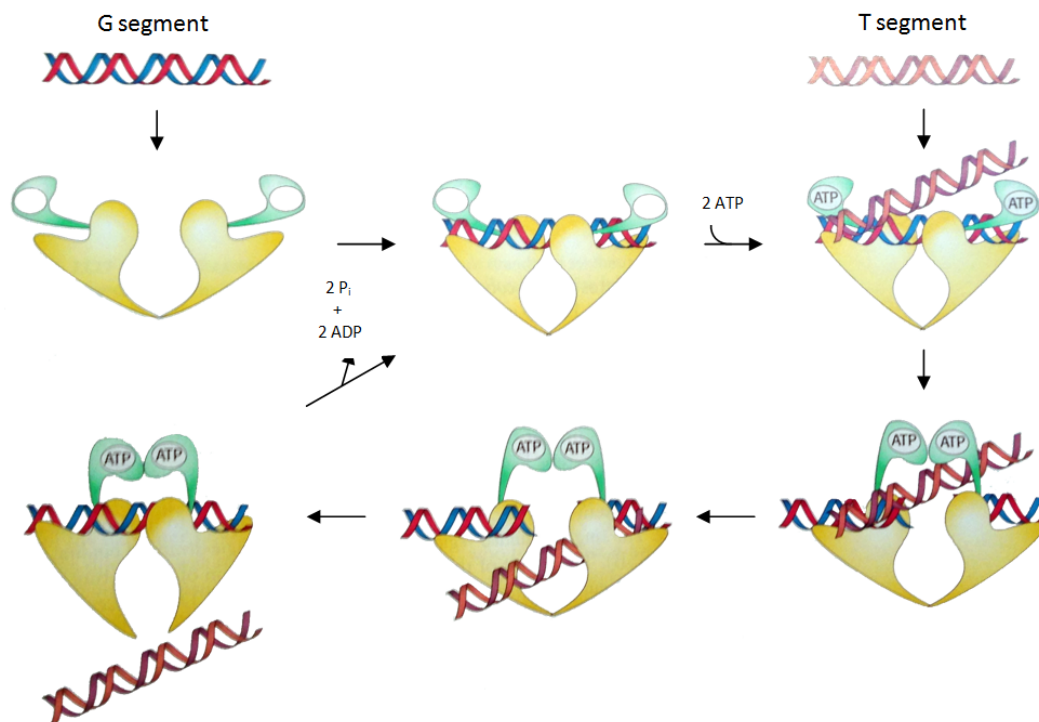


Slika 2: Delovanje topoizomeraze I (4)

1.1.2 Delovanje topoizomeraze II

Topoizomerazi I in II imata skupne številne mehanistične lastnosti (5). Za nastanek superzvitja dvojne vijačnice DNA potrebujemo energijo. To zvijanje kontrolira encim topoizomeraza II, ki združi vezavo in hidrolizo ATP. Na sliki 3 je prikazano delovanje topoizomeraze II. Topoizomeraza II se najprej veže na vstopni G (gate) segment DNA. Poleg vsake verige DNA sta nameščena dva tirozina (eden za vsak monomer), ki sta sposobna tvoriti kovalentno vez z DNA. Vsak od teh monomerov encima ima domeno, na katero se veže ATP. ATP se veže na dve N-terminalni domeni. S tem se spremeni komformacija domen encima. Ta sprememba povzroči prekinitev obeh verig DNA, vsaka veriga se veže na encim s tirozin-fosfodietersko vezjo ter ohlapno vezavo terminalnega (T) segmenta DNA. Za razliko od topoizomereaze I, encim topoizomeraza II prepreči rotacijo DNA. T segment gre skozi prekinjena trakova G segmenta in izstopi na dnu encima. Hidroliza ATP do ADP in ortofosfata omogoči, da se ATP domeni ločita in se encim lahko veže na naslednji T segment. Večkrat ko gre DNA skozi prehod, bolj zavita je dvojna vijačnica DNA. Ker sta konca fiksirana, je prisiljena, da spremeni strukturo v superzvito DNA (4).

Stopnja superzvitja je odvisna od nasprotnega delovanja teh dveh encimov. Negativno superzvitje povzroča topoizomeraza II, razvitje pa topoizomeraza I. Količina teh dveh encimov in njuna aktivnost ohranjata pravo stopnjo negativnega superzvitja (4).



Slika 3: Delovanje topozimeraze II (4)

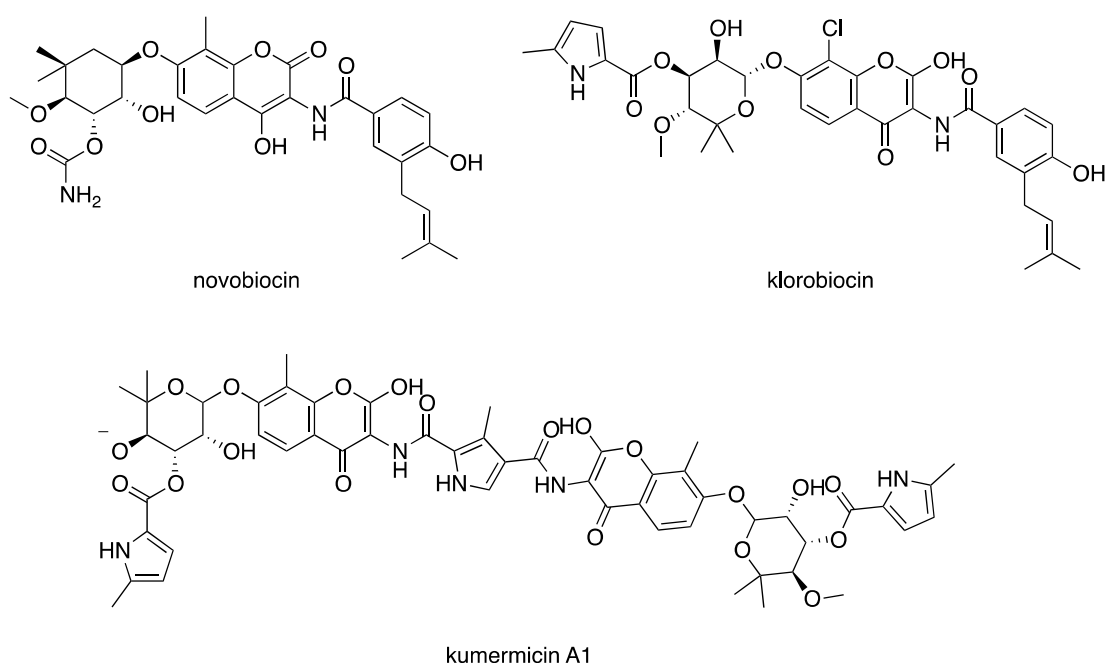
DNA giraza je pomembna tarča za načrtovanje novih protimikrobnih učinkovin, ker je celice sesalcev ne vsebujejo in ima ključno vlogo pri replikacijskem ciklu bakterijske DNA. Encim predstavlja primerno tarčo za razvoj pomembnih protimikrobnih učinkovin s selektivno toksičnostjo (10).

DNA giraza bakterije *Escherichia coli* ima dve podenoti - girazo A in girazo B. Giraza A ima N in C terminalni domeni. Tudi giraza B ima N in C domeni. Na N terminalni domeni se nahaja ATP vezavno mesto. C domena pa je skupaj s podenoto giraze A odgovorna za prekinitev dvovijačne DNA (11).

DNA giraza je heterodimerna. Prvi polipeptid se imenuje giraza B, drugi pa giraza A. Encim ima po dve podenoti – 2A in 2B. A podenota prereže verigo, B podenota uvaja negativno superzvitje, nato pa A podenota poveže verigo ponovno skupaj (12).

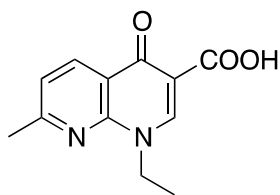
1.2 Inhibitorji giraze

DNA girazo učinkovito zavirata dve skupini spojin: kinoloni in kumarini. Predstavniki kumarinov so novobiocin, klorobiocin in kumermicin. Novobiocin se veže na girazo B na vezavno mesto za ATP po mehanizmu kompetitivnega inhibitorja in s tem prepreči njegovo hidrolizo (13,14). Aminokumarini so spojine s 3-amino-4,7-dihidroksikumarinskim obročem. Med aminokumarine spadajo novobiocin, klorobiocin in kumermicin A₁ (slika 4). Vsi ti so naravni produkti izolirani iz bakterije *Streptomyces* (15).

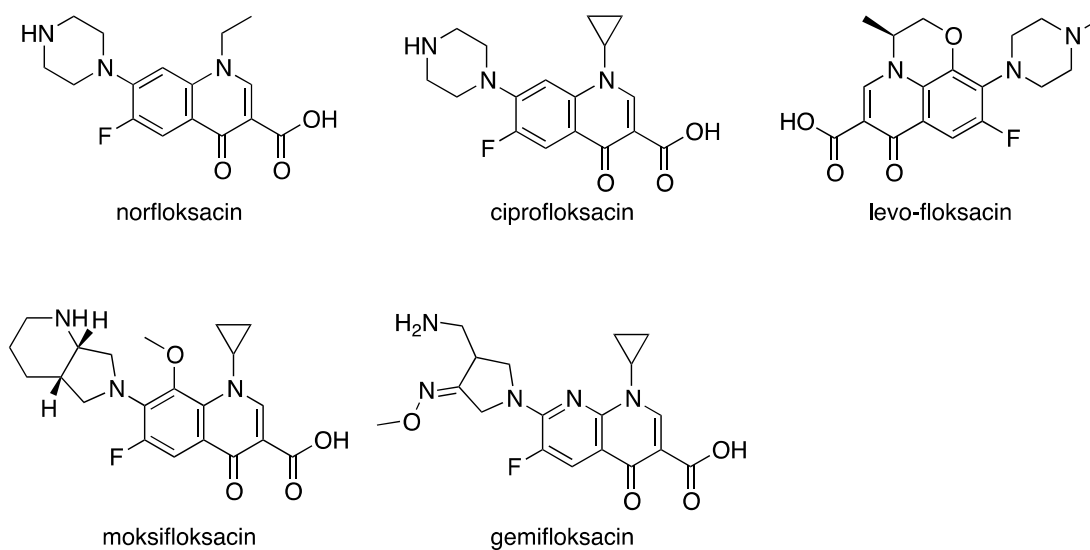


Slika 4: Strukture novobiocina, klorobiocina in kumermicina A₁

Nalidiksično (slika 5) in oksolinično kislino, ki prav tako zavirata DNA girazo bakterij, so izolirali kot stranski produkt pri sintezi klorokina. Iz teh spojin so razvili fluorokinolone, ki so postali uspešni v klinični uporabi (15). DNA girazo zavirajo tako, da motijo cepitev in združevanje verige DNA (13). Predstavniki fluorokinolonov so norfloksacin in ciprofloksacin (druga generacija), levo-floksacin (tretja generacija), moksifloksacin in gemifloksacin (četrt generacija) (slika 6) (15).



Slika 5: Struktura nalidiksične kisline (1-etil-7-metil-4-okso-1,4-dihidro-1,8-naftiridin-3-karboksilna kislina)



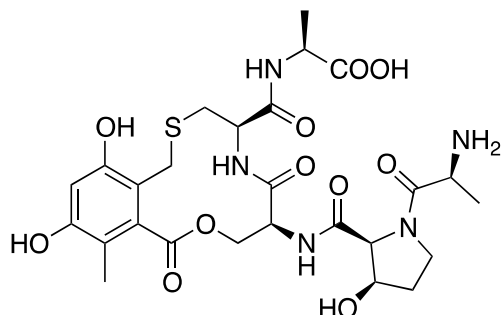
Slika 6: Strukture norfloksacina, ciprofloksacina, levo-floksacina, moksifloksacina in gemifloksacina

Da kumarini niso klinično uspešna zdravila, je poleg citotoksičnosti pri sesalcih kriva tudi njihova slaba inhibicija giraze gram negativnih bakterij in slaba topnost (15). Zaradi toksičnosti novobiocin ni več v klinični uporabi, še vedno pa se kot uspešne protibakterijske učinkovine uporabljajo fluorokinoloni (13,14). Tarča za kinolone pri gram negativnih bakterijah je giraza, pri nekaterih gram pozitivnih organizmih pa tarčo za kinolone predstavlja topoizomeraza IV (15).

Kinoloni inhibirajo girazo A ter preprečijo podvajanje DNA in povzročijo celično smrt (16).

Naravni antibiotiki, ki inhibirajo DNA girazo so tudi ciklotialidini (ciklični peptidi) (slika 7), ki imajo dvakrat močnejšo aktivnost na girazo v primerjavi z novobiocinom, a imajo slabo antibakterijsko aktivnost zaradi slabe permeabilnosti. Tudi ciklotialidini

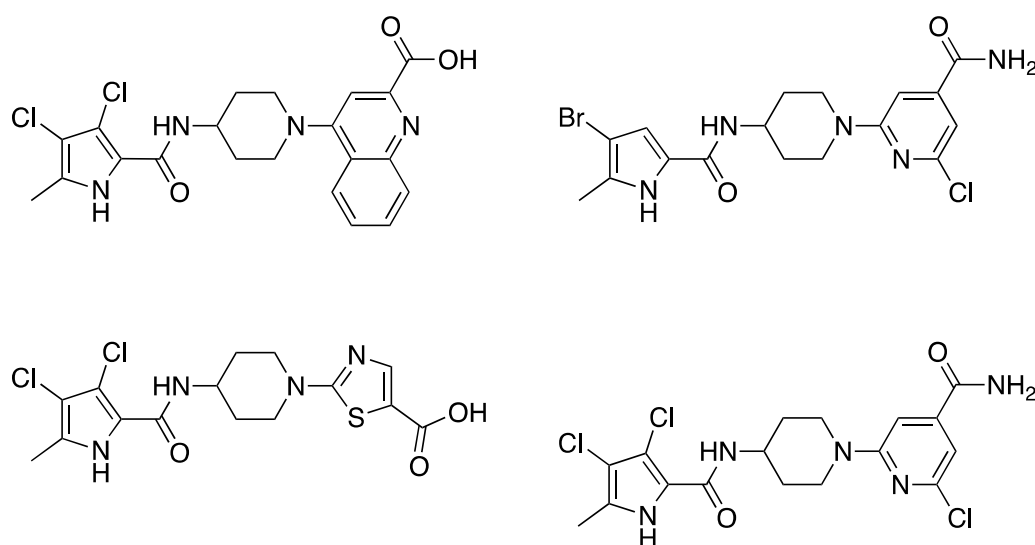
delujejo podobno kot kumarini ter inhibirajo ATP aktivnost DNA giraze in se vežejo na N-terminalni del giraze B tako, da prekrijejo ATP vezavno mesto (14,15).



Slika 7: Struktura spojine iz skupine ciklotialidinov (15)

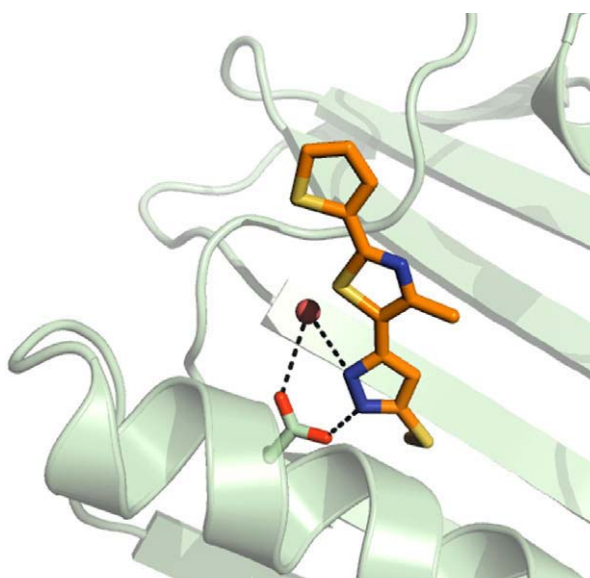
Ker so številne bakterije postale odporne na antibiotike, je stalno prisotna potreba po razvoju novih protimikrobnih učinkovin (13).

Raziskovalci farmacevtskega podjetja AstraZeneca so pred kratkim odkrili novo skupino inhibitorjev DNA giraze B – pirolamide (slika 8) (13). Te spojine preko inhibicije giraze inhibirajo sintezo DNA in posledično povzročijo apoptozo celice (17). Spojine so identificirali s fragmentnim načrtovanjem spojin vodnic (FBLD), ki je alternativa HTS rešetanju (13).



Slika 8: Pirolamidi podjetja AstraZeneca z zaviralnim delovanjem na girazo B (16, 17)

Pirolamidi zavirajo širok spekter gram pozitivnih bakterij, nimajo pa protibakterijskega delovanja na gram negativne bakterije in tiste bakterije, ki so razvile odpornost na ostale protimikrobne učinkovine. Pirolamidi delujejo tako, da se vežejo v ATP vezavno mesto giraze B. Pirolna skupina se veže v adeninsko vezavno mesto giraze B in tvori vodikovo vez z asparaginsko kislino (Asp 81) in z molekulo vode (slika 9) (13).



Slika 9: Vezava pirazolnega dela spojine z Asp81 in z vodno molekulo v GyrB *Staphylococcus aureus* (17)

Če primerjamo aktivnosti spojin, ki se nahajata desno zgoraj in desno spodaj na sliki 8, ima spodnja spojina boljšo zaviralno aktivnost na girazo B. Razlog je prisotnost dveh lipofilnih elektron privlačnih skupin na pirolu, ki povečata hidrofobne interakcije v adeninskem žepu, poleg tega pa znižata pKa pirolnemu dušiku in posledično le-ta tvori močnejšo vodikovo vez z aspartatom (17).

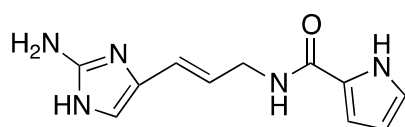
Omenjeni pirolamidni inhibitorji giraze B so po strukturi zelo podobni oroidinu in klatrodinu, morskima alkaloidoma izolirana iz spužev rodu *Agelas*.

1.3 Alkaloidi morskega izvora z 2-aminoimidazol-pirolamidno strukturo

Spojine, ki so jih izolirali iz morskih organizmov, imajo zanimive kemijske strukture in različno farmakološko delovanje (18). Številni morski organizmi so nemobilni in nimajo imunskega sistema, zato za zaščito pred sovražniki sami sintetizirajo toksične spojine ali jih pridobijo iz morskih mikroorganizmov, s katerimi živijo v simbiozi (npr. spužve). Zaradi farmakološke aktivnosti njihovih sekundarnih metabolitov, imajo le-ti potencial za razvoj novih učinkovin (19, 20). Spojine ali ekstrakti iz teh organizmov imajo med drugim tudi antivirusne, antibakterijske in protirakave lastnosti (21). Morski alkaloidi, ki so jih našli v spužvah *Agelas*, kažejo aktivnost na živčne in mišične membranske receptorje in natrijeve kanalčke (22).

1.3.1 Klatrodin

V spužvah *Agelas clathrodes* so našli klatrodin (slika 10), alkaloid z 2-aminoimidazol-pirolamidno strukturo (22). Pri klatroдинu je 2-aminoimidazolni del povezan s pirolom preko treh ogljikovih atomov in amida. Klatrodin in analogi klatrodina so blokatorji napetostno odvisnih natrijevih kanalov (20).

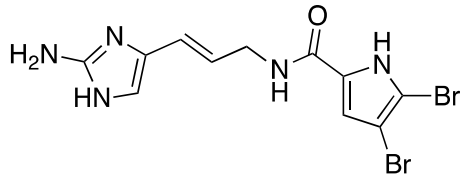


Slika 10: Struktura klatrodina

1.3.2 Oroidin

Oroidin (slika 11) je prav tako kot klatrodin spojina naravnega izvora izolirana iz spužev *Agelas oroides* ter je najbolj pomemben predstavnik 2-aminoimidazolnih alkaloidov. Je blokator kalcijevih in natrijevih kanalčkov. Njegova struktura je podobna klatroдинu, razlikuje se samo po dveh bromovih atomih, ki sta vezana na

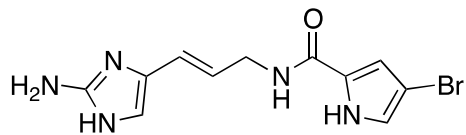
pirol. Oroidin in njegovi analogi zavirajo tvorbo bakterijskih biofilmov (24).



Slika 11: Struktura oroidina

1.3.3 Himenidin

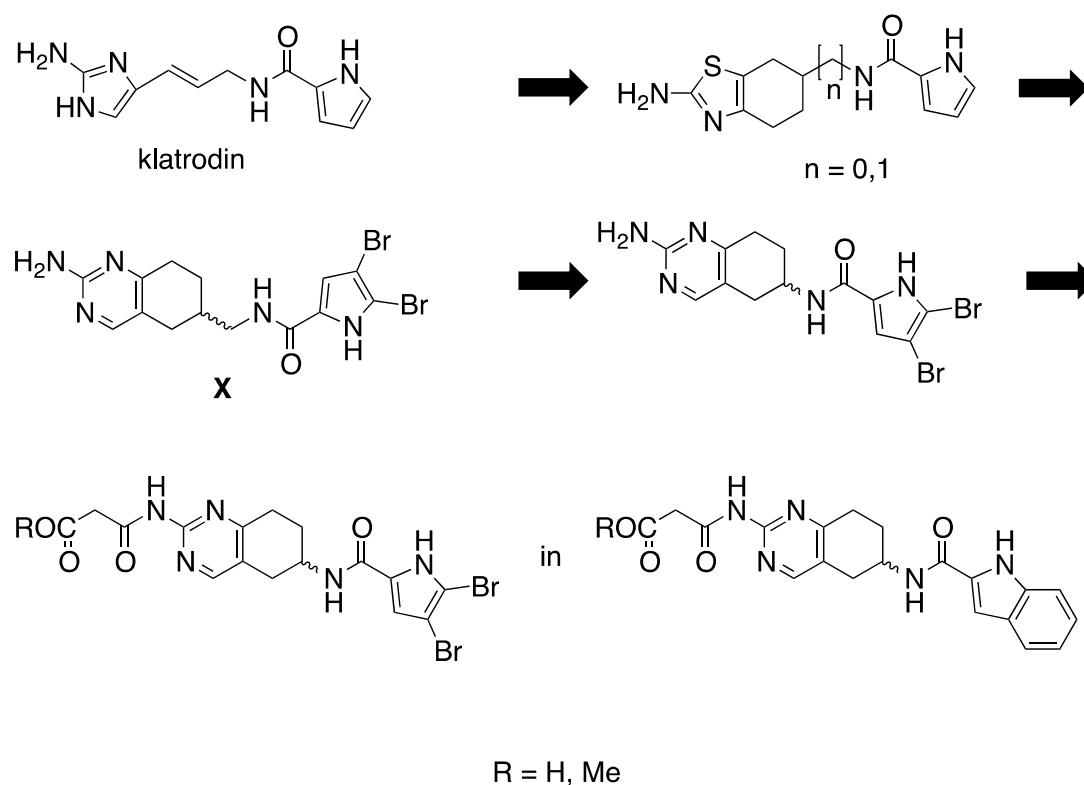
Himenidin (slika 12) so izolirali iz spužve *Hymeniacidon*. Od oroidina in klatrodina se po strukturi razlikuje v tem, da ima na pirolov obroč vezan samo en bromov atom. Ima protibakterijsko delovanje ter deluje na serotonergične receptorje (23).



Slika 12: Struktura himenidina

2 NAČRT ZA DELO

V raziskovalni skupini na Katedri za farmacevtsko kemijo so v okviru EU projekta MAREX pripravili številne analoge klatrodina, v katerih je 2-aminoimidazolski del molekule klatrodina nadomeščen z različnimi aminoheterocikli ob sočasni rigidizaciji vmesne verige med 2-aminoimidazolskim in pirolnim delom molekule. Prvotno najpogosteje uporabljen tetrahidro-2-aminobenzotiazolski obroč kot mimetik 2-aminoimidazola in dela vmesne verige so v naslednjih korakih zamenjali s tetrahidro-2-aminokinazolinskim skeletom. Ker so opisane spojine, ki so pripravljene kot potencialni blokatorji napetostno odvisnih natrijevih kanalov (20), strukturno zelo podobne nedavno objavljenim pirolamidnim inhibitorjem giraze B (17), so jih testirali na inhibicijo giraze B in dobili nekaj obetavnih zadetkov z IC_{50} v mikromolarnem območju.



Shema 1: Načrt raziskovalnega dela

Spojina *N*-((2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)metil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboxamid (**X**) je imela IC₅₀ vrednost za inhibicijo giraze B 108 μm, zato smo se odločili za načrtovanje analogov spojine X, ki bi imeli močnejše zaviralno delovanje na girazo B.

V okviru te magistrske naloge smo se tako odločili pripraviti krajše analoge spojin X na osnovi predhodnega molekulskega modeliranja, tako da smo a) v verigi med tetrahidrokinazolinskim obročem in amidno skupino izpustili ogljikov atom in b) v tako dobljeni spojini bromove atome na pirolu nadomestili z vodikom ali klorom oziroma dibromopiroлно skupino zamenjali z indolom ter c) na amino skupino na mestu 2 tetrahidrokinazolinskega skeleta uvedli metilmalonilno ali malonilno skupino.

Na shemi 1 je s puščicami nakazana miselna pot načrtovanja zaviralcev giraze B, pripravljenih v okviru te magistrske naloge.

Želeli smo sintetizirati spojine, ki bi imele večje zaviralno delovanje na girazo B (zmanjšati vrednost IC₅₀).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Reagenti in topila

1,4-Dioksan, $\geq 99,5$ %, Merck, Nemčija

2-(trikloroacetil)pirol, 99 %, Sigma Aldrich, ZDA

4-(dimetilamino)piridin, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, ZDA

Aceton, 99,5 %, J. T. Baker, ZDA

Acetonitril, $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich, ZDA

Citronska kislina, 99,5 – 100,5 %, Merck, Nemčija

Diklorometan, analitska čistost, Merck, Nemčija

Dietil eter, analitska čistost, Merck, Nemčija

DMF, $\geq 99,7$ %, Merck, Nemčija

DMSO-d₆, Euriso-Top, Francija

Etanol absolutni, 99,5 %, Merck, Nemčija

Gvanidinijev hidroklorid, ≥ 98 %, Fluka, Švica

Metanol, 99,9 %, Carlo Erba, Francija

Metil-3-kloro-3-oksopropanoat 97%, Sigma Aldrich, ZDA

NaCl, morska sol

Na₂CO₃, 99,9 %, Merck, Nemčija

NaHCO₃, analitska čistost, Merck, Nemčija

NaOH, 99 %, Merck, Nemčija

n-Heksan, analitska čistost, Merck, Nemčija

N,N- dimetilformamid dimetil acetal, 97 %, Acros Organics, ZDA

Na₂SO₄, anhidrid, analitska čistost, Merck, Nemčija

TBTU, 97 %, Fluka, Švica

Toluen, 99,7 %, Sigma Aldrich, ZDA

Trietilamin, 98 %, Fluka, Švica

Trifluoroocetna kislina, 99 %, Acros Organics, ZDA

3.2 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo Merck Kiesel gel (60 F₂₅₄) plošče z nanosom silikagela (0,25 mm) na aluminijastem nosilcu. Spojine smo detektirali z UV svetlobo valovne dolžine 254 in 365 nm ter z orositvenimi reagenti (ninhidrin, bromkrezol modro).

Kolonska kromatografija

Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel Kieselgel (60 F₂₅₄) z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm proizvajalca Merck. Za mobilno fazo smo uporabili DKM in MeOH v različnih razmerjih.

Tekočinska kromatografija (HPLC)

Analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem, G1316A termostatom in G1313A vzorčevalnikom. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5μm, 4,6 × 150 mm). Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 % trifluoroocetne kisline (A) in metanola (B). Gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min.

3.3 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H NMR in ^{13}C NMR spektre smo posneli pri 400 in 101 MHz pri temperaturi 25 °C. Uporabili smo Bruker AVANCE III spektrometer na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Kot topilo smo uporabili DMSO- d_6 in TMS kot interni standard. Spektre smo signirali s pomočjo COSY, HSQC in DEPT eksperimentov.

3.4 Masna spektroskopija (MS)

Masni spektri so bili posneti z VG-Analytical Autospec Q masnim spektrometrom v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.5 Infrardeča (IR) spektroskopija

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

3.6 Določanje temperature tališča

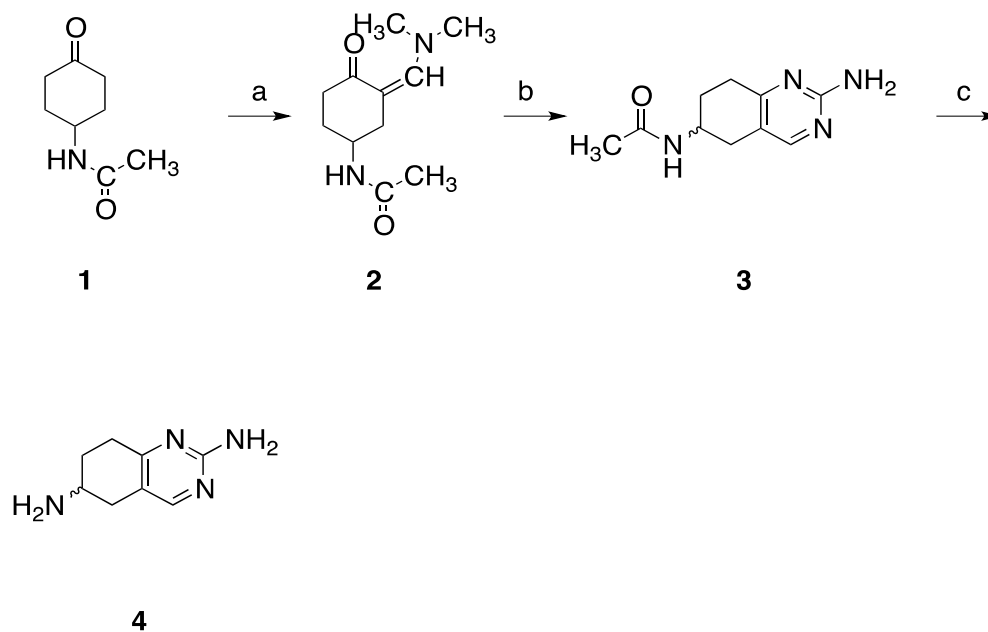
Določali smo jih na mikroskopu z ogrevalno mizico Leica Microsystems na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Tališča niso korigirana.

3.7 Poimenovanje in risanje spojin

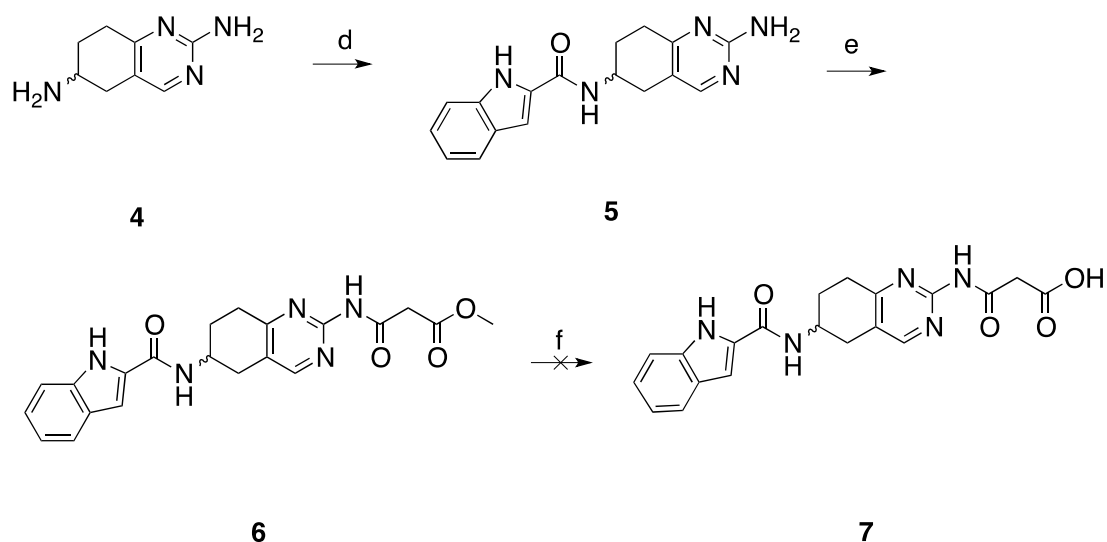
Pri poimenovanju spojin in risanju strukturnih formul smo uporabljali računalniški program CS Chem Draw Ultra 12.0 (ChambridgeSoft).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

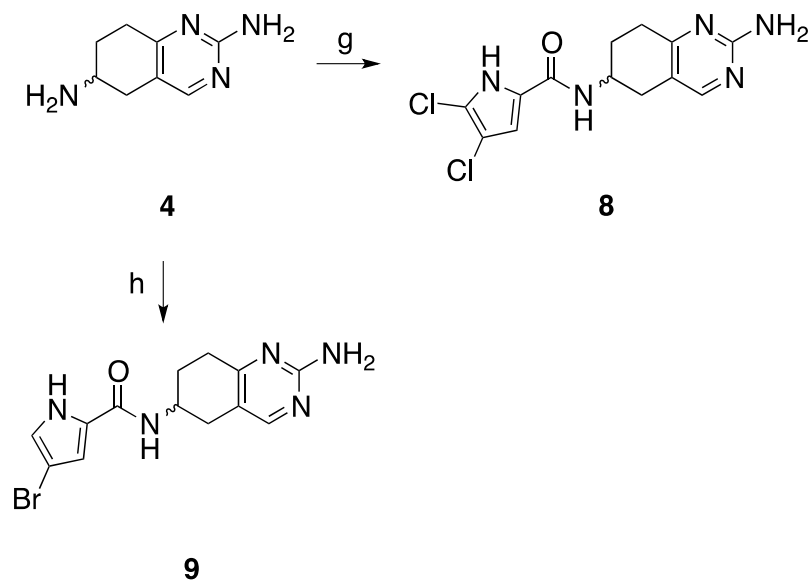
Izvedene sinteze so prikazane na shemi 2, 3, 4 in 5. Spojine **2-4** so bile sintetizirane, kot je opisano v referenci (25).



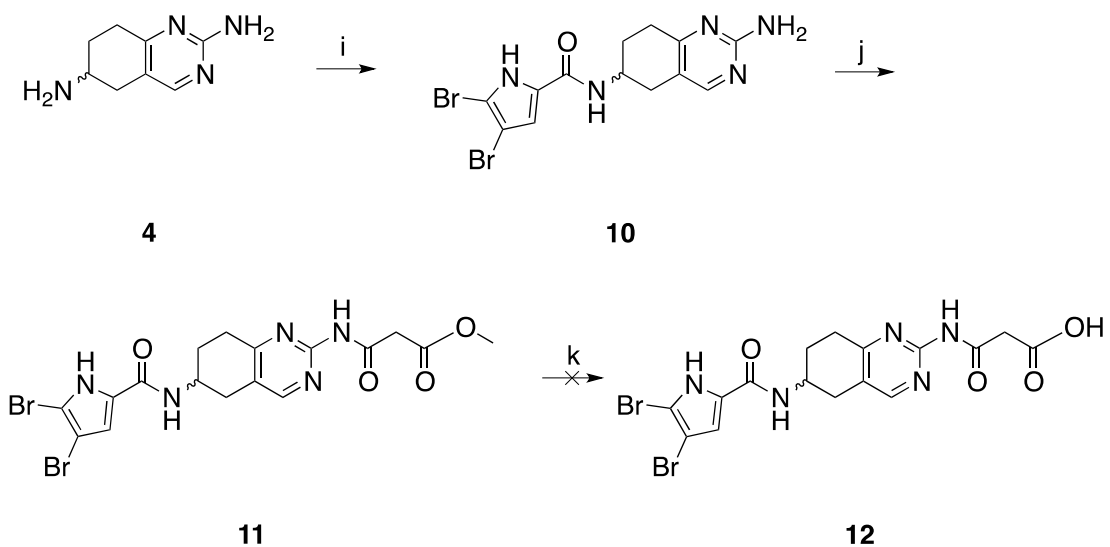
Shema 2: Reakcijska shema sintezne poti; *Reagenti in pogoji:* (a) DMF-DMA, toluen, Et₃N, 140 °C - 2 h, 105 °C - 1,5 h; (b) EtOH, gvanidinijev hidroklorid, 80 °C, 3 h; (c) NaOH, MeOH, 90 °C, 16 h.



Shema 3: Reakcijska shema sintezne poti; *Reagenti in pogoji:* (d) DMF, TBTU, Et₃N, 2,5 h; 35 °C, 3 h; (e) metil 3-kloro-3-oksopropanoat, DMF, Et₃N, 21 h; (f) LiOH, MeOH, 0 °C, 2 h.

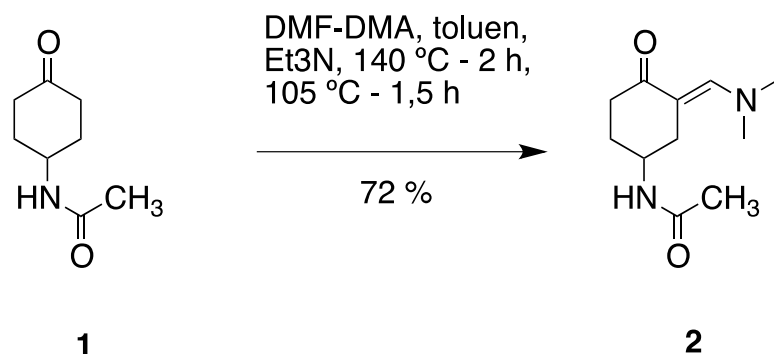


Shema 4: Reakcijska shema sintezne poti; *Reagenti in pogoji:* (g) DMF, 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etanon, (h) DMF, 1-(4-bromo-1H-pirol-2-il)-2,2,2-trikloroetanon, 35 °C, 3 h.



Shema 5: Reakcijska shema sintezne poti; *Reagenti in pogoji*: (i) DMF, Na₂CO₃, 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanon, 35 °C, 2,5 h; (j) metil 3-kloro-3-oksopropanoat, DMF, Et₃N, 23 h; (k) LiOH, MeOH, 0 °C, 2 h.

4.1 Sinteza (*E*)-*N*-(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamida (**2**) (glej shemo 2)



N-(4-oksocikloheksil)acetamidu (**1**) (13,508 g, 87 mmol) smo dodali toluen (350 mL), *N,N*-dimetilformamid dimetil acetal (75 mL) in trietilamin (1,5 mL). Vsebinsko reakcijske zmesi smo destilirali do polovice začetnega volumna, nato smo dodali toluen (150 mL) in pustili reakcijsko zmes mešati 2h pri 105 °C. Postopek smo ponovili trikrat. Reakcijsko zmes smo pustili stati na sobni temperaturi čez noč, da je produkt izkristaliziral. Surov produkt smo nato prefiltrirali na nuči preko filtrirnega papirja s pomočjo vakuuma, ga posušili v sušilniku in nato prekristalizirali iz toluena. Izkoristek: 13.038 g (72 %).

Barva: beli kristali.

$T_{\text{tališča}}$ (izmerjeno) 132-135 °C; $T_{\text{tališča}}$ (literaturni podatek) 132-134 °C (21).

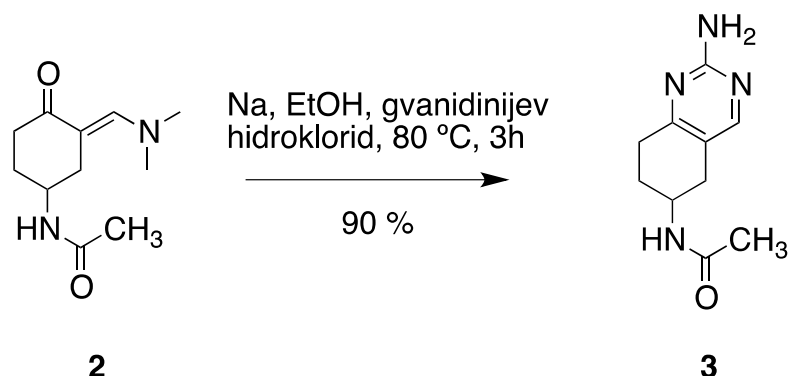
IR (ATR): ν 3271, 2951, 1666, 1633, 1525, 1360, 1135, 699, 596, 555 cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.52-1.67 (m, 1H, CH₂), 1.73-1.88 (m, 4H, CH₃, CH), 2.16-2.24 (m, 2H, CH₂), 2.39-2.48 (m, 1H, CH₂), 2.89-2.98 (m, 1H, CH₂), 3.04 (s, 6H, CH₃), 3.68-3.83 (m, 1H, CHNH), 7.30 (s, 1H, CHN(CH₃)₂), 7.89 (d, 1H, *J* = 7.40 Hz, NHCOCH₃) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.71, 28.07, 31.45, 35.91, 42.82 (2 signala se prekrivata), 45.34, 100.04, 150.48, 168.52, 193.44 ppm.

HRMS za C₁₁H₁₈N₂O₂ ([*M*+*H*⁺]⁺): izračunana masa 211,1447, izmerjena masa 211,1441.

4.2 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamida (**3**) (glej shemo 2)



Natrij (1,42 g, 62 mmol) smo počasi dodajali brezvodnemu etanolu (50 mL). Ko je ves natrij zreagirajal, smo dodali gvanidinijev hidroklorid (5,92 g, 62 mmol). Po 30 minutah mešanja smo dodali še (*E*)-*N*-(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamid (**2**) (13,020 g, 62 mmol), ki je bil raztopljen v etanolu (103 mL). Reakcijsko zmes smo 10 minut prepihovali z argonom, nato pa smo jo pustili 3 ure mešati pod refluxom ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo ohladili na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izpadli produkt smo prefiltrirali na nuči s pomočjo vakuuma. Produkt smo spirali z etanolom (10 mL) in ga posušili v sušilniku.

Izkoristek: 11.439 g (90 %).

Barva: rumeni kristali.

$T_{\text{tališča}}$ (izmerjeno) $255\text{-}257\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{tališča}}$ (literaturni podatek) $256\text{-}258\text{ }^{\circ}\text{C}$ (21).

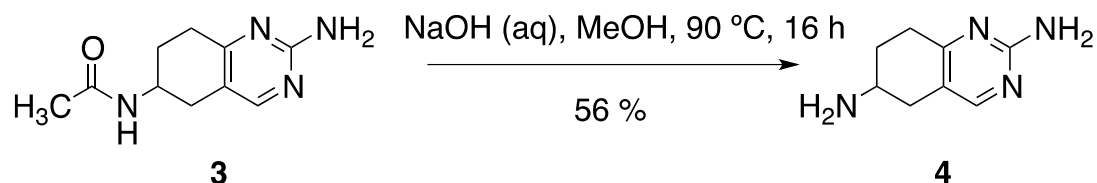
IR (ATR): ν 3395, 3316, 3206, 2944, 1642, 1593, 1474, 1374, 793 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.61-1.73 (m, 1H, CH_2), 1.81 (s, 3H, CH_3), 1.85-1.96 (m, 1H, CH_2), 2.37 (dd, 1H, $J = 9.01, 15.51\text{ Hz}$, CH_2), 2.59-2.68 (m, 2H, CH_2), 2.74 (dd, 1H, $J = 4.82, 15.41\text{ Hz}$, CH_2), 3.83-3.96 (m, 1H, CH), 6.29 (s, 2H, NH_2), 7.93 (s, 1H, Ar-H), 7.99 (d, 1H, $J = 7.31\text{ Hz}$, NH-C=O) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 22.68, 27.64, 29.59, 30.38, 44.15, 115.53, 158.11, 162.03, 164.46, 168.69 ppm.

HRMS za $C_{10}H_{14}N_4O$ ($[M+H]^{++}$): izračunana masa 207,1246, izmerjena masa 207,1242.

4.3 Sinteza 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamina (**4**) (glej shemo 2)



N-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamidu (**3**) (3,485 g, 17 mmol) smo dodali NaOH (34,800 g, 0,87 mol), ki smo ga predhodno raztopili v vodi (35 mL) in metanolu (105 mL) ter segrevali pri refluxu 16 ur. Reakcijski zmesi smo dodali vodo (50 mL) in ekstrahirali z diklorometanom (50 mL). Ekstrakcijo smo ponovili štirikrat, nato pa smo združene organske faze sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL). Združene organske faze smo sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku.

Izkoristek: 1,552 g (56 %).

Barva: skoraj beli kristali.

$T_{\text{tališča}}$ (izmerjeno) 179-182 °C; $T_{\text{tališča}}$ (literaturni podatek) 178-181 °C (21).

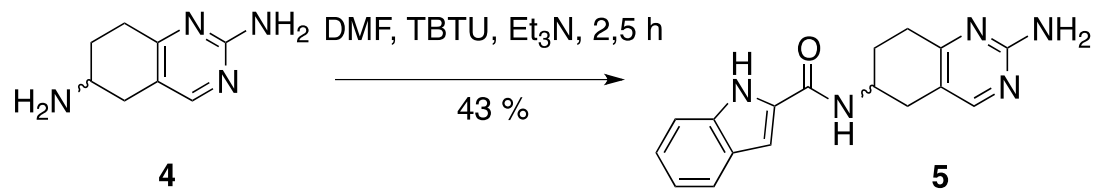
IR (ATR): ν 3413, 1670, 1557, 1592, 1478, 1423, 784, 577, 561 cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.42-1.59 (m, 3H, 6-NH₂ CH₂), 1.79-1.92 (m, 1H, CH₂), 2.20 (dd, 1H, $J = 8.98, 15.49$, CH₂), 2.53-2.72 (m, 3H, CH₂, CH₂), 2.90-3.04 (m, 1H, CH), 6.22 (s, 2H, 2-NH₂), 7.91 (s, 1H, Ar-H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 31.20, 34.02, 39,92 (signal se prekriva z DMSO- d_6) 46.19, 116.45, 157.87, 161.83, 164.94 ppm.

HRMS za $C_8H_{12}N_4$ ($[M+H]^{++}$): izračunana masa 165,1140, izmerjena masa 165,1144.

4.4 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1*H*-indol-2-karboksamida (**5**) (glej shemo 3)



Indol-2-karboksilno kislino (161 mg, 1 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (72 mL) in dodali trietilamin (1,25 mL, 9 mmol). Nato smo dodali TBTU (1,060 g, 3,3 mmol). Po 15 minutah mešanja pri sobni temperaturi smo dodali spojino **4**. Reakcija je potekala 2,5 ure pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom. Reakcijski zmesi smo dodali diklorometan in heksan in nastalo oborino prefiltrirali na nuči preko filtrirnega papirja s pomočjo vakuuma. Oborino smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃, deionizirano vodo in dietiletom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo diklorometan/metanol (11:1).

Izkoristek: 395 mg (43 %).

Barva: svetlo rumeni kristali.

T_{tališča} 270-273 °C.

IR (ATR): ν 3397, 3246, 1637, 1541, 1477, 1418, 814, 775, 713, 574 cm⁻¹.

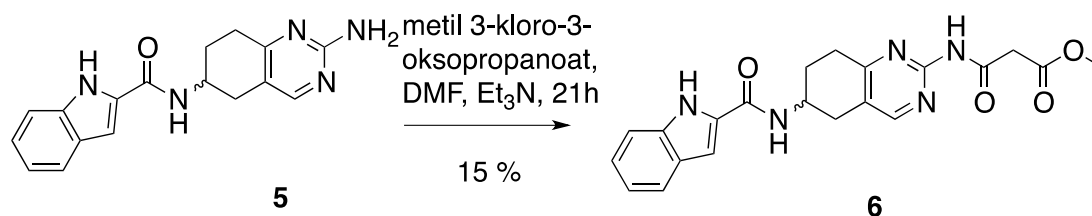
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.86 (m, 1H, CH₂), 1.98-2.13 (m, 1H, CH₂), 2.59 (dd, 1H, *J* = 9.74, 15.64, CH₂), 2.74 (m, 2H, CH₂), 2.83-2.94 (m, 1H, CH₂), 4.10-4.27 (m, 1H, CHNH), 6.32 (s, 2H, 2-NH₂), 7.04 (m, 1H, Ar-H), 7.13-7.24 (m, 2H, Ar-H, Ar-H), 7.44 (dd, 1H, *J* = 0.88, 8,24 Hz, Ar-H), 7.61 (dd, 1H, *J* = 0.71, 7.93 Hz, Ar-H), 8.00 (s, 1H, Ar-H), 8.43 (d, 1H, *J* = 7.68 Hz, NH-C=O), 11.58 (s, 1H, Ar-NH) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 21.92, 30.12, 30.41, 44.78, 102.77, 112.26, 115.73, 119.66, 121.44, 123.24, 127.01, 131.68, 136.37, 157.89, 160.60, 161.61, 164.68 ppm.

HRMS za $C_{17}H_{17}N_5O$ ($[M+H]^+$): izračunana masa 308,1509, izmerjena masa 308,1511.

Kolona Agilent Eclipse Plus $5\mu m$ C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL ; retencijski čas: 13,882 min (99,00 % pri 254 nm, 99,00 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

4.5 Sinteza metil 3-(((6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (6) (glej shemo 3)



N-(2-amin-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1*H*-indol-2-karboksamid (5) (300 mg, 0,98 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (5 mL) in dodali trietilamin (158 μL , 1,08 mmol). Med mešanjem smo počasi dodajali metil 3-kloro-3-oksopropanoat (158 μL , 1,47 mmol). Na koncu smo dodali še dimetilaminopiridin v katalitični količini. Reakcija je potekala 21 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo dodali 0,5 mL nasičene raztopine $NaHCO_3$. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom. Produkt smo raztopili v diklorometanu (20 mL) in spirali z deionizirano vodo (20 mL), z 10 % vodno raztopino citronske kisline (20 mL) in nasičeno vodno raztopino $NaHCO_3$ (10 mL). Produkt se je v vodni fazi oboril. Raztopili smo ga v dioksanu (30 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku. Nato smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo diklorometan/metanol (30:1).

Izkoristek 59 mg (15%).

Barva: beli kristali.

$T_{\text{tališče}}$ 190-192 °C.

IR (ATR): ν 3267, 1682, 1634, 1538, 1416, 1342, 1206, 1159, 771, 679 cm^{-1} .

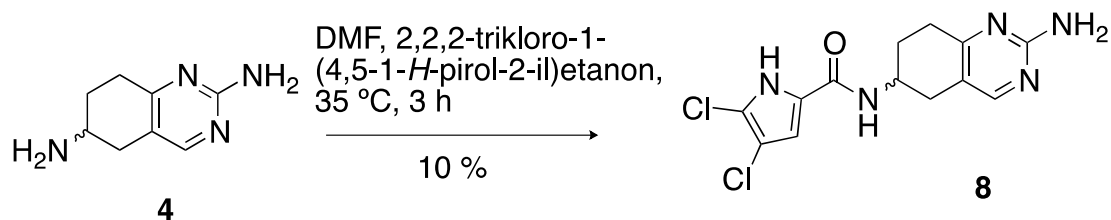
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.83-2.03 (m, 1H, CH_2), 2.06-2.15 (m, 1H, CH_2), 2.7-2.8 (m, 1H, CH_2), 2.90 (m, 2H, CH_2), 3.02-3.10 (m, 1H, CH_2), 3.64 (s, 3H, CH_3), 3.69 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 4.20-4.34 (m, 1H, CH-NH), 7.01-7.07 (m, 1H, Ar-H), 7.19 (m, 2H, Ar-H, Ar-H), 7.44 (dd, 1H, $J = 0.77, 8.25$ Hz, Ar-H), 7.62 (d, 1H, $J = 7.72$ Hz, Ar-H), 8.39 (s, 1H, Ar-H), 8.48 (d, 1H, $J = 7.56$ Hz, NH-C=O), 10.68 (s, 1H, 2-NH-C=O), 11.59 (s, 1H, Ar-NH) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 27.51, 29.96, 30.47, 44.06, 44.18, 51.84, 54.90, 102.83, 112.26, 119.67, 121.45, 123.06, 123.27, 126.99, 131.60, 136.38, 155.35, 158.16, 160.68, 165.49, 168.13 ppm.

HRMS za $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izračunana masa 408,1672, izmerjena masa 408,1660.

Kolona Agilent Eclipse Plus $5\mu\text{m}$ C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL ; rentencijski čas: 16,641 min (99,00 % pri 254 nm, 95,52 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

4.6 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida (**8**) (glej shemo 4)



5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamin (**4**) (250 mg, 1,5 mmol), Na_2CO_3 (159 mg, 1,5 mmol) in 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanon (422 mg, 1,5 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (6,5 mL) in mešali 3 ure pri temperaturi 35 °C.

Reakcijsko zmes smo redčili z dietil etrom ter spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ in deionizirano vodo. Organsko fazo, kjer se je nahajal produkt, smo sušili z Na₂SO₄. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo diklorometan/metanol/Et₃N (900:100:1). Produkt smo raztopili v metanolu in dodali etil acetat, ter prefiltrirali produkt na nuči čez filter papir s pomočjo vakuuma.

Izkoristek 46,5 mg (10 %).

Barva: skoraj beli kristali.

T_{tališče} 305-313 °C (razpad).

IR (ATR): ν 3853, 3735, 3401, 3312, 3202, 3111, 2930, 1598, 1438, 1389, 1336, 922, 770, 577 cm⁻¹.

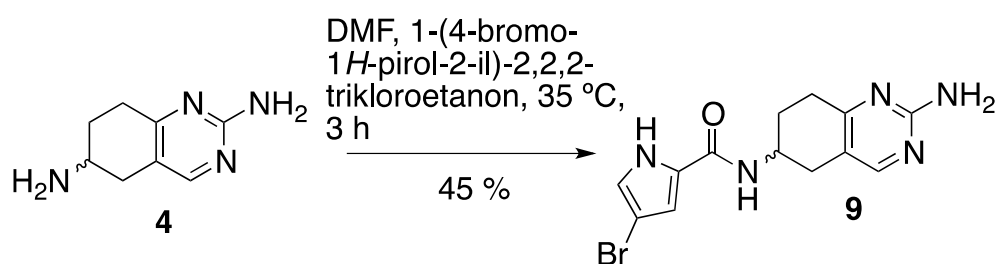
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.71-1.86 (m, 1H, CH₂), 1.92-2.06 (m, 1H, CH₂), 2.46-2.55 (m, 1H signal prekrit z DMSO-d₆, CH₂), 2.64-2.76 (m, 2H, CH₂), 2.76-2.89 (m, 1H, CH₂), 4.01-4.17 (m, 1H, CH₂), 6.32 (s, 2H, 2-NH₂), 6.97 (d, 1H, *J*=2.20 Hz, Ar-H), 7.97 (s, 1H, Ar-H), 8.07 (d, 1H, *J*=7.78, NH-C=O), 12.74 (s, 1H, Ar-NH) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 27.92, 30.03, 30.44, 44.65, 107.86, 109.89, 114.74, 115.51, 124.83, 158.11, 158.45, 162.07, 164.41 ppm.

HRMS za C₁₃H₁₄BrN₅O ([M+H]⁺): izračunana masa 326,0575, izmerjena masa 326,0567.

Kolona Agilent Eclipse Plus 5µm C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL; rentencijski čas: 15,020 min (78,69 % pri 254 nm, 86,62 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

4.7 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4-bromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (**9**) (glej shemo 4)



5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamin (**4**) (257 mg, 1,56 mmol), Na₂CO₃ (165 mg, 1,56 mmol) in 1-(4-bromo-1*H*-pirol-2-il)-2,2,2-trikloroetanon (455 mg, 1,56 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu in mešali 3 ure pri temperaturi 35 °C. Reakcijsko zmes smo redčili z diklorometanom ter spirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ in deionizirano vodo. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄. Produkt smo prekristalizirali iz etanola.

Izkoristek 237 mg (45%).

Barva: skoraj beli kristali.

T_{tališče} 275-278 °C.

IR (ATR): ν 3404, 3311, 3198, 3062, 2940, 1633, 1530, 1437, 1330, 922, 770, 566 cm⁻¹.

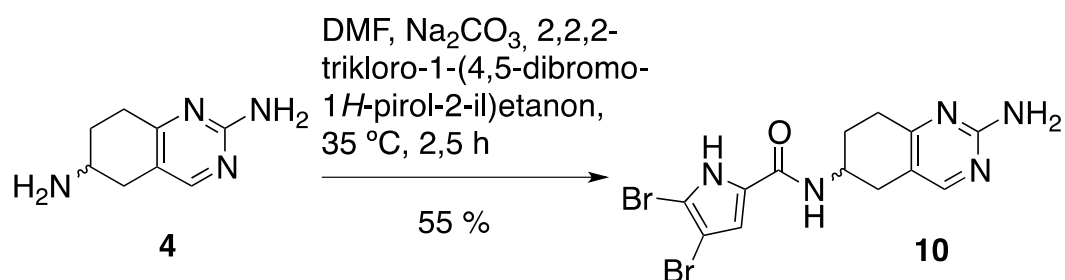
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.80 (m, 1H, CH₂), 1.93-2.02 (m, 1H, CH₂), 2.46-2.55 (m, 1H, signal prekrit z DMSO-d₆, CH₂), 2.67 -2.72 (m, 2H, CH₂), 2.66-2.73 (m, 1H, CH₂), 4.03-4.14 (m, 1H, CH-NH), 6.31 (s, 2H, 2-NH₂), 6.89 (d, 1H, *J* = 1.57 Hz, Pyrr-H-3), 6.96 (d, 1H, *J* = 1.57 Hz, Pyr-H-5), 7.97 (s, 1H, Ar-4), 8.05 (d, 1H, *J* = 7.63, NH-C=O), 11.93 (s, 1H, Ar-NH) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 28.01, 30.10, 30.49, 44.55, 94.84, 111.67, 115.60, 121.14, 126.84, 158.11, 159.05, 162.07, 164.44.

HRMS za C₁₃H₁₄BrN₅O ([M+H]⁺): izračunana masa 336,0451, izmerjena masa 336,0460.

Kolona Agilent Eclipse Plus 5 μ m C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μ L; rentencijski čas: 12,532 min (95,00 % pri 254 nm, 95,00 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

4.8 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (**10**) (glej shemo 5)



5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamin (**4**) (369 mg, 2,25 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (9 mL), dodali uprašen Na₂CO₃ (238 mg, 2,25 mmol) in mešali 15 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanon (918 mg, 2,48 mmol). Reakcija je potekala 2,5 ure pri temperaturi 35 °C. Topilo smo odstranili pri znižanem tlaku. Dodali smo diklorometan, v katerem se je spojina raztopila. Nato smo dodali vodo, v kateri se je produkt oboril, zato smo oborino prefiltrirali na nuči preko filtrirnega papirja s pomočjo vakuuma. Oborino smo sprali z diklorometanom, nasičeno raztopino NaHCO₃, deionizirano vodo in acetonom.

Izkoristek: 513 mg (55%).

Barva: svetlo rjavi kristali.

T_{tališča} 309-312 °C.

IR (ATR): ν 3136, 3113, 1667, 1596, 1596, 1429 cm⁻¹;

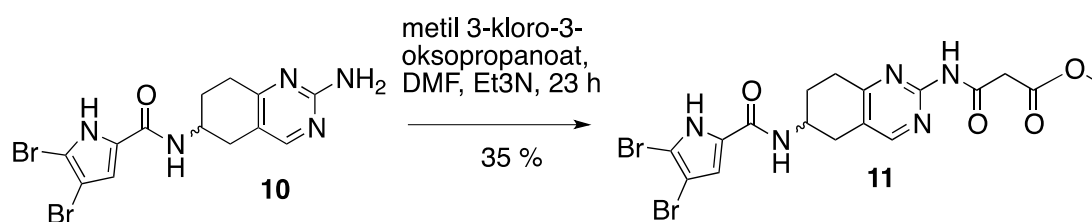
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.80 (m, 1H, CH₂), 1.88-2.07 (m, 1H, CH₂), 2.46-2.55 (m, 1H, signal prekrit z DMSO-d₆, CH₂), 2.69 (m, 2H, CH₂), 2.81 (dd, 1H, *J* = 15.26, 4.46 Hz, CH₂), 4.07 (m, 1H, CHNH), 6.31 (s, 2H, 2-NH₂), 6.95 (s, 1H, Pyr-H-3), 7.98 (m, 2H, NH-C=O, Ar-H-4), 12.13 (s, 1H, Ar-NH) ppm;

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 27.91, 30.01, 30.45, 44.59, 97.60, 104.63, 112.83, 115.52, 128.22, 158.1, 158.44, 162.08, 164.41 ppm.

HRMS za $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izračunana masa 412.9554, izmerjena masa 413,9565.

Kolona Agilent Eclipse Plus $5\mu\text{m}$ C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL ; rentencijski čas: 15,485 min (99,00 % pri 254 nm, 99,00 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

4.9 Sinteza metil 3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (11) (glej shemo 5)



N-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid (**10**) (208 mg, 0,5 mmol) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (3 mL) in dodali trietilamin (80 μL , 0,55 mmol). Med mešanjem smo počasi dodajali metil 3-kloro-3-oksopropanoat (81 μL , 0,75 mmol). Po končanem dodajanju smo dodali dimetilaminopiridin v katalitični količini. Reakcija je potekala 23 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo dodali 0,5 mL nasičene raztopine NaHCO_3 in raztopili reakcijsko zmes v diklorometanu (20 mL) ter spirali z 10 % vodno raztopino citronske kisline (20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo diklorometan/metanol (15:1).

Izkoristek 89 mg (35%).

Barva: skoraj beli kristali.

$T_{\text{tališče}}$ 185-191 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR): ν 3366, 3161, 2951, 1718, 1635, 1509, 1332, 1221, 971, 821, 613 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.80-1.95 (m, 1H, CH_2), 1.96-2.09 (m, 1H, CH_2), 2.60-2.72 (m, 1H, CH_2), 2.86 (dd, 2H, $J = 6.14, 6.66$ Hz, CH_2), 2.98 (d, 1H, $J = 4.46$ Hz, CH_2), 3.63 (s, 3H, CH_3), 3.68 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 4.10-4.25 (m, 1H, CHNH), 7.01 (s, 1H, Pyrr-H-3), 8.09 (d, 1H, $J = 7.42$ Hz, NH-C=O), 8.37 (s, 1H, Ar-H-4), 10.67 (s, 1H, 2-NH-C=O), 12.71 (s, 1H, Pyrr-NH) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 27.39, 29.76, 30.43, 43.94, 44.04, 51.83, 97.75, 104.56, 112.92, 122.95, 128.02, 155.33, 158.14, 158.42, 165.45, 168.12 ppm.

HRMS za $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}^+]^+$): izračunana masa 513, 9726, izmerjena masa 513,9739.

Kolona Agilent Eclipse Plus $5\mu\text{m}$ C18; mobilna faza: 0,1 % trifluoroocetna kislina (A) in metanol (B); gradient: 90 % A do 10 % A v 20 minutah, 5 minut 10 % A, nato 5 minut do 90 % A; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL ; rentencijski čas: 18,029 min (96,48 % pri 254 nm, 96,19 % pri 280 nm); pretok 1,0 mL/min.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri spojinah, ki smo jih sintetizirali, se pojavlja problem topnosti v topilih, ki so najbolj pogosta v laboratorijski uporabi. Zaradi tega so bili postopki čiščenja spojin bolj zapleteni in posledično končni izkoristki reakcij slabši, ker je pri čiščenju s kolonsko kromatografijo znaten delež spojin ostal na koloni.

5.1 Komentar sinteznih postopkov

5.1.1 Sinteza (*E*)-*N*-(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamida (2)

Na *N*-(4-oksocikloheksil)acetamid (1) se veže dimetilaminometilidenska skupina iz DMF DMA, pri tem pa kot stranski produkt izstopi metanol. Spojino smo pripravili po postopku iz literature (24).

5.1.2 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamida (3)

Reakcija poteka v več stopnjah. Najprej reagirata natrij in etanol in dobimo natrijev etoksid. V naslednji stopnji natrijev etoksid reagira z gvanidinijevim hidrokloridom in dobimo gvanidin, poleg tega pa nastaneta še etanol in natrijev klorid. Nato smo dodali (*E*)-*N*-(3-((dimetilamino)metilen)-4-oksocikloheksil)acetamid (2) in z gvanidinom pride do ciklizacije, pri kateri izstopi dimetilamin. Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi, da smo preprečili oksidacijo amina. Spojino smo pripravili po postopku iz literature (24).

5.1.3 Sinteza 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamina (4)

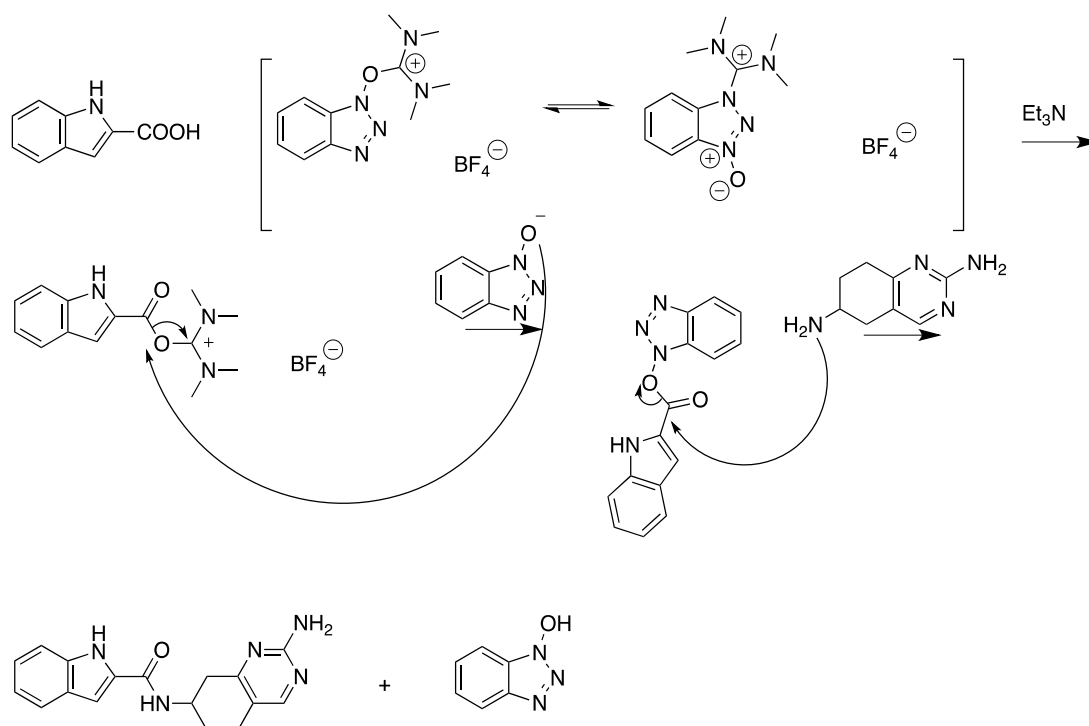
V *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)acetamidu (**3**) smo s pomočjo NaOH hidrolizirali amidno vez in nastal je amin. Spojino smo pripravili po postopku iz literature (24). Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z vodo in diklorometanom, ker pa so bile nečistote po prvem čiščenju še vedno prisotne, smo ekstrakcijo nekajkrat ponovili, nato pa smo organske faze spirali še z nasičeno raztopino NaCl in dobili smo dovolj čist produkt, iz katerega smo sintetizirali nadaljne spojine.

5.1.4 Sinteza *N*-(2-amin-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1*H*-indol-2-karboksamida (5**)**

Spojino smo pripravili z reakcijo nukleofilne substitucije hidroksilne skupine v indol-2-karboksilni kislini s 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diaminom (**4**), katerega smo pripravili po postopku iz literature (24). Poleg želene spojine smo dobili tudi stranski produkt. Poskušali smo ga spirati z dietil etrom, vendar smo s tem sprali tudi del produkta. Večji izkoristek smo dobili tako, da smo vzorec spirali z diklorometanom. Matičnici smo dodali heksan in produkt se je oboril, tako da smo ga lahko odfiltrirali na nuči. Oborino smo spirali z natrijevim hidrogen karbonatom, vodo in dietil etrom. Kljub zgornjemu postopku izolacije je bilo potrebno vzorec očistiti še s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM/MeOH v razmerju 11:1.

Z dietil etrom je produkt potrebno spirati v majhnih količinah, ker se poleg nečistot z njim spere tudi nekaj vzorca, kar močno vpliva na končni izkoristek.

Mehanizem nastanka amidne vezi z aktivacijo s TBTU je opisan na shemi 6.



Shema 6: Mehanizem reakcije tvorbe amidne vezi s TBTU (25)

5.1.5 Sinteza metil 3-((6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (6)

Spojino smo pripravili z nukleofilno substitucijo klora v metil malonil kloridu z *N*-(2-amin-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1*H*-indol-2-karboksamidom (**5**). Metil 3-kloro-3-oksopropanoat smo počasi dodajali k *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-1*H*-indol-2-karboksamidu (**5**) ob prisotnosti Et₃N, ki je vezal kloridne ione. Na koncu reakcije smo dodali natrijev hidrogen karbonat za nevtralizacijo klorovodikove kisline, ki bi utegnila biti še prisotna v reakcijski zmesi. Produkt smo raztopili v DKM in dodali vodo, zaradi katere se je produkt oboril in načrtovana ekstrakcija ni bila mogoča. Oborino smo prefiltrirali na nuči s pomočjo vakumske črpalke. Nato smo oborino spirali z 10 % vodno raztopino citronske kisline in natrijevim hidrogen karbonatom, vendar so v vzorcu še vedno ostale nečistote. Teh kljub dodatnemu spiranju nismo uspeli odstraniti in odločili smo se za čiščenje s kolonsko kromatografijo. Izkoristek je bil nizek, ker je veliko vzorca ostalo na koloni.

Iz spojine **6** smo v nadaljnji fazi želeli pripraviti kislino s hidrolizo estra. Začeli smo tako, da smo vzorec raztopili v THF in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo dodali NaOH (1M) in mešali deset minut pri tej temperaturi, nato je reakcija potekala pri

sobni temperaturi. Na začetku se je hidrolizirala majhna količina estra, v nadaljnjem poteku reakcije pa je hidroliza potekla na amidu in tako smo prišli do spojine **4**. Sklepali smo, da je nastanek spojine posledica tega, da je NaOH premočna baza. Odločili smo se za šibkejši LiOH (1M) in postopek ponovili enako kot pri NaOH, vendar smo prišli do enakega rezultata in reakcije nismo več nadaljevali v tej smeri, bi bilo pa smiselno poskusiti še hidrolizo estra z LiI, tako kot je opisano v literaturi (26). Da smo namesto kisline prišli do amina, smo opazili pri NMR spektru, saj smo na spektru dobili signal, ki pripada vodikoma iz aminske skupine, tako kot pri spojini **4**, manjkal pa je signal, ki bi moral pripadati vodikom, ki se nahajajo na verigi pripeti na amid.

5.1.6 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamida (8**)**

Spojino smo pripravili z reakcijo nukleofilne substitucije triklorometilne skupine v 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanonu s 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diaminom (**4**). 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanon smo pripravili po postopku iz literature (27). Končni produkt, spojino **8** smo redčili z dietil etrom ter spirali z natrijevim hidrogen karbonatom in vodo. Produkt smo najprej čistili s kolonsko kromatografijo. Ker vse nečistote niso ostale na koloni, smo se odločili še za prekrystaliziracijo iz metanola, vendar je bil tudi ta postopek čiščenja neuspešen. Zaradi postopkov čiščenja je bil izkoristek reakcije nizek. Na vpliv rezultatov biološkega testiranja lahko vplivajo tudi nečistote, ki so prisotne v vzorcu, saj vzorca nismo uspeli zadovoljivo očistiti (> 95 %) za biološka testiranja. Večjo čistost produkta bi lahko dosegli, če bi ga čistili na reverznofazni koloni.

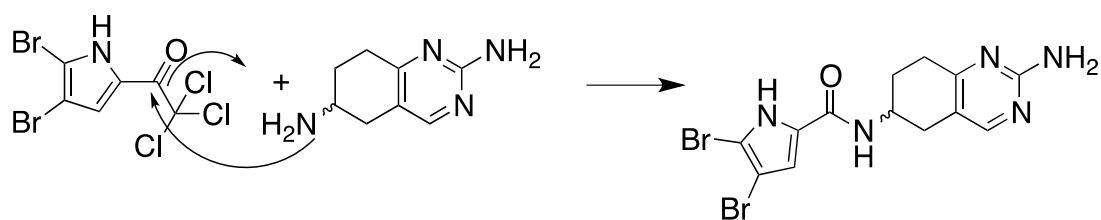
5.1.7 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4-bromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (9**)**

Spojino smo pripravili z reakcijo nukleofilne substitucije trikloro metilne skupine v 1-(4-bromo-1*H*-pirol-2-il)-2,2,2-trikloroetanonu s 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diaminom (**4**). 1-(4-bromo-1*H*-pirol-2-il)-2,2,2-trikloroetanon smo pripravili po postopku iz literature (27). Produkt, ki smo ga raztopili v DKM ter ga nato spirali z NaHCO₃ in vodo, je še vedno vseboval nečistote. V liju ločniku se nam je oborila majhna količina produkta skupaj z nečistotami. Enak rezultat smo dobili tudi pri ponovnem spiranju. Poskusili smo tudi redčenje z dietil etrom, ki je bilo neuspešno. Produkt smo poskusili raztopiti v metanolu, vendar se je pokazala slaba topnost spojine v tem topilu. Ker smo želeli produkt očistiti s kolonsko kromatografijo, smo ga raztapljali tudi v mobilni fazi DKM/MeOH/Et₃N 900/100/1, kjer se produkt ni topil v zadostni meri. Končno spojino smo uspešno očistili s prekrystalizacijo iz etanola.

5.1.8 Sinteza *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2- karboksamida (10**)**

Spojino smo pripravili z reakcijo nukleofilne substitucije triklorometilne skupine v 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanonu s 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diaminom (**4**). 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanon smo pripravili po postopku iz literature (27).

Spojino **4** smo raztopili v DMF in dodali uprašen natrijev karbonat za zagotovitev bazičnih pogojev. Kasneje smo dodali 3,4-dibromotrikloroacetilpirol. Pri 3,4-dibromotrikloroacetilpirolu zaradi induktivnega efekta kisika in klorovih atomov v trikloro-acetilni skupini na ogljiku nastane primankljaj elektronov in nanj se veže nukleofilni dušik iz spojine **4**, odcepi pa se triklorometilna skupina (shema 7). Po koncu reakcije smo surov produkt raztopili v diklorometanu, ob dodatku vode pa se je produkt oboril in namesto predvidene ekstrakcije smo oborino prefiltrirali na nuči. Produkt smo s spiranjem uspeli popolnoma očistiti.



Shema 7: Mehanizem reakcije tvorbe amidne vezi izhajajoč iz 3,4-dibromotrikloroacetilpirola

5.1.9 Sinteza metil 3-((6-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2-il)amino)-3-oksopropanoata (**11**)

Spojino smo pripravili z reakcijo nukleofilne substitucije klora v metil malonil kloridu z *N*-(2-amino-5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-6-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamidom (**10**). Metil 3-kloro-3-oksopropanoat smo počasi dodajali k spojini **10** v prisotnosti Et₃N, ki je vezal sproščene kloridne ione. Na koncu reakcije smo dodali natrijev hidrogen karbonat za nevtralizacijo morebitno še prisotne klorovodikove kisline. Produkt reakcije smo raztopili v diklorometanu in ga želeli očistiti s spiranjem z 10% vodno raztopino citronske kisline, z NaHCO₃ in z nasičeno vodno raztopino NaCl. Kljub temu smo na koncu produkt morali čistiti še s kolonsko kromatografijo.

Tudi ta produkt smo želeli uporabiti za sintezo karboksilne kisline, vendar smo se pri hidrolizi srečali z enakim problemom, kot pri pripravi kisline iz spojine **6**. Prav tako smo izvedli reakciji z NaOH in LiOH in pri obeh je prišlo do hidrolize amida. To smo opazili pri NMR spektru, ki je bil enak kot pri spojini **6**. Tudi pri tej spojini še nismo poskusili reakcije hidrolize estra z LiI.

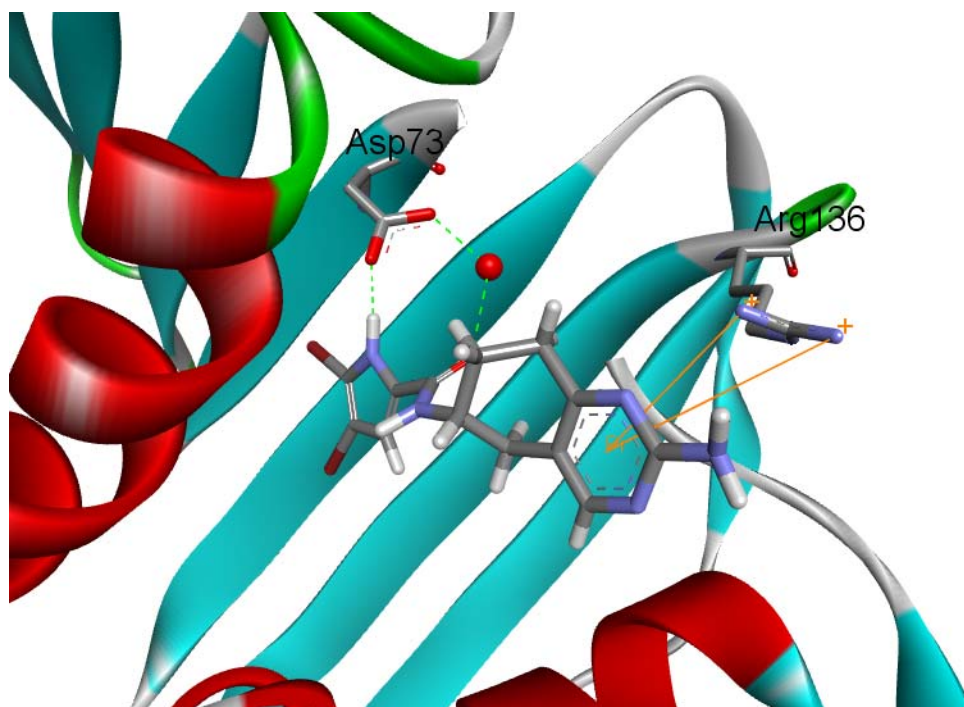
Spojina **11** je od vseh spojin, ki smo jih sintetizirali, izkazala najboljšo aktivnost na girazo (poglavje 5.3).

5.2 Modeliranje

V Protein Data Bank (PDB) je dostopnih več kristalnih struktur giraze B iz različnih mikroorganizmov. Za modeliranje smo uporabili strukturo 4DUH iz bakterije *E. coli*.

Da se spojina veže v hidrofobni žep aktivnega mesta giraze, mora tvoriti donorske in akceptorske vodikove vezi z vodo in aspartatom na eni strani in akceptorsko vodikovo vez z argininom. Vmesni del spojine povezuje začetni in končni del spojine in mora biti primerno velik, da se spojina lahko veže v hidrofobni žep. Prevelike spojine so neaktivne, saj ostanejo izven vezavnega mesta. Pri tem je potrebno upoštevati dejstvo, da je hidrofobni žep v bakteriji *Staphylococcus aureus* manjši kot v bakteriji *Escherichia coli*.

Spojino **10** je doc. dr. Tihomir Tomašič “sidral”¹ v vezavno mesto giraze. Na sliki 13 se vidita vodikovi vezi med karboksilno skupino Asp 73 in pirolnim NH ter med Asp 73 in amidnim kisikom, ki je na Asp 71 povezan preko molekule H₂O. Na drugem koncu spojine je interakcija kationa s π vezjo aromatskega obroča tj. interakcija med Arg 136 in med aromatskim obročem. Vse tri interakcije so pomembne za afiniteto spojine do vezavnega mesta. Tako smo predvideli veliko verjetnost za vezavo spojine **10** v aktivno mesto giraze B in njeno inhibitorno aktivnost, katero smo kasneje potrdili z biološkimi testi.



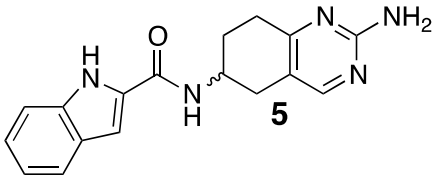
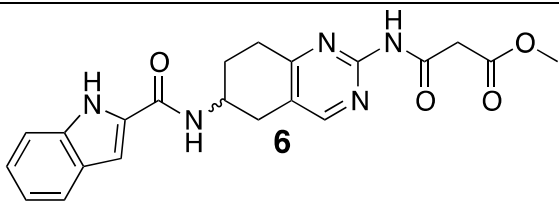
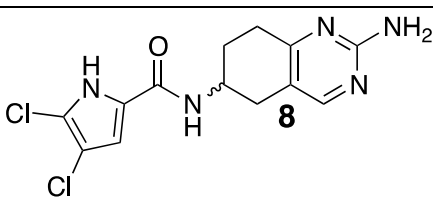
Slika 13: Spojina **10** v aktivnem mestu giraze

¹ “docking” (angl.) prevajamo v slovenščino kot “sidranje”

5.3 Biološko testiranje spojin

In vitro testiranje spojin na inhibicijo giraze B iz *E. coli* je izvedel doc. dr. Janez Ilaš. Za testiranje je uporabil set *E. coli* mikroplošč podjetja Inspiralis. Set je vseboval encim girazo, substrat DNA plazmida, pufer za redčenje encima, pufer za določanje aktivnosti, pufer za spiranje in oligonukleotid. Postopek za določanje aktivnosti se izvaja po patentu podjetja Plant Biosciences Ltd (28).

Po dodatku fluorescence barvila je plošče vstavil v čitalec fluorescence mikroplošč, izmeril intenziteto fluorescence pri valovni dolžini 630 nm (valovna dolžina vzbujanja je bila 495 nm) in iz rezultata fluorescence izračunal koncentracijo spojine, ki povroči 50 odstotno inhibicijo encima (IC_{50}) in je merilo inhibitorne jakosti spojine (28). Rezultati so podani v tabeli 1.

Spojina	IC_{50} [μ M]
 5	29,3 ± 6,0
 6	neaktivna
 8	5,67 ± 1,39

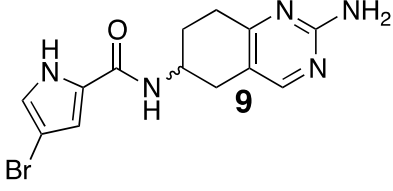
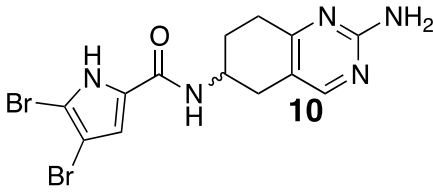
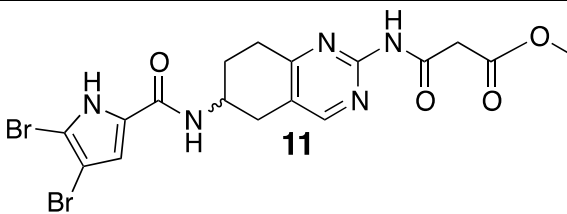
 <p>9</p>	35,3 ± 4,6
 <p>10</p>	2,90 ± 0,93
 <p>11</p>	2,60 ± 0,76

Tabela 1: Rezultati biološkega testiranja sintetiziranih ciljnih spojin na inhibicijo giraze B iz *E. coli*

Med testiranimi spojinami se je kot drugi najmočnejši inhibitor giraze B iz *E. coli* izkazal dibromopirol **10** ($IC_{50} = 2,90 \mu M$), ustrezen monobromopirol **9** je desetkrat šibkejši inhibitor giraze B ($IC_{50} = 35,3 \mu M$), analogna spojina brez bromo substituentov **6** pa je popolnoma neaktivna (tabeli 1 rezultat ni prikazan). Dikloropirol **8** je tudi dober inhibitor giraze B ($IC_{50} = 5,67 \mu M$), vendar je njegovo inhibitorno delovanje šibkejše od ustreznega dibromopirola **10**. Zamenjava dibromopirola z indolom (spojina **5**), zmanjša inhibitorno aktivnost (**5**; $IC_{50} = 29,3 \mu M$). Uvedba *N*-(metilmalonilnega) acilnega substituenta v spojino **10**, ki vodi do spojine **11**, ojača inhibitorno delovanje ($IC_{50} = 2,60 \mu M$). Ta spojina je najmočnejši inhibitor giraze B iz *E. coli* izmed spojin, ki smo jih testirali. Primerjava IC_{50} spojin **11** in **6** pokaže, da je zamenjava dibromopirola z indolom v kombinaciji z *N*-metilmalonilnim acilnim substituentom neugodna za inhibitorno delovanje.

V vezavnem mestu giraze B je pirolni del spojine (dibromopirol, indol) zelo pomemben zaradi interakcij z Asp 73 in vodno molekulo. Indol je usmerjen stran od hidrofobnega žepa in to vodi do manjše inhibicije. Za vezavo z argininom imajo boljšo aktivnost kisle spojine in manj gibljive spojine. Alkilna veriga je zelo gibljiva, kar posledično pomeni manjšo aktivnost. Spojine s prosto karboksilno skupino so se v drugih primerih izkazale za bolj aktivne od estrov, vendar jih iz naših spojin nismo uspeli pripraviti. Verjetno bi imela kislina **12**, pripravljena iz spojine **11** dobro aktivnost, za kislino **7**, pripravljeno iz spojine **6** pa sklepamo, da bi bila prevelika za dobro vezavo v vezavno mesto giraze B.

6 SKLEP

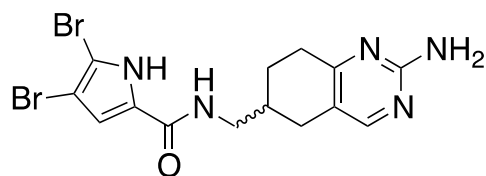
Zaradi problema odpornosti mikroorganizmov na delovanje antibiotikov je smiselno raziskovanje v smeri novih protimikrobnih učinkovin. V tej magistrski nalogi smo se posvetili sintezi spojin, ki zavirajo DNA girazo B. Pokazali smo, da imajo nekatere od teh spojin dobro zaviralno aktivnost na omenjeni encim.

Med šestimi derivati 5,6,7,8-tetrahidrokinazolin-2,6-diamina, ki smo jih pripravili in so bili nato ovrednoteni kot zaviralci DNA giraze B, so se dibromo derivati izkazali za bolj aktivne od indolnih in dikloro derivatov. Tudi monobromo pirololi so manj aktivni od dibromo pirololov. Pri spojinah z indolnim delom je bila ena od spojin neaktivna. Predvidevali smo, da je indolni obroč prevelik za umestitev v hidrofobni žep.

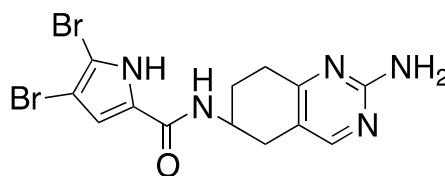
Pri nadaljevanju razvoja teh spojin je smiselno ohraniti del z dibromopirolom, ki je zelo pomemben del spojine, saj interagira z ostankom arginina in vodno molekulo v hidrofobnem žepu aktivnega mesta. Dibromo pirololi se prilegajo aktivnemu mestu obeh bakterij, tako *S. aureus* kot tudi *E. coli*. Pri vseh spojinah, ki smo jih sintetizirali, se pojavi problem topnosti v organskih topilih, zato jih je težje očistiti, kar je eden izmed razlogov, da so izkoristki reakcij slabi.

Za sam vstop v bakterijo je problematična prisotnost karboksilne skupine v sintetiziranih spojinah, zato bo šlo nadaljevanje razvoja v smeri priprave derivatov pripravljenih karboksilnih kislin.

Kot pozitivno se je pri spojinah izkazalo krajšanje verige med kinazolinskim obročem in amidom. IC_{50} vrednost spojine **10**, ki je brez vmesnega C atoma je $2,9 \mu\text{M}$, spojina **X**, ki ima vmesni C atom, pa ima IC_{50} $108 \mu\text{M}$.



X



10

7 LITERATURA

- 1) Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen B A, Alt K, Guerra B and Appel B: Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Hlth*, **2012**; 59: 158-165.
- 2) Reekala S M, Kaswan S, Nehra K and Singh A K: Global issue of antimicrobial resistance: a review. *Agricultural Reviews* **2012**; 33: 301-306.
- 3) Lloyd D H: Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. *Vet Dermatol* **2012**; 23: 299-e60.
- 4) Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L: Biochemistry, 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2002: 745-780.
- 5) Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, 2005: 271-303.
- 6) Watson D G: Pharmaceutical Chemistry, Churchill Livingstone Elsevier, London, 2011: 131-149.
- 7) Kathiravan M K, Khilare M M, Nikomomanesh K, Chlothe A S, Jain K S: Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *J Enzym Inhib Med Ch* **2013**; 28: 419-435.
- 8) 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.
- 9) Champoux J J: DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **2001**; 70: 369-413.

- 10) Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-based discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *J Med Chem* **2012**; 55: 6413-6426.
- 11) Brino L, Bronner C, Oudet P, Mousli M: Isoleucine 10 is essential for DNA gyrase B function in Escherichia coli. *Biochimie* **1999**; 81: 973-980.
- 12) Dar M A, Sharma A, Mondal N, Dhar S K: Molecular Cloning of Apicomplast-Targeted Plasmodium falciparum DNA Gyrase Genes: Unique Intrinsic ATPase Activity and ATP-Independent Dimerization of PfGyrB Subunit. *Eukaryot Cell* **2007**, 6:398-412.
- 13) Eakin A E, Green O, Hales N, Walkup G K, Bist S, Singh A, Mullen G, Bryant J, Embrey K, Gao N, Breeze A, Timms D, Andrews B, Uria-Nickelsen M, Demeritt J, Loch III J T, Hull K, Blodgett A, Illingworth R N, Prince B, Boriack-Sjodin P A, Hauck S, MacPherson L J, Ni H, Sherer B: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: fragment-based NMR screening to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Ch* **2012**; 56: 1240-1246.
- 14) Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Curr Med Chem* **2007**; 14: 2033-2047.
- 15) Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**; 92: 479-497.
- 16) Ronkin S, Badia M, Bellon S, Grillot A, Gross C H, Grossman T H, Mani N, Parsons J D, Stamos D, Trudeau M, Wei Y, Charifson P S: Discovery of pyrazolthiazoles as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**; 20: 2828-2831.
- 17) Sherer B A, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch III J T, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjodin A, Read J, DeGrace N, Uria-Nickelsen M, Illingworth R N, Eakin A E: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**; 21: 7416-7420.

- 18) Rivera Rentas A L, Rosa R, Rodríguez A D, Escalona De Motta G: Effect of alkaloid toxins from tropical marine sponges on membrane sodium currents. *Toxicon* **1995**; 33:4491-497.
- 19) Haefner B: Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today* **2003**, 8: 536-544.
- 20) Hodnik Ž, Tomašić T, Peterlin-Mašič L, Chan F, Kirby R W, Madge D J, Kikelj D: Novel state-dependent voltage-gated sodium channel modulators, based on marine alkaloids from *Agelas* sponges. *Eur J Med Chem* **2013**, 70: 154-164.
- 21) De Zoysa M: Medicinal benefits of marine invertebrates. Sources for Discovering Natural Drug Candidates, Marine Medicinal Foods, *Adv Food Nutr Res* **2012**; 65: 153-169.
- 22) Al-Sabi A, McArthur J, Ostroumov V, French R J: Marine Toxins That Target Voltage-gated Sodium Channels, *Mar Drugs* **2006**; 4: 157-192.
- 23) Ando N, Terashima S: A novel synthesis of the 2-amino-1H-imidazol-4-carbaldehyde derivatives and its application to the efficient synthesis of 2-aminoimidazole alkaloids, oroidin, hymenidin, dispacamide, monobromodispacamide, and ageladine A. *Tetrahedron* **2010**; 66: 6224-6237.
- 24) Marinko P, Obreza A, Peterlin-Mašič L, Krbavčič A, Kikelj D: Synthesis of 2-Amino-7,8-dihydro-6(5H)-quinazolinone, 2,4-Diamino-7,8-dihydro-6(5H)-quinazolinone-diamine and 5,6,7,8-Tetrahydro-2,4,6-quinazolinetriamine derivatives. *J Heterocyclic Chem* **2000**; 37: 405-409.
- 25) Balalaie S, Mahdidoust M, Eschaghi-Najafabadi R: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylurinium tetrafluoroborate as an efficient coupling reagent for the amidation and phenylhydrazination of carboxylic acids at room temperature. *J Iran Chem Soc*, **2007**; 4: 364-369.
- 26) Fisher J W, Trinkle K L: Iodide dealkylation of benzyl, PMB, PNB, and T-butyl N-acyl amino-acid esters via lithium ion coordination. *Tetrahedron* **1994**, 35: 2505-

2508.

27) Gilow H M, Burton D E, Bromination and chlorination of pyrrole and some reactive 1-substituted pyrroles. *J Org Chem* **1981**, 46: 2221-2225.

28) http://www.inspiralis.com/files/e_coli_gyrase_plate_kit.pdf, doston 21. 8. 2013.