

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA TRNOVEC

SINTEZA INDOLAMIDNIH IN DIKLOROPIROLAMIDNIH ZAVIRALCEV DNA
GIRAZE B

SYNTHESIS OF INDOLAMIDE- AND DICHLOROPYRROLAMIDE-BASED
INHIBITORS OF DNA GYRASE B

Ljubljana, 2014

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

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

Zahvala:

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

Velika zahvala gre tudi staršem in sestri, ki so mi tekom študija stali ob strani.

Izjava

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

Helena Trnovec

Ljubljana, 2014

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	PROTIBAKTERIJSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE	1
1.1.1	Razlika med bakterijsko celično steno po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij	1
1.1.2	Selektivna toksičnost protibakterijskih zdravilnih učinkovin	3
1.2	DNA MOLEKULA	4
1.3	Bakterijske topoizomeraze	4
1.4	DNA GIRAZA IN TOPOIZOMERAZA IV	5
1.4.1	Struktura DNA giraze in topoizomeraze IV	5
1.4.2	Mehanizem delovanja DNA giraze	6
1.4.3	Vezavno mesto za ATP	7
1.5	ODPORNOST BAKTERIJ NA KEMOTERAPEVTIKE - ISKANJE NOVIH TARČ IN NOVIH MEHANIZMOV DELOVANJA	9
1.5.1	DNA giraza in topoizomeraza IV kot tarči novih protibakterijskih učinkovin	11
1.5.2	Dualna aktivnost zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze IV	11
1.6	ZAVIRALCI DNA GIRAZE A / TOPOIZOMERAZE C	12
1.6.1	Fluorokinoloni	12
1.7	ZAVIRALCI DNA GIRAZE B / TOPOIZOMERAZE E	13
1.7.1	Aminokumarini	14
1.7.2	Pirolamidi	14
2	NAČRT DELA	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI:	18
3.1.1	REAGENTI IN TOPILA	18
3.2	KROMATOGRAFSKE METODE:	18
3.2.1	TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	18

3.2.2	»FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA.....	18
3.3	SPEKTROSKOPSKE METODE:.....	18
3.3.1	INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR).....	18
3.3.2	JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA (NMR)	18
3.3.3	MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)	19
3.4	NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN	19
3.5	DOLOČEVANJE TALIŠČA	19
3.6	POLARIMETRIJA.....	19
3.7	BIOKEMIJSKA TESTIRANJA	19
4	EKSPERIMENTALNI DEL	21
4.1	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-2-nitrobenzensulfonamida	21
4.2	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)- <i>N</i> -metil-2-nitrobenzensulfonamida	22
4.3	Poskus sinteze (<i>S</i>)- <i>N</i> -metil-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2,6-diamina.....	23
4.4	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -((1 <i>H</i> -pirol-2-il)metil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2,6-diamina	23
4.5	SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK A.....	24
4.6	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)furan-2-karboksamida....	25
4.7	SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK B.....	26
4.8	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-5-fluoro-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida	26
4.9	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-5-kloro-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida	27
4.10	Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida	28
4.11	SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK C	29
4.12	Sinteza (<i>S</i>)-metil-3-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo [<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanoata	29
4.13	Sinteza (<i>S</i>)-metil-4-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo [<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanoata.....	30

4.14 Sinteza (<i>S</i>)-etil-2-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetata	31
4.15 SINTEZNI POSTOPEK D.....	32
4.16 Sinteza (<i>S</i>)-3-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>] tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojske kisline	32
4.17 Sinteza (<i>S</i>)-4-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline.....	33
4.18 Sinteza (<i>S</i>)-2-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetne kisline	34
4.19 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona	35
4.20 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-6-il)-4,5dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	36
4.21 Sinteza (<i>S</i>)-metil- 3-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanoata	37
4.22 Sinteza (<i>S</i>)-metil- 4-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-4oksobutanoata.....	38
4.23 Sinteza (<i>S</i>)-etil- 2-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-2oksoacetata	39
4.24 Sinteza (<i>S</i>)-3-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojske kisline.....	40
4.25 Sinteza (<i>S</i>)-4-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline.....	41
4.26 Sinteza (<i>S</i>)-2-(6-(4,5-dikloro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetne kisline.....	42
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	43
5.1.1 Uvedba metilne skupine na amino skupino na mesto 6	43
5.1.2. Reduktivno aminiranje	45
5.1.3. Sinteza amidov s pomočjo sklopitevih reagentov.....	45
5.1.4. Kloriranje pirola	46
5.1.5. Sinteza spojine 29.....	47
5.1.6. Sinteza amidov na mestu 2 s kislinskimi kloridi	47

5.1.7. Alkalna hidroliza estrov	47
5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ.....	48
5.2.1 IC ₅₀ vrednosti določene na DNA girazi iz bakterije <i>Escherichia coli</i>	48
5.2.2 Rezidualne aktivnosti spojin, določene na DNA girazi iz <i>S. aureus</i> in topoizomerazi IV iz <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i>	51
5.2.3 Protibakterijska aktivnost.....	53
6 ZAKLJUČEK.....	54
7 LITERATURA.....	55

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivnih bakterij	2
Slika 2: Zgradba celične stene po Gramu negativnih bakterij	3
Slika 3: Prikaz dvovijačne molekule DNA v različnih topoloških stanjih	4
Slika 4: Struktura DNA giraze.....	6
Slika 5: Prikaz mehanizma delovanja DNA giraze	7
Slika 6: Shematski prikaz interakcij med ATP in 24 kDa velikim fragmentom DNA giraze B.....	8
Slika 7: 3D struktura ATP vezavnega mesta	8
Slika 8: Mehanizmi odpornosti bakterije na protibakterijske učinkovine	10
Slika 9: Struktura moksifloksacina.	12
Slika 10: Shematski prikaz interakcij med klorobiocinom in podenoto B DNA giraze iz <i>Escherichia coli</i>	14
Slika 11: Strukture pirolamidnih zaviralcev DNA giraze B, odkritih v AstraZeneca	15
Slika 12: Struktura oroidina in znanega zaviralca DNA giraze.....	16
Slika 13: Shema alkiliranja znanega zaviralca DNA giraze	16
Slika 14: Shema aciliranja (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2,6-diamina.....	17
Slika 15: Mehanizem tvorbe sulfonamidea.	43
Slika 16: Predlagani mehanizem alkiliranja spojine 3.	44
Slika 17: Odstanitev zaščitne sulfonamidne skupine s tiolatnim ionom	45
Slika 18: Mehanizem nastanka imina	45
Slika 19: Mehanizem reakcije med karboksilno kislino in aminom ob dodatku TBTU in baze N-metilmorfolina (NMM).	46
Slika 20: Osnovni mehanizem nukleofilne substitucije s tvorbo tetraedričnega intermediata, po katerem je potekala sinteza spojin 18, 20, 22, 30, 31 in 32	47
Slika 21: Mehanizem alkalne hidrolize estrov.....	48

Preglednica 1: IC ₅₀ vrednosti spojin substituiranih s furanom, 5-fluoroindolom in 5-kloroindolom določene na DNA girazi <i>E. coli</i> in MIK določene na ΔtolC in ΔimpA sevih <i>E. coli</i>	48
Preglednica 2: IC ₅₀ vrednosti spojin z indolamidnim fragmentom, določene na DNA girazi iz <i>E. coli</i> in MIK določene na ΔtolC in ΔimpA sevih <i>E. coli</i>	49
Preglednica 3: IC ₅₀ vrednosti spojin z dikloropirolnim fragmentom, določene na DNA girazi iz <i>E. coli</i> in MIK določene na ΔtolC in ΔimpA sevih <i>E. coli</i>	50
Preglednica 4: Rezidualna aktivnost spojin določene na DNA girazi iz <i>S. aureus</i> in topoizomerazi IV iz <i>E.coli</i> in <i>S. aureus</i>	51

POVZETEK

V današnjem času razvoj odpornosti mikroorganizmov na številne protibakterijske učinkovine predstavlja vedno večji problem. Razvoj gre v smer iskanja protibakterijskih učinkovin, ki bi delovale na potencialno nove tarče v mikroorganizmih, ali pa na že znane tarče, vendar z drugačnim mehanizmom delovanja.

Bakterijska DNA giraza je esencialni encim, ki uvaja negativne zavoje v molekulo DNA pred replikacijskimi vilicami in s tem zmanjša torzijsko napetost med podvajanjem molekule DNA. Sestavljena je iz dveh podenot A in dveh podenot B, ki skupaj tvorijo heterotetramerno strukturo A₂B₂. Podenoti A sodelujeta pri uvajanju negativnih zavojev v verigo molekule DNA, medtem ko sta podenoti B odgovorni za hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotovita zadostno količino energije za delovanje podenot A.

V magistrski nalogi bomo podrobnejše predstavili sintezo indolamidnih in dikloropirolamidnih zaviralcev encimov DNA giraze in topoizomeraze IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Indolamidni in pirolamidni fragment sta bila načrtovana tako, da se vežeta v hidrofobni žep ATP vezavnega mesta DNA giraze in topoizomeraze IV in s tem oponašata vezavo adeninskega obroča molekule ATP. Spojine z indolamidnim in dikloropirolamidnim fragmentom smo na amino skupini na mestu 2 tiazolnega obroča dodatno acilirali z metil malonil kloridom, metil sukcinil kloridom in etil oksalil kloridom, s čimer smo želeli doseči dodatne interakcije s proteinom. Z alkalno hidrolizo smo nato pripravili njihove kislinske derivate. Ugotavliali smo, kako dolžina stranske verige sintetiziranih spojin vpliva na jakost vezave, hkrati pa smo primerjali kislinske in esterske derivate sintetiziranih spojin med seboj.

Vse končne spojine z indolnim obročem, so imele zaviralne aktivnosti v mikromolarnem območju ($IC_{50} = 7,63 \mu M - 34,9 \mu M$), medtem ko smo z zamenjavo indolnega obroča z dikloropirolnim obročem dobili zaviralce (razen spojine **31**), ki so imeli zaviralne aktivnosti v nanomolarnem območju ($IC_{50} = 178 nM - 960 nM$). Kislinski in esterski derivati spojin z različnimi dolžinami verig so imeli primerljive zaviralne aktivnosti. Končne spojine niso imele protibakterijske aktivnosti, z izjemo spojine **30**, ki je izkazovala šibko protibakterijsko aktivnost (52,3 % zaviranje rasti po 24 h) na *S. aureus* pri 50 μM . Razlog za slabo protibakterijsko aktivnost na po Gramu pozitivne bakterije je najverjetneje slaba zaviralna aktivnost spojin na encimih, na po Gramu negativne bakterije

pa slabo prehajanje celične stene. Kljub temu spojine, sintetizirane v okviru magistrske naloge, predstavljajo pomemben doprinos k študiju povezave med strukturo in delovanjem in s tem k načrtovanju in optimizaciji novih generacij zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze IV.

ABSTRACT

Nowadays, the resistance of microorganisms to various antibacterial drugs represents a major health problem. The development of novel antibacterial drugs is needed to discover new agents that would inhibit new bacterial targets or known drug targets through binding to unexploited binding sites.

DNA gyrase is an enzyme that introduces negative supercoils in double stranded DNA in front of the replication fork and thereby relieves torsional strain during replication. The enzyme is heterotetramer composed of two GyrA subunits and two GyrB subunits. The GyrA is responsible for DNA breakage and reunion. The energy for GyrA activity is provided with hydrolysis of ATP by the GyrB.

In our thesis we will synthesise a series of indolamide- and dichloropyrrolamide-based ATP-competitive inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV. All synthesised compounds with indolamide and dichloropyrrolamide moieties were acylated at position 2 of the thiazole ring with methyl malonyl chloride, ethyl succinyl chloride and ethyl oxaryl chloride to explore additional interactions with the protein. Their carboxylic acid derivatives were prepared with alkaline hydrolysis. One of the aims of the thesis was to explore the difference in binding of indolamide and dichloropyrrolamide fragments into the hydrophobic pocket of the ATP-binding site of DNA gyrase B from *E. coli*. We also investigated, how the length of the side chain at position 2 of the thiazole ring affects the binding. The activity of acid derivatives was also compared to that of the ester derivatives.

We discovered that the compounds with indole ring show inhibitory activity in the micromolar range ($IC_{50} = 7.63 \mu M - 34.9 \mu M$), whereas the compounds with dichloropyrrole moiety, except compound **30**, show inhibitory activity in nanomolar range ($IC_{50} = 178 nM - 960 nM$). Acid and ester derivatives of compounds, with different length of side chains showed similar potency. Unfortunately, final compounds showed no antibacterial activity against two Gram positive (*S. aureus*, *E. faecium*) and two Gram negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bacterial strains, except compound **30**, which showed weak antibacterial activity (52.3% growth inhibition) against *S. aureus* at $50 \mu M$. Compound **30**, with dichloropyrrole moiety, represents a good basis for further optimisation and design of inhibitors with improved physico-chemical properties and binding affinity and consequently improved antibacterial activity.

SEZNAM OKRAJŠAV

CDCl₃	devterirani kloroform
DCC	dicikloheksil karbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GHKL	nadružina proteinov: DNA giraza B- Hsp90-histidin/serin protein kinaze-
MutL	
IC₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri pade aktivnost encima na polovico
IR	infrardeča spektroskopija
MF	mobilna faza
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
NMR	nuclear magnetic resonance = jedrska magnetna resonanca
QRDR	regija, ki določa odpornost na kinolone
RA	rezidualna aktivnost
R_f	retencijski faktor
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija

1 UVOD

1.1 PROTIBAKTERIJSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Antibiotiki so snovi, ki preprečijo rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Lahko so naravni produkti mikroorganizmov ali pa polsintezno pridobljeni iz naravnih produktov. Sintezno pridobljene učinkovine, katerih struktura temelji na strukturi naravnih produktov, imenujemo kemoterapevtiki. Izraz kemoterapevtik širše vključuje oba omenjena izraza in se enači z izrazom protibakterijska zdravilna učinkovina (1, 2, 3).

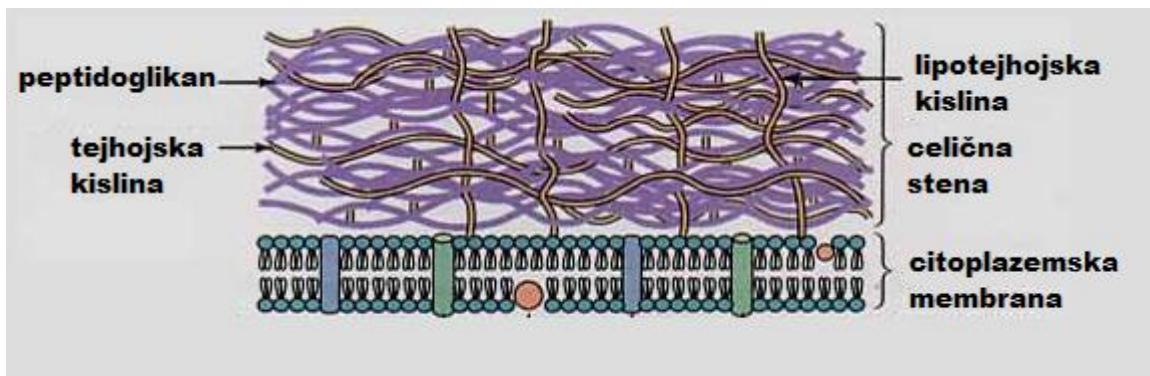
Protibakterijske zdravilne učinkovine lahko delimo glede na kemijsko strukturo učinkovin, učinkovitost proti različnim vrstam organizmov ali glede na mehanizem delovanja na različne tarče v bakterijskih celicah.

Glede na spekter delovanja protibakterijske učinkovine delimo na tiste z ozkim spektrom delovanja, ki učinkujejo na ozko skupino mikroorganizmov, zmernim spektrom delovanja, ki so učinkoviti poti po Gramu pozitivnim in nekaterim po Gramu negativnim mikroorganizmom in širokim spektrom delovanja. Slabost protibakterijskih učinkovin s širokim spektrom delovanja je, da lahko drastično spremenijo normalno mikrobno floro in s tem povzročijo okužbo z mikroorganizmi, ki so prisotni kot del normalne mikrobne flore (4).

1.1.1 Razlika med bakterijsko celično steno po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij

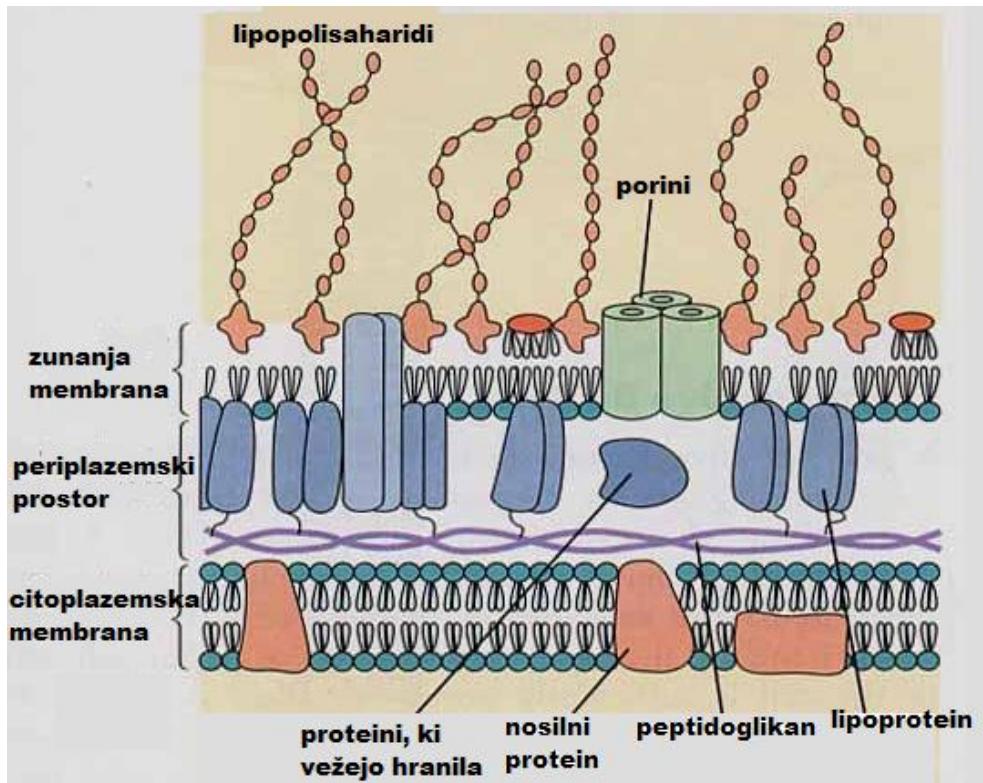
Po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije se med seboj ločijo po strukturi, sestavi in funkciji bakterijske celične stene, ki obdaja citoplazemske membrane bakterijskih celic. Po Gramu pozitivne bakterije (slika 1) imajo celično steno sestavljeno iz debelega, večplastnega, rigidnega polimera, imenovanega peptidoglikan (murein). Peptidoglikan je sestavljen iz glikanov, ki so prečno premreženi s peptidnimi vezmi. Bakterijam daje obliko, rigidnost, omogoča preživetje in razmoževanje v gostiteljih, hkrati pa je dovolj prepusten, da omogoča prehod snovi skozi bakterijsko celično steno. Poleg peptidoglikana lahko celična stena po Gramu pozitivnih bakterij vsebuje še druge komponente, kot so tejhojska kislina in lipotejhojska kislina, kompleksne polisaharide (C polisaharide), M in R proteine. Tejhojske kisline so vodotopni polimeri poliol fosfata, ki so

kovalentno povezane s peptidoglikanom, lipotejhojske kisline pa vsebujejo maščobne kisline in so zasidrane v citoplazemska membrano (4, 5, 6).



Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivnih bakterij (prirejeno po 6).

Celična stena po Gramu negativnih bakterij (slika 2) je strukturno in kemijsko bolj kompleksna od celične stene po Gramu pozitivnih bakterij. Sestavljena je iz tanke plasti peptidoglikana, ki predstavlja le 5-10 % teže bakterijske celične stene in ne vsebuje tejhojske in lipotjehojske kisline. Po Gramu negativne bakterije imajo prisotno še zunanjou membrano, ki se razlikuje od notranje citoplazemske membrane. Zunanja membrana ohranja obliko bakterij, hkrati pa predstavlja bariero večjim in hidrofobnim molekulam. Notranji del zunanje membrane je sestavljen iz fosfolipidov, zunani del pa je sestavljen iz amfifilnih molekul imenovanih lipopolisaharidi. Območje med zunanjim delom citoplazemske membrane in zunajo membrano se imenuje periplazemski prostor. Periplazemski prostor vsebuje veliko hidrolitičnih encimov (proteaze, fosfataze, lipaze, nukleaze), ki razgrajujejo velike makromolekule. V periplazemskem prostoru se nahajajo tudi komponente za transport sladkorja in ostali proteini, ki prenašajo metabolite in ostale komponente. Številni proteinski transporterji segajo preko celotne lipidne bariere in se imenujejo transmembranski proteini. Eni izmed njih so porini, ki tvorijo pore in omogočajo difuzijo manjših hidrofilnih molekul. Zunanja membrana in porini omogočajo prehod metabolitom in manjšim hidrofilnim protibakterijskim učinkovinam, hkrati pa predstavljajo bariero za prehod večjih hidrofilnih učinkovin proteinov (4, 5, 6).



Slika 2: Zgradba celične stene po Gramu negativnih bakterij (prirejeno po 6).

1.1.2 Selektivna toksičnost protibakterijskih zdravilnih učinkovin

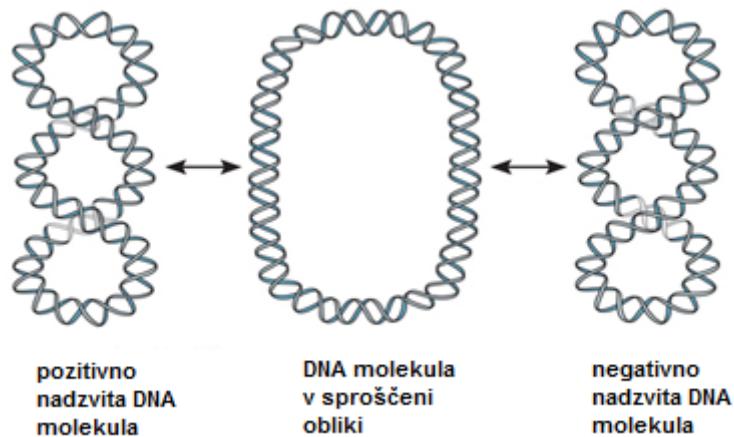
Protibakterijske zdravilne učinkovine so sposobne uničiti patogene mikroorganizme, brez da bi pri tem poškodovale človeške celice. V večini primerov je selektivna toksičnost relativna, zato je potrebno določiti ustrezno koncentracijo učinkovine z minimalnim toksičnim učinkom na človeške celice, ki še uniči ali prepreči rast mikroorganizmov (4).

Selektivna toksičnost učinkovin temelji na strukturnih in funkcionalnih razlikah med človeškimi celicami in celicami patogenih mikroorganizmov. Bakterijske celice so obdane z bakterijsko celično steno, medtem ko je človeške celice nimajo. To izkoriščajo β -laktamski antibiotiki in vankomicin, ki zavirajo sintezo bakterijske celične stene. Nekatere protibakterijske učinkovine izkoriščajo razlike v zgradbi bakterijskih ribosomov napram človeškim ribosomom (tetraciklini, makrolidi, klindamicin, kloramfenikol in aminoglikozidi) in zavirajo sintezo bakterijskih proteinov. Razlike so še v metabolizemu *p*-aminobenzojske kisline do tetrahidrofolne kisline (sulfonamidi, trimetoprim), funkciji

bakterijske celične membrane (izoniazid, amfotericin B) in funkciji ter sintezi bakterijske deoksiribonukleinske kislina (DNA) (fluorokinolini, rifampicin) (3,4).

1.2 DNA MOLEKULA

DNA je nukleinska kislina, ki je nosilka genetske informacije o razvoju in delovanju organizmov. Njena glavna vloga je shranjevanje genov in njihovo prenašanje na naslednje generacije. Pri evkariontih je DNA shranjena v celičnem jedru, pri prokariontih pa krožna dvovijačna DNA prosto plava v citoplazemskem prostoru. Krožna dvojnovijačna molekula DNA se lahko nahaja v sproščeni obliki, ali pa v nadzviti obliki, ko se poveča število zavojev, s tem, ko se zavije okoli svoje osi. Pri procesih podvajanja, prevajanja, prepisovanja in popravljanja molekule DNA mora priti do ločitve verig dvostranske molekule DNA. Enostavnost ločitve je odvisna od topološkega stanja molekule DNA (slika 3). Ko je molekula DNA zavita v smeri dvojne vijačnice, govorimo o pozitivni nadzvitosti, ko pa je zavita v obratni smeri in se bazni pari lažje razklenejo, govorimo o negativni nadzvitosti. DNA se zaradi prisotnosti topoizomeraz običajno nahaja v negativni nadzvitosti (7, 8).



Slika 3: Prikaz dvovijačne molekule DNA v različnih topoloških stanjih (prirejeno po 9).

1.3 Bakterijske topoizomeraze

Bakterijske topoizomeraze so esencialni encimi, ki spremenijo topološko stanje DNA molekule. Delimo jih v dve skupini, topoizomeraze I in topoizomeraze II. Topoizomeraze I odvijajo supernavito DNA molekulo in tvorijo energetsko ugodnejšo, relaksirano DNA obliko, tako da cepijo le eno verigo dvovijačne DNA molekule.

Topoizomeraze II pa DNA molekulo zavijajo, pri čemer tvorijo negativni supernavojo in pri tem cepijo obe verigi dvojne vijačnice hkrati. Za delovanje topoizomeraz II je potrebna energija, ki jo encim pridobi s hidrolizo adenozin-5'-trifosfata (ATP) (10).

1.4 DNA GIRAZA IN TOPOIZOMERAZA IV

Bakterije vsebujejo dva različna tipa IIa topoizomeraz: DNA girazo in topoizomerazo IV. DNA giraza je esencialni encim, ki uvaja negativne zavoje v molekulo DNA pred replikacijskimi vilicami in s tem zmanjša torzijsko napetost med podvajanjem molekule DNA. Encim topoizomeraza IV pa nadzira superzvijanje DNA molekule, hkrati pa je odgovorna za razpletanje hčerinskih DNA verig na koncu podvojitve kromosoma.

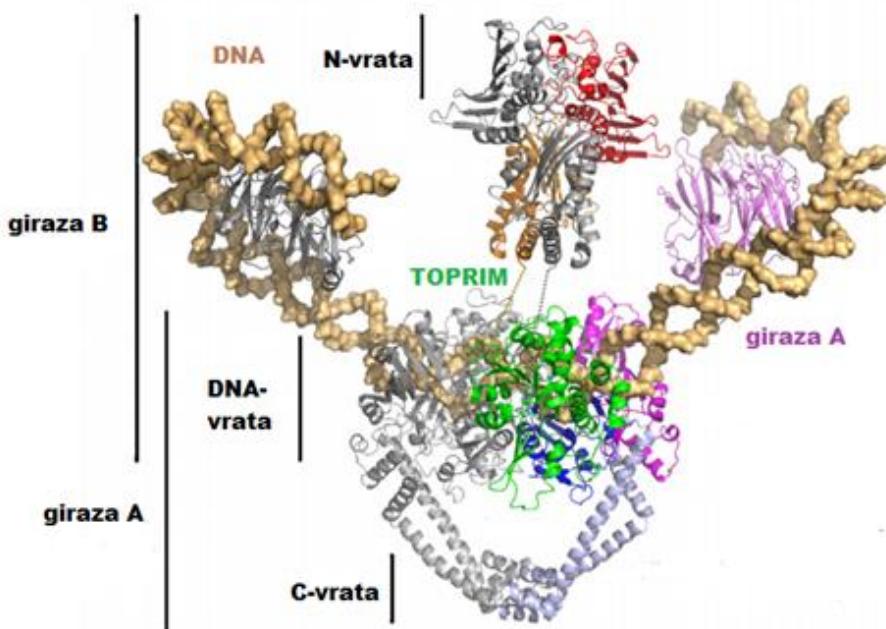
DNA giraza je sestavljena iz dveh podenot A in dveh podenot B, ki skupaj tvorijo heterotetramerno strukturo A_2B_2 . Homologna je struktura topoizomeraze IV, kjer dve podenoti C in dve podenoti E tvorita heterotetramerno strukturo C_2E_2 . Podenota C topoizomeraze IV je strukturno in funkcionalno homologna DNA girazi A, podenota E topoizomeraze IV pa je homologna DNA girazi B. DNA giraza A sodeluje pri uvajanju negativnih zavojev v verigo molekule DNA, DNA giraza B in podenota E topoizomeraze IV pa sta odgovorni za hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotovita zadostno količino energije za delovanje DNA giraze A in podenot C topoizomeraze IV. Pri obeh encimih se vezavno mesto za molekulo ATP nahaja na N-končnem delu (11).

1.4.1 Struktura DNA giraze in topoizomeraze IV

Podenoti A sta sestavljeni iz N- in C- končne domene. N-končna domena je sestavljena iz dveh heliks domen (ang. winged helix domain, tower domain) in obvite vijačnice (ang. coiled coil). Podenoti B sta sestavljeni iz N-končne ATP-azne domene iz družine GHKL (DNA giraza B-Hsp90-histidin/serin protein kinaze-MutL), domene za prenos signala (ang. transducer domain) in TOPRIM domene (slika 4) (8).

N-končna domena giraze A tvori dimer v obliki srca, ki je stabiliziran z C- in DNA- vrati, ki razdelita osrednjo votlino. Zgornji del tvorita dve heliks domeni (ang. winged helix domain, tower domain), ki zaščitita katalitične tirozine. Majhne kroglaste domene, ki se nahajajo na konici obvite vijačnice, tvorijo C-vrata. TOPRIM domene podenote B se stika s »tower« domeno in obvito vijačnico in skupaj tvorijo DNA-vrata. Nosilec komunikacije med DNA-vrati in N-vrati je najverjetnejše domena za prenos

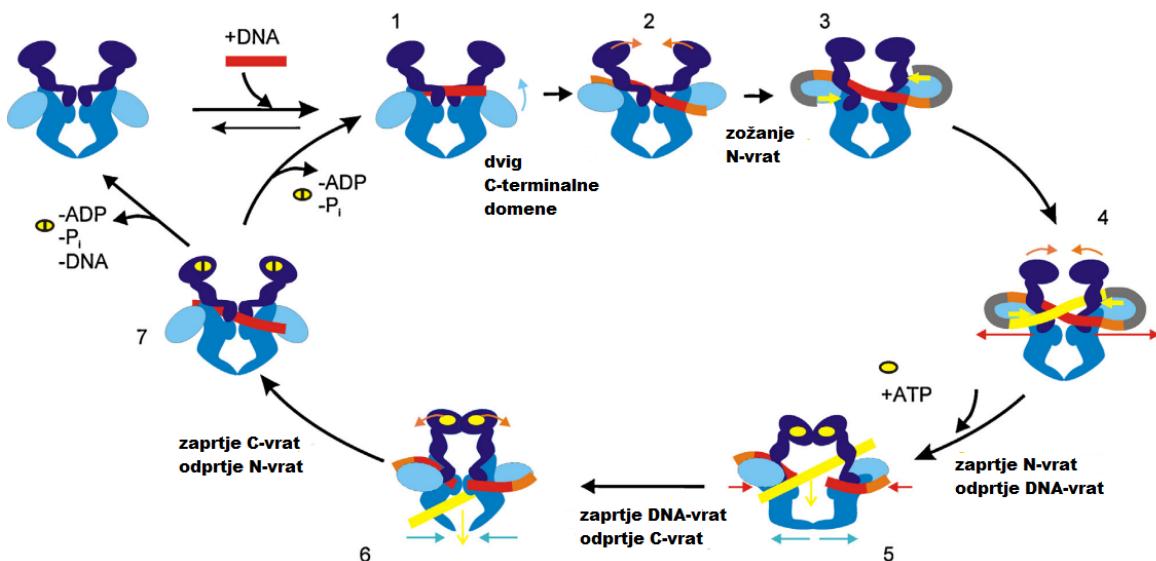
signala. N-vrata, DNA vrata in C-vrata se odpirajo in zapirajo skladno s tem, da omogočijo prehod dvojno vijačne DNA molekule v določenem katalitičnem ciklu. Pravilo »dvojnega zaklepanja« predpostavlja, da se ena vrata lahko odprejo šele, ko so ostala vrata zaprta (8,11).



Slika 4: Struktura DNA giraze (prirejeno po 8).

1.4.2 Mehanizem delovanja DNA giraze

Konec DNA molekule, imenovan G segment, se veže na DNA-vrata, preostala DNA molekula pa se ovije okoli C-končne domene encima z desnim zavojem. Vezava ATP-ja na ATP-azno domeno DNA giraze B povzroči dimerizacijo in zaprtje N-vrat. S tem pride do ujetja T segmenta v zgornjo votlino DNA giraze. Hidroliza ATP-ja in odcepitev anorganskega fosfata vodita v cepitev G segmenta in nastanek štirih koncov DNA molekule. Pri tem katalitični ostanki tirozina tvorijo začasne kovalente razcepe na 5' koncih DNA vijačnice. Ob zaprtju N-vrat se odprejo DNA-vrata in T segment se premakne iz zgornje votline v spodnjo votlino preko razcepljenega G segmenta. DNA-vrata se nato zaprejo in konca G segmenta se ponovno združita. T segment zapusti spodnjo votlino ob hidrolizi ATP-ja in odprtju C-vrat. Sprostitev nastalega adenozin-5'-difosfata (ADP) vodi v ponovno odprtje N-vrat in s tem pripravi encim za nov katalitični cikel. V enem ciklu nastaneta dva negativna zavoja, pri čemer je potrebna hidroliza dveh molekul ATP (slika 5) (8, 12).



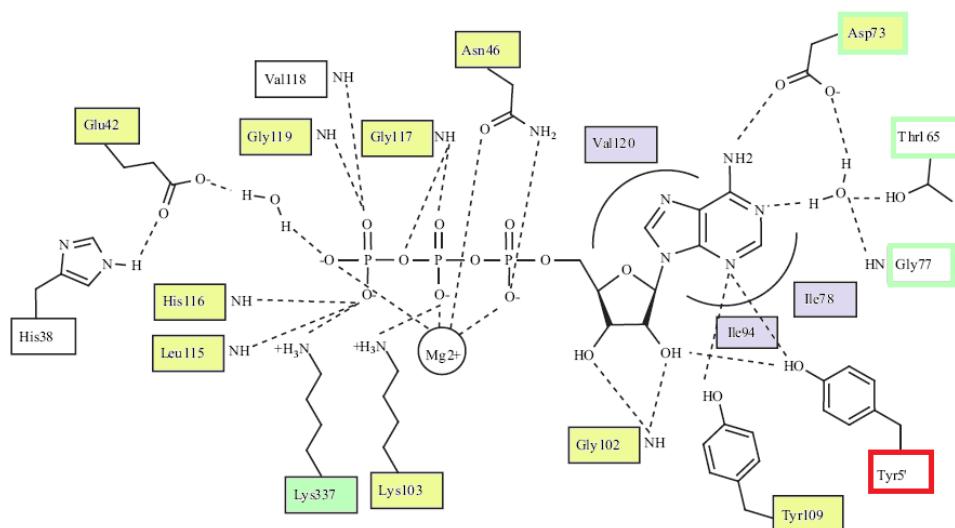
Slika 5: Prikaz mehanizma delovanja DNA giraze (prirejeno po 8).

1.4.3 Vezavno mesto za ATP

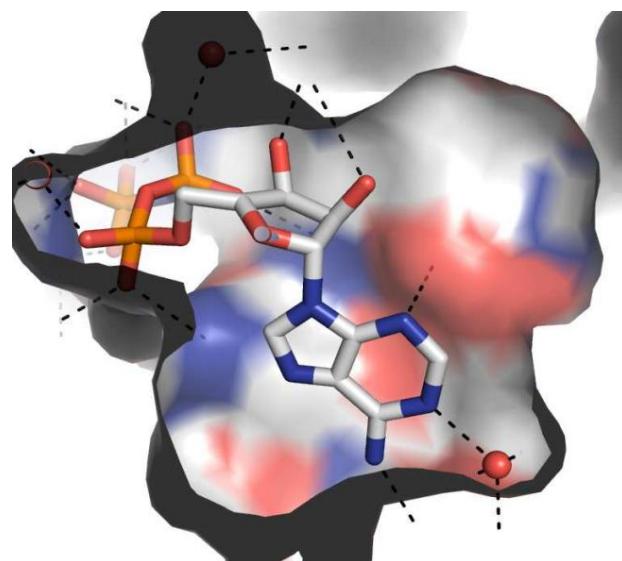
DNA giraza B v prisotnosti ATP tvori dimer, kar potrjujejo kristalne strukture encima (13). Dimer je sestavljen iz dveh domen, domene I in domene II, med njima pa se nahaja prazni prostor velikosti 20 Å, ki je obdan s pozitivno nabitimi argininskimi ostanki. Vezavno mesto za ATP se nahaja na domeni I, ki je sestavljena iz petih beta in štirih alfa zavojev. Domena II sestoji iz štirih beta in štirih alfa zavojev.

Slika 6 prikazuje interakcije med 24 kDa velikim fragmentom DNA giraze B in molekulo ATP. Konformacija molekule ATP-ja je v vezavnem mestu stabilizirana s številnimi vodikovimi vezmi z aminokislinskimi ostanki proteina. Nekatere vodikove vezi med molekulami ATP in aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta se tvorijo posredno preko molekule vode, fosfatne skupine ATP pa so v kontaktu z Mg²⁺. Aminokislinski ostanki, ki tvorijo domeno I so Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 (osenčeni rumeno). Aminokislinski ostanki Ile78, Ile94 in Val120 tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo. Aminokislinski ostanek Lys337 (osenčen zeleno) iz domene II tvori vodikovo vez z γ-fosfatno skupino molekule ATP. Aminokislinski ostanki Asp73, Gly77 in Thr65 (zelen pravokotnik) tvorijo vodikove vezi z adeninskim obročem molekule ATP bodisi neposredno bodisi posredno preko strukturno ohranjene molekule vode. Stranska veriga Tyr5', ki pripada aminokislinskemu ostanku drugega monomera (rdeč pravokotnik), se nahaja v vseh bakterijskih girazah, ne pa v evkariontskih in virusnih topoizomerazah IIa in tvori eno vodikovo vez z 2'-

hidroksilno skupino riboze in drugo z dušikovim atomom adeninskega obroča na mestu 3. Stranska veriga Ile10' stabilizira dimer preko hidrofobnih interakcij. N-terminalni rep domene I stabilizira fleksibilno zanko drugega monomera in prekrije ATP vezavno mesto. Slika 7 prikazuje 3D strukturo vezavnega mesta za ATP, na kateri vidimo prikazane interakcije med 5'-adenilimodifosfatom (AMPPNP, nehidrolizirajoči analog ATP) in aminokislinskimi ostanki ATP vezavnega mesta DNA giraze B (13).



Slika 6: Shematski prikaz interakcij med ATP in 24 kDa velikim fragmentom DNA giraze B. 'pri Tyr5' in Ile10' pomeni, da ti dve stranski verigi pripadata aminokislinskemu ostanku drugega monomera (prirejeno po 13).



Slika 7: 3D struktura ATP vezavnega mesta (prirejeno po 14).

Bakterijski genomi kodirajo več sto proteinov, ki vežejo molekulo ATP. ATP kompetitivni zaviralci tekmujejo z molekulo ATP-ja za vezavo v ATP vezavno mesto različnih encimov v bakterijski celici. Količina ATP-ja v bakterijskih celicah znaša med 0,3 in 9 fg na celico in se razlikuje med posameznimi bakterijskimi sevi. Pri vseh bakterijskih sevih pa je njihova količina v istem območju kot pri evkariontskih celicah, kjer je koncentracija ATP-ja med 1 nM in 10 mM. Največji problem pri razvoju ATP kompetitivnih zaviralcev predstavlja njihova neselektivna vezava v vezavno mesto za ATP evkariontskih encimov, npr. proteinskih kinaz, kar ima lahko za posledico neželene stranske učinke. Da se temu izognemo, poskušamo izboljšati selektivnost ATP kompetitivnih zaviralcev bakterijskih encimov, tako da vezavo molekule ATP oponašamo le delno in hkrati izkoriščamo sekundarna vezavna mesta, ki so značilna za tarčni bakterijski protein in jih ni pri sorodnih človeških proteinih. Pri tem so nam v veliko pomoč kristalne strukture encimov, ki nam omogočajo poznavanje strukture ATP vezavnega mesta bakterijskega tarčnega encima in iskanje razlik s človeškimi encimi, kar izkoriščamo pri načrtovanju novih zaviralcev (14).

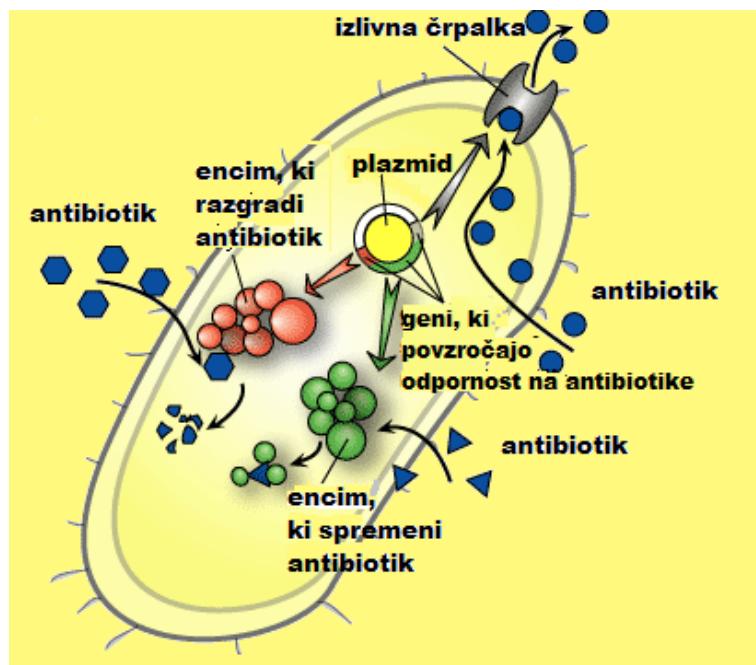
1.5 ODPORNOST BAKTERIJ NA KEMOTERAPEVTIKE - ISKANJE NOVIH TARČ IN NOVIH MEHANIZMOV DELOVANJA

Pretirana uporaba kemoterapeutikov je privedla do odpornosti mikroorganizmov na zdravilne učinkovine, kar predstavlja resno grožnjo za javno zdravje, saj v prihodnosti učinkovine, ki se uporabljajo danes, ne bodo več učinkovite pri zdravljenju okužb (15, 16).

O odpornosti mikroorganizmov na kemoterapeutike govorimo takrat, ko maksimalna koncentracija kemoterapeutika, ki jo človeški organizem še tolerira, ne prepreči nadaljnega razmoževanja mikroorganizmov. Nekateri mikroorganizmi imajo naravno pridobljeno odpornost, npr. po Gramu negativne bakterije imajo prirojeno odpornost na vankomicin (4).

Do odpornosti bakterij proti kemoterapeutikom lahko pride zaradi večih razlogov. Odpornost lahko razvijejo bakterije zaradi spontanih mutacij DNA molekule ali prevzema plazmidov, ki so nosilci genov za odpornost, pri čemer pride do spremembe izražanja proteinov. Zaradi mutacij lahko pride do spremembe vezavnega mesta za učinkovine in posledično se učinkovina zaradi spremenjenih interakcij ne veže več v vezavno mesto oziroma se veže z nizko afiniteto. Pri nekaterih bakterijah lahko zaradi zmanjšanega

privzema ali povečanega črpanja učinkovine iz celic pride do zmanjšane koncentracije učinkovine v celici in posledično le-ta nima zadostnega učinka na bakterijah. Pri po Gramu negativnih bakterijah se lahko v zunanjem membrani poveča število selektivno prepustnih proteinov, imenovanih porini. Prav tako lahko po Gramu negativne bakterije črpajo učinkovine iz celice zaradi membranskih izlivnih črpalk. Nekateri bakterijski sevi lahko postanejo odporni na več kemoterapevtikov hkrati. Mehanizmi odpornosti so prikazani na sliki 8 (4, 17).



Slika 8: Mehanizmi odpornosti bakterije na protibakterijske učinkovine (prirejeno po 18).

Zaradi povečane pojavnosti odpornosti se razvoj učinkovin, s katerim bi rešili problem odpornosti mikroorganizmov na kemoterapevtike, usmerja v iskanje takšnih učinkovin, ki bi delovali na potencialno nove tarče v celicah patogenih mikroorganizmov ali pa z novim mehanizmom delovanja na obstoječe tarče. Pri tem moramo upoštevati njihove ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem, sekrecija) lastnosti in njihovo toksičnost (15, 19).

1.5.1 DNA giraza in topoizomeraza IV kot tarči novih protibakterijskih učinkovin

DNA giraza je encim, ki se nahaja v prokariotskih in nekaterih evkariotskih celicah, npr. *Plasmodium falciparum*, ne pa v človeških, zato predstavlja idealno tarčo za odkrivanje novih učinkovin (20). Tudi topoizomerazo IV najdemo samo v prokariotskih celicah. Selektivna toksičnost zaviralcev teh dveh encimov temelji na tem, da zaustavijo sintezo izključno bakterijske DNA, kar vodi v smrt bakterijske celice (21). Podenoti A in B DNA giraze ter podenoti C in E topoizomeraze IV so tarče številnih zaviralcev, ki delujejo na ključne korake v delovanju encima, vendar so fluorokinoloni, ki delujejo kot zaviralci DNA giraze A in podenote C topoizomeraze IV, edine učinkovine, ki so danes v klinični uporabi. V preteklosti se je aminokumarinski antibiotik novobiocin uporabljal za zdravljenje okužbe s proti meticilinu rezistentnim *Staphylococcus aureus* (MRSA). Kasneje so ga kljub dobri protibakterijski aktivnosti proti po Gramu pozitivnim bakterijam ukinili iz klinične uporabe zaradi toksičnosti in pojava odpornosti (11, 13, 16).

Problem fluorokinolonov predstavljajo njihovi neželeni in toksični učinki, prav tako pa se povečuje število bakterijskih sevov odpornih proti fluorokinolonom. Razvoj zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze IV se usmerja predvsem v nove strukturne tipe zaviralcev DNA giraze A in podenote C topoizomeraze IV in na spojine, ki se vežejo v vezavno mesto za ATP, kar predstavlja nov mehanizem delovanja (13).

1.5.2 Dualna aktivnost zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze IV

Strukturna podobnost katalitičnega mesta ATP-azne domene DNA giraze in topoizomeraze IV omogoča istočasno zaviranje obetih encimov. Takšne zaviralce, ki hkrati zavirajo dva encima, imenujemo dualni zaviralci. Njihova jakost zaviranja je odvisna od vrste bakterijskega seva in kemijskega razreda spojine, saj se kljub visoki stopnji homologije aminokislinskih zaporedij vezavna mesta DNA giraze in topoizomeraze IV pri različnih bakterijskih sevih razlikujejo. Dvojna aktivnost omogoča počasnejši razvoj odpornosti bakterij na dualne zaviralce, saj je za razvoj odpornosti bakterij potrebna mutacija dveh genov znotraj iste generacije.

Največji problem dualnih zaviralcev predstavlja njihova potencialna neselektivnost, saj poleg DNA giraze in topoizomeraze IV lahko interagirajo tudi s homolognimi človeškimi encimi, predvsem človeško topoizomerazo II in piruvat dehidrogenazno kinazo

zaradi velike 3D podobnosti vezavnih mest. Kljub temu dejству, pa so se fluorokinoloni in aminokumarini izkazali za dovolj selektivne v terapevtskih odmerkih (14).

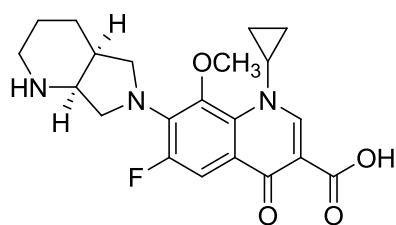
1.6 ZAVIRALCI DNA GIRAZE A / TOPOIZOMERAZE C

Zaviralci DNA giraze A in topoizomeraze IV stabilizirajo nastali kompleks med molekulo DNA, podenoto A/C in C-terminalno domeno podenote B/E in s tem preprečijo podvajanje molekule DNA (13).

1.6.1 Fluorokinoloni

Spojine so odkrili v 60. letih prejšnjega stoletja in jih od takrat uspeli uspešno optimizirati. Izboljšali so spekter delovanja proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijskim sevom in proti atipičnim bakterijam. Hkrati so uspeli izboljšati farmakokinetske in farmakodinamske lastnosti spojin, kar je privedlo do množične klinične uporabe fluorokinolonov. Fluorokinoloni se danes uporabljajo za zdravljenje urinarnih, sistemskih in respiratornih okužb. Njihova baktericidna aktivnost temelji na zaviranju podvajanja DNA molekule, hkrati pa naj bi povzročala tudi njen poškodbo, sintezo nepopolnih proteinov, oksidativne poškodbe in sprožanje mehanizmov celične smrti.

Vsem fluorokinolonom je skupni 6-fluorokinolin-4-onski del s karboksilno skupino na mestu 3 na fluorokinolonskem obroču. Na obročnem dušikovem in C7 atomu imajo pripete različne skupine (11).



Slika 9: Struktura moksifloksacina.

Kristalna struktura moksifloksacina (slika 9), predstavnika novejše generacije fluorokinolonov, v kompleksu z molekulo DNA in topoizomerazo IV, izolirano iz *Acinetobacter baumannii*, je pokazala, da kinolonski aromatski obroč tvori van der Waalsove in π - π interakcije z baznimi pari DNA molekule – interkalacija med bazne pare.

Magnezijev ion tvori interakcije s karboksilno skupino moksifloksacina in podenoto C topoizomeraze IV, ki je homologna podenoti A DNA giraze. Magnezijev ion tvori posredno preko dveh molekul vode vodikove vezi s Ser84 in Glu88, aminokislinskima ostankoma podenote C, ki pogosto mutirata pri bakterijah odpornih proti fluorokinolonom. Do mutacij pride v regiji kinolonskih odpornostnih determinant (QRDR), genu, ki kodira podenoto A DNA giraze in podenoto C topoizomeraze IV. Odkrili so tudi gen, ki kodira izlivno črpalko, ki črpa učinkovino iz celice ter encime, ki modificirajo strukturo kinolonov (11, 22).

Zaradi neželenih učinkov in povečane odpornosti proti fluorokinolonom se je povečal interes za odkrivanje novih učinkovin, ki bi delovale na podenoto B DNA giraze in podenoto E topoizomeraze IV. V preteklosti je bilo največ študij narejenih na kumarinih in ciklotrialidinih, naravnih antibiotikih, izoliranih iz rodu *Streptomyces* (11).

1.7 ZAVIRALCI DNA GIRAZE B / TOPOIZOMERAZE E

Zaviralci DNA giraze B in podenote E topoizomeraze IV delujejo tako, da se vežejo v žepek na N-končni domeni DNA giraze B in podenote E topoizomeraze IV in s tem preprečijo vezavo molekule ATP. Zaradi pomanjkanja energije, ki jo encim dobi s hidrolizo ATP, le-ta izgubi svojo aktivnost (13).

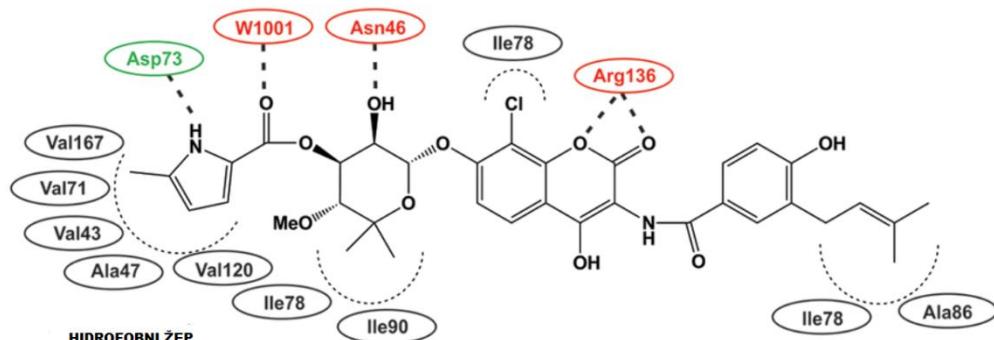
Aminokumarina novobiocin in klorobiocin sta bila prva odkrita naravna zaviralca DNA giraze B in podenote E topoizomeraze IV, izolirana iz *Streptomyces fungi* v 50. letih prejšnjega stoletja. Ti dve spojini delno zasedeta vezavno mesto za ATP in s tem preprečita njegovo vezavo (23, 24).

Iz *Streptomyces fungi* so bili izolirani tudi ciklotrialidini, naravni zaviralci DNA giraze B in podenote E topoizomeraze IV. Vsi ciklotrialidini vsebujejo resorcinolni obroč s pripeto pentapeptidno verigo (Cys, Ala, Ser, Pro in Ala). Kljub boljši jakosti vezave in boljši selektivnosti v primerjavi z aminokumarini, imajo zaradi svoje lipofilnosti slabo *in vivo* protibakterijsko aktivnost.

S pomočjo strukturno podprtga načrtovanja so bili načrtovani in sintetizirani številni novi strukturni tipi zaviralcev DNA giraze B. Te spojine sodijo v različne kemijske razrede, kot so pirazoli, triazini, indolinoni, indazoli, pirimidini, benzimidazolsečnine in Shiffove baze indolinon-2,3-dionov (24).

1.7.1 Aminokumarini

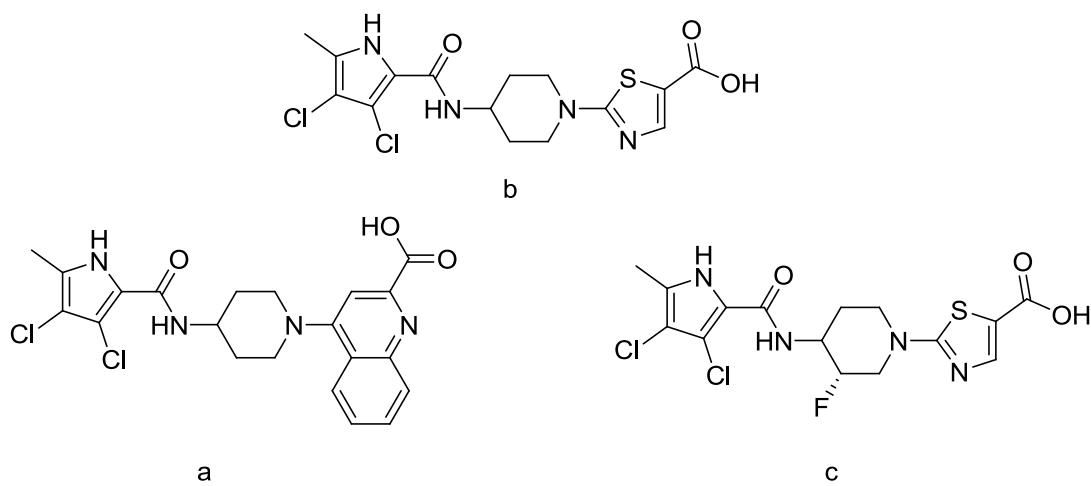
Aminokumarinski zaviralci DNA giraze so sestavljeni iz sladkorja L-novioze, ki ima pripeto 5-metilpirol-2-karboksilno kislino ali karbamoilno skupino (sodelujeta kot donorja vodikove vezi), 3-aminokumarinski obroč in 4-hidroksil-3-izoprenilbenzoilni del. 5-metil-2-karbonilpirolni fragment tvori eno vodikovo vez s stransko verigo Asp73, drugo pa preko molekule vode z aminokislinskim ostankom Tyr165 in je kot tak ključni element za prepoznavo, saj se na enak način veže tudi adeninski obroč ATP. Dodatne hidrofobne interakcije tvori z aminokislinskim ostanki Val43, Ala47, Val71, Ile78, Val120 in Val167. Te aminokisline tvorijo hidrofobni žep vezavnega mesta za ATP. Hidroksilna skupina sladkorja tvori vodikovo vez z Asn46, medtem ko metilne skupine na L-noviozi tvorijo hidrofobne interakcije z Ile78 in Ile90. Kisikova atoma kumarinskega obroča tvorita vodikove vezi z aminokislinskim ostankom Arg136, s čimer ojačata vezavo in omogočata selektivnost napram drugim od ATP odvisnim encimom, saj ATP z Arg136 ne tvori interakcij in se ta aminokislinski ostanek na enakem mestu nahaja samo še v drugih proteinih iz družine GHKL. Na sliki 10 vidimo prikazane interakcije med klorobiocinom in podenoto B DNA giraze iz *Escherichia coli* (24).



Slika 10: Shematski prikaz interakcij med klorobiocinom in podenoto B DNA giraze iz *Escherichia coli* (24).

1.7.2 Pirolamidi

AstraZeneca je s pomočjo rešetanja knjižnice fragmentov z NMR spektroskopijo odkrila nov pirolamidni strukturni tip zaviralcev DNA giraze. Strukturo začetnih zadetkov so kasneje optimizirali s pomočjo 3D struktur kompleksov encim-zaviralec, določenih z rentgensko kristalografijo (slika 11) (11).



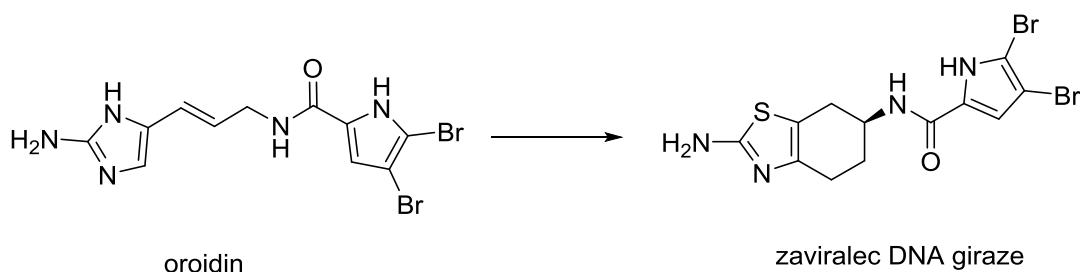
Slika 11: Strukture pirolamidnih zaviralcev DNA giraze B, odkritih v AstraZeneca (prirejeno po 11).

Spojini **a** in **b** sta zaviralca DNA giraze B iz *E. coli* z IC₅₀ vrednostima 0,9 nM in 25 nM. Čeprav spojina **a** izkazuje večjo zaviralno aktivnost, so zaradi boljše topnosti nadalje optimizirali spojino **b**. Spojina **b** izkazuje protibakterijsko aktivnost proti *S. aureus*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* z minimalnimi bakteriocidnimi koncentracijami 8 µg/mL, 0,5 µg/mL in 4 µg/mL. Optimizirana spojina **c** ima IC₅₀ proti DNA giraze iz *S. aureus* 4 nM in MIK vrednosti 0,06 µg/mL proti *S. pneumoniae*, 2 µg/mL proti *S. aureus*, 0,06 µg/mL proti *M. catarrhalis* in 0,25 µg/mL proti *E. faecium* in *H. influenzae*. Spojina **c** je neaktivna proti po Gram negativni *E. coli*, najverjetneje zato, ker sevi *E. coli* s pomočjo izlivne črpalke črpajo spojino iz celice.

Pirolamidni del spojin **a**, **b** in **c** tvori vodikovo vez z Asp81 DNA giraze B iz *S. aureus* in kristalno molekulo vode, tiazolni obroč spojine pa tvori π-π interakcije z Arg84 (11).

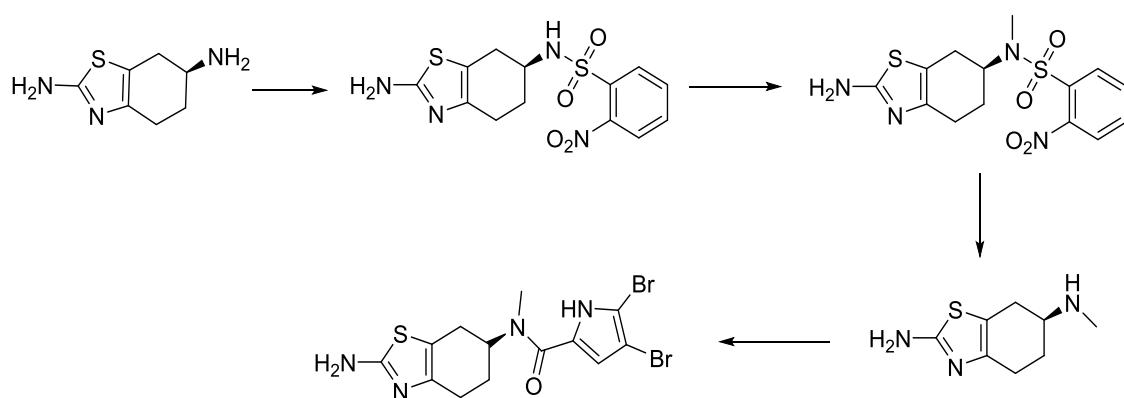
2 NAČRT DELA

Tekom eksperimentalnega dela bomo sintetizirali in optimizirali strukturo novih ATP kompetitivnih zaviralcev DNA giraze B in raziskali povezavo med strukturo in delovanjem. Izhajali bomo iz analogov oroidina, ki so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (slika 12).



Slika 12: Struktura oroidina in znanega zaviralca DNA giraze.

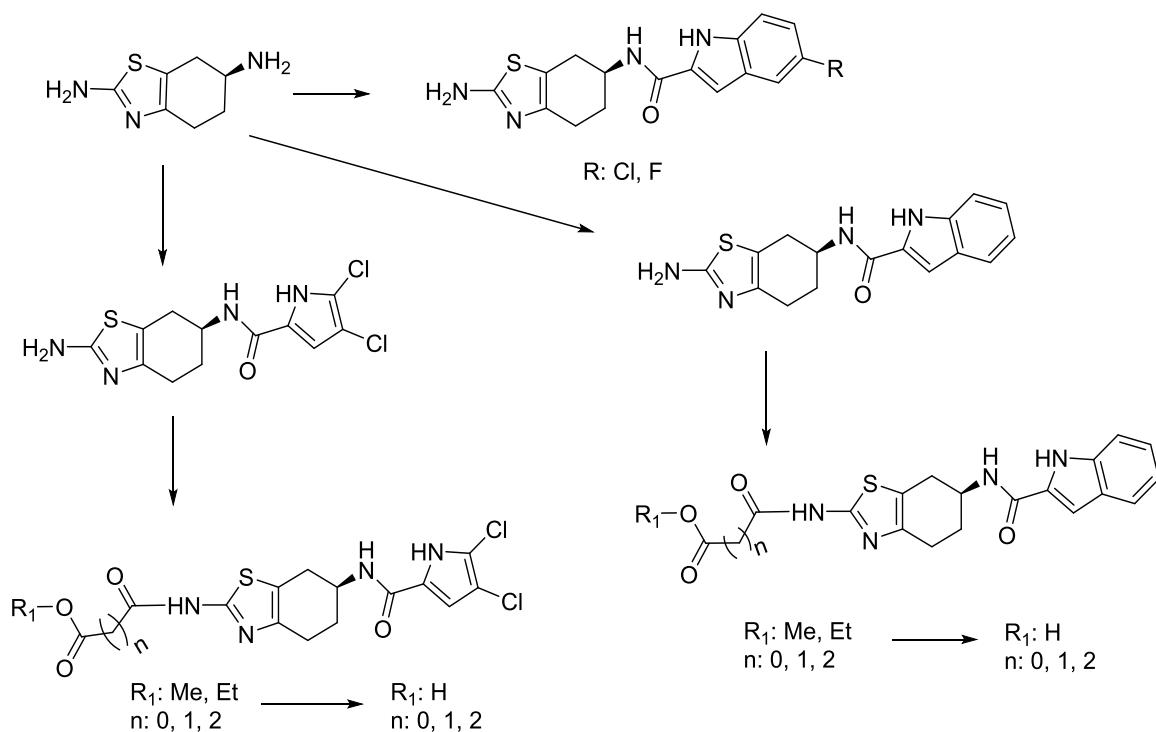
Najprej bomo na amidno skupino znanega zaviralca DNA giraze (slika 13) uvedli metilno skupino. Izhodno spojino (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2,6-diamin bomo pretvorili v sulfonamid s pomočjo 2-nitrobenzensulfonil klorida. Reaktivni sulfonamid bomo alkilirali z metil jodidom. Na koncu bomo odstranili sulfonamidno zaščitno skupino in na sekundarni amin pripeli 4,5-dibromopirolni fragment (25).



Slika 13: Shema alkiliranja znanega zaviralca DNA giraze (25).

Nadalje bomo na (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2,6-diamin pripeli furanski, indolni, 5-kloro- in 5-fluoroindolni obroč, ki ga bomo kasneje nadomestili tudi s 4,5-dikloropirolnim obročem in ovrednotili, kako sprememba velikosti liganda vpliva na jakost

vezave v ATP vezavno mesto DNA giraze. Nato bom aminsko skupino pripeto na tiazolni obroč acilirali z metil malonil kloridom, metil sukcinil kloridom in etil oksalil kloridom. Z alkalno hidrolizo bomo pripravili tudi kislinske derivate spojin (slika 14). S tem želimo doseči dodatne interakcije s stransko verigo Arg136 v ATP vezavnem mestu DNA giraze B iz *E. coli* in hkrati ugotoviti, kako dolžina stranske verige vpliva na jakost vezave. Zanimale nas bodo razlike med kislinskimi in esterskimi derivati sintetiziranih spojin.



Slika 14: Shema aciliranja (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2,6-diamina.

Sintetizirane indolamide in dikloropirolamide bomo tudi biokemijsko ovrednotili in jim določili vrednost IC_{50} - koncentracijo potencialnega zaviralca, ki povzroči 50% inhibicijo encimske reakcije na izolirani DNA girazi. Najbolj obetavnim spojinam bomo določili tudi zaviralno aktivnost na DNA girazi iz po Gramu pozitivne bakterije *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Večini spojin bomo določili protibakterijsko aktivnost na dveh po Gramu pozitivnih (*S. aureus*, *E. faecium*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bakterijskih sevih.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI:

3.1.1 REAGENTI IN TOPILA

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

3.2 KROMATOGRAFSKE METODE:

3.2.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Poteke reakcij in ustreznost mobilne faze za čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo smo spremajali s tankoplastno kromatografijo (TLC). Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila v različnih razmerjih, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali s pomočjo UV lučke z valovno dolžino 254 nm ali 366 nm in orositvenimi reagenti.

3.2.2 »FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Za čiščenje spojin smo pogosto uporabljali »flash« kolonsko kromatografijo. Od količine nečistega vzorca je bila odvisna izbira ustrezne steklene kolone, ki so se med seboj razlikovale po velikosti in premeru. Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,040 - 0,063 mm.

3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE:

3.3.1 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR)

IR spektri smo posneti na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.3.2 JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani . Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih

dimetilsulfoksid (DMSO)-*d*₆, in kloroformu (CDCl₃). S pomočjo računalniškega programa MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L. smo procesirali spektre.

3.3.3 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometu Autospec (VG – Analytical) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.4 NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

Program ChemBioDraw Ultra 12.0 podjetja CambridgeSoft smo uporabili za risanje strukturnih formul spojin in poimenovanje po IUPAC nomenklaturi. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali program SciFinder Scholar.

3.5 DOLOČEVANJE TALIŠČA

S Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica smo določali tališče končnih spojin.

3.6 POLARIMETRIJA

Na polarimetru Perkin-Elmer 241 MC smo določili sučnost sintetiziranih očiščenih spojin. S pomočjo spodnje enačbe, pri kateri je izmerjeni kot zasuka (α) povprečje petih meritev z integracijskim časom 5 s, *l* dolžina kivete in *c* koncentracija spojine, smo izračunali specifično sučnost.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{l \times c}$$

3.7 BIOKEMIJSKA TESTIRANJA

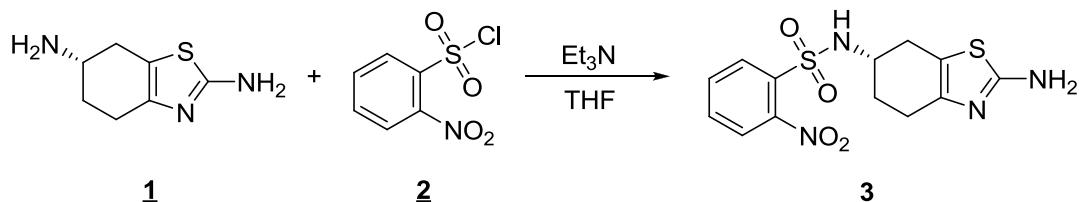
Končne sintetizirane spojine smo biokemijsko ovrednotili, tako da smo določili njihovo zaviralno aktivnost na izolirani DNA girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *S. aureus* in *E. coli*. Rezidualna aktivnost (RA) je izražena v odstotkih in predstavlja razmerje med aktivnostijo encima ob dodatku in v odsotnosti zaviralca. Rezidualne aktivnosti so bile določene pri koncentraciji zaviralca 10 µM in 100 µM na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Na DNA girazi iz *E. coli* so bile vsem spojinam

določene vrednosti IC_{50} v šestih koncentracijskih točkah, ki predstavljajo koncentracijo spojine, pri kateri je bila rezidualna aktivnost encima 50 %.

Meritve encimske aktivnosti DNA giraze je na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani opravil izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm., protibakterijsko delovanje na *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* in *Enterococcus faecium* so testirali na Univerzi v Helsinkih na Finskem.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-2-nitrobenzensulfonamide

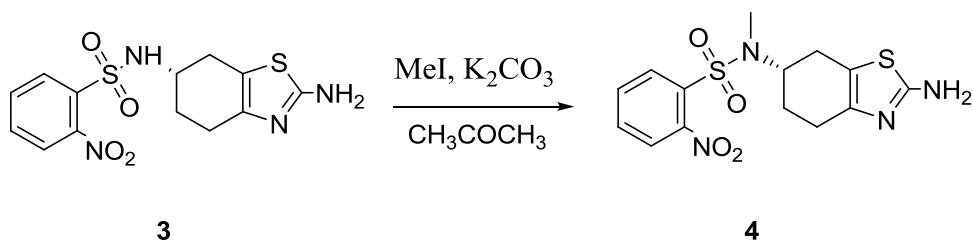


Spojino **2** (1,697 g, 7,66 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 40 mL tetrahidrofurana (THF) in na ledeni kopeli ohladili na -10 °C ter nato dodali trietilamin (4,41 mL, 317 mmol, 41 ekv.) in spojino **1** (1,417 g, 8,37 mmol, 1.1 ekv.). Suspenzijo smo mešali pri sobni temperaturi približno 1 uro, konec reakcije pa smo določili s tankoplastno kromatografijo. Oborjeni trietilamonijev klorid smo odfiltrirali s presesavanjem, matičnico pa pod znižanim tlakom skoncentrirali na tretjino volumna. Skoncentrirani matičnici smo dodali približno 20 mL vode in ponovno uparili topilo približno na polovico volumna. Ponovno smo matičnici dodali 20 mL vode, ohladili na ledu in izpadlo oborino odfiltrirali s presesavanjem in v sušilniku posušili do suhega. Dobili smo 2,47 g spojine **3**.

(*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-2-nitrobenzenesulfonamid

Elementna sestava	$C_{13}H_{14}N_4O_4S_2$ $M_r = 354,40$	
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	90,9 %	
Retencijski faktor (R_f)	0,2 (mobilna faza (MF) = diklorometan : metanol = 20:1):	
Tališče	216 - 219 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,66 – 1,79 (multiplet (m), 2 H, H- ₇), 2,32 – 2,46 (m, 3 H, H _{A-4} , H ₅), 2,61 (dvojni dublet (dd), 1H, J = 5,3, 15,4 Hz, H _{B-4}), 3,49 – 3,56 (m, 1H, CHNH), 6,68 (singlet (s), 2H, NH ₂), 7,84 – 7,89 (m, 2H, Ar-H), 7,94 – 7,97 (m, 1H, Ar-H), 8,04 – 8,07 (m, 1H, Ar-H), 8,30 (s, 1H, SO ₂ NH) ppm	
IR (ATR)	3417, 3275, 3144, 2861, 1618, 1588, 1523, 1441, 1422, 1364, 1326, 1296, 1268, 1238, 1155, 1142, 1127, 1115, 1078, 1061, 1009, 986, 939, 916, 882, 851, 799, 782, 765, 740, 727, 710, 652, 584 cm ⁻¹	

4.2 Síntese (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)-*N*-metil-2-nitrobenzensulfonamida

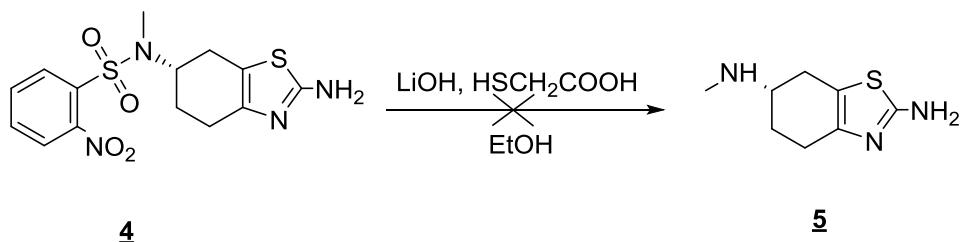


V približno 25 mL acetona smo raztopili spojino **3** (2,414 g, 6,81 mmol, 1,0 ekv.), kalijev karbonat (7,730 g, 56,0 mmol, 8,2 ekv.) in metil jodid (1,30 mL, 20,4 mmol, 3 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na oljni kopeli (60 °C) preko noči. Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo ter nastale soli odfiltrirali s presesavanjem, matičnico pa skoncentrirali na četrtino volumna. Matičnici smo dodali diklorometan (20 mL) in jo sprali z 1M natrijevim hidroksidom (20 mL). Vodno fazo smo nato ponovno ekstrahirali z diklorometanom (20 mL). Združenim organskim fazam smo uparili topilo, dobljeno spojino pa čistili s prekristalizacijo iz etanola in vode. Oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in v sušilniku posušili do suhega, matičnico pa smo očistil s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (30:1). Dobili smo 0,25 g spojine **4**.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-N-metil-2-nitrobenzensulfonamid

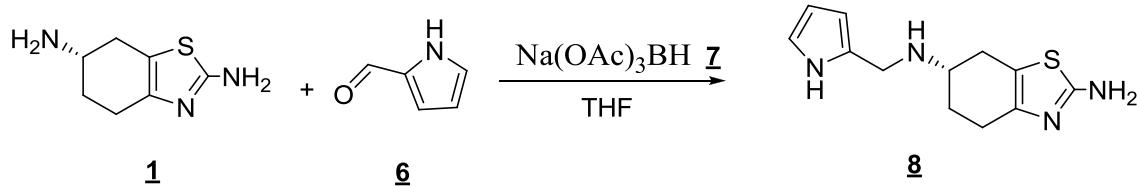
Elementna sestava	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ O ₄ S	M _r = 368,43
Opis	rumena oborina	
Izkoristek	0,1 %	
R _f	0,2 (MF: diklorometan : metanol = 30:1)	
Tališče	223 - 227 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,66 – 1,79 (multiplet (m), 2 H, H- ₇), 2,32 – 2,46 (m, 3 H, H _{A-4} , H ₅), 2,61 (dvojni dublet (dd), 1H, J = 5,3, 15,4 Hz, H _{B-4}), 3,49 – 3,56 (m, 1H, CHNH), 6,68 (singlet (s), 2H, NH ₂), 7,84 – 7,89 (m, 2H, Ar-H), 7,94 – 7,97 (m, 1H, Ar-H), 8,04 – 8,07 (m, 1H, Ar-H) ppm	
IR (ATR)	3099, 2360, 1758, 1689, 1630, 1591, 1508, 1449, 1419, 1364, 1336, 1288, 1239, 1206, 1157, 1122, 1059, 1007, 986, 965, 940, 915, 845, 777, 751, 730, 711, 651, 621, 589, 579, 566 cm ⁻¹	

4.3 Poskus sinteze (S)-N-metil-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2,6-diamina



V bučko smo natehtali litijev hidroksid (0,0976 g, 4,1 mmol, 1,8 ekv.), dodali etanol (800 µL) in ohladili na ledeni kopeli (0°C) ter dodali tioglikolno kislino (0,244g, 2,65 mmol, 5 ekv.). Nato smo reakcijsko zmes segreli na sobno temperaturo in pustili mešati približno 45 minut. Po tem času smo dodali spojino **4** (0,200 g, 0,54 mmol, 1 ekv.), reakcijsko zmes prepihali z argonom in mešali približno 1 h na oljni kopeli (60 °C). Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Po eni uri smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in odfiltrirali s presesavanjem. Matičnico smo skoncentrirali pod znižanim tlakom, dodali 1M NaOH (20 mL) ter ekstrahirali z dikloromeanom (2×40 mL). Združenim organskim fazam smo uparili topilo, a smo dobili zanemarljivo količino produkta. Reakcija ni uspela.

4.4 Sinteza (S)-N-((1*H*-pirol-2-il)metil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2,6-diamina



Spojino **1** (0,199 g, 1,18 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v tetrahidrofuranu (20 mL) in ohladili na ledeni kopeli na 0 °C, nato pa smo počasi po kapljicah dokapavali spojino **6** (0,112 g, 1,18 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v majhni količini THF. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli še približno 1 uro, nato pa smo dodali spojino **7** (0,324 g, 1,53 mmol, 1,3 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi preko noči in nato uparili topilo. Dobljeni produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa smo uporabili diklorometan/metanol (9:1). Dobili smo 160 mg spojine **8**.

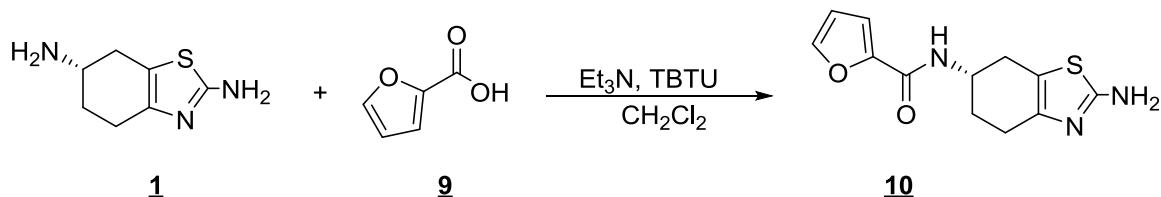
(*S*)-*N*-((1*H*-pirol-2-il)metil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2,6-diamin

Elementna sestava	$C_{16}H_{15}FN_4OS$	$M_r = 248,35$
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	55,2 %	
R_f	0,34 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	131 – 132 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,47-1,57 (m, 1H, H _{A-7}), 1,87-1,94 (m, 2H, H _{B-7} , H _{A-5}), 2,20 – 2,26 (m, 1H, H _{B-5}), 2,29-2,38 (m, 1H, H _{A-4}), 2,73 (dd, 1H, J = 4,9, 14,9 Hz, H _{B-4}), 2,78 – 2,84 (m, 1H, CH ₂ NH), 3,69 (s, 2H, CH ₂ NH), 5,85-5,87 (m, 1H, Ar-H ₄), 5,88 – 5,90 (m, 1H, Ar-H ₃), 6,59 (s, 2H, 2-NH ₂), 6,61 (dt, 1H, J = 1,6, 2,6 Hz, Ar-H-5), 10,59 (br s, 1H, Ar-NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,7 (C-5), 28,7 (C-4/7), 29,0 (C-4/7), 43,0 (CH ₂ NH), 52,6 (C-6), 105,8 (Ar-C-3/4), 106,9 (Ar-C-3/4), 112,9 (C-7a), 116,7 (Ar-C-5), 130,2 (Ar-C-2), 144,4 (C-3a), 165,8 (C-2) ppm	
HR-MS (ESI+)	249,1169 (izračunana: 249,1174)	
IR (ATR)	3362, 3134, 1630, 1527, 1407, 1324, 1118, 1097, 1011, 884, 814, 730, 610 cm ⁻¹	

4.5 SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK A

Izhodno kislino (1 ekv.) smo raztopili v diklorometanu in med mešanjem dodali trietilamin (2 ekv.) in *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (TBTU) (1,3 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi približno pol ure, nato pa dodali še trietilamin (1 ekv.) in izhodni amin (1,3 ekv.). Zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Reakcijsko zmes smo najprej sprali z 1M HCl (2×25 mL), nato pa še z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2×25 mL). Na koncu smo organsko fazo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organski fazi smo uparili topilo, dobljeni produkt pa očistili s flash kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo diklorometan/metanol (20:1). Čisto spojino smo na koncu posušili v sušilniku.

4.6 Sinteza (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)furan-2-karboksamida



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku A iz spojine **9** (0,200 g, 1,78 mmol, 1 ekv.), trietylamina (0,5 mL + 0,25 mL, 3,56 mmol + 1,78 mmol, 2 ekv. + 1 ekv), *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborata (TBTU) (0,745 g, 2,32 mmol, 1,3 ekv.) in spojine **6** (0,302 g, 1,78 mmol). Dobili smo 303 mg spojine **10**.

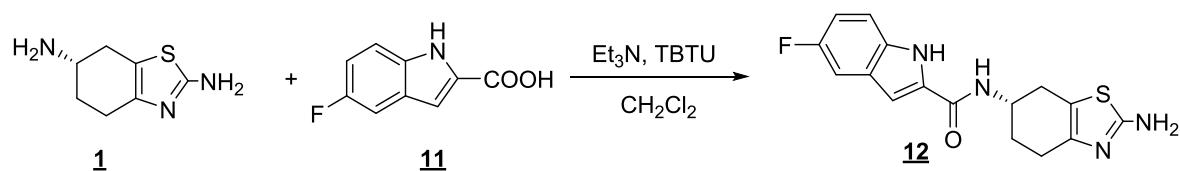
(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)furan-2-karboksamid

Elementna sestava	C ₁₂ H ₁₄ N ₃ O ₂ S	M _r = 263,32
Opis	beli kristali	
Izkoristek	65%	
R _f	0,05 (MF: diklorometan : metanol = 20:1)	
Tališče	188 – 190 °C	
[α] _D (c 0,17, MeOH)	- 51,8	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,77 – 1,85 (m, 1H, H _{A-7}), 1,87 – 1,93 (m, 1H, H _{B-7}), 2,50 – 2,53 (m, 2H, signal se prekriva z DMSO-d ₅ , H ₅), 2,55–2,60 (m, 1H, H _{A-4}), 2,75 (dd, 1H, J = 5,1, 15,0 Hz, H _{B-4}), 4,09 – 4,18 (m, 1H, CH ₂ NH), 6,63 (dd, 1H, J = 1,8, 3,4 Hz, Ar-H ₄), 6,68 (s, 2H, 2-NH ₂), 7,12 (dd, 1H, J = 0,8, 3,4 Hz, Ar-H ₃), 7,83 (dd, 1H, J = 0,8, 1,8 Hz, Ar-H ₅), 8,34 (d, 1H, J = 8,1 Hz, NH-C=O) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ 25,1 (C-5), 28,5 (C-4/7), 28,7 (C-4/7), 45,5 (C-6), 111,8 (Ar-C-4), 112,4 (C-7a), 113,4 (Ar-C-3), 144,2 (Ar-C-2), 144,8 (Ar-C-5), 147,9 (C-3a), 157,2 (C=O), 166,2 (C-2) ppm	
HR-MS (ESI+)	264,0796 (izračunana: 264,0807)	
IR (ATR)	3430, 3328, 3117, 2926, 2850, 1647, 1596, 1533, 1482, 1367, 1318, 1226, 1170, 1105, 1010, 982, 936, 876, 831, 800, 756, 592, 494 cm ⁻¹	

4.7 SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK B

Izhodno kislino (1 ekv.) smo raztopili v približno 15 mL diklorometana in dodali trietilamin (2 ekv.) in TBTU (1,1 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali približno 30 minut pri sobni temperaturi, nato pa dodali trietilamin (1 ekv.) in izhodni amin (1 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in sprali z manjšo količino diklorometana. Čisto spojino smo na koncu posušili v sušilniku.

4.8 Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-5-fluoro-1*H*-indol-2-karboksamida



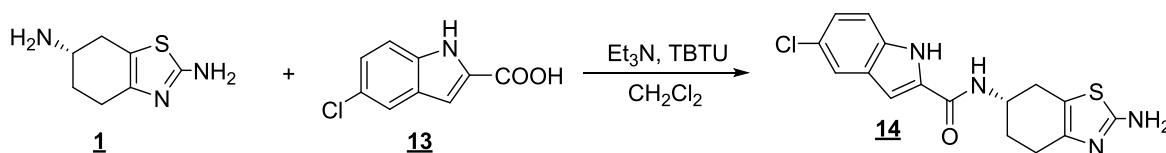
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojine **11** (150 mg, 0,877 mmol, 1 ekv.), trietilamina (233 µL + 116 µL, 1,67 mmol + 0,877 mmol, 2 ekv. + 1 ekv.), TBTU (296 mg, 0,920 mmol, 1,1 ekv.) in spojine **1** (141 mg, 0,837 mmol, 1 ekv.). Dobljeni produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa smo uporabili diklorometan/metanol (7:1). Dobili smo 80 mg spojine **12**.

(*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-5-fluoro-1*H*-indol-2-karboksamid

Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₅ FN ₄ OS	M _r = 330,38
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	28,9 %	
R _f	0,6 (MF: diklorometan : metanol = 7:1)	
Tališče	279-282 °C	
[α] _D (c 0,22, MeOH)	- 38,9	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,80-1,89 (m, 1H, H _A -7), 1,94-2,02 (m, 1H, H _B -7), 2,52-2,60 (m, 3H, H-5, H _A -4), 2,84 (dd, 1H, J ₁ = 5,8 Hz, J ₂ = 14,8 Hz, H _B -4), 4,17-4,26 (m, 1H, CHNH), 6,70 (s, 2H, NH ₂), 6,99-7,06 (m, 1H, Ar-H), 7,17-7,20 (m, 1H, Ar-H), 7,43-7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,70 (d, 1H, J = 2,1 Hz, Ar-H), 8,59 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONH), 11,87 (s, 1H, Ar-NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 25,1, 28,7, 28,8, 45,8, 102,8 (d, ³ J _{CF} = 5,0 Hz), 105,6 (d, ² J _{CF} = 23,0 Hz), 111,9 (d, ² J _{CF} = 26,0 Hz), 112,3, 113,4 (d, ³ J _{CF} = 9,7 Hz), 127,1 (d,	

	$^3J_{CF} = 10,6$ Hz), 133,2 (d, $^2J_{CF} = 32,3$ Hz), 144,1, 155,9, 158,2 (d, $^1J_{CF} = 232$ Hz), 160,2, 166,2 ppm
HR-MS (ESI+)	331,1031 (izračunana: 331,1029)
IR (ATR)	3633, 3276, 2948, 2843, 1627, 1584, 1537, 1508, 1488, 1445, 1423, 1372, 1320, 1300, 1279, 1262, 1223, 1158, 1111, 1074, 1019, 974, 954, 915, 880, 863, 798, 768, 757, 735, 674, 629, 615, 602, 588 cm^{-1}

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



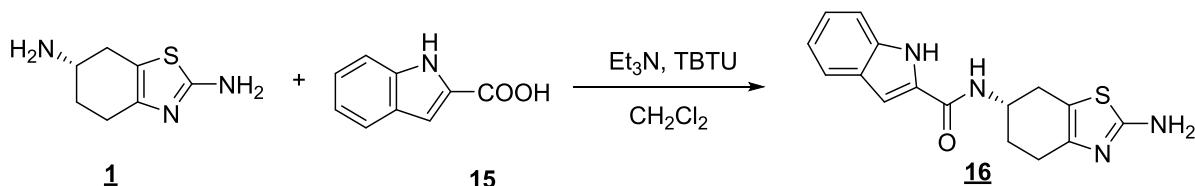
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojine **13** (150 mg, 0,767 mmol, 1 ekv.), trietilamina (213 μL + 107 μL , 1,53 mmol + 0,767 mmol, 2 ekv. + 1 ekv.), TBTU (271 mg, 0,843 mmol, 1,1 ekv.) in spojine **1** (130 mg, 0,767 mmol, 1 ekv.). Dobljeni produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa smo uporabili diklorometan/metanol (7:1). Dobili smo 88 mg spojine **14**.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-5-kloro-1H-indol-2-karboksamid

Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{OS}$	$M_r = 346,83$
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	33 %	
R_f	0,4 (MF: diklorometan : metanol = 20:1)	
Tališče	265 - 267 $^{\circ}\text{C}$	
$[\alpha]_D$ (c 0,18, MeOH)	+ 31,4	
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,79-1,89 (m, 1H, H _A -7), 1,95-2,01 (m, 1H, H _B -7), 2,52-2,59 (m, 3H, H-5, H _A -4), 2,84 (dd, 1H, $J_1 = 5,5$ Hz, $J_2 = 14,8$ Hz, H _B -4), 4,17-4,26 (m, 1H, CHNH), 6,70 (s, 2H, NH ₂), 7,04 (dt, 1H, $J_1 = 2,6$ Hz, $J_2 = 9,4$ Hz, Ar-H), 7,18 (d, 1H, $J_1 = 1,2$ Hz, Ar-H), 7,41 (dt, 2H, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 9,4$ Hz, Ar-H), 8,50 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, CONH), 11,71 (s, 1H, Ar-NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 25,1, 28,7, 28,8, 45,8, 102,3, 112,3, 113,8, 120,5, 123,3, 124,4, 128,1, 133,2, 134,8, 144,3, 160,2, 166,2 ppm	
HR-MS (ESI+)	347,0728 (izračunana: 347,0733)	

IR (ATR)	3635, 3275, 3098, 2365, 1696, 1625, 1581, 1536, 1458, 1383, 1323, 1285, 1240, 1217, 1194, 1165, 1124, 1098, 1060, 1003, 916, 876, 812, 797, 768, 737, 714, 670, 631, 599, 587, 573 cm ⁻¹
----------	---

4.10 Sinteza (S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-1H-indol-2-karboksamida



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku B iz spojine **15** (954 mg, 5,92 mmol, 1 ekv.), trietilamina (1,65 mL + 822,5 µL, 11,84 mmol + 5,92 mmol, 2 ekv. + 1 ekv.) in TBTU (2,09 g, 6,51 mmol, 1,1 ekv.). Dobljeni produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa smo uporabili diklorometan/metanol (9:1). Dobili smo 1,14 g spojine **14**.

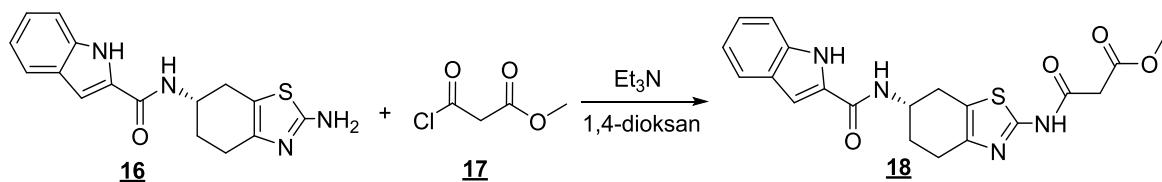
(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-1H-indol-2-karboksamid

Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ OS	M _r = 312,39
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	61,6 %	
R _f	0,28 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	259–261 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,80 – 1,90 (m, 1H, H _{A-7}), 1,97 – 2,00 (m, 1H, H _{B-7}), 2,53 – 2,60 (m, 3H, H _{A-4,H-5}), 2,84 (dd, 1H, J = 5,6 , 14,7 Hz, H _{B-4}), 4,18 – 4,27 (m, 1H, CHNH), 6,72 (s, 2H, NH ₂), 7,04 (ddd, 1H, J = 1,0, 7,0, 8,0 Hz, Ar-H), 7,16 – 7,20 (m, 1H, Ar-H), 7,43 (d, 1H, J ₁ = 0,9 Hz, J ₂ = 1,8 Hz, Ar-H), 7,61 (dd, 1H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 7,8 Hz, Ar-H), 8,43 (d, 1H, J = 7,9 Hz, CONH), 11,58 (d, 1H, J = 1,6 Hz, CNHCCO) ppm	
IR (ATR)	3350, 3240, 3055, 2950, 2360, 1717, 1666, 1630 , 1544, 1491, 1449, 1439, 1418, 1382, 1340, 1312, 1266, 1229, 1209, 1171, 1137, 1106, 1073, 1039, 1007, 987, 932, 912, 897, 871, 846, 807, 781, 767, 742, 669, 609, 574, 560 cm ⁻¹	

4.11 SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPEK C

Izhodni amin (1 ekv.) smo raztopili v majhni količini 1,4-dioksana (približno 7 mL). Med mešanjem smo počasi po kapljicah v reakcijsko zmes dodali prebiten trietilamin (1,2 ekv.) in prebiten kislinski klorid (1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo določili s tankoplastno kromatografijo. Nato smo reakcijski zmesi uparili topilo, trdnemu preostanku dodali nasičeno raztopino NaHCO_3 (10 mL) in nekaj kapljic vode. Vodno fazo smo ekstrahirali z etil acetatom (3×30 mL). Združene organske faze smo nato sprali z nasičeno raztopino natrijevega klorida, sušili z natrijevim sulfatom, sušilno sredstvo odfiltrirali in filtratu uparili topilo. Surovi produkt smo čistili s prekristalizacijo iz diklorometana z dodatkom nekaj kapljic metanola. Čisto spojino smo na koncu posušili v sušilniku.

4.12 Sinteza (S)-metil-3-(6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanoata



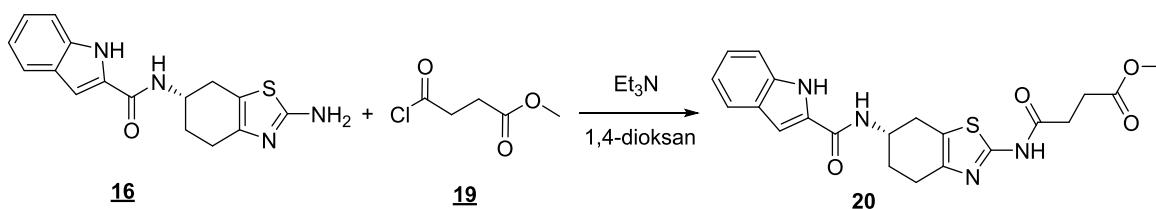
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **16** (250 mg, 0,80 mmol, 1 ekv.), trietilamina (133,6 μL , 0,96 mmol, 1,2 ekv) in spojine **17** (129 μL , 1,2 mmol, 1,5 ekv). Dobili smo 130 mg spojine **18**.

(S)-metil-3-(6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanoat

Elementna sestava	$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	$M_r = 412,46$
Opis	svetlo rumeni kristali	
Izkoristek	39,4 %	
R_f	0,5 (MF: dikloromean : metanol = 9:1)	
Tališče	122 - 124 °C	
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)	δ 1,87-1,97 (m, 1H, H_A -7), 2,03-2,08 (m, 1H, H_B -7), 2,67-2,75 (m, 3H, H_5 , H_A -4), 3,04 (dd, 1H, $J_1 = 4,9$ Hz, $J_2 = 15,2$ Hz, H_B -4), 3,58 (s, 2H, COCH_2CO), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,24-4,30 (m, 1H, CHNH), 7,03 (ddd, 1H, $J_1 = 1,0$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,15-7,20 (m, 2H, Ar-H), 7,43 (dd, 1H, $J_1 = 0,9$ Hz, $J_2 = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,61 (dd, 1H, $J_1 = 0,8$ Hz, $J_2 = 7,9$ Hz, Ar-H), 8,47 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, CONHCH), 11,58 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, NH)	

	Hz, NH), 12,15 (s, 1H, NH) ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ 24,8, 28,4, 28,7, 42,0, 45,5, 52,1, 102,8, 112,3, 119,7, 119,8, 121,5, 123,3, 127,0, 131,6, 136,4, 143,6, 155,1, 160,6, 163,9, 167,6 ppm
HR-MS (ESI+)	413,1279 (izračunana: 413,1284)
IR (ATR)	3745, 3274, 2949, 2360, 2042, 2025, 1742, 1664, 1624, 1570, 1541, 1492, 1436, 1407, 1341, 1312, 1251, 1228, 1204, 1164, 1135, 1052, 1008, 986, 969, 939, 908, 875, 851, 811, 769, 746, 719, 690, 669, 648, 623, 612, 596, 582, 573, 567, 558 cm ⁻¹

4.13 Sinteza (*S*)-metil-4-(6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanoata

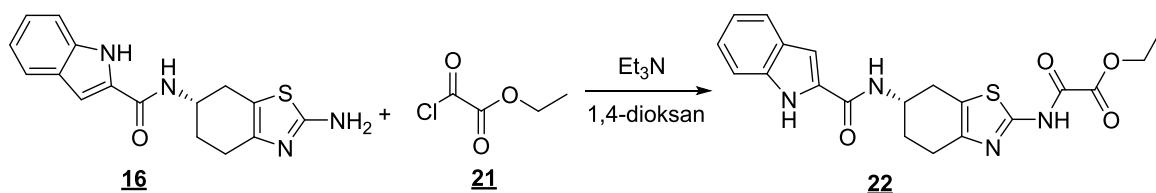


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **16** (250 mg, 0,80 mmol, 1 ekv.), trietilamina (133,6 μL, 0,96 mmol, 1,2 ekv.) in spojine **19** (147 μL, 1,2 mmol, 1,5 ekv.). Dobili smo 188 mg spojine **20**.

<i>(S</i>)-metil-4-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanoat	
Elementna sestava	C ₂₁ H ₂₃ N ₄ O ₄ S M _r = 426,49
Opis	bež kristali
Izkoristek	55,0 %
R _f	0,4 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)
Tališče	202 – 205 °C
[α] _D (c 0,27, MeOH)	+ 16,9
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,88-1,98 (m, 1H, H _A -7), 2,05-2,09 (m, 1H, H _B -7), 2,61-2,75 (m, 7H, COCH ₂ CH ₂ CO, H-5, H _A -4), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 4,7 Hz, J ₂ = 15,6 Hz, H _B -4), 3,60 (s, 3H, COOCH ₃), 4,24-4,35 (m, 1H, CHNH), 7,04 (ddd, 1H, J ₁ = 1,0 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, J ₃ = 8,0 Hz, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H), 7,44 (dd, 1H, J ₁ = 0,9 Hz, J ₂ = 8,2 Hz, Ar-H), 7,62 (dd, 1H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 7,9 Hz, Ar-H), 8,49 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 11,59 (d, 1H, J = 1,5 Hz, NH), 12,00 (s, 1H, NH) ppm

¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,8, 28,0, 28,4, 28,7, 29,7, 45,5, 51,4, 102,8, 112,3, 119,2, 119,7, 121,4, 123,3, 127,0, 131,6, 136,4, 143,4, 155,4, 160,6, 169,7, 172,6 ppm
HR-MS (ESI+)	429,1429 (izračunana: 427,1440)
IR (ATR)	3350, 3239, 3055, 2950, 2362, 1717, 1666, 1630, 1546, 1492, 1449, 1439, 1418, 1382, 1340, 1313, 1266, 1228, 1208, 1170, 1137, 1107, 1073, 1039, 1008, 987, 971, 932, 911, 897, 870, 845, 824, 809, 799, 782, 767, 742, 685, 604, 584, 574, 561 cm ⁻¹

4.14 Sinteza (S)-etil-2-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetata



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **16** (250 mg, 0,80 mmol, 1 ekv.), trietilamina (V=133,6 µL, 0,96 mmol, 1,2 ekv.) in spojine **21** (V=134 µL, 1,2 mmol, 1,5 ekv.). Dobili smo 210 mg spojine **22**.

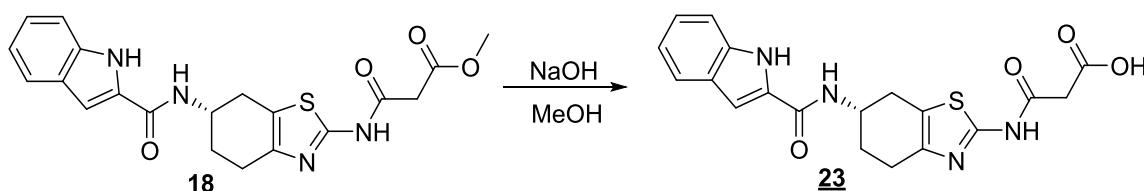
(S)-etil-2-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetat	
Elementna sestava	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄ S M _r = 412,46
Opis	rumeni kristali
Izkoristek	63,6 %
R _f	0,56 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)
Tališče	132 - 135 °C
[α] _D (c 0,21, MeOH)	+ 20,0
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,31 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 1,90-2,00 (m, 1H, H _A -7), 2,05-2,11 (m, 1H, H _B -7), 2,71-2,81 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,08 (dd, 1H, J ₁ = 5,4 Hz, J ₂ = 15,5 Hz, H _B -4), 4,24-4,6 (m, 3H, CHNH, CH ₂ CH ₃), 7,04 (ddd, 1H, J ₁ = 1,0 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, J ₃ = 8,0 Hz, Ar-H), 7,16-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,44 (dd, 1H, J ₁ = 0,9 Hz, J ₂ = 8,2 Hz, Ar-H), 7,62 (dd, 1H, J ₁ = 0,7 Hz, J ₂ = 7,9 Hz, Ar-H), 8,50 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 11,59 (d, 1H, J = 1,6 Hz, NH), 12,92 (s, 1H, NH) ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 13,8, 24,3, 28,3, 28,4, 45,3, 62,3, 102,8, 112,3, 119,7, 121,5, 123,3, 127,0, 131,6, 136,4, 160,6 ppm
HR-MS (ESI+)	413,1280 (izračunana: 413,1284)

IR (ATR)	3179, 2934, 1686, 1625, 1529, 1437, 1366, 1265, 1221, 1158, 1116, 1082, 1017, 872, 845, 812, 768, 747, 675, 659, 639, 605, 590, 584, 574, 558 cm ⁻¹
----------	--

4.15 SINTEZNI POSTOPEK D

Izhodno spojino (**18**, **20** ali **22**) smo raztopili v metanolu (približno 7 mL) in dodali 1M natrijev hidroksid (5 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Po končani reakciji smo reakcijski zmesi uparili topilo in suhemu preostanku dodali vodo (10 mL). Vodno fazo smo najprej ekstrahirali z etil acetatom (30 mL), nato pa smo vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH=1. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z etilacetatom (3×30 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino natrijevega klorida (30 mL), sušili z natrijevim sulfatom, sušilno sredstvo pa odfiltrirali in filtratu uparili topilo. Čisto spojino smo na koncu posušili v sušilniku.

4.16 Sinteza (S)-3-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojske kislina



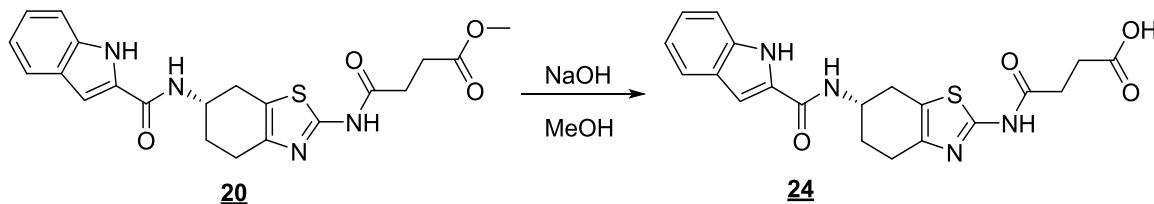
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **18** (82 mg, 0,199 mmol, 1 ekv.) in 1M NaOH (994 µL, 0,994 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 29 mg spojine **23**.

(S)-3-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojska kislina

Elementna sestava	C ₁₉ H ₁₉ N ₄ O ₄ S	M _r = 398,44
Opis		rumeni kristali
Izkoristek		47,7%
R _f		0,0 (MF: diklorometan : metanol = 7:1)
Tališče		> 300 °C
[α] _D (c 0.20, DMF)		+ 4,5
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,88-1,98 (m, 1H, H _A -7), 2,03-2,10 (m, 1H, H _B -7), 2,67-2,76 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,05 (dd, 1H, J ₁ = 5,3 Hz, J ₂ = 15,1 Hz, H _B -4), 3,46 (s, 2H,	

	COCH ₂ CO), 4,27-4,33 (m, 1H, CHNH), 7,04 (ddd, 1H, J ₁ = 1,0 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, J ₃ = 8,0 Hz, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H), 7,44 (dd, 1H, J ₁ = 0,8 Hz, J ₂ = 8,2 Hz, Ar-H), 7,62 (dd, 1H, J ₁ = 0,7 Hz, J ₂ = 8,0 Hz, Ar-H), 8,48 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 11,59 (d, 1H, J = 1,7 Hz, NH), 12,08 (br s, 1H, NH/COOH), 12,79 (br s, 1H, NH/COOH) ppm
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,9, 28,3, 28,7, 42,4, 45,6, 103,2, 112,2, 119,6, 121,4, 123,2, 127,0, 131,4, 136,4, 143,5, 155,2, 160,5, 164,6, 168,7 ppm
HR-MS (ESI+)	399,1126 (izračunana: 399,1127)
IR (ATR)	3184, 3066, 2956, 2853, 2359, 1732, 1676, 1639, 1545, 1527, 1438, 1426, 1401, 1371, 1322, 1271, 1225, 1206, 1175, 1156, 1113, 1075, 1017, 993, 981, 897, 865, 839, 812, 796, 748, 685, 626, 612, 603, 587 cm ⁻¹

4.17 Sinteza (S)-4-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline



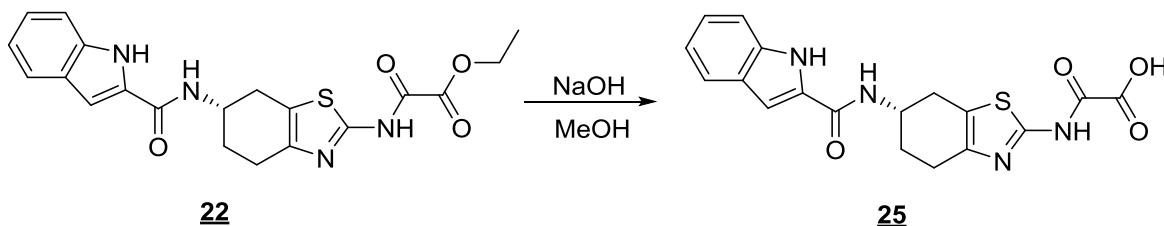
Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **20** (173 mg, 0,406 mmol, 1 ekv.) in 1M natrijevega hidroksida (2,03 mL, 2,03 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 106 mg spojine **24**.

(S)-4-(6-(1H-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline

Elementna sestava	C ₂₀ H ₂₁ N ₄ O ₄ S	M _r = 412,46
Opis	beli kristali	
Izkoristek	63,5 %	
R _f	0,0 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	225 - 229 °C	
[α] _D (c 0,17, DMF)	+ 17,6	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,88-1,98 (m, 1H, H _A -7), 2,05-2,09 (m, 1H, H _B -7), 2,53-2,74 (m, 7H, H-5, H _A -4, COCH ₂ CH ₂ CO), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 5,2 Hz, J ₂ = 15,3 Hz, H _B -4), 4,24-4,33 (m, 1H, CHNH), 7,04 (ddd, 1H, J ₁ = 1,0 Hz, J ₂ = 7,0 Hz, J ₃ = 8,0 Hz, Ar-H), 7,16-7,20 (m, 2H, Ar-H), 7,44 (dd, 1H, J ₁ = 0,9 Hz, J ₂ = 8,2 Hz, Ar-H), 7,62 (dd, 1H, J ₁ = 0,7 Hz, J ₂ = 7,9 Hz, Ar-H), 8,47 (d, 1H, J = 7,8 Hz,	

	CONHCH), 11,58 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz, NH), 11,96 (s, 1H, NH/COOH), 12,19 (br s, 1H, NH/COOH) ppm
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	δ 24,8, 28,3, 28,4, 28,7, 29,8, 45,5, 102,8, 112,3, 119,1, 119,7, 121,4, 123,3, 127,0, 131,6, 136,4, 143,4, 155,5, 160,6, 169,9, 173,6 ppm
HR-MS (ESI+)	413,1284 (izračunana: 413,1284)
IR (ATR)	3283, 2943, 2363, 1744, 1660, 1577, 1536, 1480, 1456, 1405, 1374, 1350, 1302, 1276, 1247, 1203, 1165, 1124, 1096, 1028, 1008, 987, 969, 929, 877, 845, 812, 745, 736, 669, 648, 611, 589, 582, 575, 563, 559 cm ⁻¹

4.18 Sinteza (S)-2-(6-(1*H*-indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetne kislina

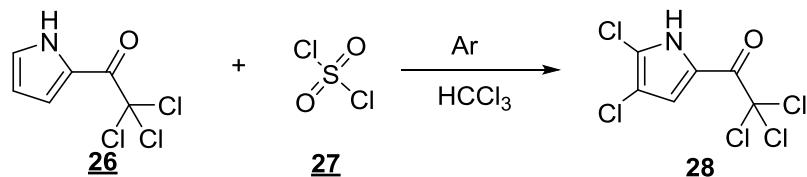


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **22** (187 mg, 0,454 mmol, 1 ekv.) in 1M natrijevega hidroksida (2,27 mL, 2,27 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 94 mg spojine **25**.

(S)-2-(6-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>d</i>]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetna kislina		
Elementna sestava	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₄ S	M _r = 384,41
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	54,0 %	
R _f	0,0 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	218 - 220 °C	
[α] _D (c 0,21, DMF)	+ 23,7	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,90-2,00 (m, 1H, H _A -7), 2,05-2,11 (m, 1H, H _B -7), 2,72-2,81 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,09 (dd, 1H, $J_1 = 5,0$ Hz, $J_2 = 15,5$ Hz, H _B -4), 4,25-4,36 (m, 1H, CHNH), 7,04 (ddd, 1H, $J_1 = 1,0$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,16-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,44 (dd, 1H, $J_1 = 0,9$ Hz, $J_2 = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,62 (dd, 1H, $J_1 = 0,8$ Hz, $J_2 = 7,9$ Hz, Ar-H), 8,50 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, CONHCH), 11,59 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, NH), 12,54 (br s, 2H, COOH, NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	δ 24,6, 28,4, 28,5, 45,4, 102,8, 112,3, 119,7, 120,9, 121,5, 123,3, 127,0, 131,6, 136,4, 160,6, 161,0, 172,0 ppm	

HR-MS (ESI+)	385,0981 (izračunana: 385,0971)
IR (ATR)	2933, 2042, 1691, 1631, 1534, 1436, 1366, 1293, 1267, 1222, 1155, 1082, 1016, 808, 746, 684, 669, 630, 610, 596, 582, 575, 567, 559, 552 cm ⁻¹

4.19 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etanona

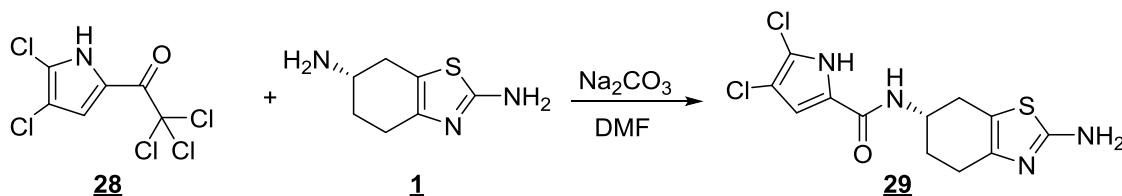


Spojino **26** (2,50 g, 11,8 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v približno 30 mL kloroformata in prepihali z argonom ter počasi po kapljicah dodali spojino **27** (3,338 g, 24,735 mmol, 2,1 ekv.). Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali toliko časa, dokler s tankoplastno kromatografijo nismo detektirali konca reakcije. Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (30 mL). Nato smo vodno fazo ekstrahirali z diklorometanom (2×30 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (30 mL), dodali natrijev sulfat, filtrirali in uparili topilo. Dobljeni produkt smo očistili s flash kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa smo uporabili heksan/etilacetat (4:1). Dobili smo 1.05 g spojine **28**.

2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etanon

Elementna sestava	C ₆ H ₂ Cl ₅ NO	M _r =281,35
Opis	rjavi kristali	
Izkoristek	31,5 %	
R _f	0,32 (MF: heksan : etilacetat = 4:1)	
Tališče	118 - 120 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 7,40 (s, 1H, Ar-H), 13,76 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	3284, 3133, 2963, 1653, 1529, 1438, 1401, 1363, 1234, 1222, 1158, 1133, 1059 cm ⁻¹	

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

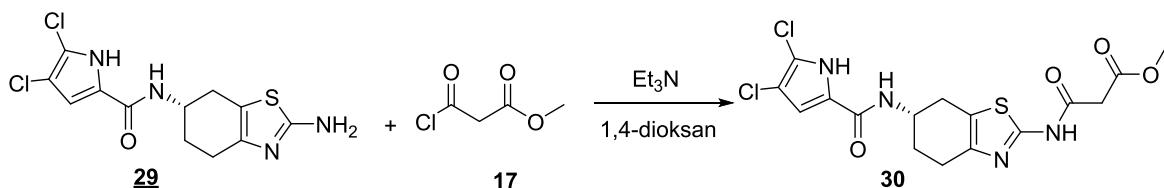


Spojino **1** (0,512 g, 3,03 mmol, 1 ekv.) smo suspendirali v *N,N*-dimetilformamidu (DMF) (6 mL) in dodali natrijev karbonat (0,321 g, 3,03 mmol, 1 ekv.). Reakcijski zmesi smo po kapljicah med mešanjem na oljni kopeli (40 °C) dodali spojino **28** (0,853 g, 3,03 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v DMF. Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči, konec reakcije pa smo detektirali s tankoplastno kromatografijo. Reakcijski zmesi smo uparili topilo, dobljeni produkt pa smo očistili s flash kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (20:1). Dobili smo 962 mg spojine **29**.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)-4,5dikloro-1H-pirol-2-karboksamid

Elementna sestava	C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ OS	M _r = 331,22
Opis	svetlo rumeni kristali	
Izkoristek	76,5 %	
R _f	0,38 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	254 – 257 °C	
[α] _D (c 0,24, MeOH)	- 31,8	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,71-1,83 (m, 1H, H _A -7), 1,90-1,94 (m, 1H, H _B -7), 2,43-2,54 (m, 3H, signali se delno prekrivajo z DMSO-d ₅ , H-5, H _A -4), 2,78 (dd, 1H, J ₁ = 5,1 Hz, J ₂ = 15,3 Hz, H _B -4), 4,09-4,18 (m, 1H, CHNH), 6,68 (s, 2H, NH ₂), 6,96 (s, 1H, Ar-H), 8,07 (d, 1H, J = 7,7 Hz, CONH), 12,72 (s, 1H, Ar-NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,9, 28,6, 28,7, 45,5, 107,9, 109,9, 112,2, 114,7, 124,8, 144,0, 158,4, 166,2 ppm	
HR-MS (ESI+)	331.0183 (izračunana: 331.0187)	
IR (ATR)	3117, 2910, 1612, 1562, 1512, 1429, 1397, 1366, 1312, 1271, 1230, 1170, 1095, 1017 cm ⁻¹	

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

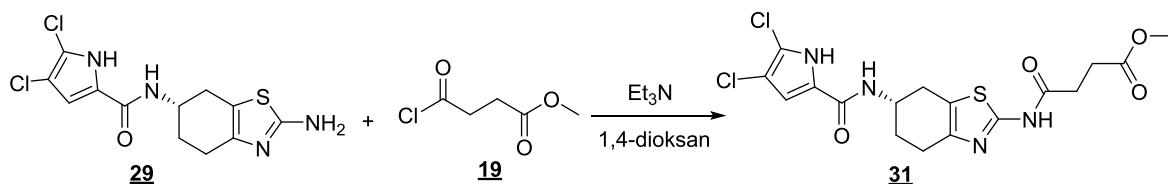


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **29** (250 mg, 0,753 mmol, 1 ekv.), trietilamina (126 µL, 0,90 mmol, 1,2 ekv.) in metil malonil klorida (**17**) (121 µL, 1,13 mmol, 1,5 ekv.). Dobili smo 187 mg spojine **30**.

(S)-metil- 3-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanoat

Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₇ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	M _r = 431,29
Opis	svetlo rumeni kristali	
Izkoristek	57,5 %	
R _f	0,49 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	136 - 138 °C	
[α] _D (c 0,20, MeOH)	+ 10,5	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,81-1,92 (m, 1H, H _A -7), 1,96-2,04 (m, 1H, H _B -7), 2,60-2,74 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J ₁ = 5,1 Hz, J ₂ = 15,9 Hz, H _B -4), 3,58 (s, 2H, COCH ₂ CO), 3,66 (s, 3H, COOCH ₃), 4,15-4,24 (m, 1H, CHNH), 6,97 (s, 1H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, J = 7,6 Hz, CONHCH), 12,15 (s, 1H, NH), 12,75 (s, 1H, NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,6, 28,4, 28,6, 42,0, 45,2, 52,1, 97,7, 107,9, 109,9, 114,8, 124,8, 143,8, 155,1, 158,5, 163,9, 167,5 ppm	
HR-MS (ESI+)	431,0353 (izračunana: 431,0348)	
IR (ATR)	3172, 2951, 1735, 1627, 1561, 1522, 1434, 1400, 1333, 1253, 1214, 1151, 1080, 1016 cm ⁻¹	

4.22 Sinteza (S)-metil- 4-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4oksobutanoata

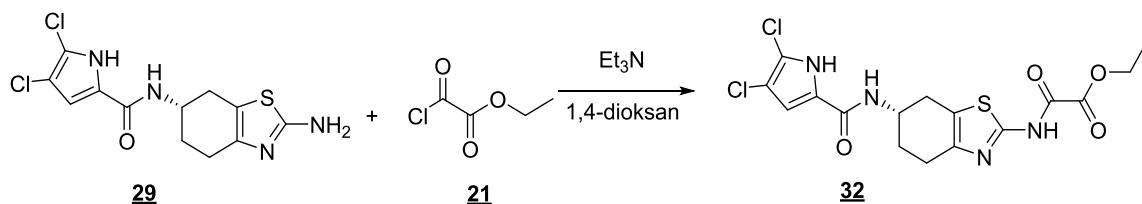


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **29** (250 mg, 0,753 mmol, 1 ekv.), trietylamina (126 µL, 0,90 mmol, 1,2 ekv.) in metil sukcinil klorida (**19**) (138 µL, 1,13 mmol, 1,5 ekv.). Dobili smo 181 g spojine **31**.

(S)-metil- 4-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanoat

Elementna sestava	C ₁₇ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	M _r = 445,32
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	53,9 %	
R _f	0,58 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	210 - 212 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,80-1,90 (m, 1H, H _A -7), 1,97-2,03 (m, 1H, H _B -7), 2,61-2,70 (m, 7H, H-5, H _A -4, COCH ₂ CH ₂ CO), 2,98 (dd, 1H, J ₁ = 5,0 Hz, J ₂ = 15,7 Hz, H _B -4), 3,60 (s, 3H, COOCH ₃), 4,17-4,24 (m, 1H, CH ₂ NH), 6,97 (d, 1H, J = 2,7 Hz, Ar-H), 8,11 (d, 1H, J = 7,7 Hz, CONHCH), 11,98 (s, 1H, NH), 12,75 (d, 1H, J = 2,3 Hz, NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,5, 28,1, 28,3, 28,4, 29,7, 45,3, 51,4, 107,9, 110,0, 114,8, 119,0, 124,8, 143,3, 155,5, 158,5, 169,7, 173,4 ppm	
HR-MS (ESI+)	445,0499 (izračunana: 445,0504)	
IR (ATR)	3511, 3185, 3065, 2956, 2853, 1732, 1640, 1585, 1547, 1527, 1438, 1426, 1401, 1371, 1322, 1272, 1206, 1175, 1155, 1113, 1068, 1015, 993, 981, 897, 865, 838, 796, 754, 731, 685, 647, 626, 609 cm ⁻¹	

4.23 Sinteza (S)-etil- 2-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-2oksoacetata

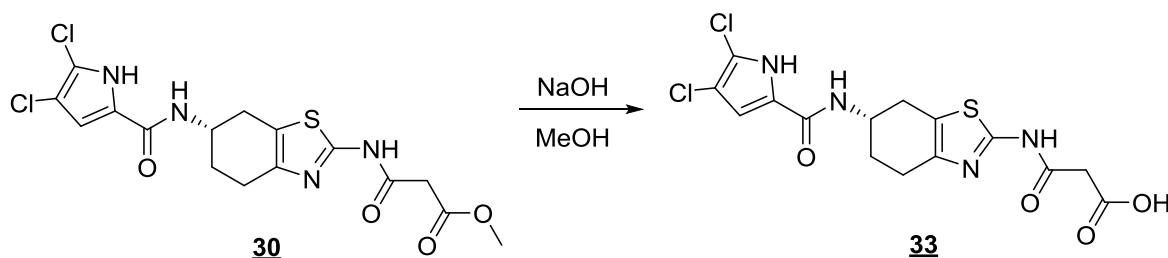


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku C iz spojine **29** (250 mg, 0,753 mmol, 1 ekv.), trietilamina (126 µL, 0,90 mmol, 1,2 ekv.) in etil oksalil klorida (**21**) (126 µL, 1,13 mmol, 1,5 ekv.). Dobili smo 171 mg spojine **32**.

(S)-etil- 2-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-
oksoacetat

Elementna sestava	C ₁₆ H ₁₇ Cl ₂ N ₄ O ₄ S	Mr = 431,29
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	52,6 %	
R _f	0,60 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	132 – 134 °C	
[α] _D (c 0,21, MeOH)	- 4,2	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,31 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 1,83-1,93 (m, 1H, H _A -7), 1,98-2,05 (m, 1H, H _B -7), 2,62-2,80 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 5,0 Hz, J ₂ = 16,1 Hz, H _B -4), 4,17-4,25 (m, 1H, CHNH), 4,29 (q, 2H, J = 7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 6,98 (s, 1H, Ar-H), 8,14 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 12,76-12,95 (br s, 1H, 2 × NH) ppm	
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 13,8, 24,1, 28,3, 28,4, 45,1, 62,4, 100,0, 107,9, 110,0, 114,8, 120,8, 124,8, 158,5 ppm	
HR-MS (ESI+)	431,0359 (izračunana: 431,0348)	
IR (ATR)	3125, 2936, 1739, 1696, 1630, 1562, 1519, 1433, 1396, 1369, 1330, 1257, 1230, 1178, 1155, 1115, 1014 cm ⁻¹	

4.24 Sintesa (S)-3-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojske kisline

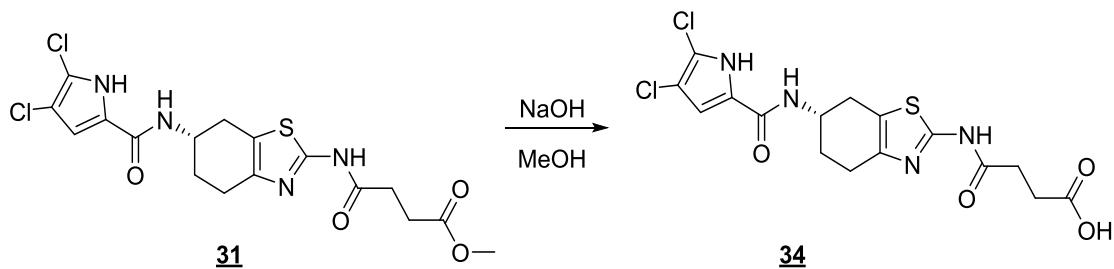


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **30** (177 mg, 0,41 mmol, 1 ekv.) in 1M NaOH (2,05 mL, 2,1 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 94 mg spojine **33**.

(S)-3-(6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-3-oksopropanojske kisline

Elementna sestava	$C_{15}H_{15}Cl_2N_4O_4S$	$M_r = 417,27$
Opis	bež kristali	
Izkoristek	55,3 %	
R_f	0 (MF: diklorometan: metanol = 9:1)	
Tališče	> 300 °C	
$[\alpha]_D$ (c 0.23, DMF)	+ 1,7	
1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,81-1,91 (m, 1H, H _A -7), 1,97-2,03 (m, 1H, H _B -7), 2,62-2,73 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,00 (dd, 1H, J_1 = 5,3 Hz, J_2 = 15,6 Hz, H _B -4), 3,46 (s, 2H, COCH ₂ CO), 4,15-4,24 (m, 1H, CHNH), 6,97 (d, 1H, J = 2,9 Hz, Ar-H), 8,13 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 12,07 (s, 1H, NH), 12,73 (d, 1H, J = 2,8 Hz, NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ 24,6, 28,3, 28,5, 42,4, 45,2, 107,8, 109,9, 114,8, 119,4, 124,7, 143,5, 155,2, 158,4, 164,3, 168,6 ppm	
HR-MS (ESI+)	417,0182 (izračunana: 417,0186)	
IR (ATR)	2043, 2025, 1928, 1736, 1686, 1624, 1561, 1523, 1438, 1400, 1333, 1262, 1220, 1161, 1082, 1017, 919, 874, 843, 810, 765, 748, 669, 657, 623, 615, 591, 583, 574, 559 cm ⁻¹	

4.25 Sinteza (S)-4-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline

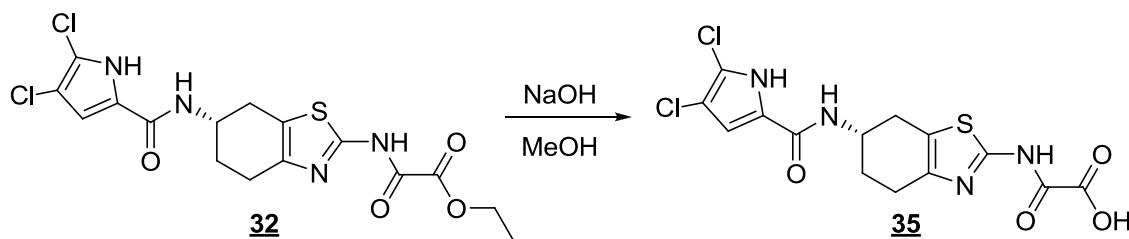


Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **31** (170 mg, 0,314 mmol, 1 ekv.) in 1M NaOH-ja (1,56 mL, 1,56 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 85 mg spojine **34**.

*(S)-4-(6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-4-oksobutanojske kisline*

Elementna sestava	$C_{16}H_{17}Cl_2N_4O_4S$	$M_r = 431,29$
Opis	beli kristali	
Izkoristek	63,0 %	
R_f	0,0 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	252 – 255 °C	
$[\alpha]_D$ (c 0,18, DMF)	+ 5,2	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,80-1,90 (m, 1H, H _A -7), 1,95-2,01 (m, 1H, H _B -7), 2,53-2,71 (m, 7H, H-5, H _A -4, COCH ₂ CH ₂ CO), 2,98 (dd, 1H, J_1 = 5,3 Hz, J_2 = 15,7 Hz, H _B -4), 4,14-4,24 (m, 1H, CHNH), 6,97 (d, 1H, J = 2,9 Hz, Ar-H), 8,12 (d, 1H, J = 7,8 Hz, CONHCH), 11,95 (s, 1H, NH/COOH), 12,20 (s, 1H, NH/COOH), 12,75 (d, 1H, J = 2,7 Hz, NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	δ 24,7, 28,3, 28,4, 28,6, 29,8, 45,3, 107,9, 109,9, 114,8, 119,0, 124,8, 143,3, 155,5, 158,5, 169,9, 173,6 ppm	
HR-MS (ESI+)	431,0352 (izračunana: 431,0348)	
IR (ATR)	3418, 2984, 2941, 2361, 1655, 1578, 1496, 1456, 1438, 1403, 1373, 1355, 1303, 1240, 1204, 1166, 1096, 1010, 987, 970, 928, 878, 844, 811, 761, 715, 686, 669, 650, 629, 612, 590, 571, 559 cm ⁻¹	

4.26 Sintesa (S)-2-(6-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-2-ilamino)-2-oksoacetne kisline



Reakcijo smo izvedli po sinteznem postopku D iz spojine **32** (161 mg, 0,373 mmol, 1 ekv.) in 1M NaOH-ja (1,86 mL, 1,86 mmol, 5 ekv.). Dobili smo 99 mg spojine **35**.

(S)-2-(6-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-2-ilamino)-2-oksoocetna kislina

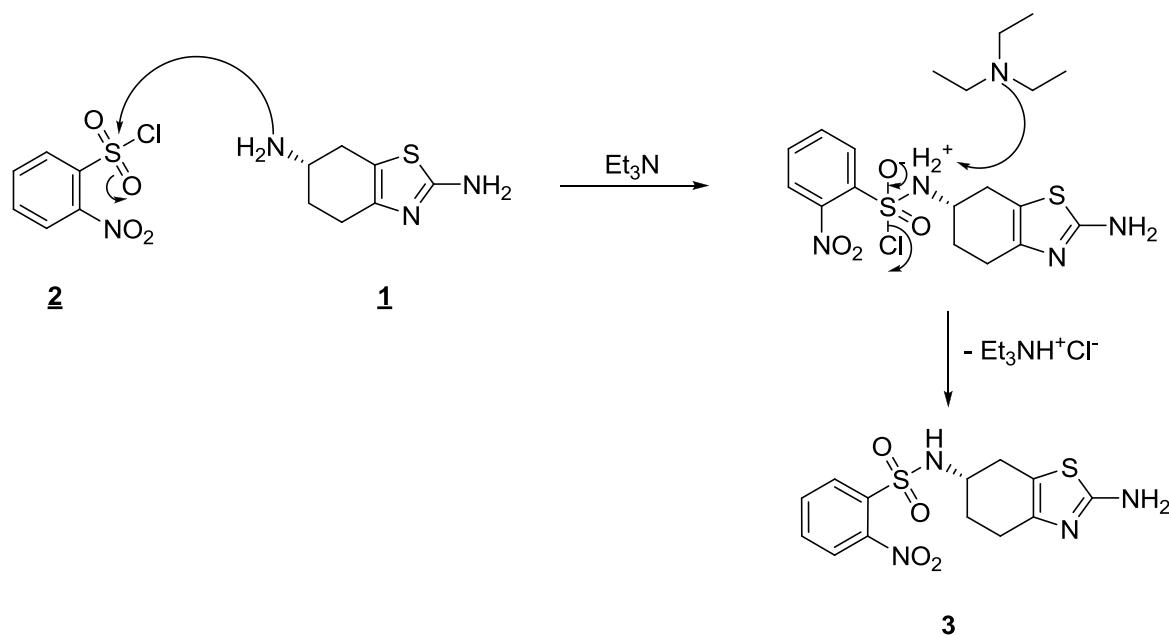
Elementna sestava	$C_{14}H_{13}Cl_2N_4O_4S$	$M_r = 403,24$
Opis	rumeni kristali	
Izkoristek	66,0 %	
R_f	0.0 (MF: diklorometan : metanol = 9:1)	
Tališče	183 - 185 °C	
$[\alpha]_D$ (c 0.23, DMF)	+6,7	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,85-1,93 (m, 1H, H _A -7), 1,98-2,04 (m, 1H, H _B -7), 2,63-2,75 (m, 3H, H-5, H _A -4), 3,04 (dd, 1H, $J_1 = 5,3$ Hz, $J_2 = 15,6$ Hz, H _B -4), 4,17-4,26 (m, 1H, CHNH), 6,98 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, Ar-H), 8,15 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, CONHCH), 12,76 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	δ 24,4, 28,3, 28,4, 45,1, 95,2, 107,9, 110,0, 114,8, 120,8, 124,8, 147,5, 158,5, 161,0 ppm	
HR-MS (ESI+)	403,0044 (izračunana: 403,0035)	
IR (ATR)	3735, 3164, 2949, 2361, 2342, 2175, 2014, 1977, 1739, 1719, 1686, 1654, 1624, 1566, 1522, 1436, 1400, 1332, 1265, 1219, 1162, 1083, 1018, 987, 920, 875, 844, 811, 767, 748, 669, 654, 638, 624, 616, 605, 590, 582, 575, 566, 559 cm ⁻¹	

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1 Uvedba metilne skupine na amino skupino na mesto 6

Izhodno spojino (*6S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-2,6-diamin smo pretvorili v bolj lipofilen sulfonamid s pomočjo 2-nitrobenzen-1-sulfonil klorida v prisotnosti trietilamina kot baze za nevtralizacijo sproščene HCl in tetrahidrofurana kot topila. Razlog za sintezo sulfonamida je selektivno alkiliranje sulfoamidnega dušika v naslednji stopnji. Če bi alkiliranje (v našem primeru metiliranje) izvajali na spojini **1**, bi lahko dobili zmes monoalkiliranega in dialkiliranega produkta in tudi čiščenje reakcijske zmesi bi bilo težavno zaradi bazičnosti in polarnosti nastalega produkta.



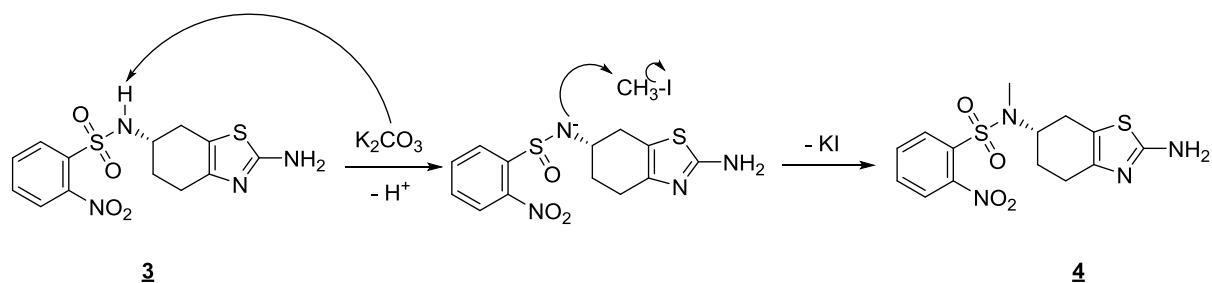
Slika 15: Mehanizem tvorbe sulfonamida.

Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije na žveplovem atomu preko tetraedričnega intermediata (slika 15). Spojina vsebuje žveplov atom, ki ima pomanjkanje elektronske gostote in reagira kot elektrofil ob napadu nukleofilne aminske skupine spojine **1**. Kljub temu da ima spojina **1** dve nukleofilni amino skupini, je nukleofilnost primarne, alifatske amino skupine na mestu 6 večja od nukleofilnosti aromatske amino skupine na mestu 2. Selektivnost reakcije smo dodatno dosegli s tem, da smo reakcijsko zmes ob dodajanju reagentov ohladili na -10 °C. Ob napadu in vezavi nukleofilne amino skupine se tvori nestabilni tetraedrični intermediat, hkrati pa pride do ločitve naboja. Dodana baza trietilamin zaradi večje bazičnosti od sulfonamidne NH skupine veže proton na pozitivno

nabitemu dušiku. pride do premika elektronov in izstopa Cl^- , ki je dobro izstopajoča skupina. Dobimo spojino **3**, pri čemer pride do tvorbe trietilamonijevega klorida.

Reakcijo smo izvajali v tetrahidrofuranu s pribitkom spojine **1**, s čimer smo želeli doseči porabo vsega 2-nitrobenzen-1-sulfonil klorida in povečati selektivnost reakcije. Po filtraciji oborjenega trietilamonijevega klorida smo spojino **3** oborili iz vodne faze, medtem ko je nezreagirani izhodni amin zaradi velike hidrofilnosti ostal raztopljen v vodni fazi.

Sinteza spojine **4** poteka po reakciji alkiliranja sulfonamidne skupine spojine **3**. Pri alkiliranju spojine **3** dodani kalijev karbonat odcepi kisli proton sulfonamidne skupine, pri tem pa dobi dušik negativen naboj, s čimer se poveča njegova nukleofilnost. Dušik sulfonamidne skupine nato kot nukleofil napade ogljikov atom metil jodida. Pri tem pride do odcepa jodidnega iona in tvorbe kalijevega jodida. Dobimo metilirano sulfonamidno skupino spojine **4** (slika 16).

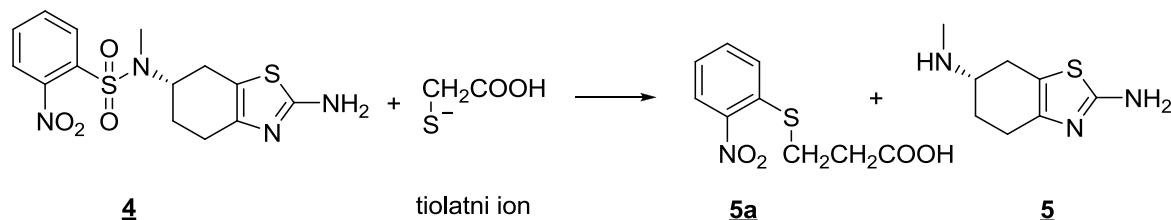


Slika 16: Predlagani mehanizem alkiliranja spojine **3**.

Alkiliranje izhodne spojine (*6S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzotiazol-6-il)-2-nitrobenzensulfonamida (spojava **3**) poteka s presežnim metil jodidem v prisotnosti K_2CO_3 v acetonitrilu kot topilu. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in odfiltrirali nastali KI in K_2CO_3 . Po naalkaljenju reakcijske zmesi z 1M NaOH smo morebitno preostalo izhodno spojino deprotonirali in nastala sol je ostala raztopljena v vodni fazi, medtem ko je spojava **4** pri ekstrakciji prešla v organsko fazo. Prebitni metil jodid smo odstranili pri uparevanju topila. Dobili smo zelo nizek izkoristek reakcije. Razlog je lahko v tem, da so pri reakciji nastali stranski produkti.

V naslednji stopnji smo hoteli odstraniti sulfonamidno zaščito (slika 17). Najprej smo pripravili tiolatni ion, ki omogoča odstranitev sulfonamidne zaščitne skupine. V etanol, ki ima vlogo topila, smo dodali bazo LiOH , ki je ob dodatku tioglikolne kisline tvorila tiolatni ion. Pri odščiti pride do nastanka spojine **5** in 2-(2-nitrofenil)tioacetne kisline (spojava **5a**). Spojino **5a** odstranimo ob dodatku 1 M NaOH , saj se deprotonira in

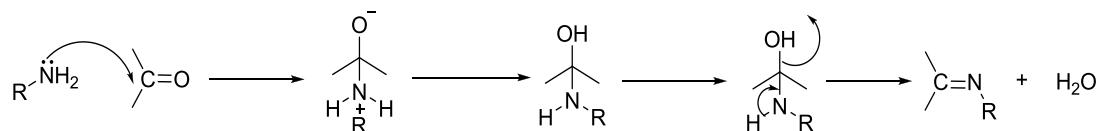
pri ekstrakciji z diklorometanom ostane v vodni fazi, medtem ko spojina **5** preide v organsko fazo. Reakcija ni uspela in je nismo ponavljali zaradi majhne količine izhodne spojine.



Slika 17: Odstanitev zaščitne sulfonamidne skupine s tiolatnim ionom (prirejeno po 25).

5.1.2. Reduktivno aminiranje

Pri sintezi spojine **8** smo najprej tvorili imin med aminsko skupino ene spojine in karbonilno skupino druge spojine (slika 18), nato pa nastali imin reducirali z $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Reakcijo imenujemo reduktivno aminiranje. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ je šibak hidridni reducent, ki ga lahko dodamo v reakcijsko zmes brez predhodne izolacije imina. Pogosto uporabljena reducenta za redukcijo imina v amin sta še NaCNBH_3 in H_2 , Pd/C (26), vendar je v primeru slednjega potrebno najprej izolirati imin.

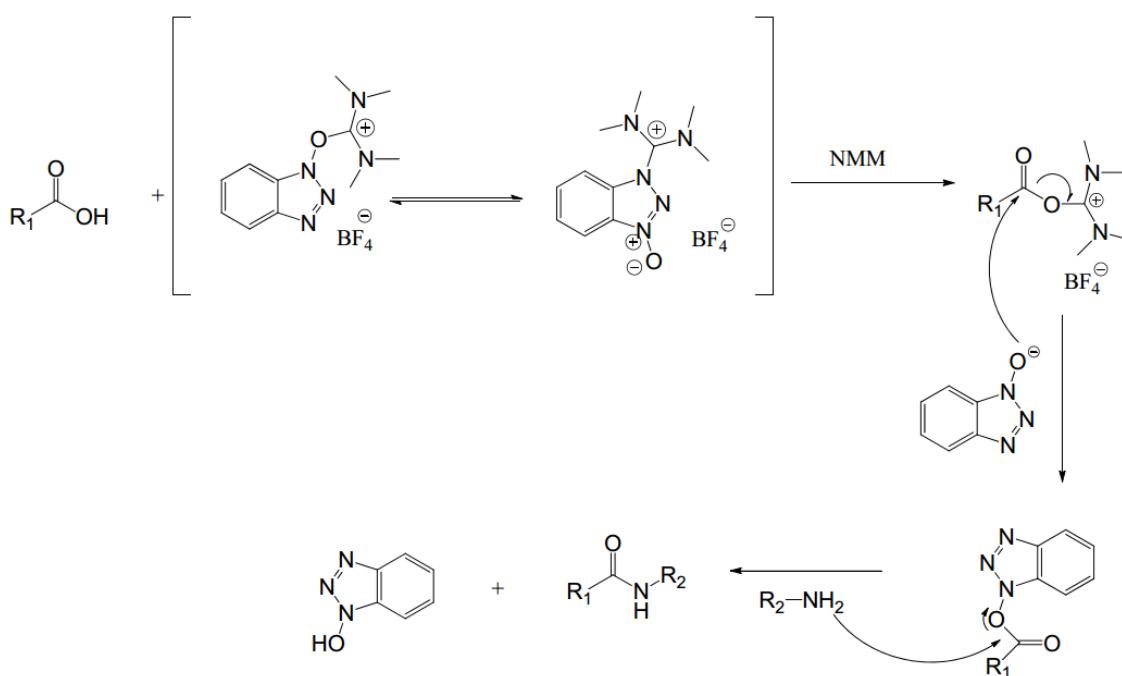


Slika 18: Mehanizem nastanka imina (prirejeno po 26).

5.1.3. Sinteza amidov s pomočjo sklopitvenih reagentov

Pri sintezi spojin **10**, **12**, **14** in **16** smo uporabljali kot izhodno spojino ustreznou karboksilno kislino. Reakcija med karboksilno skupino ene spojine in aminsko skupino druge spojine poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije na karbonilnem C atomu. Adiciji amina na karbonilni C atom sledi eliminacija vode. Karboksilne kisline so napram kislinskim kloridom veliko manj reaktivne, zato smo v reakcijsko zmes dodali sklopitveni reagent TBTU. Poleg TBTU se pogosto uporablajo tudi ostali sklopitveni reagenti, kot so karbonil diimidazol (CDI), dicikloheksil karbodiimid (DCC), benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) in drugi. TBTU aktivira karboksilno kislino na ta način, da se s pomočjo dodane baze (npr. trietilamin, *N*-metilmorfolin

(NMM)), ki ionizira karboksilno kislino, tvori aktiviran ester z elektrofilnim delom molekule TBTU. V naslednji stopnji nastane aktiviran ester z 1-hidroksibenzotriazolnim delom TBTU-ja. Pri tem pride do premestitve elektronov in izstopa tetrametilsečnine kot stranskega produkta. V končni fazi reakcije se nukleofilni amin veže na karbonilni ogljikov atom, pri tem pa pride do izstopa 1-hidroksibenzotriazola. Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 19 (26).



Slika 19: Mehanizem reakcije med karboksilno kislino in aminom ob dodatku TBTU in baze N-metilmorfolina (NMM) (prirejeno po 27).

5.1.4. Kloriranje pirola

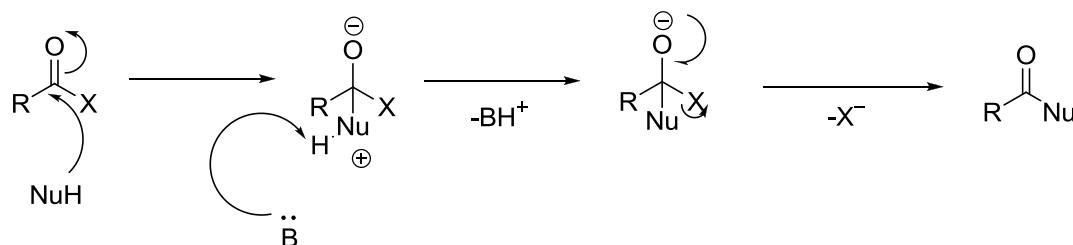
Kloriranje izhodne spojine 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etanona (spojava **26**) poteka s presežnim sulfuril kloridom v kloroformu kot topilu. Reakcijsko zmer smo prepihali z inertnim plinom argonom, saj prisotnost kisika lahko povzroči oksidacijo izhodnega pirola. Po končani reakciji smo reakcijsko zmes sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃. Pri tem smo odstranili sulfuril klorid, medtem ko smo spojini **26** in **28** med seboj ločili s flash kolonsko kromatografijo. Reakcija je potekla po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije.

5.1.5. Sinteza spojine **29**

Pri sintezi spojine **29** smo uporabljali kot izhodno spojino 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanon. Sinteza je potekala v *N,N*-dimetilformamidu kot topilu. Reakcija med karbonilno skupino spojine **28** in aminsko skupino spojine **1** poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije na karbonilnem C atomu. Adiciji amina na karbonilni C atom sledi eliminacija CHCl₃.

5.1.6. Sinteza amidov na mestu 2 s kislinskimi kloridi

Po enakem mehanizmu je potekala tudi sinteza spojin **18**, **20**, **22**, **30**, **31** in **32**, le da imamo namesto žveplovega atoma tu elektrofilni karbonilni C atom (slika 20). Sinteze teh spojin so potekale v topilu 1,4-dioksanu (25, 26).



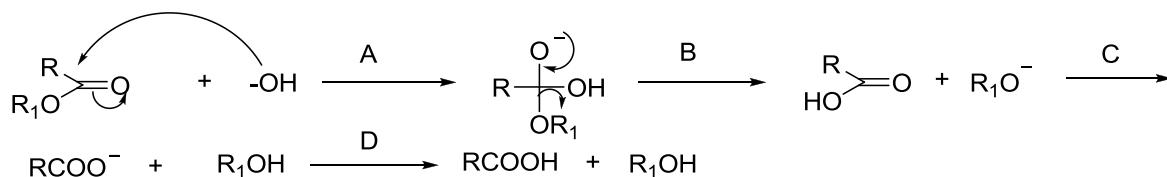
Slika 20: Osnovni mehanizem nukleofilne substitucije s tvorbo tetraedričnega intermediata, po katerem je potekala sinteza spojin **18**, **20**, **22**, **30**, **31** in **32** (prijejeno po 28).

5.1.7. Alkalna hidroliza estrov

Izhodne spojine **18**, **20**, **22**, **30**, **31** in **32** smo raztopili v metanolu in dodali pribitek 1 M natrijevega hidroksida. Poteckla je alkalna hidroliza estov. Hidrolize estrov so nukleofilne substitucije, ki so katalizirane kislinsko ali bazično. Lahko se uporabljujo različna topila, kot so dioksan, etanol, voda, tetrahidrofuran (THF) in metanol. Mehanizem alkalne hidrolize poteka po naslenjem vrstnem redu (slika 21):

- nukleofilni napad ^-OH skupine, ki se veže na esterski karbonilni ogljikov atom
- po prerazporeditvi elektronov pride do odcepa alkoholatnega aniona in nastanka kisline
- v alkalnem mediju pride do nastanka alkohola in karboksilatnega aniona

D. v kislem mediju karboksilatni anion pritegne proton, pri tem pa se sol karboksilne kisline pretvori v nedisociirano obliko (prirejeno po 29).



Slika 21: Mehanizem alkalne hidrolize estrov.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

5.2.1 IC₅₀ vrednosti določene na DNA girazi iz bakterije *Escherichia coli*

Končne sintetizirane spojine smo biološko ovrednotili na DNA girazi iz *E. coli*. Iz rezultatov testiranja na DNA girazi iz *E. coli* (preglednica 1) je razvidno, da spojina **12**, ki vsebuje 5-fluoroindolni obroč izkazuje šibko zaviralno aktivnost ($IC_{50} = 268 \mu M$), medtem ko spojina **14**, ki vsebuje namesto 5-fluoroindolnega fragmenta 5-kloroindolni obroč nima zaviralne aktivnosti. Razlog za slabšo aktivnost spojin **12** in **14** v primerjavi z aktivnostjo spojine **16**, ki vsebuje nesubstituiran indolni obroč je v velikosti substituenta na mestu 5. 5-kloroindolni in 5-fluoroindolni fragment sta očitno prevelika in se slabše prilegata v hidrofobni žep ATP vezavnega mesta DNA giraze iz *E. coli* v primerjavi z nesubstituiranim indolom. Posledično nista sposobna tvoriti optimalnih vodikovih vezi s stransko verigo Asp73 in strukturno ohranjeno molekulo vode. Spojina **10** s furanovim obročem izgubi zaviralno aktivnost, saj ni sposobna tvoriti vodikove vezi s stransko verigo Asp73.

Preglednica 1: IC₅₀ vrednosti spojin substituiranih s furanom, 5-fluoroindolom in 5-kloroindolom določene na DNA girazi *E. coli* in MIK določene na ΔtolC in ΔimpA sevih *E. coli* (n.d. – ni določeno).

Oznaka	Struktura	IC ₅₀	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> ΔtolC	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> ΔimpA
10		>100 µM	n.d.	n.d.
12		268 µM	>256	>256

14		>100 µM	n.d.	n.d.
16		21 µM	n.d.	n.d.

Sintezo spojin smo nadalje načrtovali tako, da smo ohranili indolni obroč, medtem ko smo aminsko skupino na mestu 2 tiazolnega obroča acilirali z oksalilno, malonilno in sukcinilno skupino (tabela 2). Vse acilirane spojine (**20**, **22–24**), z izjemo spojine **18** ($IC_{50} = 34,9 \mu M$), izkazujejo boljšo zaviralno aktivost napram spojini **16** ($IC_{50} = 21 \mu M$). Acilna veriga na aminski skupini na mestu 2-tiazolnega obroča najverjetneje tvori dodatne interakcije s stransko verigo Arg136. Izkazalo se je, da imajo spojine **18**, **20** in **22**, kljub različni dolžini acilnega fragmenta, podobne zaviralne aktivnosti (IC_{50} vrednosti med 9,1 μM in 34,9 μM). Rahlo boljša zaviralna aktivnost spojin se je pokazala pri spojinah **23**, **24** in **25**, ki imajo na koncu verige prosto karboksilno skupino, vendar ni bistvenih razlik v zaviralni aktivnosti (7,69 μM – 8,11 μM) v primerjavi z estri.

Preglednica 2: IC_{50} vrednosti spojin z indolamidnim fragmentom, določene na DNA girazi iz *E. coli* in MIK določene na Δ tolC in Δ impA sevih *E. coli* (n.d. – ni določeno).

Oznaka	Struktura	IC_{50}	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> Δ tolC	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> Δ impA
18		34,9 μM	>256	>256
20		9,1 μM	n.d.	n.d.
22		10,4 μM	n.d.	n.d.
23		7,63 μM	>256	>256
24		8,11 μM	>256	>256

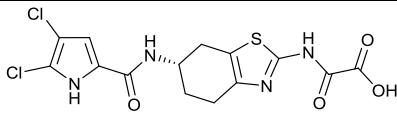
25		7,69 µM	>256	128
-----------	--	---------	------	-----

Pri spojinah **30-35** smo indolni obroč zamenjali z dikloropirolnim obročem, prav tako pa smo amino skupino na mestu 2 tiazolnega obroča acilirali z oksalilno, malonilno in sukcinilno skupino, ter tako pripravili estre in kisline (preglednica 2). Vse te spojine (**30**, **32-35**), razen spojine **31**, imajo zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju. Najmočnejšo zaviralno aktivnost ima kislina **33** z malonilnim fragmentom ($IC_{50} = 178$ nM), medtem ko imata spojini s sukcinilnim in oksalilnim fragmentom s prosto karboksilno skupino nekoliko slabšo zaviralno aktivnost (spojava **35** ima $IC_{50} = 588$ nM, medtem ko ima spojina **34** $IC_{50} = 960$ nM).

Spojina **32** ($IC_{50} = 378$ nM) s pripetim oksalilnim fragmentom in spojina **30** z malonilnim fragmentom ($IC_{50} = 330$ nM) imata primerljivo aktivnost, medtem ko spojina **31** z najdaljšim sukcinilnim fragmentom izkazuje najslabšo zaviralno aktivnost na encimu z IC_{50} vrednostjo 36,0 µM (preglednica 3).

Preglednica 3: IC_{50} vrednosti spojin z dikloropirolnim fragmentom, določene na DNA girazi iz *E. coli* in MIK določene na $\Delta tolC$ in $\Delta impA$ sevih *E. coli*.

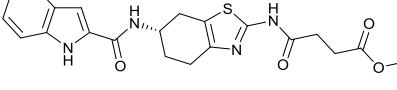
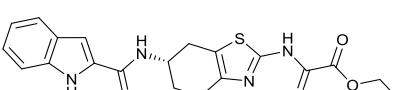
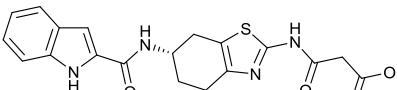
Oznaka	Struktura	IC_{50}	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> $\Delta tolC$	MIK (µg/mL) <i>E. coli</i> $\Delta impA$
30		330 nM	32	32
31		36,0 µM	>256	>256
32		378 nM	256	>256
33		178 nM	>256	>256
34		960 nM	>256	>256

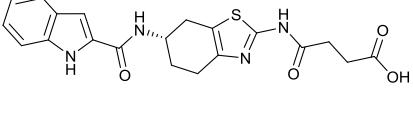
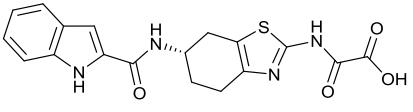
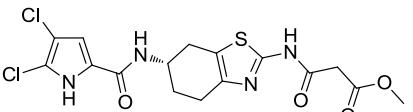
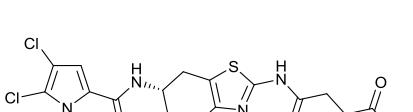
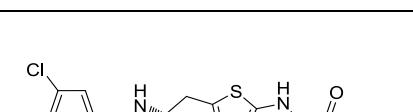
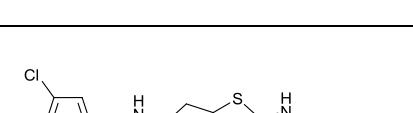
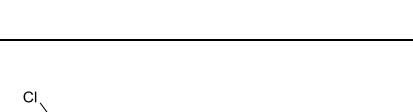
35		588 nM	>256	>256
-----------	---	--------	------	------

5.2.2 Rezidualne aktivnosti spojin, določene na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*

Spojinam **20**, **22**, **23**, **24**, **25**, **30**, **31**, **32**, **33**, **34** in **35** smo določili rezidualno aktivnost tudi na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Rezidualna aktivnost je bila določena pri dveh koncentracijah, 10 µM in 100 µM. Spojine z indolnim obročem žal niso izkazale zaviralega delovanja na DNA girazo po Gramu pozitivnega *S. aureus*. Prav tako niso izkazale zaviralnega delovanja na topoizomerazo IV po Gramu pozitivnega *S. aureus* in po Gramu negativne *E. coli*. Šibko rezidualno aktivnost izkazujeta le spojini **34** in **35** z dikloropirolnim fragmentom (preglednica 4).

Preglednica 4: Rezidualna aktivnost spojin določene na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*.

Oznaka	Struktura	Rezidualna aktivnost DNA giraze iz <i>S. aureus</i>	Rezidualna aktivnost topoizomeraze IV iz <i>E. coli</i>	Rezidualna aktivnost topoizomeraze IV iz <i>S. aureus</i>
20		RA (100 µM) = 87 % RA (10 µM) = 80 %	RA (100 µM) = 101 % RA (10 µM) = 100 %	RA (100 µM) = 104 % RA (10 µM) = 102 %
22		RA (100 µM) = 76 % RA (10 µM) = 81 %	RA (100 µM) = 101 % RA (10 µM) = 101 %	RA (100 µM) = 99 % RA (10 µM) = 108 %
23		RA (100 µM) = 118 % RA (10 µM) = 114 %	RA (100 µM) = 96 % RA (10 µM) = 98 %	RA (100 µM) = 103 % RA (10 µM) = 99 %

24		RA (100 µM) = 87 % RA (10 µM) = 80 %	RA (100 µM) = 99 % RA (10 µM) = 101 %	RA (100 µM) = 79 % RA (10 µM) = 102 %
25		RA (100 µM) = 110 % RA (10 µM) = 79 %	RA (100 µM) = 47 % RA (10 µM) = 97 %	RA (100 µM) = 99 % RA (10 µM) = 97 %
30		RA (100 µM) = 53.3 % RA (10 µM) = 73.2 %	RA (100 µM) = 97 % RA (10 µM) = 99 %	RA (100 µM) = 91 % RA (10 µM) = 107 %
31		RA (100 µM) = 86 % RA (10 µM) = 69 %	RA (100 µM) = 100 % RA (10 µM) = 99 %	RA (100 µM) = 93 % RA (10 µM) = 96 %
32		RA (100 µM) = 57.7 % RA (10 µM) = 103.7 %	RA (100 µM) = 35 % RA (10 µM) = 99 %	RA (100 µM) = 98 % RA (10 µM) = 107 %
33		RA (100 µM) = 86.6 % RA (10 µM) = 109.6 %	RA (100 µM) = 98 % RA (10 µM) = 100 %	RA (100 µM) = 102 % RA (10 µM) = 106 %
34		RA (100 µM) = 32.1 % RA (10 µM) = 86.0 %	RA (100 µM) = 30 % RA (10 µM) = 100 %	RA (100 µM) = 25 % RA (10 µM) = 102 %

35		RA (100 µM) = 38.7 % RA (10 µM) = 76.1 %	RA (100 µM) = 18 % RA (10 µM) = 99 %	RA (100 µM) = 42 % RA (10 µM) = 105 %
-----------	--	---	---	--

5.2.3 Protibakterijska aktivnost

Vsem končnim spojinam smo določili tudi njihovo protibakterijsko aktivnost na dveh po Gramu pozitivnih (*S. aureus*, *E. faecium*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bakterijskih sevih. Vse spojine so se izkazale za neaktivne, z izjemo spojine **30**, ki je izkazovala šibko protibakterijsko aktivnost na *S. aureus* pri 50 µM (52,3% inhibicija rasti po 24 h).

Spojinam **12**, **18**, **23**, **24**, **25**, **30**, **31**, **32**, **33**, **34** in **35** smo določili tudi njihovo protibakterijsko aktivnost na Δ tolC in Δ imp4213 sevih *E. coli* (preglednice 1-3). Δ tolC sev *E. coli* nima funkcionalnega *tolC* gena, ki nosi zapis za izlivno črpalko. Tak bakterijski sev *E. coli* v zunanji membrani nima izlivnih črpalk in posledično ne črpa spojin iz celice. Δ imp4213 sev *E. coli* ima prisotno mutacijo v *imp* lokusu. Zaradi prisotne mutacije ima takšen bakterijski sev povečano permeabilnost zunanje membrane in posledično spojine lažje preidejo v celico. Vse spojine, z izjemo spojine **30**, imajo visoke MIK vrednosti na Δ tolC in Δ imp4213 sevih *E. coli*.

Spojine ne izkazujejo protibakterijske aktivnosti na po Gramu pozitivnih bakterijah, saj izkazujejo slabo zaviralno aktivnost na izoliranih encimih, DNA girazi in topoizomerazi IV (preglednica 4). Prav tako ne izkazujejo protibakterijske aktivnosti proti po Gramu negativnih bakterijah (*E. coli*). Razlog je najverjetneje v tem, da *E. coli* z izlivnimi črpalkami črpa spojine iz celice. Drugi problem je tudi velika polarnost spojin in pri derivatih s karboksilno kislino njihova kislost, kar otežuje prehod celične stene. Primer je spojina **30**, ki je izkazovala boljšo protibakterijsko aktivnost (MIK = 32 µg/mL) na sevu s povečano prepustnostjo membrane in na sevu brez izlivne črpalke kot na normalnem sevu *E. coli* (MIK > 256 µg/mL). Koncentracija spojine v celici je posledično premajhna, da bi lahko izkazovala protibakterijsko aktivnost.

6 ZAKLJUČEK

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali indolamidne in dikloropirolamidne zaviralce encimov DNA giraze iz bakterije *E. coli*. Končnim spojinam smo določili IC₅₀ vrednosti na DNA girazi iz bakterije *E. coli*, rezidualne aktivnosti na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus* ter protibakterijsko aktivnost na dveh po Gramu pozitivnih (*S. aureus*, *E. faecium*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli*, *P. aeruginosa*) bakterijskih sevih.

Spojine **18**, **20**, **22**, **23**, **24** in **25** z indolnim obročem so pokazale nizko zaviralno aktivnost v mikromolarnem območju (IC₅₀ = 7,69 µM – 34,9 µM). Boljšo zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju so izkazale spojine **30**, **32**, **33**, **34** in **35** z dikloropirolnim obročem (IC₅₀ = 178 nM – 960 nM).

Končne spojine, z izjemo spojin **34** in **35**, niso pokazale rezidualne aktivnosti na DNA girazi iz *S. aureus* in topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Spojini **34** in **35** z dikloropirolnim obročem in prosto karboksilno kislino izkazujeta šibko rezidualno aktivnost na obeh encimih. Vse spojine, razen spojine **30**, ki izkazuje šibko protibakterijsko aktivnost na *S. aureus* pri 50 µM, niso izkazale protibakterijske aktivnosti. Razlog v odsotnosti protibakterijske aktivnosti pri po Gramu pozitivnih bakterijskih sevih je v tem, da imajo spojine slabo zaviralno aktivnost. Pri po Gramu negativni *E. coli* pa najverjetneje pride do črpanja spojin iz celice preko izlivnih črpalk in zaradi neprimernih fizikalno-kemijskih lastnosti do slabega prehajanja celične stene, zato je njihova koncentracija v celici premajhna, da bi izkazovale protibakterijsko aktivnost. Možno pa je tudi, da je kljub nanomolarni zaviralni aktivnosti spojin le-ta še vedno prešibka za doseganje protibakterijske aktivnost, na kar nakazujejo nekateri literurni podatki.

Dikloropirolamidni derivati predstavljajo zanimivo skupino spojin za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo zaviralcev bakterijskih encimov DNA giraze in topoizomeraze IV, pri katerih lahko izboljšamo fizikalno-kemijske lastnosti in zaviralno aktivnost spojin in s tem dosežemo boljše protibakterijsko delovanje.

7 LITERATURA

1. Demain AL: Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev* 2009; 29(6): 821-42.
2. Dale MM, Haylett DG: *Pharmacology condensed*. 2nd ed, Churchill Livingstone, Edinburgh; New York, 2004: 106-12.
3. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: *Foye's principles of medicinal chemistry*. 7th ed, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 1073-124.
4. Clark MA: *Lippincott's illustrated reviews. Pharmacology*. 5th ed, Lippincott's illustrated reviews Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2012: 369-80.
5. Madigan MT, Martinko JM, Parker J: *Brock biology of microorganisms*. 9th ed, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2000: 68-75.
6. <http://micro.digitalproteus.com/morphology4.php>, dostopano dne 17.6.2014.
7. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, Kristl J, Doljak B, Slanc P, Kočevar N: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 27-33.
8. Gubaev A, Klostermeier D: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA Repair (Amst)* 2014; 16: 23-34.
9. Sinden RR: The helix turns at 60: writhing free in chromosomes. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(3): 251-3.
10. Clarke DJ: *DNA topoisomerases. Methods and protocols. Methods in molecular biology*, Humana Press, University of Minnesota Medical school, Minneapolis, MN, 2009: 582 .
11. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem* 2014; 14(1): 130-51.
12. Reece RJ, Maxwell A: DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1991; 26(3-4): 335-75.
13. 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.

14. Škedelj V, Tomašić T, Peterlin Mašič L, Zega A: ATP-binding site of bacterial enzymes as a target for antibacterial drug design. *J Med Chem* 2011; 54(4): 915-29.
15. Brown ED, Wright GD: New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem Rev* 2005; 105(2): 759–774.
16. Eakin AE, Green O, Hales N, Walkup GK, Bist S, Singh A, Mullen G, Bryant J, Embrey K, Gao N, Breeze A, Timms D, Andrews B, Uria-Nickelsen M, Demeritt J, Loch JT 3rd, Hull K, Blodgett A, Illingworth RN, Prince B, Boriack-Sjodin PA, Hauck S, MacPherson LJ, Ni H, Sherer B: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: fragment-based nuclear magnetic resonance screening to identify antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(3): 1240-6.
17. Hawkey PM: The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ* 1998; 317(7159): 657–660.
18. http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html, dostopano dne 17.6.2014.
19. Silver LL: Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol* 2006; 71(7): 996-1005.
20. Dar MA, Sharma A, Mondal N, Dhar SK: Molecular cloning of apicoplast-targeted Plasmodium falciparum DNA gyrase genes: unique intrinsic ATPase activity and ATP-independent dimerization of PfGyrB subunit. *Eukaryotic cell* 2007; 6(3): 398–412.
21. Sherer BA, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch JT 3rd, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjodin A, Read J, DeGrace N, Uria-Nickelsen M, Illingworth RN, Eakin AE: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(24): 7416-20.
22. Wohlkonig A, Chan PF, Fosberry AP, Homes P, Huang J, Kranz M, Leydon VR, Miles TJ, Pearson ND, Perera RL, Shillings AJ, Gwynn MN, Bax BD: Structural basis of quinolone inhibition of type IIa topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(9): 1152-3.
23. Flatman RH, Eustaquio A, Li SM, Heide L, Maxwell A: Structure-activity relationship of aminocoumarin-type gyrase and topoisomerase IV inhibitors obtained by combinatorial biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4): 1136–42.
24. 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(14): 6413-26.

25. Živec M, Anžič B, Gobec S: A novel scalable synthesis of pramipexole. *Org Proc Res Develop* 2010; 14(5): 1125–1129.
26. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/2/vlu/carbonyle/nucleophile_n.vl u/Page/vsc/de/ch/2/oc/stoffklassen/systematik_funktionelle_gruppen/carbonyle/carbo nylreaktionen/n_nucl_imine.vscml.html, dostopano dne 17.6.2014.
27. Balalaie S, Mahdidoust M, Eshaghi-Najafabadi R: 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate as an efficient coupling reagent for the amidation and phenylhydrazation of carboxylic acids at room temperature. *J Iranian Chem Soc* 2007; 4(3): 364-369.
28. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
29. Tišler M.: Organska kemija. DZS, Ljubljana, 1982; 114-119.