

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ČRT FERANT

MAGISTRSKA NALOGA

**SINTEZA 4-BROMO- IN 3,4-DIBROMO-5-METIL-1*H*-PIROL-
2-KARBOKSAMIDOV KOT NOVIH ATP KOMPETITIVNIH
ZAVIRALCEV BAKTERIJSKE DNA GIRAZE B**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ČRT FERANT

**SINTEZA 4-BROMO- IN 3,4-DIBROMO-5-METIL-1H-PIROL-
2-KARBOKSAMIDOV KOT NOVIH ATP KOMPETITIVNIH
ZAVIRALCEV BAKTERIJSKE DNA GIRAZE B**

**SYNTHESIS OF 4-BROMO- AND 3,4-DIBROMO-5-METHYL-1H-PYRROLE-
2-CARBOXAMIDES AS NOVEL ATP-COMPETITIVE
INHIBITORS OF BACTERIAL DNA GYRASE B**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, biološka testiranja pa so bila opravljena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vso pomoč, prijaznost, potrpežljivost in strokovne nasvete tako pri laboratorijskem delu kot pri pisanju naloge.

Staršem in bratu Žanu se zahvaljujem za vso podporo in nasvete tekom študija.

Prav tako se zahvaljujem vsem prijateljem za odlične spomine, ki smo jih ustvarili v študentskih časih. Bilo je nepozabno!

Izjava

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

Ljubljana, 2015

Črt Ferant

VSEBINA

VSEBINA.....	II
POVZETEK	IV
ABSTRACT	IV
OKRAJŠAVE.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 BAKTERIJSKA REZISTENCA	1
1.2 TOPOIZOMERAZE.....	2
1.2.1 BAKTERIJSKA DNA-GIRAZA	3
1.2.2 TOPOIZOMERAZA IV	6
1.3 INHIBITORJI DNA-GIRAZE B.....	6
1.3.1 ZNANI INHIBITORJI DNA-GIRAZE B	6
1.3.2 ANALOGI OROIDINA	8
2 NAMEN DELA.....	10
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.2 METODE	13
3.2.1 KROMATOGRFSKE METODE.....	13
3.2.2 SPEKTROSKOPSKE METODE	14
3.2.3 TEMPERATURA TALIŠČA.....	14
3.2.4 BIOLOŠKA TESTIRANJA	14
3.2.5 RISANJE IN POIMENOVANJE SPOJIN	15
4 EKSPERIMENTALNO DELO	16
4.1 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona ter 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dibromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona	16
4.2 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	17
4.3 Sinteza (<i>S</i>)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dibromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	19

4.4 Sinteza (S)-metil 3-((6-(4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata.....	20
4.5 Sinteza (S)-metil 3-((6-(3,4-dibromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata.....	21
4.6 Sinteza (S)-3-((6-(4-bromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline	22
4.7 Sinteza (S)-3-((6-(3,4-dibromo-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline	24
4.8 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona in 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona	25
4.9 Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-kloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	26
4.10 Sinteza (S)-metil 3-((6-(4-kloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata.....	28
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	30
5.1 KOMENTAR SINTEZE	30
5.1.1 HALOGENIRANJE PIROLNEGA OBROČA.....	30
5.1.2 TVORBA AMIDA Z (S)-4,5,6,7-TETRAHIDROBENZO[1,2- <i>d</i>]TIAZOL-2,6-DIAMINOM.....	32
5.1.3 TVORBA AMIDA Z METILMALONIL KLORIDOM	33
5.1.4 ALKALNA HIDROLIZA ESTRA	34
5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ.....	36
5.2.1 DOLOČANJE INHIBITORNE AKTIVNOSTI NA IZOLIRANIH ENCIMIHI.....	36
5.2.2 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI - MIC ₉₀ IN MBC ₉₉	41
6 SKLEP	44
7 LITERATURA	46

POVZETEK

Vse pogostejše pojavljanje bakterijskih sevov, ki so odporni proti večini ali celo vsem razpoložljivim protibakterijskim učinkovinam na tržišču, nas žene k iskanju novih tarč ali novih mehanizmov delovanja na že znane tarče za delovanje protibakterijskih učinkovin. Bakterijska DNA-giraza je znana tarča za delovanje protibakterijskih učinkovin, kot so fluorokinoloni, ki delujejo na njeno podenoto A. Zaradi naraščajoče rezistence tudi proti fluorokinolonom je potrebno iskati nove učinkovine, ki bodo delovale po novem mehanizmu in se vezale v ATP vezavni žep na podenoti B DNA-giraze. Sintetizirali smo nove strukturne analoge oroidina, alkaloida morskih spužev iz rodu *Agelas*, ki imajo za skelet 4-bromo- in 3,4-dibromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid ter 4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid in jim določili zaviralno aktivnost na izolirani DNA-girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*, katere so zavirali v nanomolarnih do mikromolarnih koncentracijah. Najnižje vrednosti IC₅₀ so znašale 0,32 μM na DNA-girazi iz *E. coli*, 7,3 μM na DNA-girazi iz *S. aureus*, ~100 μM na topoizomerazi IV iz *E. coli* in 5,2 μM na topoizomerazi iz *S. aureus*. Dve spojini sta izkazali tudi protibakterijsko delovanje proti grampozitivnim *Staphylococcus aureus* in *Enterococcus faecalis*, in sicer sta vrednosti MIC₉₀ znašali 125 μM in 25 μM. Proti gramnegativnim bakterijam *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* ni bila aktivna nobena izmed sintetiziranih spojin.

Ključne besede: DNA-giraza, protibakterijsko, oroidin, 1*H*-pirol-2-karboksamid, zaviranje, rezistenca

ABSTRACT

The increasing incidence of bacterial strains, which are resistant against most or even all available antibacterial drugs on the market, forces us to keep searching for new targets or new mechanisms of action of drugs on known targets for antibacterial drug action. Bacterial DNA gyrase is a well known target for action of antibacterial drugs, such as fluoroquinolones, which bind to its subunit A. Due to the rise of resistance against fluoroquinolones we need to find new drugs acting via different mechanisms, such as binding to the ATP-binding pocket of

the subunit B. We prepared new structural analogues of oroidin, an alkaloid isolated from sponges from the genus *Agelas*, which possess a 4-bromo- and 3,4-dibromo-5-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide and 4-chloro-5-methyl-1*H*-pyrrole-2-carboxamide moiety and tested their *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* DNA gyrase and topoisomerase IV inhibition, which were inhibited in nanomolar to micromolar concentrations. The lowest IC₅₀ values were 0,32 μM for *E. coli* DNA gyrase, 7,3 μM for *S. aureus* DNA gyrase, ~100 μM for *E. coli* topoisomerase IV and 5,2 μM for *S. aureus* topoisomerase IV. Two inhibitors also exhibited antibacterial activity against gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* with the MIC₉₀ values of 125 μM and 25 μM. However, none of the synthesised inhibitors showed activity against the gram-negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: DNA gyrase, antibacterial, oroidin, 1*H*-pyrrole-2-carboxamide, inhibition, resistance

OKRAJŠAVE

ATP	adenozin-5'-trifosfat
ATR	oslabljena popolna odbojnost (attenuated total reflectance)
br s	širok singlet
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
d	dublet
dd	dublet dubleta
ESI	ionizacija z razprševanjem
GyrA	DNA-giraza A
GyrB	DNA-giraza B
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
MeOD- <i>d</i> ₄	devteriran metanol
J	sklopitvena konstanta
m	multiplet
M	molarna koncentracija
MBC ₉₉	minimalna baktericidna koncentracija, ki ubije vsaj 99,9% mikroorganizmov
MIC ₉₀	minimalna inhibitorna koncentracija, ki zavre rast 90% mikroorganizmov
ParC	podenota C topoizomeraze IV
ParE	podenota E topoizomeraze IV
s	singlet
t	triplet
TLC	tankoplastna kromatografija
topoIV	topoizomeraza IV

1 UVOD

1.1 BAKTERIJSKA REZISTENCA

Vse odkar so bile odkrite prve učinkovine s protibakterijskim delovanjem, se človeštvo spopada s problemom pojavljanja odpornosti bakterij proti njim, kar ima za posledico omejeno uporabnost nekaterih protibakterijskih učinkovin. Od odkritja penicilina leta 1928 se je do danes pojavilo že ogromno protimikrobnih učinkovin, a hkrati se pojavljajo tudi vedno novi bakterijski sevi, odporni proti njim. Danes je prevalenca bakterije *Staphylococcus aureus*, odporne proti meticilinu, od 1% (v Skandinavskih državah) pa tudi do 80% (v nekaterih državah Azije), pojavljajo pa se tudi že takšni sevi, ki so odporni proti večim ali pa celo proti vsem protimikrobnim učinkovinom. Pojavnost je močno povezana z nepravilno rabo protibakterijskih učinkovin. V populaciji bakterij preživijo le tiste z genomom, ki jim omogoča preživetje. Geni se med sevi iste vrste ali med različnimi vrstami lahko prenašajo z bakteriofagi, golo DNA, plazmidi ali transpozoni. Rezistenca proti zaviralcem topoizomeraz tipa II, med katere sodita DNA-giraza in topoizomeraza IV, se pojavlja predvsem zaradi spremembe vezavnega mesta učinkovine, ali pa povečanega izražanja endogenih izlivnih črpalk (1, 2, 3).

Kljub temu, da rezistenca proti protibakterijskim učinkovinom narašča, pa je od leta 2000 do danes na tržišče prišlo le nekaj učinkovin z novim mehanizmom delovanja (od odkritja fluorokinolonov v šestdesetih letih do leta 2000 ni na tržišče prišel noben nov razred protibakterijskih učinkovin (4)), kot sta denimo linezolid, ki spada v razred oksazolidinonov, ter daptomicin, ki spada v razred lipopeptidov. Večja farmacevtska podjetja pa tudi opuščajo raziskovanje in razvoj novih protibakterijskih učinkovin, kar je precej zaskrbljujoče (4). Če bi prihajali na tržišče vedno novi razredi protibakterijskih učinkovin z delovanjem na nove tarče, potem pojav odpornosti proti zdaj uporabljanim učinkovinom s protibakterijskim delovanjem niti ne bi bil tako velik problem. Tako pa je zaradi naraščajočega pojava rezistence in majhnega števila odkritih protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja potreba po odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin s širokim spektrom delovanja proti gramnegativnim in grampozitivnim bakterijam zelo velika. Da bi omilili pojava rezistentnih bakterij, je potrebno iskati ali nova vezavna mesta na znanih tarčah ali pa nove

tarče, ki bi omogočale selektivno toksičnost (5). Takšne tarče so med drugimi tudi topoisomeraze tipa II, na katere delujejo aminokumarini in fluorokinoloni, a se žal tudi proti njim že pojavlja rezistenca (3, 6).

1.2 TOPOIZOMERAZE

Topoisomeraze so encimi, ki odpravljajo topološke spremembe DNA, ki nastajajo med njenim podvojevanjem in transkripcijo (7). Med transkripcijo postaja DNA pred transkripcijskim mehurčkom pozitivno dodatno zvita, DNA za transkripcijskim mehurčkom pa negativno dodatno zvita; analogno pri podvojevanju postaja DNA pred podvojevalnimi vilicami pozitivno dodatno zvita, DNA za podvojevalnimi vilicami pa negativno dodatno zvita. Med podvojevanjem se tudi novonastali dupleks DNA preplete z izvornim dupleksom DNA. Vse te spremembe topoisomeraze odpravljajo in s tem omogočajo stabilizacijo DNA in nemoteno nadaljevanje transkripcije in podvojevanja. Hidroksilna skupina tirozina v njihovem aktivnem mestu cepi fosfodiestrsko vez v verigi DNA, konformacijske spremembe v encimih nato premaknejo eno verigo preko druge, na koncu pa se verigi združita z obratno reakcijo od začetne – fosfatni kisik iz proste verige DNA napade fosforjev atom, ki je kovalentno vezan na tirozinski kisik, da se zopet vzpostavi fosfodiestrsko vez (7).

Tabela 1: Poddružine topoisomeraz in njihovi predstavniki

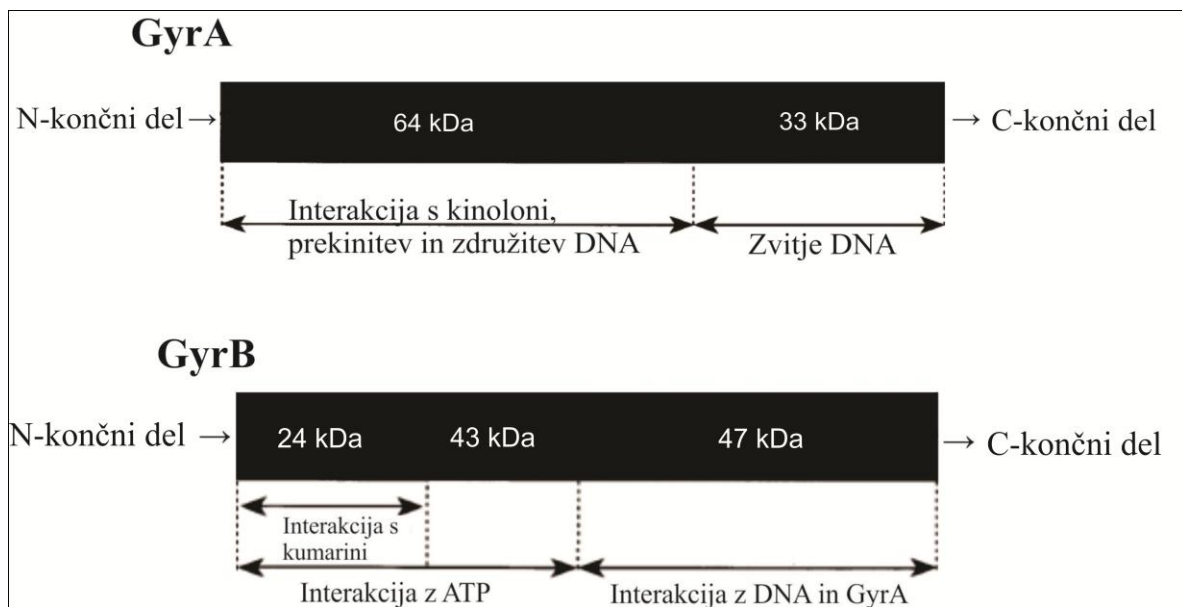
Poddružina	Predstavniki
IA	Bakterijski topoisomerazi I in III Sesalski topoisomerazi III α in III β
IB	Eukariotska topoisomeraza I Sesalska mitohondrijska topoisomeraza I
IC	Topoisomeraza V
IIA	DNA-giraza Sesalski topoisomerazi II α in II β Bakterijska topoisomeraza IV
IIB	Topoisomeraza VI

Topoizomeraze delimo na dva tipa. Encimi tipa I cepijo eno verigo DNA, medtem ko encimi tipa II cepijo obe verigi dupleksa DNA. Razlikujejo se med posameznimi organizmi, še posebej pa so vidne razlike med prokariontskimi in evkariontskimi encimi (**Tabela 1**).

Evkariontske topoizomeraze so sestavljene iz dveh polipeptidnih podenot, ki skupaj tvorita homodimerno strukturo A_2 , bakterijska DNA-giraza in njej sorodna bakterijska topoizomeraza IV pa sta tetramerni strukturi. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot GyrA ter dveh podenot GyrB, topoizomeraza IV pa sestoji iz dveh podenot ParC ter dveh podenot ParE (8). Podenoti GyrA in ParC sta homologni C-končnem delu evkariontske topoizomeraze II, podenoti GyrB in ParE pa sta homologni N-končnem delu evkariontske topoizomeraze II.

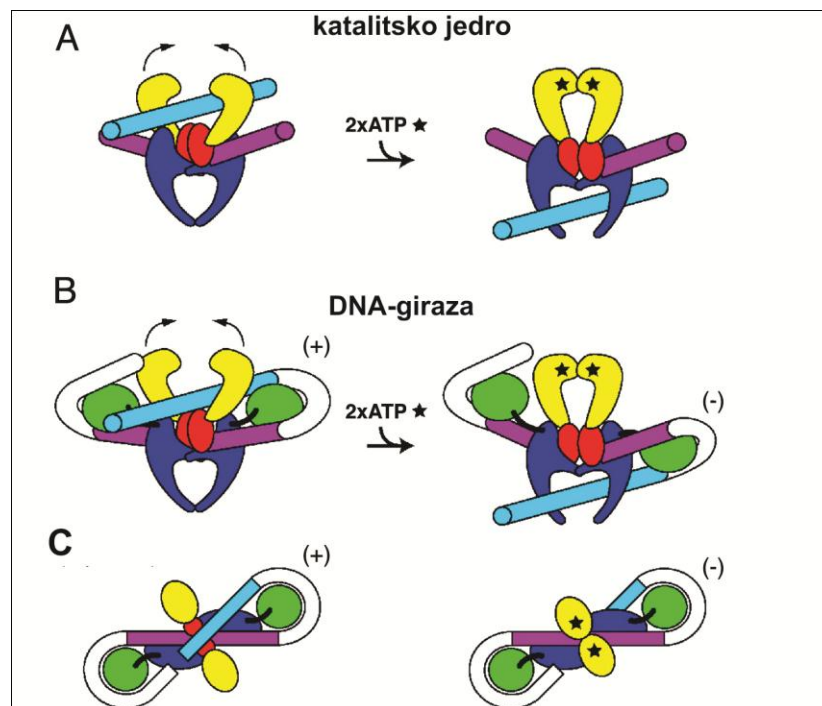
1.2.1 BAKTERIJSKA DNA-GIRAZA

DNA-giraza je esencialen encim v vseh bakterijah, ki je edini sposoben ne samo sprostiti pozitivnih dodatnih zvitij, temveč tudi vnašati negativno dodatno zvitje v DNA, zato njena inhibicija povzroči motnje v sintezi DNA in posledično smrt bakterije. Spada med topoizomeraze, ki so encimi, ki katalizirajo topološke spremembe molekule DNA. V njihovi prisotnosti lahko verige DNA prehajajo ena čez drugo, s čimer se v terciarno strukturo vnašajo vozli in dodatno zvitje, kar je pomembno pri podvajanju DNA, transkripciji, rekombinaciji ter kondenzaciji kromosomov in bakterijske DNA (7, 9).



Slika 1: Struktura 97 kDa in 94 kDa velikih podenot DNA-giraze iz bakterije *Escherichia coli* ter označitev funkcij posameznih regij encima. Povzeto po (10).

Bakterijska DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot, GyrA in GyrB (**Slika 1**), ki skupaj tvorita heterodimerno strukturo A_2B_2 . DNA-giraza A sodeluje pri cepitvi in ponovni povezavi verig molekule DNA, medtem ko je podenota B odgovorna za hidrolizo molekule ATP, s čimer zagotovi zadostno količino energije za uvajanje negativnih zavojev v plazmid (**Slika 2**). V enem ciklu dodatnega zvitja DNA se le-ta najprej zviije okrog A_2B_2 kompleksa, DNA-giraza nato cepi DNA, pri čemer se ustvari kovalentna vez encim-DNA, čez to prekinitev potuje segment DNA, na koncu pa se DNA poveže nazaj skupaj. S tem DNA-giraza uvede dve dodatni zvitji v molekulo DNA, za kar je potrebna hidroliza dveh molekul ATP (10, 11).



Slika 2: Shema procesa uvedbe negativnega zvitja – **a**) prikazano je le katalitsko jedro v DNA-girazi in segmenta DNA (označena s svetlomodro in vijolično barvo); **b**) cela DNA-giraza (GyrA v temnomodri in GyrB v rumeni barvi) in dvovertična DNA; **c**) pogled z vrha na (pozitivno) zvitje pred in (negativno) zvitje po delovanju DNA-giraze.

DNA-giraza je prisotna in nujna za preživetje pri vseh bakterijah, medtem ko je pri evkariontih odsotna, kar daje dobro izhodišče z vidika selektivne toksičnosti in je zaradi tega privlačna tarča za načrtovanje in sintezo novih protibakterijskih učinkovin. Fluorokinoloni, ki so terapevtsko uporabni inhibitorji DNA-giraze in njej sorodne topoizomeraze IV, stabilizirajo kovalentni kompleks med 5' koncem prekinjene verige DNA in GyrA ter s tem preprečijo nadaljevanje cikla dodatnega zvijanja (10, 12). Ker pa se proti fluorokinolonom že pojavlja rezistenca, je smiselna sinteza novih analogov z drugačnim osnovnim ogrodjem, saj se lahko v nasprotnem primeru hitro pojavi navzkrižna rezistenca z že znanimi, strukturno podobnimi učinkovinami. Zaradi prisotnosti DNA-giraze v različnih bakterijskih sevih je tukaj velik potencial za razvoj širokospektralnih protibakterijskih učinkovin.

Alternativno mesto vezave zaviralcev DNA-giraze je vezavno mesto za ATP, ki se nahaja na njeni podenoti B. Kljub temu, da vezavno mesto za ATP vsebujejo tudi drugi encimi, kot so proteinske kinaze in ATPaze, je moč doseči dovolj visoko selektivnost za DNA-girazo v primerjavi z encimi, nujnimi za preživetje človeških celic, kar dokazuje tudi uspešna uporaba inhibitorjev tirozin-kinaze (imatinib, erlotinib idr.) v klinični praksi (13). Ker je GyrB podobna tudi ParE podenoti topoizomeraze IV, to odpira možnost razvoja dvojnih inhibitorjev, proti katerim bi se rezistenca težje razvila, saj bi se morali v eni generaciji bakterij hkrati pojaviti mutaciji na vsaj dveh genih, ki sta odgovorna za rezistenco.

1.2.2 TOPOIZOMERAZA IV

Bakterijska topomeraza IV je strukturno precej podobna DNA-girazi. Ima tetramerno strukturo, v kateri dve podenoti ParC in ParE tvorita heterodimer C_2E_2 , tudi njeno aktivno mesto pa je strukturno precej podobno strukturi aktivnega mesta DNA-giraze. Glavna naloga topoizomeraze IV je, da po podvojevanju DNA loči obe dvoverižni DNA, ki se med samim podvojevanjem prepleteta medse. Na ta način topoizomeraza IV zagotovi, da bo po celični delitvi v obeh hčerinskih celicah celoten genom ter predvsem, da bo delitev sploh lahko potekla. Njena druga funkcija pa je sprostitvev pozitivnih zvitij, tako kot to počne tudi DNA-giraza (velja enaka shema kot na **Sliki 2**), vendar pa topoizomeraza IV za razliko od DNA-giraze ni sposobna vnašati dodatnih zvitij v DNA. Topoizomerazo IV zavirajo fluorokinoloni – za le-te je v gramnegativnih bakterijah primarna tarča za delovanje DNA-giraza, v grampozitivnih bakterijah pa topoizomeraza IV.

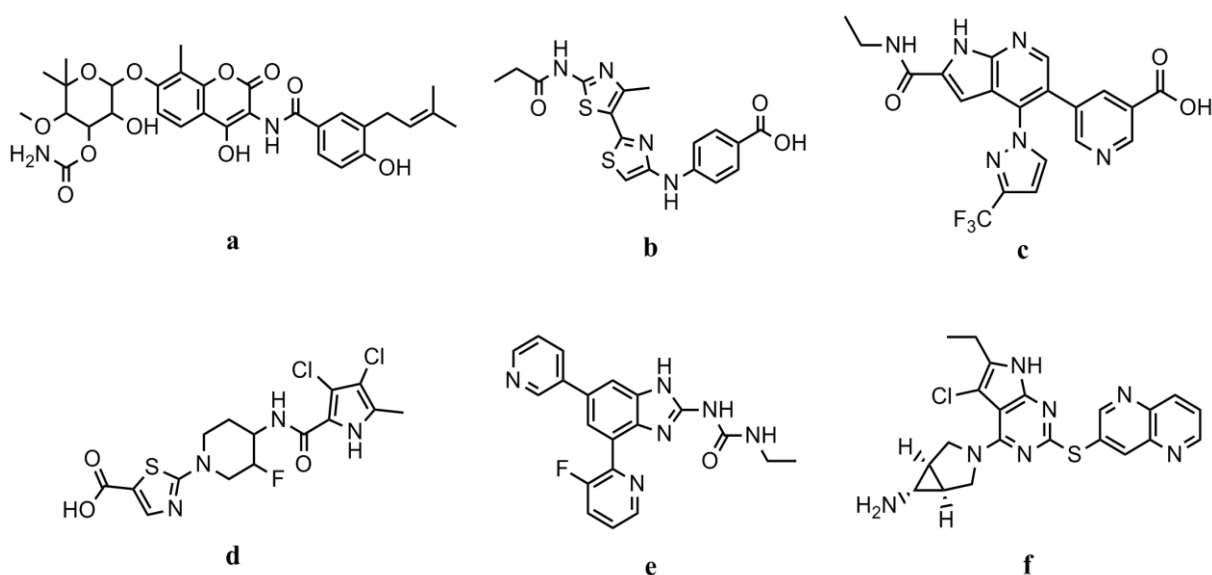
1.3 INHIBITORJI DNA-GIRAZE B

1.3.1 ZNANI INHIBITORJI DNA-GIRAZE B

V 50-ih letih 20. stoletja so bile odkrite protibakterijske učinkovine, ki jih proizvajajo bakterije gena *Streptomyces* – to so aminokumarini (novobiocin (**a**), klorobiocin). Na DNA-girazo se vežejo blizu vezavnega mesta za ATP podenote GyrB, ga tudi delno prekrijejo in

tako preprečijo vezavo ATP. *In vitro* so dobri inhibitorji GyrB, toda zaradi slabe topnosti, neučinkovitosti proti gramnegativnim bakterijam in toksičnosti *in vivo* niso bili tako uspešni v klinični praksi kot fluorokinoloni (12).

Tekom zadnjih petih let je bilo objavljenih več strukturnih tipov spojin, ki zavirajo ATPazno aktivnost DNA-giraze (8, 14, 15). Nekaj predstavnikov je prikazanih na **Sliki 3**. Spojine vodnice so večinoma našli z načrtovanjem na podlagi fragmentov in virtualnim rešetanjem ali rešetanjem visoke zmogljivosti (HTS). Na Kemijskem inštitutu so tako z virtualnim rešetanjem odkrili spojino **b**, ko so knjižnico spojin računalniško sidrali v vezavno mesto za ATP GyrB.

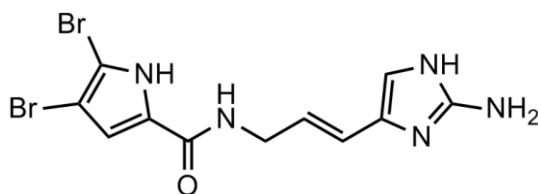


Slika 3: Različni strukturni tipi inhibitorjev DNA-giraze B

Pri farmacevtskem podjetju AstraZeneca so z virtualnim rešetanjem fragmentov, ki so del znanih inhibitorjev proteinskih kinaz, odkrili azaindolni tip inhibitorjev GyrB (**c**), z rešetanjem fragmentov s pomočjo NMR spektroskopije pa so odkrili tudi pirolamidni strukturni razred inhibitorjev GyrB (**d**). Z rešetanjem visoke zmogljivosti so pri podjetju Vertex v ATPaznem testu GyrB ovrednotili 30.000 spojin in odkrili benzimidazolne inhibitorje (**e**). Pri podjetju Trius so s kristalografskim rešetanjem fragmentov in nadaljnjo optimizacijo zadetkov prišli do inhibitorja **f** (8).

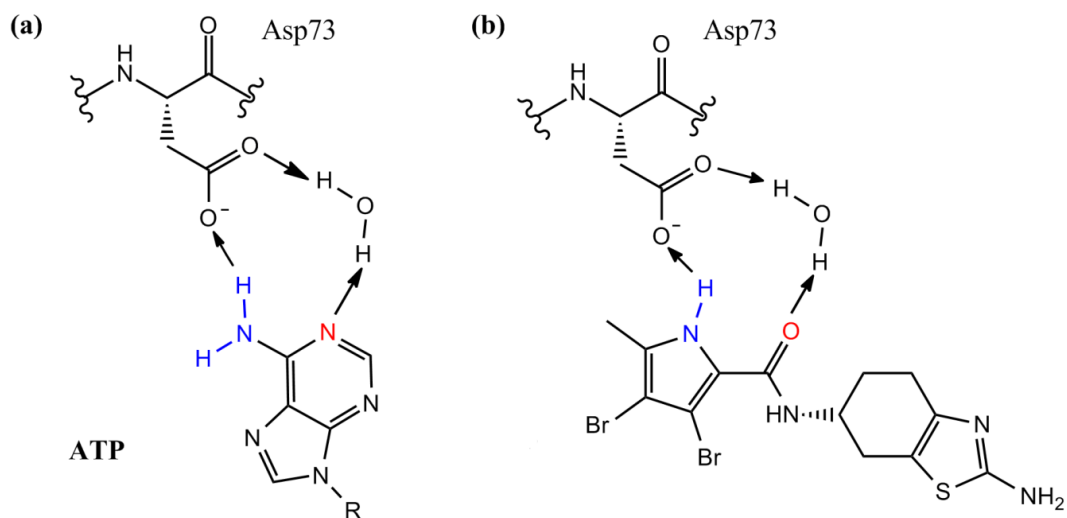
1.3.2 ANALOGI OROIDINA

Skupino pirol-imidazolnih alkaloidov sestavlja stotine različnih metabolitov, ki izhajajo izključno iz morskih spužev, pretežno iz družin *Agelasidae*, *Axinellidae*, *Dyctionellidae* in *Hymeniacidonidae*. Ti so si med seboj zelo različni, od precej enostavnih (kot je denimo oroidin) do zelo kompleksnih. Alkaloidi spužev iz rodu *Agelas* so znani tudi kot modulatorji napetostno odvisnih natrijevih kanalov (16), oroidin (**Slika 4**) in njegovi analogi, ki vsebujejo dibromopirolni fragment (ali njegov mimetik), pa zavirajo tvorbo bakterijskih biofilmov (17) in delujejo protibakterijsko (18). Oroidin nam zaradi svoje dokaj preproste strukture, relativno enostavne sinteze in široke možnosti derivatizacije daje dobro izhodišče za načrtovanje analogov s protibakterijskim delovanjem.



Slika 4: Struktura oroidina

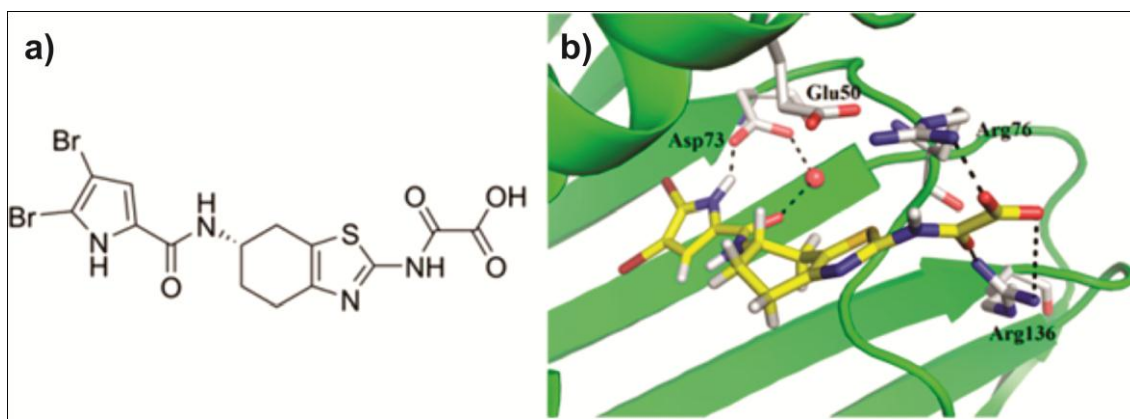
Inhibitorji GyrB tvorijo vodikovi vezi z Asp73 (**Slika 5**), ki sicer interagira z aaminsko skupino adenina. Zelo blizu skupaj imajo donor in akceptor vodikove vezi – donor tvori vodikovo vez z Asp73 direktno, akceptor pa tvori dodatno vodikovo vez indirektno preko kristalno vezane vode. Inhibitorji GyrB pogosto tvorijo tudi vodikovo vez ali π -kation interakcijo z Arg136 in pa različne interakcije v fosfatnem ter riboznem žepu (8, 13, 14). Ravno interakcija z Arg136, ki ni udeležen pri vezavi ATP, omogoča doseganje selektivnosti napram ostalim kinazam in ATPazam.



Slika 5: Shema vodikovih vezi med kislinsko skupino aminokisline Asp73, kristalno vezano molekulo vode in **(a)** adeninom molekule ATP ali **(b)** inhibitorjem v vezavnem mestu za ATP GyrB iz *E. coli*. Povzeto po (15).

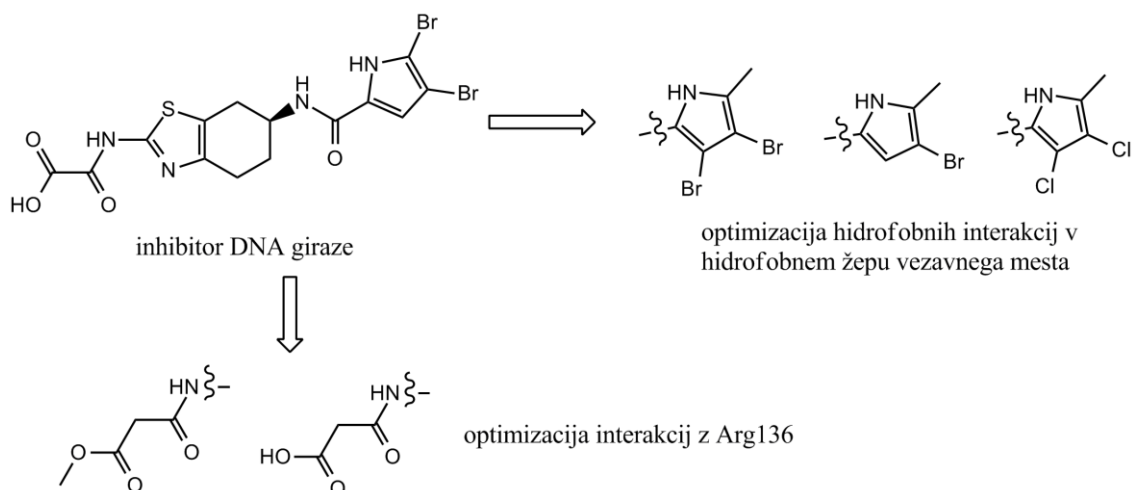
2 NAMEN DELA

Cilj magistrskega dela je optimizacija strukture novih ATP kompetitivnih zaviralcev bakterijske DNA-giraze B, ki temeljijo na osnovi znanih spojin, ki so bile sintetizirane na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (**Slika 6**). Te spojine zavirajo delovanje DNA-giraze iz *E. coli* v nanomolarnem koncentracijskem območju, njihove strukture pa je možno enostavno derivatizirati. Nekatere izmed njih tudi izkazujejo zaviranje topoisomeraze IV, tako da želimo z optimizacijo teh spojin doseči dvojno inhibicijo (tako DNA-giraze kot tudi topoisomeraze IV), proti čemur bi bakterije težje razvile odpornost.



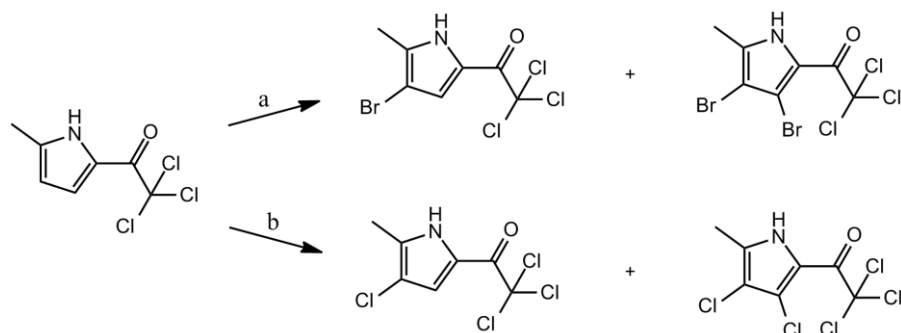
Slika 6: a) Inhibitor DNA-giraze iz *E. coli* in b) njegova umestitev v vezavno mesto na GyrB iz *E. coli*. S črtnanimi črtami so označene vodikove vezi, ki jih inhibitor tvori z encimom. Povzeto po (15).

Spojine bomo derivatizirali tako, da bomo zamenjali substituentne na pirolnem obroču ter končni oksalat z malonatom (**Shema 1**). Pirolni obroč se veže v hidrofobni žep DNA-giraze, zato bomo na mesto 5 uvedli metilno skupino namesto bromida, na mestu 4 bomo uvedli klorid ali pa pustili bromid, na mestu 3 pa bomo pustili proton ali pa ga bomo zamenjali z bromovim oziroma klorovim atomom. Oksalno kislino bomo zamenjali z malonsko kislino ali njenim metilnim estrom in tako poskušali izboljšati interakcijo z Arg136. S temi zamenjavami želimo preučiti, kako se bosta spremembi hidrofobne površine in kislinskega dela izražali na aktivnosti spojin na izolirani DNA-girazi in topoisomerazi IV.



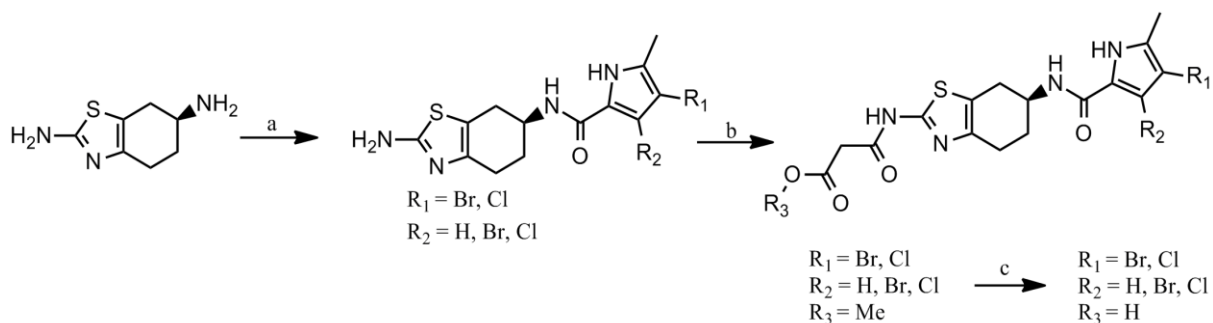
Shema 1: Splošna shema načrtovanih strukturnih sprememb.

Najprej bomo sintetizirali substituirane pirole tako, da bomo na izhodnem reagentu, ki je bil že predhodno sintetiziran, izvedli elektrofilno aromatsko substitucijo protona z bromidom ali kloridom (**Shema 2**).



Shema 2: Reagenti in pogoji: a) Br_2 , CHCl_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; b) SO_2Cl_2 , CHCl_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h.

Naprej bomo izhajali iz derivata 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina, ki je bil že predhodno sintetiziran (sinteza in optična resolucija racemata do (*S*) izomera je potekala po postopku, kot sta ga opisala Schneider in Mierau (20)). Najprej bomo na bolj reaktivni alifatski amino skupini izhodne spojine tvorili amid s predhodno pripravljenimi substituiranimi piroli. V naslednji stopnji bomo na aromatski amino skupini tvorili amid z metil malonil kloridom, v zadnji stopnji sinteze pa bomo izvedli alkalno hidrolizo metilnega estra spojine (**Shema 3**).



Shema 3: Reagenti in pogoji: a) 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dibromo-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon ali 2,2,2-trikloro-1-(4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon ali 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon, Na₂CO₃, DMF, 40 °C, 4 h; b) metil malonil klorid, Et₃N, 1,4-dioksan, sobna temperatura, 12 h; c) 1 M NaOH, MeOH/H₂O, sobna T, 12 h.

Končnim spojinam bomo nato določili zaviralno aktivnost na izoliranih encimih (DNA-giraza in topoizomeraza IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*) ter protibakterijsko aktivnost na bakterijskih kulturah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* in *Pseudomonas aeruginosa*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali komercialno dostopne kemikalije podjetij Acros Organics, TCI in Sigma-Aldrich Corporation in smo jih uporabili brez predhodnega čiščenja.

3.2 METODE

3.2.1 KROMATOGRFSKE METODE

- ♦ **Tankoplastna kromatografija**

S tankoplastno kromatografijo (TLC) smo spremljali potek reakcij in izolacij produktov ter izbirali primerno mobilno fazo za uporabo kolonske kromatografije. Za stacionarno fazo smo uporabljali plošče proizvajalca Merck, TLC Silica gel 60 F₂₅₄, ki ima na aluminijastem nosilcu nanesen 0,20 mm debeli nanos silikagela, mobilne faze pa so opisane pri posameznem sinteznem postopku. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali s pomočjo UV svetilke z valovno dolžino $\lambda = 254$ nm ali $\lambda = 366$ nm.

- ♦ **Kolonska kromatografija**

Izolirane produkte smo čistili s kolonsko kromatografijo. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti (odvisno od pričakovane količine produkta), v katere smo nasuli kot stacionarno fazo silikagel Merck Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,04-0,063 mm. Za elucijo smo uporabljali različne mobilne faze, ki so navedene v sinteznem postopku, njihov pretok pa smo pospešili z ustvarjanjem zračnega nadtlaka.

- ♦ **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Končnim produktom smo s pomočjo HPLC določili retencijski čas. Meritve smo izvajali z instrumentom Agilent Technologies 1100 z UV-Vis detektorjem

G1365B, samovzorčevalnikom G1313A, termostatom G1316A ter Agilent EclipsePlus C18 kolono (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm). Kot mobilno fazo smo uporabili 0,1% trifluoroocetno kislino v vodi (A) in metanol (B); najprej v gradientu od 90% A do 10% A v 20 minutah, nato še 5 minut 10% A. Volumen injiciranja je bil 10 μL , pretok je 1,0 mL/min.

3.2.2 SPEKTROSKOPSKE METODE

♦ Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H NMR in ^{13}C NMR spektre sintetiziranih spojin smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih DMSO- d_6 ali MeOD- d_4 , za interni standard pa smo uporabili tetrametilsilan (TMS). Spektre smo reševali s programom MestRe-C 4.8.6 proizvajalca Mesterlab Research S. L.

♦ Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na Nicolet Nexus 470 FT-IR spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

♦ Masna spektroskopija (MS)

Masne spektre so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q s tehniko ESI (electrospray ionisation) v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.2.3 TEMPERATURA TALIŠČA

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

3.2.4 BIOLOŠKA TESTIRANJA

• določanje aktivnosti

Zaviralno aktivnost na DNA-girazo B so določili na Fakulteti za farmacijo z uporabo *E. coli* Microplate Assay Kit podjetja Inspiralis. Testiranja so najprej opravili pri koncentraciji 100 μM in 10 μM , nato pa so spojinam, ki so pri teh koncentracijah izkazovale več kot 50% inhibicijo encima, določili vrednost IC₅₀ (14).

- **določanje MIC_{90} in MBC_{99}**

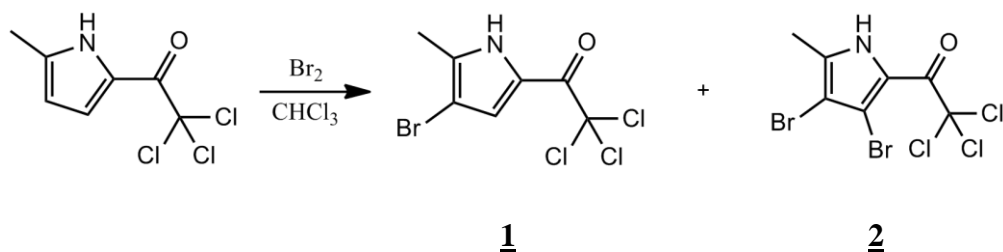
MIC_{90} in MBC_{99} so določili na Faculty of Pharmacy, Centre for Drug Research, University of Helsinki na Finskem. Le-te so določili na bakterijskih kulturah *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) v dveh poskusih (vsakič s tremi meritvami). Za pozitivno kontrolo je bil uporabljen ciprofloksacin.

3.2.5 RISANJE IN POIMENOVANJE SPOJIN

Za risanje in poimenovanje strukturnih formul spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca Cambridge Soft.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-il)etanona ter 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dibromo-5-metil-1H-pirol-2-il)etanona



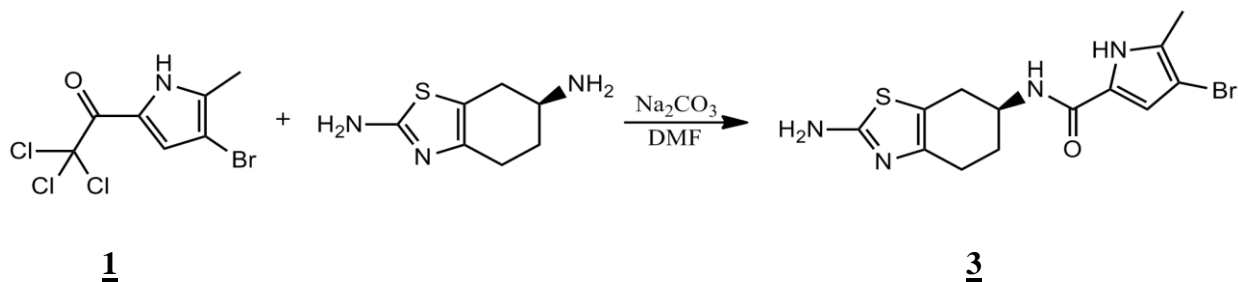
V bučko smo natehtali izhodno spojino (1,214 g, 5,36 mmol, 1 ekv), dodali 25 mL kloroforma in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel. Reakcijsko zmes smo nato prepihali z argonom, zatem pa začeli počasi dodajati brom (0,608 mL, 11,8 mmol, 2,2 ekv) - dodamo nekaj kapljic in pustimo reagirati približno minuto, tako da po 30 minutah dodamo ves brom. Po približno 15 minutah je reakcijska zmes postala motna. Ko smo dodali ves brom, smo zmes odstavili z ledene kopeli in jo pustili reagirati na sobni temperaturi najprej 24 ur, in ker glede na razviti TLC kromatogram reakcija še ni potekla, pa še čez vikend (skupno 96 ur). Nato smo kloroform uparili na rotavaporju, suhi ostanek pa očistili s kolonsko kromatografijo. Najprej smo uporabili MF: heksan, ko so se s kolone sprale spojine z višjim R_f , pa smo spiranje pospešili z uporabo bolj polarne MF: heksan/etilacetat = 15/1. Spojini **1** in **2** se nista popolnoma ločili, tako da smo posebej združili frakcije, kjer je bila večinoma spojina **1** in posebej frakcije, kjer je bila večinoma spojina **2**, da jih uporabimo pri naslednji stopnji reakcije. Masa frakcije z večino spojine **1** je bila 540,2 mg, masa frakcije z večino spojine **2** pa 363,4 mg.

2,2,2-trikloro-1-(4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-il)etanon	
Elementna sestava: C ₇ H ₅ ONCl ₃ Br	Izgled: rjava kristalna snov
Molska masa: 305,38 g/mol	R_f: 0,49 (MF:heksan/etilacetat = 3/1)
Izkoristek: 31,0%	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 2,27 (s, 3H, CH₃), 7,30 (s, 1H, Ar- H), 12,71 (s, 1H, Ar- NH) ppm

¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,58, 94,78, 97,91, 120,05, 122,15, 138,69, 171,11 ppm
IR (ATR)	ν = 3298, 3132, 1637, 1555, 1497, 1447, 1391, 1361, 1261, 1175, 1067, 1049 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 301,8542, izmerjen 301,8546

2,2,2-trikloro-1-(3,4-dibromo-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-il)etanon	
Elementna sestava: C ₇ H ₄ ONCl ₃ Br ₂	Izgled: vijolična kristalna snov
Molska masa: 384,28 g/mol	R_f: 0,38 (MF:heksan/etilacetat = 3/1)
Izkoristek: 18,4%	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 2,39 (s, 3H, <u>CH</u> ₃), 12,31 (s, 1H, Ar- <u>NH</u>) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,58, 94,78, 97,91, 120,05, 122,15, 138,69, 171,11 ppm
IR (ATR)	ν = 3315, 1659, 1552, 1499, 1436, 1403, 1365, 1324, 1251, 1176, 1121, 1059, 1030 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 379,7647, izmerjen 379,7641

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

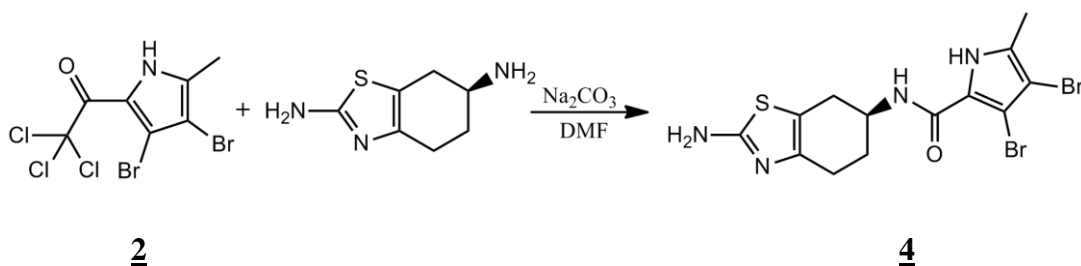


(*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin (86 mg, 0,51 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 5 mL DMF in dodali natrijev karbonat (53 mg, 0,50 mmol). Reakcijsko zmes smo nato segrevali na oljni kopeli pri 40 °C in počasi dodajali spojino 1 (152 mg, 0,50 mmol, 1

ekv), predhodno raztopljeno v 5 mL DMF, ter pustili reagirati 2 uri. Po končani reakciji smo topilo odstranili s pomočjo rotavaporja, surov produkt pa očistili s kolonsko kromatografijo. Najprej smo uporabili MF: diklorometan/metanol = 40/1, ko pa smo eluirali celotni dibromirani produkt, smo uporabili malo bolj polarno MF: diklorometan/metanol = 30/1. Dobili smo 102 mg spojine **3** in 47 mg spojine **4**.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₁₅ ON ₄ BrS	Izgled: rjava kristalna snov
Molska masa: 355,25 g/mol	R_f: 0,32 (MF: diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 39,6%	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,71-1,82 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,88-1,93 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,14 (s, 3H, CH ₃), 2,52-2,56 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,77 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 14,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,5 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 4,07-4,11 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,69 (s, 2H, Ar'-NH ₂), 6,85 (d, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz, Ar-H), 7,91 (d, 1H, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-CONH), 11,69 (s, 1H, Ar-NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,10, 21,04, 25,04, 28,85, 45,37, 94,18, 111,71, 112,38, 124,53, 129,31, 144,21, 159,21, 166,13, 172,02 ppm
IR (ATR)	ν = 3194, 2921, 2847, 1700, 1618, 1517, 1412, 1366, 1332, 1271, 1215, 1170, 1089, 1048, 1004 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 353,0072, izmerjen 353,0067
HPLC	t _r = 14,894 min (96,3% pri 254 nm)

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

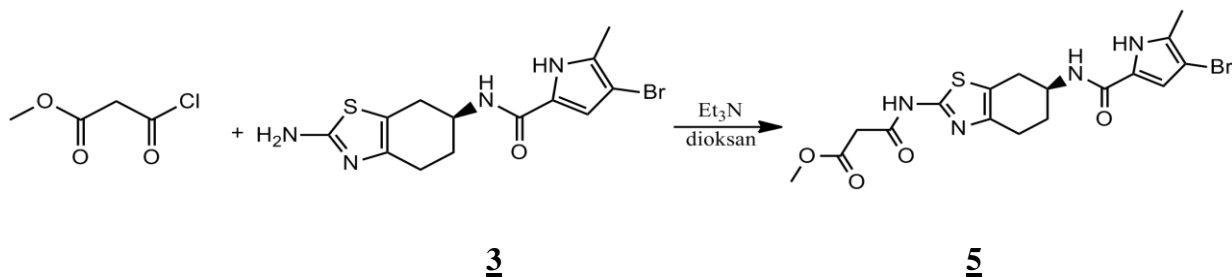


Sintezni postopek je enak kot v točki **4.2**, le da imamo tu (večinoma) dibromiran produkt. Reakcijo smo izvedli s 190 mg spojine **2** (0,49 mmol, 1 ekv), 84 mg (*S*)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina (0,50 mmol, 1 ekv) in 52 mg natrijevega karbonata (0,49 mmol). Po končani reakciji smo surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo oljastega ostanka po rotavapiranju – najprej z MF: dikloroetan/metanol = 40/1, nato pa MF: diklorometan/metanol = 9/1. Tako smo dobili 64 mg spojine **4** in 38 mg spojine **3**.

(<i>S</i>)-<i>N</i>-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)-3,4-dibromo-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamid	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₁₄ ON ₄ Br ₂ S	Izgled: belkasta kristalna snov
Molska masa: 434,15 g/mol	R_f: 0,40 (diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 25,7%	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,83-1,88 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,92-1,98 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,21 (s, 3H, CH ₃), 2,52-2,57 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,85 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,4 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 4,18-4,27 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,74 (s, 2H, Ar'-NH ₂), 7,33 (d, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, Ar-CONH), 12,15 (s, 1H, Ar-NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,95, 21,05, 23,99, 27,84, 28,71, 45,18, 98,58, 99,23, 112,08, 121,82, 129,82, 158,26, 166,35, 172,02 ppm
IR (ATR)	ν = 3397, 3184, 2925, 1698, 1624, 1565, 1519, 1439, 1401, 1367, 1260, 1234, 1171, 1065, 1042 cm ⁻¹

HR-MS (ESI⁺)	[M+H] ⁺ izračunan 432,9333, izmerjen 432,9330
HPLC	t _r = 17,165 min (100% pri 254 nm)

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



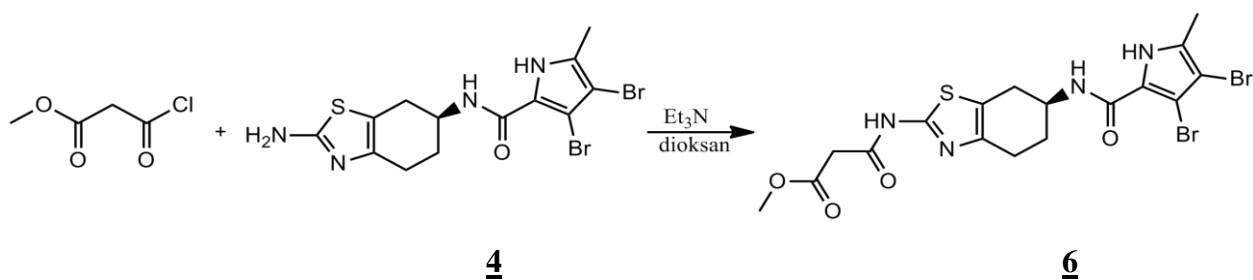
Spojino **3** (140 mg, 0,40 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 7 mL 1,4-dioksana, dodali trietilamin (60,9 μ L, 0,44 mmol, 1,1 ekv) ter po kapljicah še metil malonil klorid (63,8 μ L, 0,60 mmol, 1,5 ekv) in pustili reagirati pri sobni temperaturi. Ker je bilo po 24 urah na TLC kromatogramu vidno še veliko nezreagirane izhodne spojine, smo dodali še 0,5 ekv metil malonil klorida in pustili reagirati še 1 uro. Reakcijski zmesi smo potem uparili topilo na rotavaporju, trdni ostanek raztopili v etilacetatu (10 mL) in spirali najprej s H₂O (10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Po končani ekstrakciji smo etilacetat odparili pod znižanim tlakom, surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etilacetat = 1/1) in tako dobili 76 mg spojine **5**.

Nato smo ponovili celotno sintezo spojine **5**, da smo je imeli dovolj za hidrolizo (poglavje 4.6).

(<i>S</i>)-metil 3-((6-(4-bromo-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₁₉ O ₄ N ₄ BrS	Izgled: bela kristalna snov
Molska masa: 455,33 g/mol	R_f: 0,49 (MF: etilacetat)
Izkoristek: 16,7%	Tališče: 115-117°C

¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,80-1,87 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,95-2,04 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,15 (s, 3H, CH ₃), 2,68 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,99 (d, 1H, <i>J</i> = 15,5 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,58 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 3,66 (s, 3H, OCH ₃), 4,10-4,26 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,87 (s, 1H, Ar-H), 7,96 (d, 1H, <i>J</i> = 7,0 Hz, Ar-CONH), 11,70 (s, 1H, Ar'-NHCO), 12,00 (s, 1H, Ar-NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,10, 24,70, 28,46, 28,71, 41,97, 45,07, 52,12, 94,20, 111,75, 119,75, 124,48, 129,40, 143,59, 155,08, 159,27, 163,84, 167,54 ppm
IR (ATR)	ν = 3382, 3181, 3132, 2952, 2926, 2849, 2361, 2342, 1747, 1686, 1624, 1571, 1524, 1435, 1418, 1366, 1331, 1306, 1262, 1233, 1216, 1201, 1171, 1137, 1049, 1014, 987, 971, 875, 831, 805, 758, 722, 679, 631, 607 cm ⁻¹
HR-MS (ESI⁺)	[M+H] ⁺ izračunan 455,0402, izmerjen 455,0380
HPLC	t _r = 18,501 min (100% pri 254 nm)

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

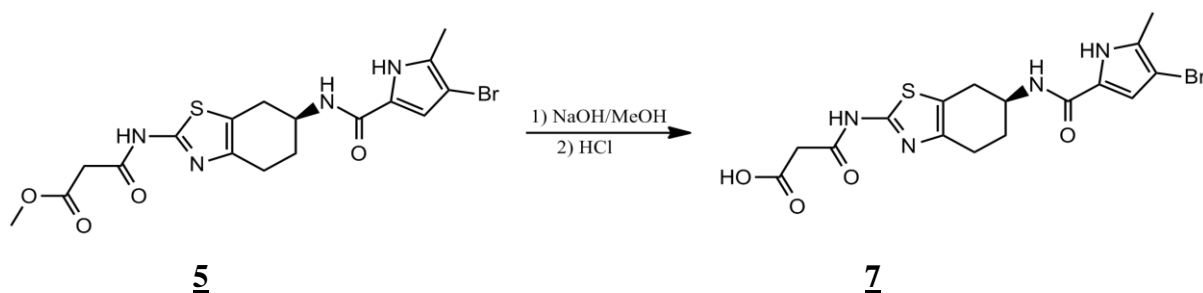


Sintezni postopek izvedemo enako kot v točki **4.4**, le da smo tokrat uporabili 103 mg spojine **4** (0,24 mmol, 1 ekv), 38,2 μL metil malonil klorida (0,36 mmol, 1,5 ekv) in 36,4 μL trietilamina (0,26 mmol, 1,1 ekv). Tudi postopek izolacije je enak kot v točki **4.4** in po čiščenju s kolonsko kromatografijo smo dobili 41 mg spojine **6**.

Nato smo ponovili celotno sintezo spojine **6**, da smo je imeli dovolj hidrolizo (poglavje 4.7).

(S)-metil 3-((6-(3,4-dibromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₁₈ O ₄ N ₄ Br ₂ S	Izgled: bela kristalna snov
Molska masa: 534,22 g/mol	R_f: 0,46 (MF: etilacetat)
Izkoristek: 32,4%	Tališče: 146-148°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,92-1,97 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,00-2,05 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,21 (s, 3H, CH ₃), 2,67-2,77 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,04 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 4,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 15,9 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,58 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 3,66 (s, 3H, OCH ₃), 4,23-4,31 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 7,39 (d, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, Ar-CONH), 12,14 (s, 1H, NH), 12,15 (s, 1H, NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,96, 24,02, 27,87, 28,35, 41,97, 45,05, 52,13, 98,59, 98,28, 119,46, 121,85, 129,84, 143,48, 152,55, 158,36, 163,85, 167,54 ppm
IR (ATR)	ν = 3394, 3222, 2950, 2926, 2845, 2359, 2342, 1736, 1701, 1623, 1525, 1437, 1404, 1372, 1317, 1295, 1260, 1234, 1171, 1151, 1066, 1037, 1005, 976, 803, 760, 720, 668, 643, 630 cm ⁻¹
HR-MS (ESI⁺)	[M+H] ⁺ izračunan 532,9507, izmerjen 532,9491
HPLC	t _r = 20,951 min (100% pri 254 nm)

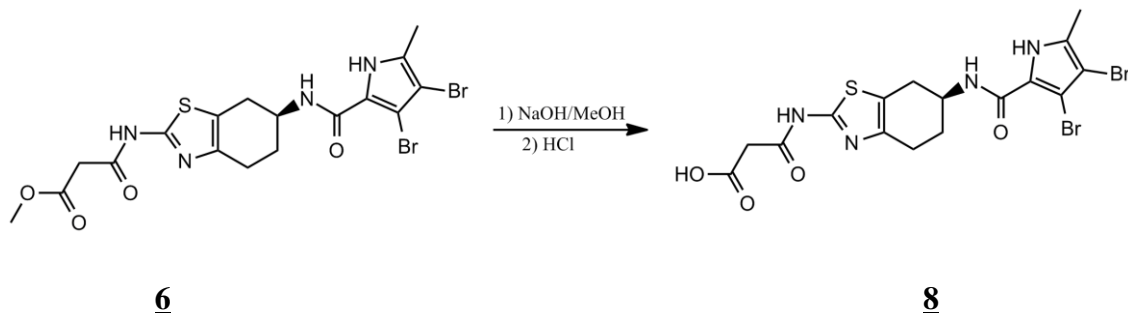
4.6 Sinteza (S)-3-((6-(4-bromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline



100 mg spojine **3** (0,22 mmol, 1 ekv) smo raztopili v metanolu (3 mL), in dodali 1,1 mL 1 M NaOH (1,1 mmol, 5 ekv) ter pustili reagirati 20 ur pri sobni temperaturi. Ker smo naslednji dan s pomočjo TLC kromatograma ugotovili, da je nekaj spojine **5** še nezreagirane, smo reakcijski zmesi dodali še 0,5 mL 1 M NaOH (5 mmol, 2,3 ekv) in pustili reagirati še 4 ure. Metanol smo nato odparili pod znižanim tlakom, vodno raztopino pa ekstrahirali z etilacetatom (10 mL). Vodno fazo smo nato nakisali s koncentrirano HCl do pH=1 in ekstrahirali z etilacetatom (3×10 mL). Združene organske faze smo nato sušili nad Na₂SO₄, etilacetat smo izparili pod znižanim tlakom in tako dobili 36 mg spojine **7**.

(S)-3-((6-(4-bromo-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina	
Elementna sestava: C ₁₆ H ₁₇ O ₄ N ₄ BrS	Izgled: bela kristalna snov
Molska masa: 441,30 g/mol	R_f: 0,31 (diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 37,1%	Tališče: 210-212°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,80-1,90 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,95-2,03 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,15 (s, 3H, CH ₃), 2,62-2,72 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,98 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,1 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,46 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 4,13-4,25 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,87 (d, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz, Ar- <u>H</u>), 7,96 (d, 1H, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-CON <u>H</u>), 11,71 (s, 1H, Ar'-NH <u>CO</u>), 12,07 (s, 1H, Ar-N <u>H</u>), 12,85 (br s, 1H, COOH <u>H</u>) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,10, 24,72, 28,45, 28,74, 42,47, 45,09, 94,20, 111,75, 119,60, 124,48, 129,40, 143,54, 155,25, 159,27, 164,34, 168,67 ppm
IR (ATR)	ν = 3277, 3066, 2920, 2843, 2359, 2342, 1686, 1618, 1571, 2530, 1477, 1458, 1438, 1405, 1332, 1274, 1218, 1166, 1115, 1083, 1047, 876, 806, 756 cm ⁻¹
HR-MS (ESI⁺)	[M+H] ⁺ izračunan 441,0232; izmerjen 441,0219
HPLC	t _r = 17,562 min (100% pri 254 nm)

4.7 Sinteza (S)-3-((6-(3,4-dibromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline

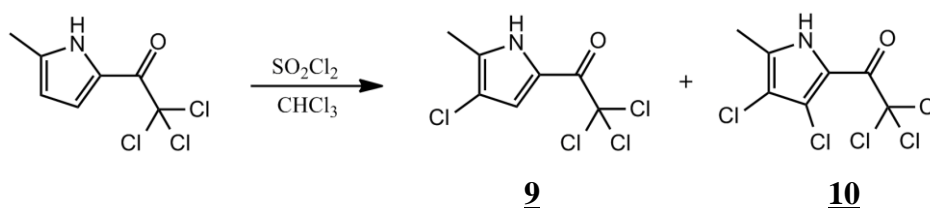


74 mg spojine **6** (0,14 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 3 mL metanola, dodali 0,7 mL 1 M NaOH (0,70 mmol, 5 ekv) ter pustili reagirati 20 ur pri sobni temperaturi. Metanol smo potem odparili na rotavaporju, vodno raztopino pa ekstrahirali z etilacetatom (5 mL). Vodno fazo smo nato nakisali s koncentrirano HCl do pH=1 in ekstrahirali z etilacetatom (3×10 mL). Iz združenih organskih faz smo etilacetat izparili pod znižanim tlakom in tako dobili 13 mg spojine **8**.

(S)-3-((6-(3,4-dibromo-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina	
Elementna sestava: C ₁₆ H ₁₆ O ₄ N ₄ Br ₂ S	Izgled: bela kristalna snov
Molska masa: 520,20 g/mol	R_f: 0,29 (MF: diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 17,9%	Tališče: 266-268°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,92-2,06 (m, 2H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,21 (s, 3H, CH ₃), 2,69-2,76 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,03 (dd, 1H, J ₁ = 16,2 Hz, J ₂ = 4,8 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,45 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 4,22-4,31 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 7,38 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-CONH), 12,07 (s, 1H, Ar'-NHCO), 12,14 (s, 1H, Ar-NH), 12,79 (br s, 1H, COOH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 11,96, 24,04, 27,91, 28,36, 42,47, 45,06, 98,59, 99,28, 119,29, 121,85, 129,83, 143,38, 155,23, 158,35, 164,36, 168,67 ppm

IR (ATR)	$\nu = 3392, 3220, 2926, 2849, 2359, 2342, 1680, 1627, 1558, 1524, 1441, 1400, 1371, 1317, 1295, 1261, 1237, 1210, 1066, 1041, 984, 944, 908, 792, 759, 703, 648, 634, 613 \text{ cm}^{-1}$
HR-MS (ESI)	$[M-H]^-$ izračunan 516,9221; izmerjen 516,9195
HPLC	$t_r = 20,120 \text{ min}$ (96,6% pri 254 nm)

4.8 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanona in 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanona



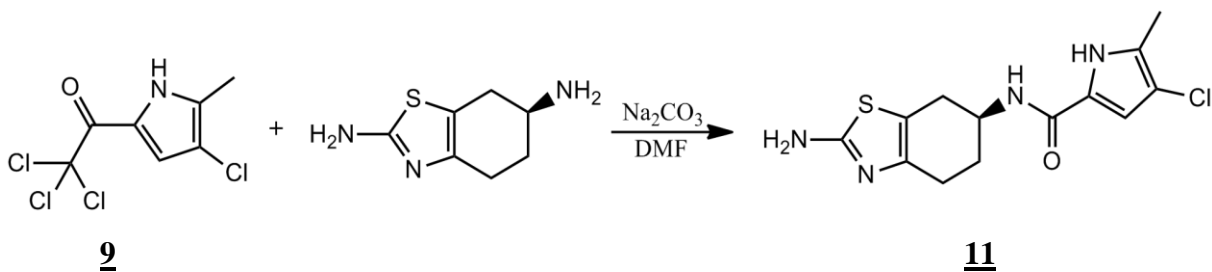
549 mg izhodne spojine (2,42 mmol, 1 ekv) smo raztopili v kloroformu (30 mL) in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel in prepihali z argonom. Nato smo po kapljicah dodali sulfuril klorid (SO_2Cl_2) (240 μL , 2,97 mmol, 1,23 ekv) in pustili reagirati 1 uro. Po 80 minutah smo dodali še 0,5 ekv SO_2Cl_2 , da smo dobili poleg monokloriranega še dikloriran produkt. Zmes smo pustili reagirati čez noč, zatem pa smo trikrat (v enournih presledkih) dodali še 0,5 ekv SO_2Cl_2 . Reakcijo smo prekinili z dodatkom 20 mL nasičene raztopine NaHCO_3 , reakcijsko zmes prelili v lij ločnik, stresali in nato ločili fazi. Organsko fazo smo nato spirali še z nasičeno raztopino NaHCO_3 ter nasičeno raztopino NaCl in še sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in uparili topilo. Potem smo dvakrat izvedli še kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/petroleter = 1/8), a se kljub temu spojini **9** in **10** nista povsem ločili, zato smo končne frakcije kolonske kromatografije razdelili na tri dele – čista spojina **9** (110 mg), zmes spojin **9** in **10** (168 mg) ter čista spojina **10** (10 mg).

2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-il)etanon	
Elementna sestava: $\text{C}_7\text{H}_5\text{ONCl}_4$	Izgled: rjava oborina
Molska masa: 260,93 g/mol	R_f: 0,48 (MF: heksan/etilacetat = 3/1)
Izkoristek: 19,8%	Tališče: 144-146°C

¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 2,28 (s, 1H, CH₃), 7,26 (s, 1H, Ar- H), 12,68 (t, 1H, J = 0,6 Hz, Ar- NH) ppm
IR (ATR)	ν = 3299, 3137, 3114, 2954, 2926, 2821, 2360, 2342, 1635, 1558, 1522, 1498, 1439, 1406, 1392, 1365, 1362, 1176, 1154, 1074, 1037, 841, 810, 756, 736, 687, 675, 363 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 257,9047; izmerjen 257,9049

2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-il)etanon	
Elementna sestava: C ₇ H ₄ ONCl ₅	Izgled: rjava oljasta snov
Molska masa: 295,38 g/mol	R_f: 0,39 (MF: heksan/etilacetat = 3/1)
Izkoristek: 23,5%	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 2,34 (s, 3H, CH₃), 12,41 (s, 1H, Ar- NH) ppm
IR (ATR)	ν = 3423, 3326, 3109, 2977, 2926, 1716, 1661, 1628, 1558, 1441, 1390, 1360, 1259, 1172, 1136, 1079, 1032, 999, 978, 846, 814, 792, 761, 738, 711, 688, 653, 636, 619, 605 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 291,8657; izmerjen 291,8653

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



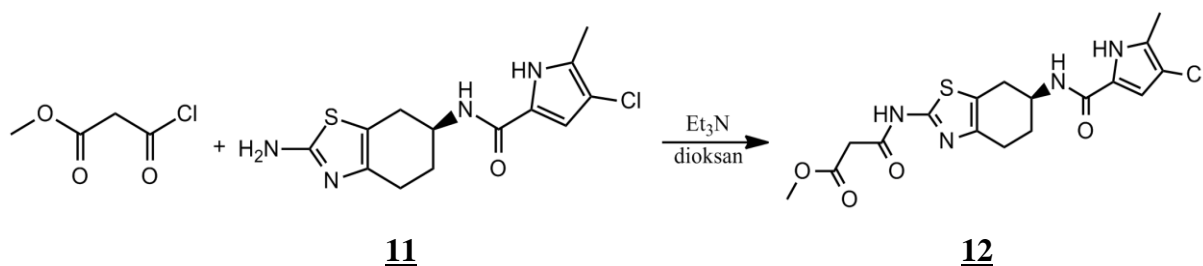
71 mg 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina (0,42 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali 45 mg Na₂CO₃ (1 ekv) in bučko z reakcijsko zmesjo segrevali na oljni kopeli pri 40 °C. Nato smo raztopini počasi dodali 110 mg spojine **9** (0,42 mmol, 1 ekv), ki smo jo predhodno raztopili v 5 mL DMF, in pustili reakcijsko zmes reagirati 3 ure in

pol. DMF smo potem odparili pod znižanim tlakom in še surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo

(MF: diklorometan/metanol = 20/1). Ker se spojina **11** in neznana nečistota nista ločili, smo izvedli še kolonsko kromatografijo z MF: diklorometan/metanol = 40/1 ter z MF: etilacetat. Ker ju še vedno nismo uspeli povsem ločiti, smo združili frakcije, pri katerih je bil delež spojine **11** večji kot delež nečistote in to uporabili v naslednji stopnji sinteze. Tako smo dobili 66 mg spojine **11**.

(S)-N-(2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-4-kloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid	
Elementna sestava: C ₁₃ H ₁₅ ON ₄ ClS	Izgled: belkasta kristalna snov
Molska masa: 310,80 g/mol	R_f: 0,46 (MF: diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 50,3%	Tališče: 112-114°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,71-1,81 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,85-1,94 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,13 (s, 3H, CH ₃), 2,42-2,46 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,53-2,56 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,77 (dd, 1H, J ₁ = 14,9 Hz, J ₂ = 55,5 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 4,07-4,16 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,67 (s, 2H, Ar'-NH ₂), 6,79 (d, 1H, J = 2,7 Hz, Ar-H), 7,89 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar-CONH), 11,60 (s, 1H, Ar-NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 10,07, 25,05, 28,85 (2C), 45,37, 108,12, 109,25, 112,39, 123,34, 127,40, 144,20, 159,31, 166,14 ppm
IR (ATR)	ν = 3464, 3422, 3194, 3137, 2917, 2848, 2361, 1661, 1622, 1578, 1519, 1435, 1413, 1385, 1370, 1336, 1276, 1220, 1172, 1094, 1073, 862, 828, 758, 689, 660, 636 cm ⁻¹
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 309,0577; izmerjen 309,0572
HPLC	t _r = 14,652 min (96,4% pri 254 nm)

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



66 mg spojine **11** (21 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 1,4-dioksanu (5 mL) in dodali 30 μ L trietilamina (22 mmol, 1,05 ekv). Zatem smo po kapljicah dodali metil malonil klorid (22,8 μ L, 21 mmol, 1 ekv) in pustili reagirati 24 ur. Dioksan smo nato odparili pod znižanim tlakom, trdni ostanek smo raztopili v etilacetatu in spirali najprej s H₂O (10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO₃ (10 mL) in nazadnje še z nasičeno raztopino NaCl (10 mL) ter posušili nad Na₂SO₄ in filtrirali. Raztopini smo nato dodali 300 mg silikagela in topilo odparili pod znižanim tlakom. Suh silikagel smo nanесли na kolono in eluirali z MF: etilacetat/heksan = 3/1. Tako smo dobili 11 mg spojine **12**, kar je bilo premalo, da bi lahko izvedli naslednjo stopnjo sinteze.

(S)-metil 3-((6-(4-kloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat	
Elementna sestava: C ₁₇ H ₁₉ O ₄ N ₄ ClS	Izgled: bela kristalna snov
Molska masa: 410,86 g/mol	R_f: 0,36 (MF: diklorometan/metanol = 9/1)
Izkoristek: 13,7%	Tališče: 124-126°C
¹H NMR (400 MHz, MeOD- <i>d</i> ₄) Spekter smo posneli v MeOD- <i>d</i> ₄ zaradi tako majhne količine spojine.	δ = 1,80-1,90 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 1,95-2,04 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,15 (s, 3H, CH ₃), 2,68-2,75 (m, 3H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 2,98 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 15,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,2 Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 3,58 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 3,66 (s, 3H, OCH ₃), 4,12-4,25 (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), 6,81 (s, 1H, Ar-H), 7,95 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, CONH), 11,63 (s, 1H, Ar-NH), 12,15 (s, 1H, Ar'-CONH) ppm

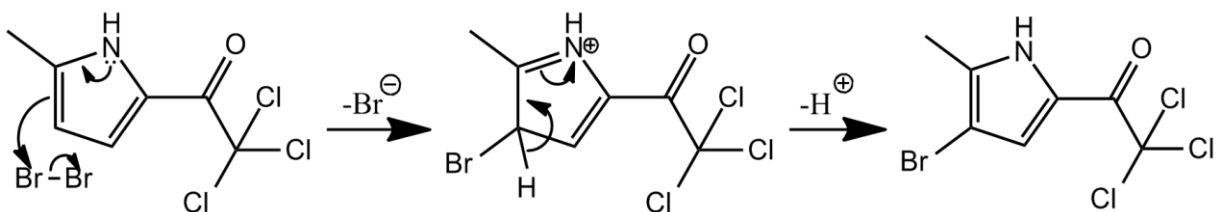
IR (ATR)	$\nu = 3204, 2954, 2849, 2361, 2342, 1736, 1681, 1624, 1526, 1436, 1335, 1259, 1215, 1154, 1073, 756, 688 \text{ cm}^{-1}$
HR-MS (ESI)	$[\text{M-H}]^-$ izračunan 409,0737; izmerjen 409,0731

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZE

5.1.1 HALOGENIRANJE PIROLNEGA OBROČA

5.1.1.1 Bromiranje

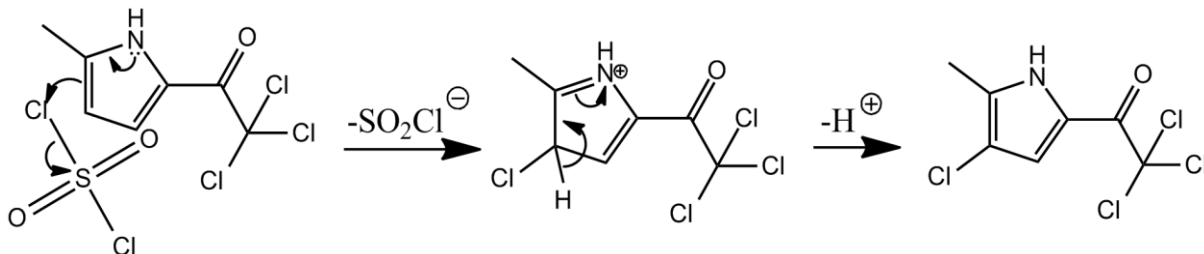


Shema 4: Mehanizem bromiranja pirolnega obroča

Sintezo smo začeli z elektrofilno aromatsko substitucijo na pirolnem obroču (**Shema 4**). Elektron donorska metilna skupina in elektron akceptorska keto skupina na obroču usmerita substitucijo z bromom najprej na mesto, ki je ob metilni skupini. Če je prisotnega dovolj broma, pa se bo tudi preostali vodikov atom na pirolnem obroču zamenjal z bromom. Potem, ko smo raztopili izhodno spojino v kloroformu in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C, smo reakcijsko zmes prepihali z argonom, da smo zagotovili inertno atmosfero. Nato smo po kapljicah dodajali brom, tako da smo v 30 minutah dodali celotno količino broma. Če bi ga dodali hitro, bi bila večja možnost tvorbe stranskih produktov. Po 15 minutah je reakcijska zmes postala motna, kar najverjetneje pomeni, da se je začel tvoriti produkt. Ko smo dodali ves brom, smo reakcijsko zmes odstavili z ledene kopeli in pustili reagirati pri sobni temperaturi najprej do naslednjega dne in ker reakcija še vedno ni potekla nato še preko vikenda (skupno 96 ur), kar je bilo verjetno predolgo, saj smo na razvitem TLC kromatogramu (MF: heksan/etilacetat = 3/1) videli poleg lis mono- in dibromiranega produkta še dve rožnati lisi (ena ostane na štartu, druga pa ima $R_f = 0,66$). Po uparevanju kloroforma pod znižanim tlakom smo surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo. Elucijo smo začeli z lipofilno MF: heksan/etilacetat = 15/1, nato pa smo povečali polarnost in eluirali z MF: heksan/etilacetat = 9/1. Ker se spojini nista ločili, smo kolono ponovili z bolj nepolarno

mobilno fazo, pri čemer smo najprej uporabili MF: heksan, nato pa MF: heksan/etilacetat = 15/1. Spojini se zopet nista povsem ločili, a smo se kljub temu odločili preiti na naslednjo stopnjo sinteze, da bi videli, če bi lahko ločili produkta naslednje stopnje. Posebej smo združili frakcije z večjim deležem spojine **1** in posebej frakcije z večjim deležem spojine **2**, ki smo jih nato ločeno uporabili v naslednji stopnji sinteze.

5.1.1.2 Kloriranje



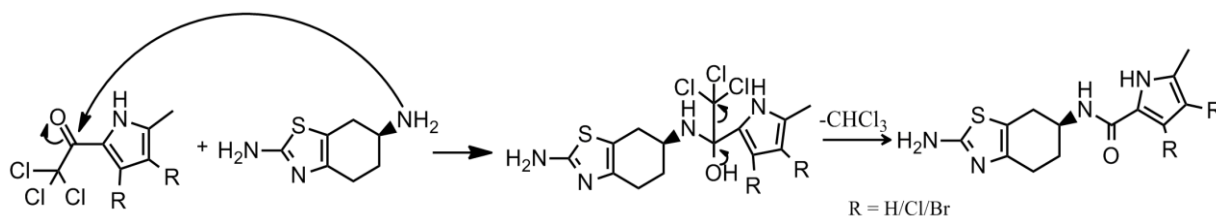
Shema 5: Mehanizem kloriranja pirolnega obroča

Pri halogeniranju pirolnega obroča poteče elektrofilna aromatska substitucija (**Shema 5**), pri kateri elektron donorska metilna skupina in elektron akceptorska keto skupina na obroču usmerita substitucijo na mesto, ki je ob metilni skupini. Če uporabimo več kot en ekvivalent sulfuril klorida, pa se bo tudi drugi vodikov atom na pirolnem obroču zamenjal s klorom. Raztopino izhodne spojine v kloroformu smo prepihali z argonom, da smo zagotovili inertno atmosfero in na ledeni kopeli ohladili na 0 °C. Sulfuril klorid smo nato dodajali po kapljicah, da ne bi nastalo preveč stranskih produktov. Dodati smo morali večkrat (najprej 1,2 ekv, nato pa še 4×0,5 ekv), saj je v steklenički s sulfuril kloridom bilo še dokaj malo tega in ga je najverjetneje med mnogokratnim predhodnim odpiranjem stekleničke že dosti razpadlo na zračni vlagi ($\text{SO}_2\text{Cl}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + 2\text{HCl}$). Nato smo dodali raztopino NaHCO_3 , da smo nevtralizirali nastale kisline in prekinili reakcijo, izvedli ekstrakcijo, da smo se znebili vodotopnih ostankov reagentov ter ekstrahirali z nasičeno raztopino NaCl in sušili nad Na_2SO_4 , da smo odstranili vso vodo iz organske faze. Kloroform smo odparili in izvedli kolonsko kromatografijo.

Z ločbo spojin **9** in **10** smo imeli veliko težav, saj ju tudi po treh kolonah z različnimi MF (heksan/etilacetat = 9/1, heksan/etilacetat = 15/1, heksan) nismo uspeli ločiti, nato pa smo ugotovili, da se lahko dokaj dobro ločita z MF: etilacetat/petroleter = 1/8. Zaradi izgub pri

ločbah smo sintezo nato ponovili, nato pa dvakrat izvedli kolonsko kromatografijo (zato tudi večje izgube) s slednjo MF, a kljub temu do popolne ločbe ni prišlo – v frakcijah z dikloriranim produktom je bilo še nekaj monokloriranega, zato smo se odločili z nadaljevanjem sinteze le s čisto spojino **9**.

5.1.2 TVORBA AMIDA Z (S)-4,5,6,7-TETRAHIDROBENZO[1,2-d]TIAZOL-2,6-DIAMINOM



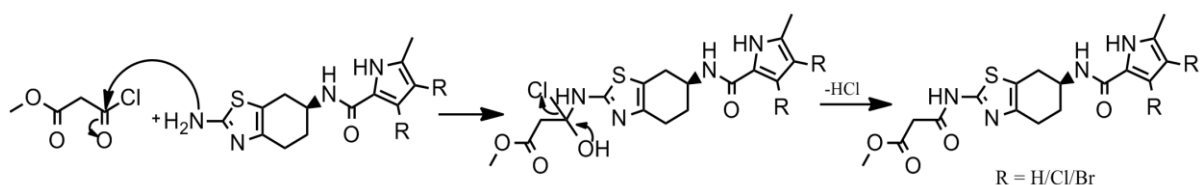
Shema 6: Mehanizem tvorbe amida

Tvorba amida poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije preko tetraedričnega intermediata (**Shema 6**). Aromatska amino skupina ima zaradi tiazolnega obroča manjšo elektronsko gostoto na dušiku in je posledično manj reaktivna kot alifatska amino skupina, zato slednja napade karbonylni ogljikov atom, ki je aktiviran z dobro izstopajočo CCl_3^- skupino. Izhodne spojine (**1**, **2** in **9**) smo raztopili v DMF in počasi dodajali 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-d]tiazol in Na_2CO_3 , ki sta bila predhodno raztopljeni v DMF in na oljni kopeli segreta na 40 °C. Pustili smo reagirati 2 uri (pri spojini **9** 3 ure in pol), nato pa topilo odparili pod znižanim tlakom in izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo.

Kljub temu, da izhodni spojini **1** in **2** nista bili čisti, ampak zmesi le-teh in smo zato dobili pri obeh sintezah zmes produktov **3** in **4**, nismo imeli problemov pri njuni ločbi s kolonsko kromatografijo (MF: najprej diklorometan/metanol = 40/1, nato diklorometan/metanol = 30/1). Na drugi strani je bila izolacija spojine **11** zelo težavna, saj je bila slabo topna v naši mobilni fazi diklorometan/metanol = 20/1 in so se spojine (predvsem **11** in nečistota **13**, ki smo se je znebili šele v naslednji stopnji sinteze) enakomerno spirale, ne da bi se ločile. Če pa smo vzorec pred nanosom na kolono raztopili v minimalni količini metanola in nanесли na kolono, do ločbe ni prišlo, saj so se zelo hitro eluirale iz kolone. Tako smo s tremi kolonami zopet imeli veliko izgube, zato smo združili frakcije s spojino **11**, ki so

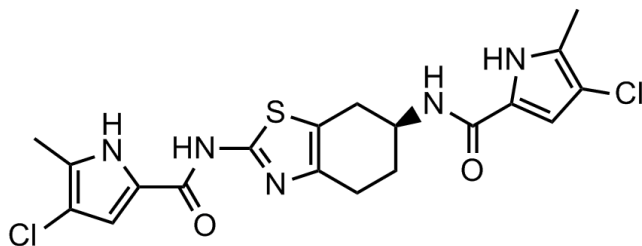
žal vsebovale tudi nečistoto **13** in šli na naslednji korak sinteze v upanju, da se znebimo nečistote.

5.1.3 TVORBA AMIDA Z METILMALONIL KLORIDOM



Shema 7: Mehanizem tvorbe amida

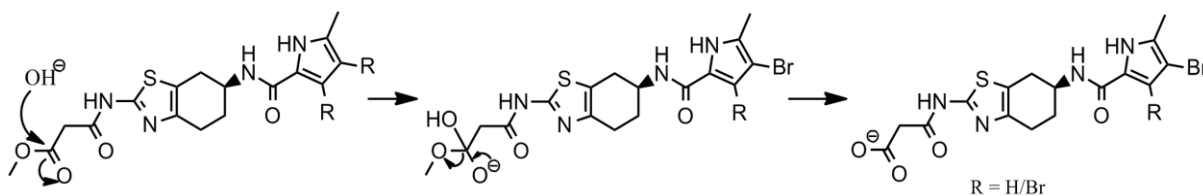
Tako kot v prejšnji stopnji tudi tukaj poteče nukleofilna substitucija preko tetraedričnega intermediata do amida (**Shema 7**). Reakcijskim zmesem smo dodali še trietilamin, nato pa po kapljicah metil malonil klorid in pustili reagirati na sobni temperaturi 24 ur. Pri sintezi spojin **5** in **6** smo nato dodali še 0,5 ekv metil malonil klorida, saj smo na TLC kromatogramu opazili še veliko nezreagiranih izhodnih spojin **3** in **4** in pustili reagirati še 1 uro. Po končani reakciji smo topilo uparili pod znižanim tlakom, trdni ostanek pa raztopili v etilacetatu in spirali z vodo, NaHCO₃ in NaCl. Etilacetat smo uparili na rotavaporju in produkte očistili s kolonsko kromatografijo. Pri čiščenju spojin **5** in **6** smo uporabili mobilno fazo heksan/etilacetat = 1/1 in dobili čista produkta. Pri izolaciji spojine **12** pa smo (z MF: najprej etilacetat/heksan = 3/1, potem etilacetat/heksan = 5/1 in nazadnje etilacetat) ločili tri spojine, katerih lise smo videli na TLC kromatogramu pred kolono – to so **13** (stranski produkt prejšnje stopnje sinteze, **Slika 7**), produkt **12** in izhodna spojina **8**. S spojinama **5** in **6** smo izvedli še zadnjo stopnjo sinteze, spojine **12** pa smo dobili premalo, da bi lahko nadaljevali.



Slika 7: Spojina **13**, stranski produkt sinteze spojine **11**.

13: (S)-N,N'-(4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diil)bis(4-kloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid)	
Elementna sestava: C ₁₉ H ₁₉ O ₂ N ₅ Cl ₂ S	Izgled: belkasta kristalna snov
Molska masa: 452,36 g/mol	R_f: 0,10 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)
¹H NMR (400MHz, DMSO-d ₆)	$\delta = 1,82-1,93$ (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $1,97-2,05$ (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $2,15$ (s, 3H, CH ₃), $2,19$ (s, 3H, C' ₃ H ₃), $2,61-2,61$ (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $2,70-2,77$ (m, 2H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $2,99$ (dd, 1H, $J_1 = 15,7$ Hz, $J_2 = 5,1$ Hz, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $4,16-4,25$ (m, 1H, C-CH ₂ -CH ₂ -CH-CH ₂ -C), $6,82$ (d, 1H, $J = 2,8$ Hz, Ar-H), $7,25$ (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, Ar'-H), $7,96$ (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-CONH-CH), $11,63$ (s, 1H, Ar'-CONH-tiazol), $12,05$ (s, 2H, Ar-NH + Ar'-NH) ppm <i>Opomba: za protone Ar-CH₃/Ar'-CH₃ in Ar-H/Ar'-H ne vemo, kateri so na katerem pirolnem obroču.</i>
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	$\delta = 10,08, 10,24, 24,68, 28,43, 28,74, 45,14, 108,13, 109,26, 109,29, 111,90, 119,29, 123,31, 127,46, 130,46, 144,55, 145,09, 159,36, 166,66, 167,20$ ppm
HR-MS (ESI)	[M-H] ⁻ izračunan 450,0558; izmerjen 450,0550
HPLC	t _r = 21,511 min (96,3% pri 254 nm)

5.1.4 ALKALNA HIDROLIZA ESTRA



Shema 8: Mehanizem hidrolize estra

Hidroksilni ion nukleofilno napade ogljikov atom v estrski skupini in preko tetraedričnega intermedata poteče nukleofilna substitucija (**Shema 8**). V metanolu raztopljeni izhodni spojini dodamo vodno raztopino NaOH in pustimo reagirati 20 ur pri sobni temperaturi (če bi segrevali, bi lahko prišlo do hidrolize amida). Ker smo nato na TLC

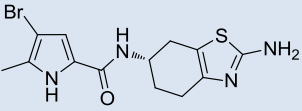
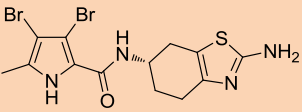
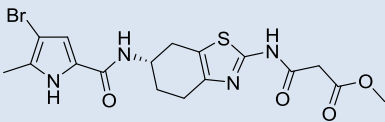
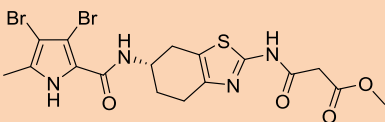
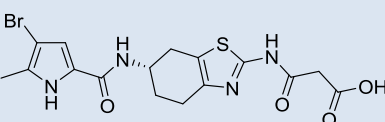
kromatogramu videli še nekaj nezreagirane izhodne spojine, smo dodali še 2 ekv NaOH in pustili reagirati še 4 ure. Potem smo izolacijo izvedli brez večjih problemov. Metanol smo uparili pod znižanim tlakom, zaostalo vodno raztopino pa ekstrahirali z etilacetatom, da smo se znebili nepolarnih nečistot in morebitne nezreagirane izhodne spojine. Bazično vodno fazo smo nato nakisali s koncentrirano HCl do pH=1 (s tem se $\text{COO}^- \text{Na}^+$ pretvori v COOH), da se je naš produkt izoboril. Oborino smo filtrirali z odsesavanjem, matičnico pa ekstrahirali z etilacetatom, da smo dobili še dodatno količino produkta. Etilacetat smo nato odparili pod znižanim tlakom in dobili čisti spojini **7** in **8**.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

5.2.1 DOLOČANJE INHIBITORNE AKTIVNOSTI NA IZOLIRANIH ENCIMIH

Končnim spojinam **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **11**, **12** ter **13** smo najprej izmerili inhibitorno aktivnost pri 10 μM in 100 μM koncentraciji na izoliranih encimih DNA-girazi ter topoizomerazi IV bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Aktivnim spojinam (rezidualna aktivnost <50% pri 100 μM) smo določili tudi vrednost IC_{50} (**Tabela 2**). Rezultate smo primerjali s strukturnimi analogi oroidina, ki so bili že predhodno sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (**Tabela 3**).

Tabela 2: Inhibitorne aktivnosti spojin **3-8**, in **11-13** na izoliranih encimih DNA-girazi ter topoizomerazi IV bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*

oznaka spojine	struktura spojine	<i>E. coli</i> DNA-giraza IC_{50}	<i>S. aureus</i> DNA-giraza IC_{50}	<i>E. coli</i> topoIV IC_{50}	<i>S. aureus</i> topoIV IC_{50}
3		44 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
4		12 μM	ni aktivnosti	ni aktivnosti	ni aktivnosti
5		0,73 μM	47 μM	230 μM	35 μM
6		1,0 μM	~100 μM	neaktivna	neaktivna
7		0,72 μM	7,3 μM	150 μM	5,2 μM

8		0,60 μM	12 μM	neaktivna	neaktivna
11		87 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno
12		0,32 μM	8,7 μM	~100 μM	neaktivna
13		~ 100 μM	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno	ni bilo izmerjeno

Tabela 3: Inhibitorne aktivnosti strukturo podobnih spojin na izoliranih encimih DNA-girazi ter topoizomerazi IV bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* (14)

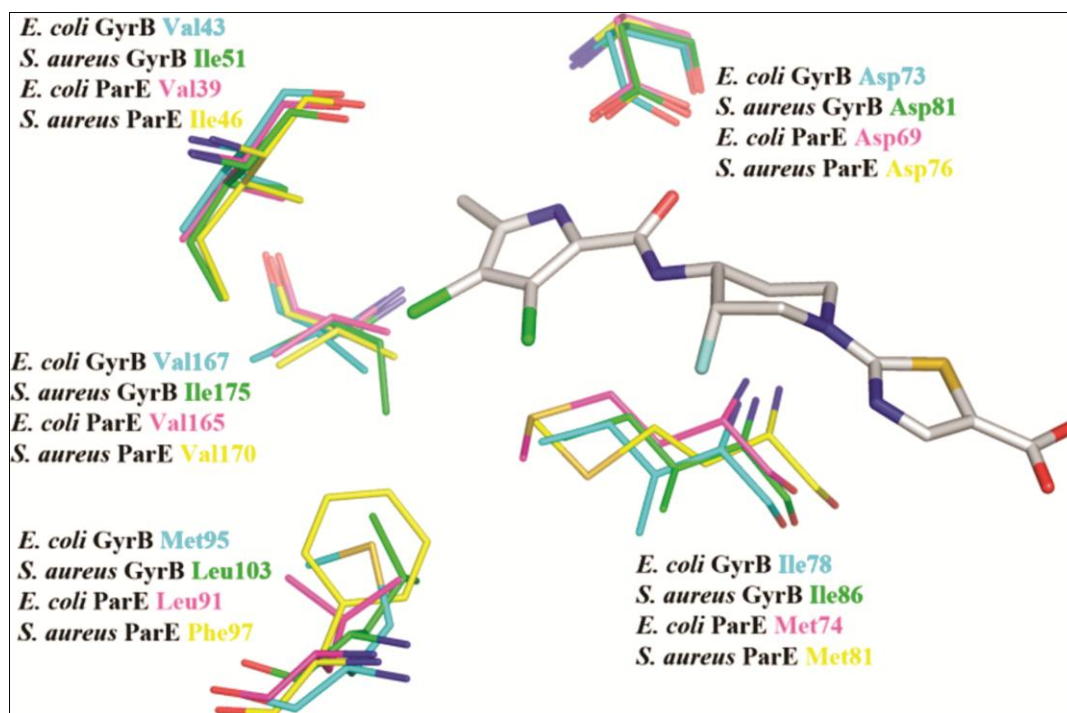
oznaka spojine	struktura spojine	<i>E. coli</i> DNA-giraza IC ₅₀	<i>S. aureus</i> DNA-giraza IC ₅₀	<i>E. coli</i> topoIV IC ₅₀	<i>S. aureus</i> topoIV IC ₅₀
TTM07		12 μM	ni aktivnosti	ni aktivnosti	ni aktivnosti
KSK02		0,096 μM	110 μM	86 μM	ni aktivnosti
KSK15		0,069 μM	86 μM	74 μM	76 μM
KSK06		12 μM	ni aktivnosti	ni aktivnosti	ni aktivnosti
KSK09		0,40 μM	~150 μM	ni aktivnosti	ni aktivnosti

Spojina **3** je imela $IC_{50} = 44 \mu\text{M}$, spojina **4** je imela $IC_{50} = 12 \mu\text{M}$, spojina **11** pa $IC_{50} = 87 \mu\text{M}$. Z uvedbo metilmalonilne skupine smo dosegli znižanje IC_{50} na DNA-girazo *E. coli*. Spojina **5** je tako imela $IC_{50} = 0,73 \mu\text{M}$, kar je 60-kratno znižanje v primerjavi s spojino **3**, spojina **6** je imela $IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$, kar je 12-kratno znižanje IC_{50} v primerjavi s spojino **4**, spojina **12** pa je imela $IC_{50} = 0,32 \mu\text{M}$, kar je 270-kratno znižanje IC_{50} v primerjavi s spojino **11**. Znižanje IC_{50} je najverjetneje posledica interakcije z gvanidinskim delom Arg136 (z vodikovo vezjo), ki je ATP ne doseže. Z uvedbo te nove interakcije smo dosegli tudi aktivnost na DNA-girazi iz *S. aureus* v nizkem mikromolekularnem območju, in sicer znaša IC_{50} spojine **5** $47 \mu\text{M}$, IC_{50} spojine **6** znaša $\sim 100 \mu\text{M}$, IC_{50} spojine **12** pa $8,7 \mu\text{M}$. S hidrolizo metilnega estra se aktivnost na DNA-girazi iz *E. coli* ni bistveno izboljšala. IC_{50} spojine **7** je znašal $0,72 \mu\text{M}$, kar je bilo praktično enako kot IC_{50} spojine **5**, IC_{50} spojine **8** pa je znašal $0,60 \mu\text{M}$, kar je bilo le malenkost nižje od spojine **6**, ki je imela $IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$. Iz tega lahko sklepamo, da interakcija naših inhibitorjev DNA-giraze z Arg136 res poteka preko vodikove in ne preko ionske vezi, saj bi v primeru ionske vezi aktivnost spojin **7** in **8** bila veliko boljša od spojin **5** in **6**.

Tudi fragmenti na pirolnem obroču bistveno prispevajo k zaviralni aktivnosti na encime. Uvedba metilne skupine na mestu 5 na pirolu namesto broma zmanjša aktivnost inhibitorjev na DNA-girazo *E. coli*. IC_{50} spojine **TTM07** znaša $12 \mu\text{M}$, IC_{50} spojin **3** in **4** pa znaša $44 \mu\text{M}$ (skoraj 4-krat višje kot pri **TTM07**) ter $12 \mu\text{M}$ (toliko kot pri **TTM07**). IC_{50} spojine **5** znaša $0,73 \mu\text{M}$, kar je skoraj 8-krat višje kot IC_{50} spojine **KSK02**, ki znaša $0,096 \mu\text{M}$. IC_{50} spojine **7** znaša $0,72 \mu\text{M}$, kar je 10-krat višje od IC_{50} spojine **KSK15**, ki znaša $0,069 \mu\text{M}$. Zamenjava klora z metilno skupino na mestu 5 na pirolu je prav tako privedla do šibkejše aktivnosti na DNA-girazo *E. coli*. IC_{50} spojine **11** znaša $87 \mu\text{M}$, kar je 7-krat višje od IC_{50} spojine **KSK06**, ki znaša $12 \mu\text{M}$; IC_{50} spojine **12** pa znaša $0,32 \mu\text{M}$, kar je skoraj enako kot IC_{50} spojine **KSK09**. To je najverjetneje posledica zmanjšanja površine hidrofobnega pirolnega dela spojin in posledično šibkejših interakcij v hidrofobnem žepu GyrB, kamor se veže adeninski fragment ATP, ter zmanjšanja kislosti pirolnega NH vodika in posledično šibkejše vodikove vezi med pirolnim NH in Asp73. Z zamenjavo broma z metilno skupino na pirolu na mestu 5 se je izboljšala aktivnost na DNA-girazi *S. aureus*. Tako se je IC_{50} zmanjšal s $110 \mu\text{M}$ na $47 \mu\text{M}$ (primerjava spojin **KSK02** in **5**) in s $87 \mu\text{M}$ na $7,3 \mu\text{M}$ (primerjava spojin **KSK15** in **7**).

Pri aktivnosti na topoizomerazo IV ima zamenjava broma z metilno skupino na pirolu na mestu 5 podoben učinek kot pri aktivnosti na DNA-girazo – aktivnost na topoIV iz *E. coli* se poslabša s 86 μM na 230 μM (primerjava spojin **KSK02** in **5**) ter s 74 μM na 150 μM (primerjava spojin **KSK15** in **7**). Aktivnost na topoIV iz *S. aureus* se s to zamenjavo izboljša, saj imata spojin **7** in **5** nižji IC_{50} (5,2 μM oziroma 35 μM od njihovih analogov **KSK15** (IC_{50} znaša 76 μM) in **KSK02**, ki celo nima aktivnosti na topoIV iz *S. aureus*.

Zanimiva je tudi situacija pri uvedbi broma na pirolu na mesto 3. Aktivnost na DNA-girazi *E. coli* se ni bistveno spremenila – malce se je poslabšala v primeru **5** ($\text{IC}_{50} = 0,73 \mu\text{M}$) \rightarrow **6** ($\text{IC}_{50} = 1,0 \mu\text{M}$) in malce izboljšala v primerih **3** ($\text{IC}_{50} = 44 \mu\text{M}$) \rightarrow **4** ($\text{IC}_{50} = 12 \mu\text{M}$) ter **7** ($\text{IC}_{50} = 0,72 \mu\text{M}$) \rightarrow **8** ($\text{IC}_{50} = 0,60 \mu\text{M}$). Aktivnost na DNA-girazi *S. aureus* se je poslabšala, saj se je IC_{50} povečal s 47 μM na $\sim 100 \mu\text{M}$ (primerjava spojin **5** in **6**) oziroma s 7,3 μM na 12 μM (primerjava spojin **7** in **8**).



Slika 8: Prekrivanje kristalnih struktur GyrB iz *E. coli* (svetlo modra barva), GyrB iz *S. aureus* (zelena barva), ParE iz *E. coli* (škrlatna barva) in ParE iz *S. aureus* (rumena barva). S sivimi palčkami je ponazorjena struktura zaviralca GyrB pirolamidnega tipa. Povzeto po (14).

Z uvedbo broma na mesto 3 smo povsem izgubili aktivnost na topoizomerazo IV tako *E. coli* kot *S. aureus*, kar je najverjetneje posledica sterične oviranosti v hidrofobnem žepu topoIV (**Slika 8**) – E podenota topoizomeraze IV ima namreč manjši hidrofobni žep, v katerem inhibitorji tvorijo hidrofobne interakcije, kot ga ima B podenota DNA-giraze. Tako sta npr. pri DNA-girazi *E. coli* Met95 in Ile78 zamenjani z večjima Leu91 in Met74 pri DNA-girazi *S. aureus*, kar zmanjša prostornino hidrofobnega žepa. Spojine z večjim 3,4-dibromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem se tako ne morejo usidrati v manjši hidrofobni žep na ParE, medtem ko inhibitorji s 4-bromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem nimajo teh težav. Zanimivo bi bilo videti tudi primerjavo spojin s 4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ter 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem, da bi videli, če je tudi slednje ogrodje preveliko za vezavo v hidrofobni žep na ParE ali ne, a slednjih spojin žal nismo uspeli sintetizirati.

5.2.2 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI - MIC₉₀ IN MBC₉₉

Spojina 5, 6, 7, 11, 12 in 13 (spojine 8 smo sintetizirali premalo, da bi lahko izvedli testiranje protibakterijske aktivnosti) je bil najprej določen delež inhibicije rasti bakterij *Enterococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus* pri koncentraciji 50 µM v primerjavi s ciprofloksacinom kot pozitivno kontrolo. Rezultati so prikazani v *Tabeli 4* in *Tabeli 5*.

Tabela 4: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij *Enterococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus* po 4, 8 in 24 urah

spojina	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<u>5</u>	106	92,7	43,9	109	101	60,6
<u>6</u>	118	102	95,2	134	107	94,0
<u>7</u>	19,2	-2,89	-7,65	16,4	8,57	-4,15
<u>11</u>	54,9	9,34	6,88	47,5	17,1	-7,56
<u>12</u>	10,8	-0,460	-20,4	14,7	33,4	3,18
<u>13</u>	67,1	19,9	13,0	77,0	24,1	2,07

Tabela 5: Delež (izražen v %) inhibicije rasti bakterij *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* po 4, 8 in 24 urah

spojina	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
<u>5</u>	0,12	-1,28	6,77	-2,18	7,00	7,14
<u>6</u>	10,5	-9,13	-2,79	-9,88	4,77	5,57
<u>7</u>	1,54	0,970	9,83	-0,930	10,7	2,69
<u>11</u>	5,10	-18,0	0,940	-2,23	9,83	12,3
<u>12</u>	-9,32	-39,3	0,060	5,10	3,93	2,03
<u>13</u>	13,6	11,4	6,53	-2,44	17,4	-0,200

Spojini **5** in predvsem **6** sta izkazali dobro protibakterijsko delovanje na grampozitivnih bakterijskih kulturah *Enterococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus* pri 50 μM koncentraciji, saj sta zavrla bakterijsko rast v podobni meri kot ciprofloksacin, vendar je protibakterijska aktivnost spojine **5** pri obeh sevih po 24 urah precej padla (z 92,7% na 43,9% pri *E. faecalis* in s 101% na 60,6% pri *S. aureus*). Za deleže inhibicije rasti bakterij, ki so večji od 100% in manjši od 0% lahko ta odstopanja pripišemo napakam pri merjenju. Po drugi strani pa spojine **7**, **11**, **12** in **13** na omenjenih grampozitivnih kulturah niso dale dobrih rezultatov, saj je bil po 4 urah delež inhibicije rasti bakterij za spojino **13** manj kot 80%, za spojino **11** manj kot 55%, za spojini **7** in **12** pa celo manj kot 20%, po 8 in 24 urah pa je ta delež še padel. Na gramnegativni *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa* ni protibakterijsko delovala nobena izmed spojin. Neaktivnost spojin proti omenjenim bakterijskim kulturam je verjetno posledica slabega prodiranja skozi bakterijsko celično steno, ki je pri gramnegativnih bakterijah kompleksnejša kot pri grampozitivnih bakterijah. Če primerjamo spojini **5** in **7**, vidimo, da se strukturno razlikujeta le po končnem malonilnem delu (spojina **5** je v obliki metilnega estra, **7** pa kot prosta kislina), kljub temu pa je protibakterijsko delovanje spojine **5** dosti boljše, čeprav so *in vitro* testiranja pokazale boljšo aktivnost spojine **7** na DNA-girazo v primerjavi s spojino **5**. To si lahko razložimo z boljšim prodiranjem estrov kot pa prostih kislin preko bakterijske celične stene v citoplazmo, kjer se nahaja DNA-giraza, saj negativni naboj spojine ovira prehod skozi negativno nabito celično steno bakterij. Tako lahko predvidevamo, da tudi spojina **8** nima protibakterijskega učinka tako na grampozitivne kot gramnegativne bakterije.

Na podlagi deleža inhibicije rasti bakterij po 24 urah smo izbrali spojini **5** in **6** za določitev MIC₉₀ (najnižja koncentracija spojine, ki zavre rast bakterij za $\geq 90\%$) in MBC₉₉ (najnižja koncentracija spojine, ki uniči $\geq 99,9\%$ bakterijske kulture) na bakterijskih kulturah *Enterococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus* (**Tabela 6** in **Tabela 7**).

Tabela 6: MIC₉₀ spojin **5** in **6**

spojina	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)			<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		
	4 h	8 h	24 h	4 h	8 h	24 h
5	50 μM	75 μM	125 μM	50 μM	75 μM	125 μM
6	12,5 μM	12,5 μM	25 μM	6,25 μM	12,5 μM	25 μM

Tabela 7: MBC₉₉ spojini **5** in **6**

spojina	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
5	>125 µM	>125 µM
6	>75 µM	>75 µM

MIC₉₀ spojine **5** na *Enterococcus faecalis* je znašal 125 µM po 24 urah, prav toliko je znašal tudi MIC₉₀ na *Staphylococcus aureus*, medtem ko je MIC₉₀ spojine **6** znašal 25 µM po 24 urah tako na *E. faecalis* kot tudi na *S. aureus*. Pri obeh spojinah se s časom MIC₉₀ rahlo povečuje, za kar je najverjetneje kriva eksponentna rast bakterij – število bakterij namreč z vsako delitvijo raste eksponentno, medtem ko količina inhibitorja ostaja enaka, zato je zaviranje rasti bakterij lahko čez čas navidezno manjše. Pri določanju MBC₉₉ ni nobena izmed spojin dosegla dovoljšnjega baktericidnega učinka tudi pri najvišji koncentraciji pri določanju, kar je bila 125 µM za spojino **5** in 75 µM za spojino **6**.

Kljub temu, da je spojina **5** izkazala večjo aktivnost na DNA-girazo kot spojina **6**, pa je spojina **6** izkazala boljše protibakterijsko delovanje. Verjetno je le-to posledica boljšega prehajanja preko celične stene pri spojinah **6** kot pri spojinah **5**, saj je slednja bolj polarna (spojina **5** ima logP = 2,06, spojina **6** pa ima logP = 2,88) in je morda logP tisti, ki je odgovoren za boljše prehajanje preko celične stene; za doseganje protibakterijskega učinka je odgovornih več dejavnikov poleg inhibicije samega encima, med drugim tudi polarnost inhibitorja, ki vpliva na prehajanje skozi celično steno. Ravno slednje predstavlja največjo oviro pri doseganju protibakterijskega učinka, saj je prehajanje skozi bakterijsko celično steno precej kompleksno, poleg tega pa imajo bakterije tudi izlivne črpalke, s katerimi se znebijo njim neželenih snovi, kot so inhibitorji DNA-giraze. Tukaj so še posebej problematične gramnegativne bakterije, proti katerim naši inhibitorji kljub dobrim aktivnostim na DNA-girazo niso imeli protibakterijskega učinka, najverjetneje prav zaradi slabega prehajanja skozi njihovo celično steno, ki vsebuje še zunanjo membrano, ki ima drugačne lastnosti od citoplazemske membrane in vsebuje izlivne črpalke.

6 SKLEP

Sintetizirali smo šest novih inhibitorjev bakterijske DNA-giraze, ki imajo za osnovni skelet 4-bromo- oziroma 3,4-dibromo-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid. Pri sintezi smo imeli največ težav z izolacijo spojin, predvsem zaradi neuspešnih ločb s kolonsko kromatografijo, kjer smo ponekod morali le-to ponavljati. Pri bromiranju pirolnega obroča se zaradi neustrezne mobilne faze produkta **1** in **2** tudi po ponovitvi kolonske kromatografije nista povsem ločila, tako da bi morali ali najprej poiskati primerno mobilno fazo za ločbo spojin ali pa brez čiščenja iti na naslednjo stopnjo sinteze, kjer sta se produkta ločila brez težav. Pri ostalih stopnjah z izolacijo ni bilo večjih težav, tako da bi za boljši izkoristek bilo potrebno optimizirati reakcijske pogoje, predvsem čase reakcij.

Spojine **3-8** zavirajo DNA-girazo iz *E. coli* in *S. aureus* v submikromolarni in mikromolarni koncentraciji, spojini **5** in **7** pa zavirata tudi topoIV iz *E. coli* in *S. aureus* v mikromolarni koncentraciji. Vidimo, da uvedba broma na mesto 3 pirolnega obroča privede do izgube zaviralne aktivnosti na topoIV. Za protibakterijski učinek je boljša (če ne že kar potrebna) oblika terminalnega estra namesto proste kisline, najverjetneje zaradi boljšega prodiranja spojine v bakterijske celice.

Sintetizirali smo tudi tri nove zaviralce bakterijske DNA-giraze (**11-13**), ki imajo za osnovno ogrodje 4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamid. Pri kloriranju pirolnega obroča nam je sulfuril klorid najverjetneje že predhodno v nekem deležu razpadel, saj smo ga morali dodati kar precej več od pričakovanega. Pri izolaciji produktov **9** in **10** je bilo težavno določiti mobilno fazo, s katero bi se ločili. Prav tako je bila težavna izolacija spojine **11**, saj nismo našli mobilne faze, v kateri bi se dobro raztopila in bi se hkrati ločila od ostalih nečistot, zato smo naredili kompromis. Na tem mestu bi morda bilo bolje uporabiti drugo možnost izolacije, denimo s kristalizacijo, vendar bi potrebovali večjo količino spojine. Tudi izolacija spojine **12** je bila težavna, a smo jo rešili tako, da smo po ekstrakciji v raztopino dodali silikagel in šele nato topilo odparili pod znižanim tlakom, da smo imeli na silikagelu že nanešeno spojino **12** z nečistotami. Le-ta ima v primerjavi s spojinama **5** in **6** manjši volumen hidrofobnega obroča in posledično manj interakcij v hidrofobnem žepu GyrB, kar pojasni manjšo aktivnost na encime in slabše protibakterijsko delovanje.

ATP vezavno mesto DNA-giraze B ima velik potencial kot tarča za protibakterijske učinkovine, predvsem zaradi podobnosti s topoizomerozo IV in torej možne dvojne inhibicije. Smiselno bi bilo, da bi farmacevtska podjetja začela vlagati več sredstev v razvoj novih protibakterijskih učinkovin, saj je pojavljanje odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam nevaren problem v porastu, za katerega je rešitev odkritje novih strukturnih tipov zdravilnih učinkovin ali pa učinkovin z delovanjem na nove tarče. In čeprav bo potrebno še veliko nadaljnjih raziskav, da bomo dosegli tudi ustrezno selektivno toksičnost in širokospektralno delovanje, tudi na gramnegativne bakterije, so naše spojine dale pomembne rezultate v smeri optimizacije učinkovin z delovanjem na podenoto B DNA-giraze.

7 LITERATURA

- (1) **Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J.** Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 48: 1-12.
- (2) **Stuart B. Levy in Bonnie Marshall.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Med. Suppl.* 2004, 10(12): 122-129.
- (3) **David C. Hopper.** Mechanisms of fluoroquinolone resistance: The never-ending story. *Drug Resist Updat*, 1999, 2(1): 38-55.
- (4) **Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A.** Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.* 2013, 66 (571-591)
- (5) **Silver, L. L.** Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, 24: 71–109.
- (6) **Boyd LB, et al.** Increased fluoroquinolone resistance with time in *Escherichia coli* from 17,000 patients at a large county hospital as a function of culture site, age, sex and location. *BMC Infect. Dis.*, 2008, 8:4.
- (7) **Wang, J. C.** Cellular roles of topoisomerases: A molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, 3: 430-440.
- (8) **Tomašić, T. in Peterlin Mašič, L.** Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, 14: 130-151.
- (9) **Sissi, C.; Palumbo, M.** In front of and behind the replication fork: bacterial type IIA topoisomerases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010, 67: 2001-2024.
- (10) **Maxwell J. J.** DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 1997, 5: 102-109.
- (11) **Champoux J. J.** DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70: 369-413.
- (12) **Maxwell A, Lawson DM.** The ATP binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003, 3: 283-303.
- (13) **Chene P.** ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, 1: 665-673.
- (14) **Kale R. R., Kale M. G., Waterson D., Raichurkar A., Hameed S. P., Manjunatha M. R., Kishore Reddy B. K., Malolanarasimhan K., Shinde V., Koushik K., Kumar Jena L.,**

- Menasinakai S., Humnabadkar V., Madhavapeddi P., Basavarajappa H., Sharma S., Nandishaiah R., Mahesh Kumar K. N., Ganguly S., Ahuja V., Gaonkar S., Naveen Kumar C. N., Ogg D., Boriak-Sjodin P. A., Sambandamurthy V. K., deSousa S. M., Ghorpade S. R.** Thiazolopyridone ureas as DNA gyrase B inhibitors: Optimization of antitubercular activity and efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24: 870-890.
- (15) **Tomašič T., Katsamakos S., Hodnik Ž., Ilaš J., Brvar M., Solmajer T., Montalvão S., Tammela P., Banjanac M., Ergović G., Anderluh M., Peterlin Mašič L., Kikelj D.** Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site; *J. Med. Chem.*, 2015, 58: 5501-5521.
- (16) **Hodnik, Ž., Tomašič T., Petrlin Mašič L., Chan F., Kirby R. W., Madge D. J., Kikelj D.** Novel state-dependent voltage-gated sodium channel modulators, based on marine alkaloids from *Agelas* sponges. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70: 154-164.
- (17) **Hodnik Ž., Łoś J. M., Žula A., Zidar N., Jakopin Ž., Łoś M., Sollner Dolenc M., Ilaš J., Węgrzyn G., Peterlin Mašič L., Kikelj D.** Inhibition of biofilm formation by conformationally constrained indole-based analogues of the marine alkaloid oroidin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24(11): 2530-2534.
- (18) **Zidar N., Montalvão S., Hodnik Ž., Nawrot D. A., Žula A., Ilaš J., Kikelj D., Tammela P., Peterlin Mašič L.** Antimicrobial Activity of the Marine Alkaloids, Clathrocin and Oroidin, and Their Synthetic Analogues. *Mar. Drugs*, 2014, 12(2): 940-963.
- (19) **Brino L., Urzhmutsev A., Mousli M., Bronner C., Mitschler A., Oudet P., Moras D.** Dimerization of *Escherichia coli* DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATP catalytic center. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 9468-9475.
- (20) **Schneider C. S., Mierau J.** Dopamine autoreceptor agonists: resolution and pharmacological activity of 2,6-diaminotetrahydrobenzothiazole and an amino thiazole analogue of apomorphine. *J. Med. Chem.*, 1987, 30: 494-498.