

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES KLEMENČIČ

**SINTEZA ETILSEČNINSKIH DERIVATOV 4,5,6,7-
TETRAHIDROBENZO[1,2-*d*]TIAZOL-2,6-DIAMINA
KOT ZAVIRALCEV DNA GIRAZE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES KLEMENČIČ

**SINTEZA ETILSEČNINSKIH DERIVATOV 4,5,6,7-
TETRAHIDROBENZO[1,2-*d*]TIAZOL-2,6-DIAMINA
KOT ZAVIRALCEV DNA GIRAZE**

**SYNTHESIS OF ETHYLUREA DERIVATIVES OF
4,5,6,7-TETRAHYDROBENZO[1,2-*d*]THIAZOLE-2,6-
DIAMINE AS INHIBITORS OF DNA GYRASE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Encimska testiranja so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, vrednotenje protibakterijske aktivnosti pa bo izvedeno na Univerzi v Helsinkih.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za vso strokovno pomoč, nasvete, prijaznost in podarjeno znanje pri izdelavi magistrske naloge.

Velika zahvala staršem, ki so mi omogočili izbrani študij, me pri tem spodbujali in mi ves čas stali ob strani.

Izjava

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

Ines Klemenčič

Ljubljana, 2015

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE II.....	2
1.1.1	DNA giraza.....	2
1.1.2	Topoizomeraza IV	4
1.2	VEZAVNO MESTO ZA ATP.....	5
1.3	RAZVOJ ETILSEČNINSKIH DERIVATOV	8
2	NAČRT ZA DELO.....	14
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	REAGENTI IN TOPILA	17
3.2	KROMATOGRFSKE METODE	17
3.2.1	Tankoplastna kromatografija (TLC).....	17
3.2.2	Kolonska («flash») kromatografija.....	17
3.3	SPEKTROSKOPSKE METODE	18
3.3.1	Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	18
3.3.2	Masna spektroskopija (MS).....	18
3.4	POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN	19
3.5	MOLEKULSKO SIDRANJE	19
3.6	DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA.....	19
3.7	BIOKEMIJSKA TESTIRANJA	19
4	EKSPERIMENTALNO DELO.....	20
4.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)- ali (<i>R</i>)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata	20
4.2	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)- ali (<i>R</i>)-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata	22

4.3	Sinteza (S)- ali (R)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-aminijevega klorida	24
4.4	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida	26
4.5	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-5-metilizoksazol-4-karboksamida.....	29
4.6	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -imidazol-4-karboksamida	30
4.7	Sinteza (S)- ali (R)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)izonikotinamida.....	31
4.8	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-(4-(2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata.....	34
4.9	Sinteza (S)-2-(2-aminotiazol-4-il)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)acetamida.....	35
4.10	Sinteza etil (S)- ali (R)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata.....	36
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	40
5.1.1	Uvedba karbamatne zaščitne skupine.....	40
5.1.2	Reakcija z etilizocianatom.....	40
5.1.3	Odščita karbamatne zaščitne skupine z acidolizo.....	41
5.1.4	Sintezna metoda sklopitve pri tvorbi amidne vezi.....	42
5.1.5	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida (spojina 9).....	43
5.1.6	Sinteza (S)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida (spojina 10).....	44
5.1.7	Sinteza (S),(R)- <i>N</i> -(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)izonikotinamida.....	45
5.1.8	Reakcija z etiloksalil kloridom.....	45

5.1.9	Reakcija alkalne hidrolize	47
5.2	REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ	48
6	SKLEP	52
7	LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1:	Katalitični cikel delovanja DNA giraze.	3
Slika 2:	Kristalna struktura GyrB ₂ in GyrA ₂ v kompleksu z ADPNP in inhibitorjem.....	4
Slika 3:	Prikaz interakcij med molekulo ATP in GyrB24.	6
Slika 4:	Hidrofobni žep v ATP vezavnem mestu DNA giraze.....	8
Slika 5:	Vezava novobiocina v vezavno mesto za ATP DNA giraze.....	9
Slika 6:	Vezava klorobiocina v vezavno mesto za ATP DNA giraze.	9
Slika 7:	Vezava aminobenzimidazol sečninskega fragmenta v vezavno mesto GyrB.....	10
Slika 8:	Prikaz tautomerije na strukturi spojine 3	10
Slika 9:	Optimizacija predhodno odkritih zaviralcev DNA giraze.....	14
Slika 10:	Predvidena vezava načrtovanega etilsečninskega inhibitorja DNA giraze v ATP vezavnem mestu encima.	15
Slika 11:	Neselektivna vezava Boc zaščitne skupine na obe amini skupini.	40
Slika 12:	Reakcija etilizocianata z aminom, nastanek etilsečninskega fragmenta.	41
Slika 13:	Reakcija Nu-substitucije in nastanek HCl.....	42
Slika 14:	Odščita Boc zaščitne skupine z acidolizo	42
Slika 15:	Protonacija aminske skupine z NaOH.....	45
Slika 16:	Protonacija obročnega dušika s citronsko kislino.	45
Slika 17:	Reakcija z etiloksalil kloridom in prikaz potovanja spojin na kromatogramu.....	46
Slika 18:	Predvidena vezava spojin a) 12 , b) 13 in c) 14 v vezavnem mestu za ATP DNA giraze iz bakterije <i>E. coli</i>	51

KAZALO SHEM in PREGLEDNIC

Shema 1: Reagenti in pogoji sinteznega načrtovanja spojin.	16
Shema 2: Nastanek amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta EDC in HOBt.....	43
Shema 3: Sintezna pot nastanka spojine 10	44
Shema 4: Sinteza spojine 19 z alkalno hidrolizo in dodatnim nakisanjem s HCl.	47

Preglednica I: Zaviralna aktivnost spojin 1,2,4 in 6 na encimu DNA girazi iz <i>S. aureusa</i> in <i>E. coli</i>	11
--	----

Preglednica II: Inhibicija DNA giraze iz bakterije <i>E. coli</i> <i>S</i> -izomernih spojin 10, 11, 12, 13, 15, 16 in 17	48
--	----

Preglednica III: Inhibicija DNA giraze iz bakterije <i>E. coli</i> <i>R</i> -izomernih spojin 14, 18 in 19	49
---	----

POVZETEK

Encim DNA giraza je znana tarča učinkovin s protibakterijskim delovanjem. V bakterijski celici ima pomembno vlogo pri podvajanju molekule DNA, pri čemer uvaja nove negativne zavoje in regulira stopnjo njene zvitosti. Zgrajen je iz dveh podenot A in dveh podenot B, ki skupaj tvorijo aktivno heterotetramerno strukturo. Podenota A je zadolžena za cepitev in ponovno združitev verig DNA, kar pa ji omogoča podenota B z vezavo in hidrolizo ATP. Učinek zaviralcev temelji na principu selektivne toksičnosti, saj je encim prisoten samo v prokariontskih, ne pa tudi v evkariontskih celicah. Ciljano delovanje na vezavno podenoto za ATP je eden od potencialnih načinov, kako rešiti problem navzkrižne rezistence pri že uveljavljenih protibakterijskih učinkovinah fluorokinolonih, ki primarno delujejo na podenoto A DNA giraze. Zaradi velike strukturne podobnosti encimov razreda topoizomeraz II, kamor uvrščamo DNA girazo in topoizomerozo IV, lahko izkoriščamo dvojno tarčno delovanje zaviralcev. S tem vplivamo na delovanje obeh encimov hkrati, kar je velika prednost, ki prav tako pripomore k zmanjšanju pojavnosti rezistence.

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo sintetizirali potencialne zaviralce DNA giraze novega strukturnega tipa z etilsečninskim fragmentom. Ohranili smo centralni 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminski skelet nedavno odkritih zaviralcev DNA giraze na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, z uvedbo ostalih substituentov pa skušali izboljšati zaviralno aktivnost in s tem doseči protibakterijsko aktivnost sintetiziranih spojin. Odločili smo se za uvedbo substituentov, ki izkoriščajo interakcije z Asp73, Arg76 in Arg136, saj so se te aminokisliline izkazale kot ključne za doseganje močne zaviralne jakosti znanih zaviralcev. Možnost tvorbe omenjenih interakcij smo potrdili tudi s pomočjo molekulskega sidranja spojin v vezavno mesto za ATP DNA giraze. Sprva smo sintetizirali samo *S*-enantiomere spojin in testirali njihovo zaviralno aktivnost na izoliranem encimu, ki je bila v μM območju. V naslednji fazi smo sintetizirali še *R*-enantiomere spojin, ki so se na testu izkazale najboljše, in primerjali njihovo aktivnost. Spojinam bomo določili tudi njihovo protibakterijsko aktivnost.

ABSTRACT

The enzyme DNA gyrase is a well-known target of drugs possessing antibacterial activity. In bacterial cells it plays an important role in the replication of DNA molecule. DNA gyrase catalyzes the introduction of negative supercoils and regulates the level of DNA supercoiling. It consists of two A and two B subunits, which together form an active heterotetrameric structure. Subunit A is responsible for breakage and reunification of DNA chains, which is enabled by subunit B that provides energy by ATP hydrolysis. The effect of inhibitors is based on the principle of selective toxicity, because DNA gyrase is present only in prokaryotic but not in eukaryotic cells. Targeting the ATP-binding subunit of DNA gyrase is one of the potential ways to overcome the problem of cross-resistance with the already established antibacterial drugs, such as fluoroquinolones primarily targeting subunit A of DNA gyrase. Due to the high structural similarities within the topoisomerase II enzyme family, which consist of DNA gyrase and topoisomerase IV, we may utilize the potential of inhibitors for dual targeting. This influences the function of both enzymes simultaneously, which is a great advantage that helps to reduce the occurrence of resistance.

During the experimental work of this master's thesis we synthesized a new structural type of DNA gyrase inhibitors bearing ethyl urea moiety. We maintained the central 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamine scaffold of recently discovered DNA gyrase inhibitors at the Faculty of pharmacy, University of Ljubljana. We introduced additional substituents to improve the inhibitory activity and consequently achieve antibacterial activity of the synthesized compounds. We decided to introduce substituents that have potential to interact with Asp73, Arg76 and Arg136, since these amino acids were recognized as very important for achieving potent enzyme inhibition of known inhibitors. The possibility of formation of already mentioned interactions was confirmed by means of the molecular docking of the compounds into the ATP-binding site of DNA gyrase. Initially, we synthesized only the *S*-enantiomers of compounds and tested their inhibitory activity on the isolated *Escherichia coli* DNA gyrase, which was found to be in the μM range. In the next step, we synthesized *R*-enantiomers of the most potent compounds and compared their activities. The antibacterial activity of final compounds will also be evaluated.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCl	acetilklorid
ADPNP	5'-adenilil- β,γ -imidodifosfat
AK	aminokislina, aminokislinski
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BOC₂O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
CHCl₃	kloroform
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC₅₀	koncentracija spojine, ki povzroči 50% odziv
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
Et₃N	triethylamin
EtAc	etilacetat
G-, G+	gram pozitiven, gram negativen
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HRMS	high resolution mass spectrometry – masna spektroskopija visoke ločljivosti
H-vez	vodikova vez
IC₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zavre delovanje encima za 50%
K_i	konstanta inhibicije
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija

MS	masna spektrometrija
Mtb	mikobakterija tuberkuloze (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
NMR	nuclear magnetic resonance - jedrska magnetna resonanca
Nu	nukleofil
Py	piridin
RA	rezidualna aktivnost
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	thin layer chromatography - tankoplastna kromatografija
UČ	učinkovina
UV	ultravijolično valovanje
vdW	van der Waals

1 UVOD

Odkritje antibiotikov je zdravstvu ponudilo nove, neprecenljive možnosti za obvladovanje bakterijskih bolezni. Tudi danes ni njihova vloga nič manjša, zato razvojni procesi vedno bolj napredujejo in dosegajo nove razsežnosti.

Protibakterijske učinkovine delujejo po principu selektivne toksičnosti na osnovi razlik med bakterijsko in človeško celico (1, 2). Med seboj se razlikujejo po učinku na bakterije, ki je bodisi baktericiden bodisi bakteriostatičen (popolnoma uniči bakterijo/zaustavi njeno rast), spektru delovanja (širok/ozek na G-/G+ bakterije), mehanizmu delovanja (antimetaboliti, interakcije s celično membrano, inhibicija biosinteze celične stene, proteinov in sinteze nukleinskih kislin), mestu delovanja (sistemsko/lokalno) in fizikalno-kemijskih lastnostih (3, 4).

V vsakdanjem življenju je potreba po protibakterijskih učinkovinah velika, saj so bakterije pogost povzročitelj bolezni, a je kljub temu pomembno preudarno ravnanje z njimi. Njihova prekomerna uporaba samo še pospeši nastanek odpornih bakterijskih sevov in vodi k neuspešnosti zdravljenja. Ključna pri terapiji bakterijskih okužb je najprej ustrezna indikacija, nato pa še ustrezno jemanje zdravila. S tem se izognemo pojavu rezistence, ki je vse bolj zaskrbljujoč, saj nam počasi začenja primanjkovati učinkovitih protibakterijskih učinkovin proti določenim, predvsem G- patogenom (5). Posledično se to kaže v povečanih stroških zdravljenja in vse večji stopnji umrljivosti. Poznanih je več mehanizmov rezistence: prisotnost encimov, ki razgradijo zdravilno učinkovino (UČ), sprememba vezavnega mesta kot posledica kromosomskih mutacij, pojav transmembranskih proteinov (izlivne črpalke), ki UČ odstranijo iz celice in sprememba tarčnega bakterijskega encima (3).

Znanost daje velik poudarek odkrivanju vedno novih, učinkovitejših protibakterijskih učinkovin in želi na ta način premagovati nastale prilagoditve patogenov. Žal smo pri tem omejeni s številom tarčnih mest v bakterijski celici, pa tudi s samim odkrivanjem novih učinkovin, ki je zelo zahteven, dolgotrajen in finančno obremenilen proces. Razvojna pot iskanja protibakterijskih učinkovin se lahko usmeri v iskanje bodisi povsem novih tarč, ki jim sledi odkrivanje UČ z drugačnim mehanizmom delovanja, še nerazvito rezistenco in

velikimi finančnimi vložki, ali v optimizacijo spojin z delovanjem na že znane tarče, pri katerih je cilj v čim večji meri preprečiti nastop že obstoječih mehanizmov rezistence (6).

1.1 BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE II

Topoizomeraze so encimi, ki spreminjajo topološka stanja DNA oz. uravnavajo stopnjo njenega zvitja (7). So življenjskega pomena za celice, saj njihovo delovanje vpliva na procese podvojevanja, prepisovanja in popravljanja nepravilnosti v strukturi DNA. Ločimo topoizomeraze tipa I, ki katalizirajo reakcije prekinitve ene verige DNA in topoizomeraze tipa II, ki katalizirajo prekinitev obeh verig (6, 8).

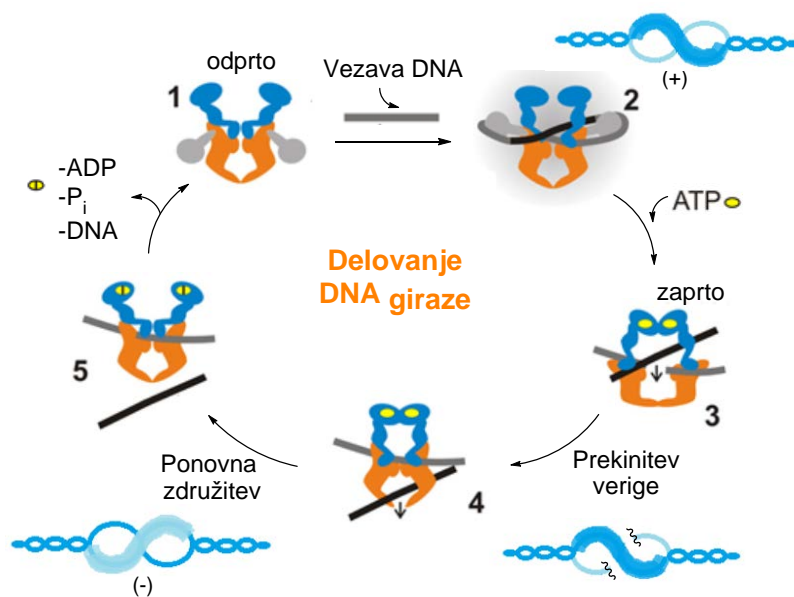
Topoizomeraze II so uveljavljene tarče za razvoj protibakterijskih učinkovin, saj z eno učinkovino ciljamo dva strukturno podobna encima, ki pa imata v celici različne biološke funkcije. To sta DNA giraza in topoizomeraza IV. S hkratnim delovanjem na dva encima podaljšamo čas razvoja rezistence, saj je manjša verjetnost, da pride hkrati do mutacije na dveh tarčnih genih kot samo na enem (8, 9).

Odkrili so strukturno podobnost teh encimov pri različnih sevih bakterij, kar je optimalno za razvoj inhibitorjev s širokim spektrom delovanja. Učinek temelji tudi na selektivnem delovanju inhibitorjev na prokariotski tip celic (10). Sintezni inhibitorji DNA giraze in topoizomeraze IV, npr. do sedaj dobro poznani fluorokinoloni, izkazujejo dokazano večjo afiniteto do prokariotske kot do evkariotske oblike encima. Encimi iz družine topoizomeraz II, ki so prisotni pri evkariotih, se kljub strukturni podobnosti vseeno pomembno razlikujejo od prokariotskih. Ena od strukturno pomembnih razlik je ta, da niso sestavljeni iz dveh podenot, ampak samo iz ene, in da delujejo kot homodimeri (8).

1.1.1 DNA giraza

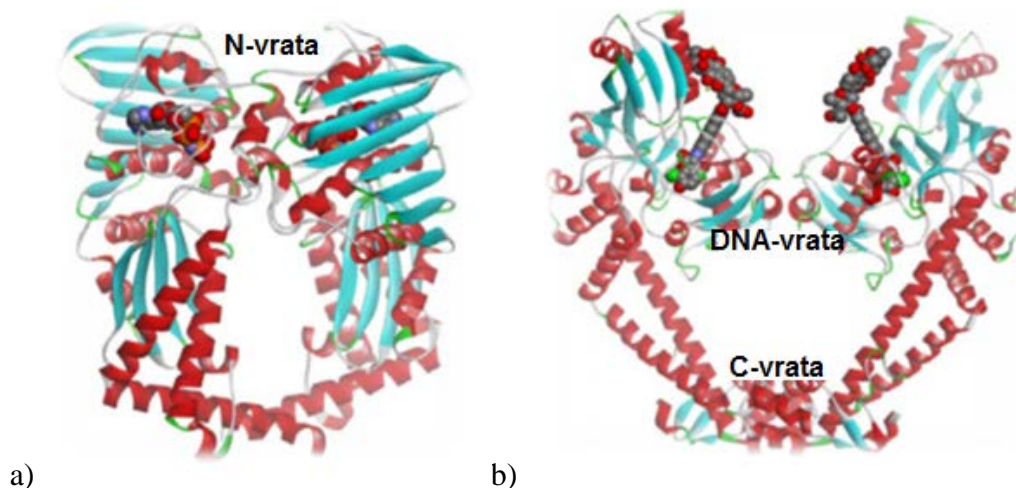
Encim DNA giraza je znana tarča učinkovin s protibakterijskim delovanjem. Njegova vloga v celici je uvajanje dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA, ki se v bakterijski celici nahaja prosto v citoplazmi, saj ta ne vsebuje jedra (6, 7). Negativno zvitje omogoči lažjo razklenitev baznih parov, kar je za procese prepisovanja oz. podvojevanja molekule zelo ugodno.

Katalitični cikel DNA giraze je prikazan na Sliki 1. V prvi stopnji katalitičnega cikla pride do vezave molekule DNA v vezavno mesto encima DNA giraze. Sledi vezava molekule ATP, ki povzroči zaprtje encimske konformacije in omogoči nadaljnje procese prekinitve in ponovne združitve verig DNA. Po uspešni uvedbi dodatnega negativnega zavoja v DNA zvitje, se v zadnji stopnji s pomočjo sproščene energije ob hidrolizi ATP encimska struktura ponovno razpre in sprostí spremenjeno molekulo DNA.



Slika 1: Katalitični cikel delovanja DNA giraze. Modre vijačnice ob straneh predstavljajo zvitje DNA (prirejeno po 9, 11).

Aktiven encim DNA giraza je sestavljen iz dveh podenot A (GyrA) in dveh podenot B (GyrB) (Slika 2), ki skupaj tvorijo heterotetramer A_2B_2 . Podenota GyrA je zadolžena za cepitev in ponovno združitev verig, kar pa ji omogoča podenota GyrB z vezavo in hidrolizo ATP (6, 12).



Slika 2: Kristalna struktura: a) GyrB₂ iz bakterije *Escherichia coli* v kompleksu z ADPNP in b) GyrA₂ iz bakterije *E. coli* v kompleksu s simociklinom D8 (prirejeno po 8).

Prepoznavna so tri področja encima: N-vrata, ki sodelujejo pri vezavi molekule ATP, DNA-vrata, ki povzročijo pretrganje in ponovno združitve verige DNA in C-vrata, ki omogočijo odpust molekule DNA iz katalitskega mesta (Slika 2) (8, 13).

1.1.2 Topoizomeraza IV

Zelo sorodno strukturo DNA girazi ima tudi topoizomeraza IV, ki prav tako tvori heterotetramerno strukturo zgrajeno iz dveh podenot C (ParC) in dveh podenot E (ParE). Njena do sedaj znana funkcija je razpletanje hčerinskih verig ob koncu podvojitve kromosoma (6).

Homolognost podenot DNA giraze in topoizomeraze IV se kaže v tem, da GyrA in ParC podenote sodelujejo pri pretvarjanju med sproščeno in dodatno zvito verigo DNA, medtem ko podenote GyrB in ParE vsebujejo vezavno domeno za ATP, ki zagotovi potrebno energijo za delovanje encima (6).

Inhibitorji bakterijske topoizomeraze II navadno učinkujejo tako na DNA girazo, kot tudi na topoizomerazo IV, ampak z različno afiniteto. Ta je odvisna od kemijskega razreda spojin in lastnosti bakterijskih sevov. Fluorokinoloni, ki so danes edini v praksi uporabljeni zaviralci DNA giraze in topoizomeraze IV, pri G⁻ bakterijah učinkujejo predvsem na DNA girazo, pri G⁺ pa na topoizomerazo IV. Svojo aktivnost izražajo z vezavo na podenoto GyrA/ParC. Zaradi pojava neželenih stranskih učinkov in rezistentnih sevov narašča

interes za razvoj ATP kompetitivnih inhibitorjev z delovanjem na tarčno podenoto GyrB/ParE (8).

1.2 VEZAVNO MESTO ZA ATP

Kristalna struktura celotnih tetramerov DNA giraze in topoizomeraze IV do sedaj še ni znana, so pa določeni posamezni strukturni fragmenti obeh encimov. Znane so kristalne strukture podenot GyrB in ParE v kompleksu z ADPNP (nehidrolizirajoči analog ATP) in različnimi strukturnimi razredi inhibitorjev. Kot prva je bila razrešena kristalna struktura kompleksa 43 kDa velikega fragmenta N-končne domene GyrB iz bakterije *E. coli* z ADPNP (6).

Vezavna podenota za ATP GyrB je po svoji strukturi dimer, njena posamezna monomerna enota pa je sestavljena iz N- in C-končne domene. Konformacijske spremembe domen pomembno pripomorejo k učinkovitosti delovanja encima. Ugotovili so, da se ob hidrolizi ATP domeni bolj približata in s tem usmerjata pravilnost povezav verig DNA v katalitičnem ciklu, pri vezavi inhibitorjev pa te spremembe konformacije ni (9).

Če želimo, da se naša spojina čim bolj prilega vezavnemu mestu za ATP GyrB, moramo vedeti, kateri aminokislinski ostanki oz. tvorba katerih interakcij je ključnega pomena za delovanje encima. To so ugotovili z uvedbo mutacij AK ostankov v aktivnem mestu, pri čemer so spremljali katalitsko delovanje encima. Za pomembne so se izkazali AK ostanki His38, Glu42, Asn46, Glu50, Asp73, Arg76, Gly77, Ile78, Thr165 in Lys103. Zamenjava z alaninom ali izolevcinom je močno zmanjšala, ponekod celo izničila ATP-azno aktivnost DNA giraze. Večina AK ostankov, ki gradijo vezavno mesto za ATP, pripada N-končni domeni, razen Lys337, ki pripada C-končni domeni (6).

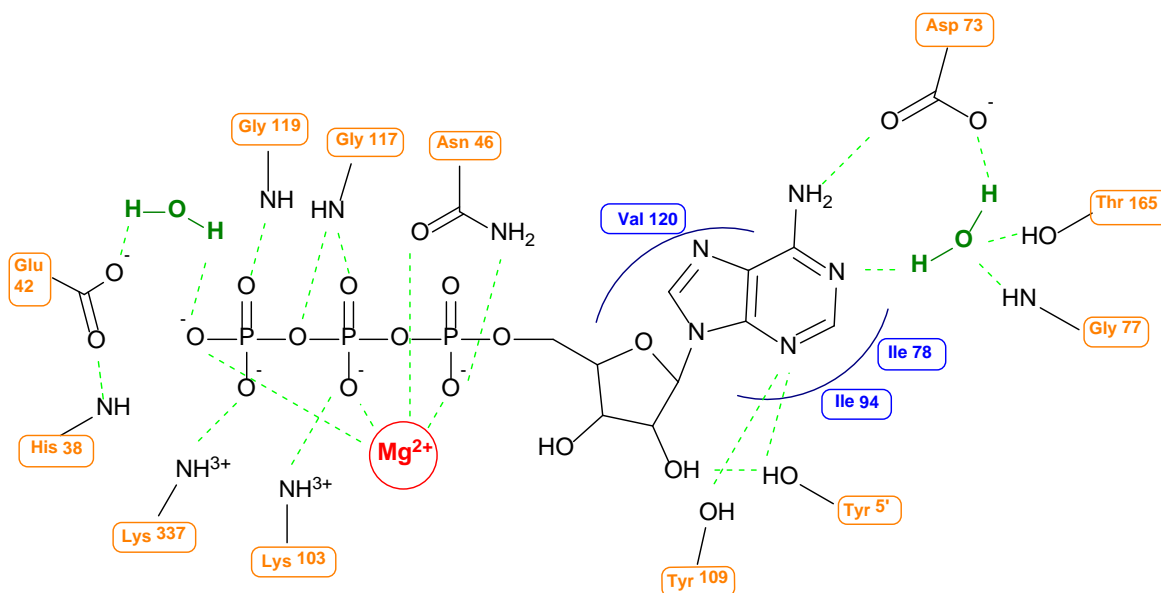
Glu42 predstavlja katalitično bazo stabilizirano preko His38, ki s sprejemom protona od vodne molekule posledično povzroči njeno aktivacijo. Aktivirana molekula vode veže γ -fosfatno skupino ATP, pri čemer pride do sprostitve energije in nastanka ADP (6, 14).

AK ostanka Lys103 in Lys337 imata pomembno vlogo pri konformacijskih spremembah encima v povezavi med N- in C-končno domeno ter vezavi molekule ATP v vezavno mesto. Prvi se poveže s kisikom na β -fosfatni skupini, drugi pa s kisikom na γ -fosfatni skupini molekule ATP (Slika 3) (6). Za konformacijske spremembe v N-končni domeni so odgovorni AK ostanki Gly114, Gly117 ter Gly119, ki sestavljajo t.i. glicinsko zanko. Le-ti

omogočijo tvorbo zaprte konformacije encima ob vezavi molekule ATP v svoje vezavno mesto (9). Hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo tvorijo AK ostanki Ile78, Ile94 in Val120 (Slika 3) (6).

Znano je, da adeninski obroč molekule ATP tvori vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki Asp73, Gly77, Tyr109, Tyr5' in Thr165 (Slika 3). Z Asp73 tvori dve vodikovi vezi, eno neposredno in eno posredno preko molekule vode. Za uspešno vezavo mora torej inhibitor vsebovati donor vodikove vezi, ki se bo povezal s karboksilno skupino Asp73 in akceptor, ki se bo povezal z molekulo vode, ki je naprej vezana do stranske verige Asp73. Inhibitorji večinoma tvorijo še vodikovo vez s stransko verigo Arg136, ki dodatno stabilizira vezavo, čeprav ta nima neposrednih interakcij z molekulo ATP (8). Z doseganjem interakcij z gvanidinsko skupino Arg136 lahko torej poskusimo doseči selektivnost vezave v primerjavi z drugimi encimi, ki za svoje delovanje prav tako potrebujejo ATP in le-teh AK na podobnem mestu v svoji strukturi nimajo.

Aminokislinski ostanek Tyr5' je značilen za vse bakterijske DNA giraze, za razliko od evkariontskih in virusnih topoizomeraz II, kjer ni prisoten. Tvori vodikovo vez s hidroksilno skupino na ribozi in dušikovim atomom v purinskem obroču adenina (Slika 3) (6).



Slika 3: Prikaz interakcij med molekulo ATP in GyrB24 (prirejeno po 6). Koordinacijske in H-vezi so prikazane z zeleno črtkano črto, hidrofobne interakcije pa z modro krivuljo. Z oranžnimi okvirčki so prikazane ključne aminokislinske.

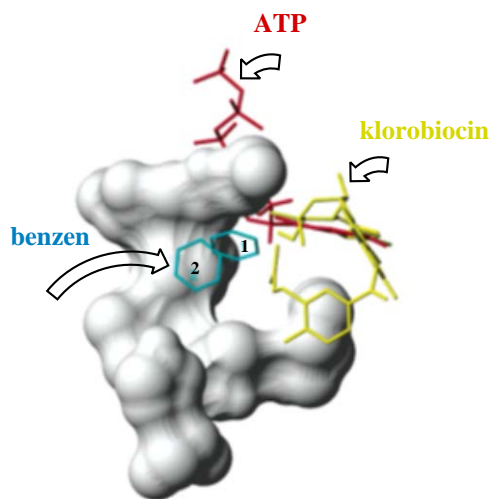
Primerjava kristalnih struktur 43 kDa velikega fragmenta N-končne domene DNA GyrB v kompleksu z ADPNP in 24 kDa velikega fragmenta N-končne domene (GyrB24) DNA GyrB v kompleksu z različnimi inhibitorji je pokazala, da domena GyrB24 vsebuje dve zanki, ki pomembno vplivata na ATP-azno aktivnost encima. Še posebej zanimivi iz stališča vezave inhibitorjev so AK ostanki 99-119, ki sestavljajo eno izmed zank. Ugotovljeno je, da so te pri domeni GyrB24 v drugačni konformacijski obliki, kar lahko pomembno vpliva na vezavo inhibitorjev. Preučevanih je bilo 23 različnih funkcionalnih skupin, glede na to, kako ugodna je njihova vezava v vezavno mesto za ATP. Določili so tudi, kateri deli vezavnega mesta so manj oz. sploh niso občutljivi na konformacijske spremembe proteina (15).

Fenolna skupina ima dokazano zelo veliko afiniteto vezave v vezavnem mestu za adenin ($\Delta G^{\text{vezave}} \sim -18 \text{ kcal/mol}$). Ugodne za vezavo v adeninski žep so tudi manjše polarne skupine, kot so *N*-metilacetamid, acetamid in metanol, čeprav zaradi svoje velikosti ne zasedejo celotnega vezavnega prostora ($\Delta G^{\text{vezave}} \sim$ od -15 do -10 kcal/mol). Ključna je H-vez z AK ostankom Asp73. Podobno afiniteto vezave izkazujejo tudi manjše aromatske skupine kot so oksazol in tiazol ($\Delta G^{\text{vezave}} \sim -10 \text{ kcal/mol}$). Razlika v vezavi se pojavi zaradi manj ugodnih van der Waalsovih (vdW) in elektrostatskih interakcij med proteinom in ligandom. Ugotovljeno je bilo, da vezavno mesto za adeninski obroč ATP ne podleže konformacijskim spremembam zanke, zato je ciljanje le-tega še toliko bolj učinkovito (15).

Drugače je pri vezavnem mestu za ribozo in fosfat, kjer srečamo predstavnike AK ostankov, za katere so značilne konformacijske spremembe (npr. Ala100, Val118, Gly119, Val120,...). Afiniteta vezave je zelo odvisna od prisotnosti odprte ali zaprte konformacijske zanke (16). Za močne inhibitorje so se izkazale spojine z aromatsko strukturo, npr. oksazol in tiazol. Večji aromati, kot sta npr. benzen in triptofan, učinkujejo samo pri odprti strukturi zanke. V zaprti konformaciji zanke se oblikuje ugodno vezavno mesto za ligande z negativnim nabojem. Acetatni ion in butanojska kislina imata zelo ugodne vrednosti sproščene energije vezave, še posebej na mestu, ki sicer ustreza vezavi γ -fosfatne skupine pri molekuli ATP ($\Delta G^{\text{vezave}} \text{ CH}_3\text{COO}^- \sim -14,1 \text{ kcal/mol}$). Žal pa te prednosti pri odprti strukturi zanke ni (15).

Poleg že znanih vezavnih mest za ATP in inhibitorje kumarinskega tipa je bil identificiran tudi nov hidrofobni žep, ki ga sestavljajo AK ostanki Pro79, His83, Ala90, Val93, Ile94, Ala100, Gly101 in Gly102. Nekateri od njih so vpleteni v stabilizacijo izopentilne skupine

kumarinskih inhibitorjev, kot je klorobiocin, a je bilo ugotovljeno, da v notranjosti encima gradijo dodatno vezavno mesto, ki bi ga lahko izkoriščali novi, bolj specifični inhibitorji. Med testiranimi aromatskimi skupinami imajo zelo ugodno ΔG^{vezave} tiazol, oksazol, fenol in 3-metilindol. Ta je v območju od -13 do -8 kcal/mol. Uspešno se veže tudi benzen (Slika 4) z ΔG^{vezave} v območju od -12 do -10 kcal/mol (15).

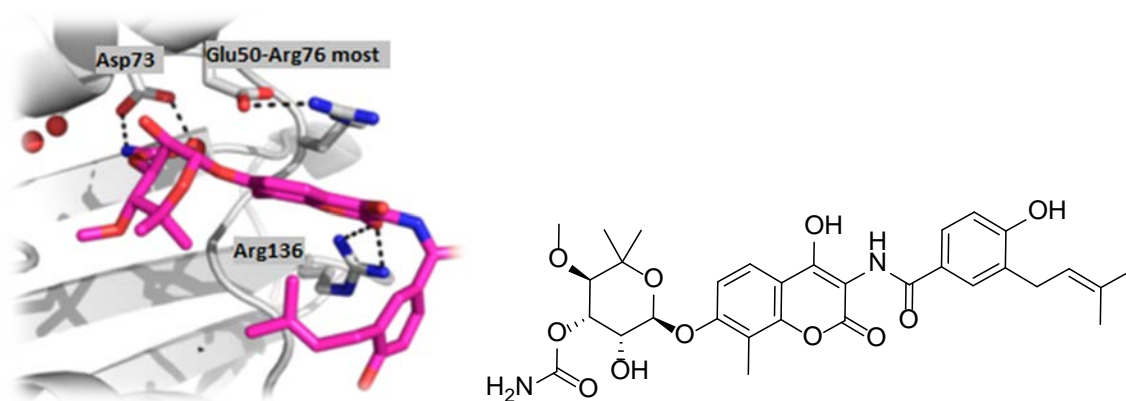


Slika 4: Hidrofobni žep v vezavnem mestu DNA Gyr B (prirejeno po 15). Prikaz vezave ATP, aminokumarinskega inhibitorja klorobiocina in dveh benzenov z najbolj ugodno vezavo v vezavno mesto encima GyrB. ΔG^{vezave} za benzen₁ = -12.1 kcal/mol, za benzen₂ = -11.3 kcal/mol.

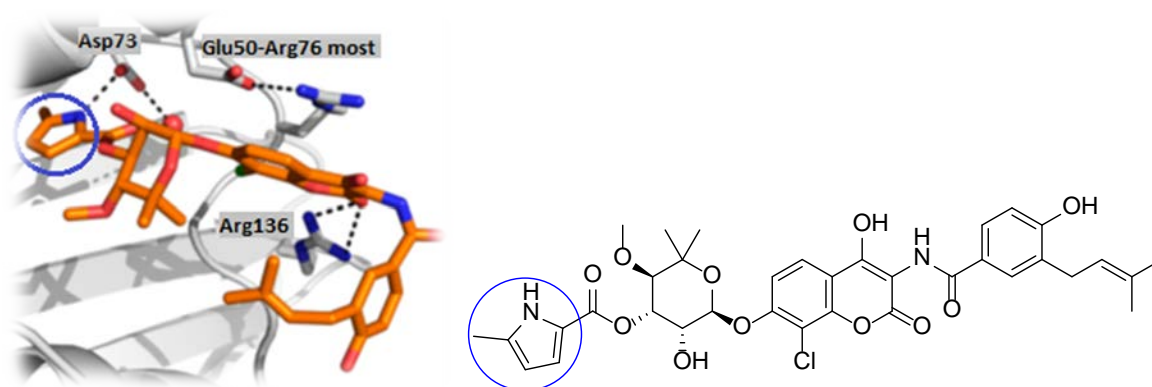
1.3 RAZVOJ ETILSEČNINSKIH DERIVATOV

Prvi razred spojin, ki je izkazoval zaviralne lastnosti encimov DNA giraze in topozomeraze IV z delovanjem na vezavno podenoto za ATP, so bili aminokumarinski antibiotiki. Najbolj znana predstavnika sta novobiocin in klorobiocin. Zaradi izraženih toksičnih lastnosti, slabe topnosti in permeabilnosti ter slabšim delovanjem na G- bakterije, se novobiocin kot učinkovina v klinični praksi ni najboljše izkazal. Kljub temu sta novobiocin in klorobiocin služila kot osnova za nadaljnjo optimizacijo spojin (8).

Ugotovili so, da sta za vezavo novobiocina zelo pomembna AK ostanka Asp73 in Arg136 (Slika 5), pri klorobiocinu pa, da je boljše delovanje posledica uvedbe pirolovega obroča z metilno skupino, ki z vezavo v dodaten lipofilni žep omogoči močnejšo vezavo v encim (Sliki 4, 6). Novejše skupine inhibitorjev ugotovljene prednosti s pridom izkoriščajo, z uvedenimi izboljšavami pa dosegajo vedno boljše encimsko in protibakterijsko aktivnost (9).



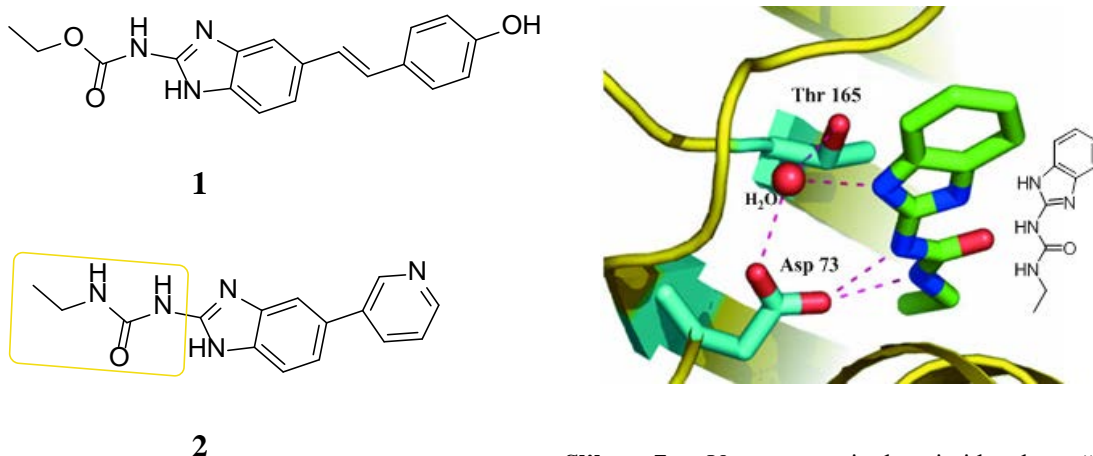
Slika 5: Vežava novobiocina v vezavno mesto za ATP DNA giraze (prirejeno po 9).



Slika 6: Vežava klorobiocina v vezavno mesto za ATP DNA giraze (prirejeno po 9).

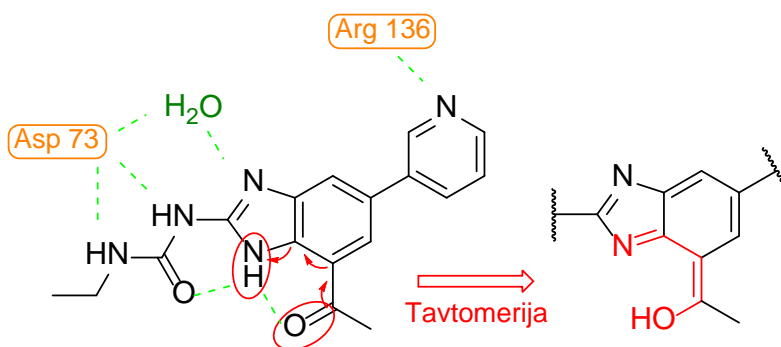
Eden izmed bolj preučevanih strukturnih razredov inhibitorjev z dvojnimi tarčnimi delovanjem na GyrB in ParE so tudi spojine z etilsečninsko stransko verigo, ki so bile odkrite z metodo rešanja visokih zmogljivosti (8).

Spojina, ki izkazuje zmerno afiniteto do svoje tarče v μM območju pri *in vitro* testiranjih, se imenuje spojina zadetek (17). Takšna predstavnica je spojina **1** (Slika 7). Njena zaviralna aktivnost je prikazana v Preglednici I skupaj z vrednostmi za ostale spojine. Deluje šibko protibakterijsko na *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* in *Haemophilus influenzae* z MIC > 16 $\mu\text{g/mL}$ (18). Sledila je optimizacija strukture, da bi dosegli višjo jakost inhibicije na izoliranem encimu in s tem boljše protibakterijsko delovanje. Rezultat optimizacije je bila spojina **2**, ki je derivat etilsečnine (8). S kristalno strukturo kompleksa GyrB-2 so določili njeno vezavo, pri čemer etilsečninska skupina tvori dve vodikovi vezi z Asp73 (Slika 7).



Slika 7: Vezava aminobenzimidazol sečninskega fragmenta v vezavno mesto GyrB (prirejeno po 19).

Kristalizacija N-končne domene topoizomeraze IV izolirane iz *E. coli* skupaj s spojino **3** (Slika 8) je pokazala prisotnost interakcij Asp73 z vodikovima atomoma iz etilsečninskega fragmenta inhibitorja in vodikovo vez med stransko verigo Arg136 ter piridinskim obročem. Dodatna vez se tvori tudi preko kristalno vezane molekule vode med Asp73 in benzimidazolnim dušikovim atomom. Kot zelo pomemben del strukture se je izkazal imidazol, ki s tvorbo intramolekularnih vezi poskrbi za ustrezno orientacijo etilsečninskega fragmenta in s tem preostalega dela molekule v vezavnem mestu. Prisotnost ketona omogoči nastanek tautomerije, ki pa se pri kasnejših analogih ni izkazala kot ključni dejavnik inhibicije (9).

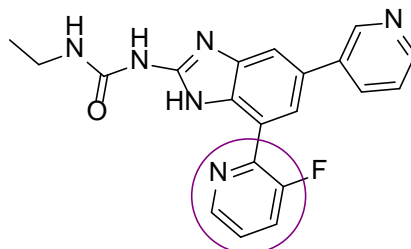


Slika 8: Prikaz tautomerije na strukturi spojine **3** (prirejeno po 9).

Preglednica I: Zaviralna aktivnost spojin **1,2,4** in **6** na encimu DNA girazi iz *S. aureusa* in *E. coli* (prirejeno po 8, 20).

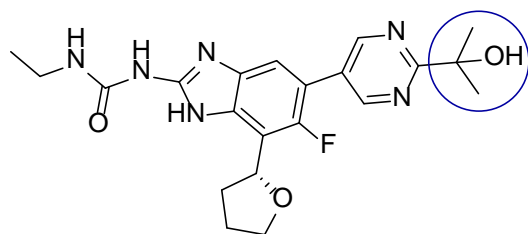
DNA giraza	K _i (1)	K _i (2)	K _i (4)	K _i (6)
<i>S. aureus</i>	2 μM	130 nM	14 nM	140 nM
<i>E. coli</i>	20 μM	81 nM	< 4 nM	< 4 nM

Velik razvojni korak naprej predstavlja spojina **4**. Jakost inhibicije je v nM območju, izraža selektivnost do človeške oblike encima topoizomeraze II ($EC_{50} > 25\mu\text{M}$), izboljšana pa je tudi njena protibakterijska aktivnost. Je inhibitor z dvojnimi tarčnim delovanjem, saj poleg DNA giraze ($K_i < 4\text{ nM}$) zavira tudi delovanje topoizomeraze IV ($K_i = 23\text{ nM}$) pri *E. coli* (18, 20). MIC vrednosti za *S. aureus*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* so nižje od 1 μg/mL. Strukturno je sorodna spojini **3**. Razlikuje se le v tem, da namesto ketona v stranski verigi vsebuje piridilni fragment, ki prav tako stabilizira benzimidazolni skelet. Kombinacija sečninske stranske verige in dveh substituiranih piridinov je pokazala dober odziv pri *in vivo* testiranju na glodavcih. Učinkovita je bila tako po intravenski, kot tudi peroralni aplikaciji pri zdravljenju pljučnice in infekcij kože (8, 9).

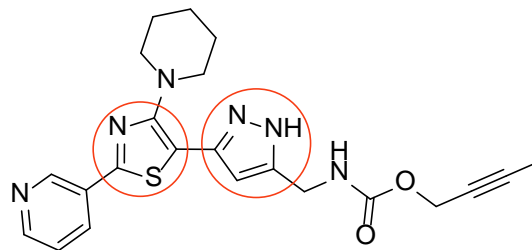
**4**

Predstavniki novejših generacij spojin benzimidazol sečninskega tipa z dvojnimi inhibitorynim delovanjem je spojina **5**, ki v svoji strukturi vsebuje terciarni alkohol. V zelo nizki koncentraciji zavre delovanje DNA giraze ($K_i = 9\text{ nM}$) in topoizomeraze IV ($K_i = 12\text{ nM}$) pri *S. aureusu*, ter kaže dobro protibakterijsko aktivnost pri G⁺ bakterijah (8, 9). Izboljšano delovanje proti G⁻ bakterijam predstavljajo spojine pirazoltiazolnega razreda zaviralcev DNA giraze (primer je spojina **6**). Močnejše zavrejo delovanje DNA giraze B pri *E. coli* kot pri *S. aureusu*. Razlog je v različni strukturi vezavnega mesta za adenin. Kristalna struktura kompleksa encim-inhibitor je pokazala, da je hidrofobni žep pri DNA

girazi *S. aureusa* manjši kot pri *E. coli*. Spojine, ki močno zavirajo delovanje encima pri *E. coli*, zato kažejo manjšo zaviralno aktivnost encima pri *S. aureusu*. S tem ko je vezavno mesto manjše, je manj prostora za tvorbo ugodnih interakcij (8).

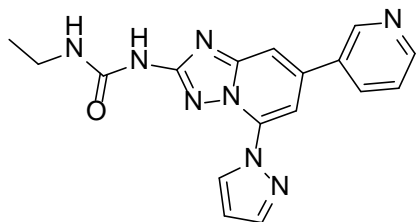


5

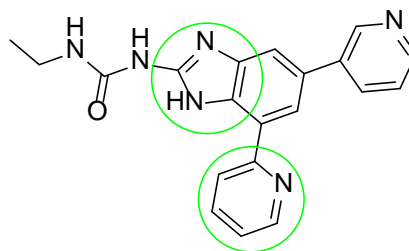


6

Spojini 7 in 8 imata na prvi pogled zelo podobni strukturi, a se po delovanju precej razlikujeta. Spojina 7 ima izraženo skromno protibakterijsko delovanje proti G- in G+ bakterijam (MIC = 2-4 $\mu\text{g/mL}$) ter učinkuje bolj na GyrB (IC_{50} = 54 nM), kot na ParE (IC_{50} = 25 μM). Spojina 8 ima izboljšano delovanje v smislu enakovredne zaviralne aktivnosti encimov GyrB in ParE v nM območju, zaradi česar je tudi stopnja razvoja rezistence počasnejša. Bistveno boljša je tudi aktivnost proti G+ sevom (MIC pri *S. aureusu* = 0,031 $\mu\text{g/mL}$) (8).



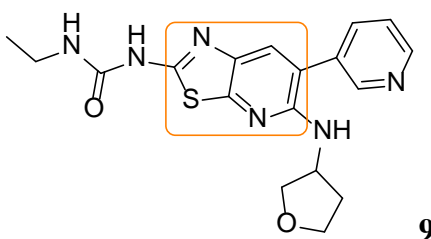
7



8

Encim DNA giraza je tudi tarča za razvoj novih spojin proti *Mycobacterium tuberculosis* (8). Genom *M. tuberculosis* se razlikuje od genoma ostalih bakterij v tem, da kodira zapis samo za en encim iz skupine topoizomeraz I in enega iz topoizomeraz II, to je DNA giraza. Ne vsebuje topoizomeraze IV, zato tu ne moremo izkoriščati prednosti dvojnega tarčnega delovanja inhibitorjev. Po drugi strani pa prisotnost samo enega encima iz posameznega razreda topoizomeraz naredi le-tega bolj občutljivega za inhibicijo (21).

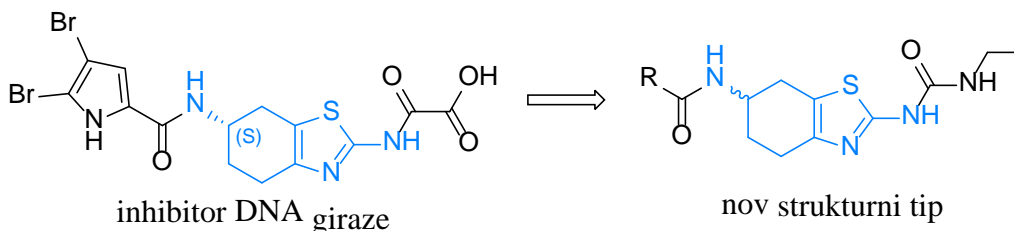
Zaviralci razreda benzimidazolečnin so pokazali aktivnost proti sevom *M. tuberculosis* z razvito rezistenco proti fluorokinolonom. To je spodbudilo k nadaljnjemu iskanju in optimizaciji spojin. Dobre lastnosti in odprte možnosti za dodatne farmakokinetične izboljšave izkazuje razred tiazolopiridinsečnin (primer je spojina **9**), ki so potencialni zaviralci ATP-azne aktivnosti DNA GyrB s protituberkuloznim delovanjem. Določena je nizka stopnja nastanka spontanah mutacij 3.1×10^{-8} pri koncentraciji inhibitorja $\leq 8 \mu\text{g/mL}$. Pri večjih koncentracijah inhibitorja mutacije niso bile prisotne (9, 21). Spojina **9** zavira delovanje izoliranega encima in izkazuje protibakterijsko delovanje. Njen IC_{50} je 30 nM, MIC na *M. tuberculosis* pa 1 μM (21).



Raziskovalna pot do učinkovine primerne za klinična testiranja je dolga. Zahteve testiranja UČ se na vsaki naslednji stopnji zaostrejejo, število spojin, ki zadosti kriterijem, pa je vedno manjše (22). Želimo si, da bi naše sintetizirane spojine dosegale čim boljše rezultate že v začetnih stopnjah, kot spojine zadetki oz. spojine vodnice in imele tako več potencialnih možnosti za uspešen prodor naprej.

2 NAČRT ZA DELO

Pri eksperimentalnem delu bomo načrtovali in sintetizirali potencialne zaviralce DNA giraze B novega strukturnega tipa z etilsečninskim fragmentom. Ohranili bomo centralni 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminski skelet nedavno odkritih zaviralcev DNA giraze na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, ostale dele molekule pa spremenili (Slika 9) (23). Kandidate za sintezo bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtega načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur encima v kompleksu z inhibitorji. Predvideno vezavo načrtovanih spojin pa bomo preučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP vezavno mesto DNA giraze iz *E. coli*.

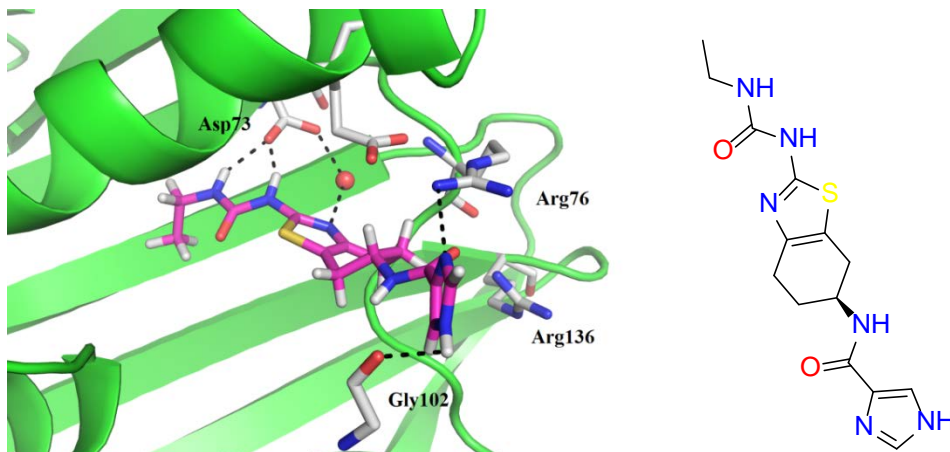


Slika 9: Optimizacija predhodno odkritih zaviralcev DNA giraze ($IC_{50} = 58$ nM pri *E. Coli*). Struktura novih zaviralcev ima ohranjen centralni skelet, označen modro in uveden etilsečninski fragment (prirejeno po 23).

Tvorba vodikovih vezi že znanih inhibitorjev z AK ostankom Asp73 v ATP vezavnem mestu se je izkazala kot ključna za delovanje, zato smo jo želeli ohraniti pri načrtovanju novih spojin. Odločili smo se za uvedbo etilsečninskega fragmenta, ker je bilo z rentgensko kristalografijo dokazano, da se ta veže v ATP vezavno mesto DNA giraze iz *E. coli* in tam tvori vodikove vezi z Asp73. Prav tako je bilo iz študij razvidno, da spojine izbranega strukturnega tipa izražajo aktivnost na izoliranem encimu in protibakterijsko aktivnost.

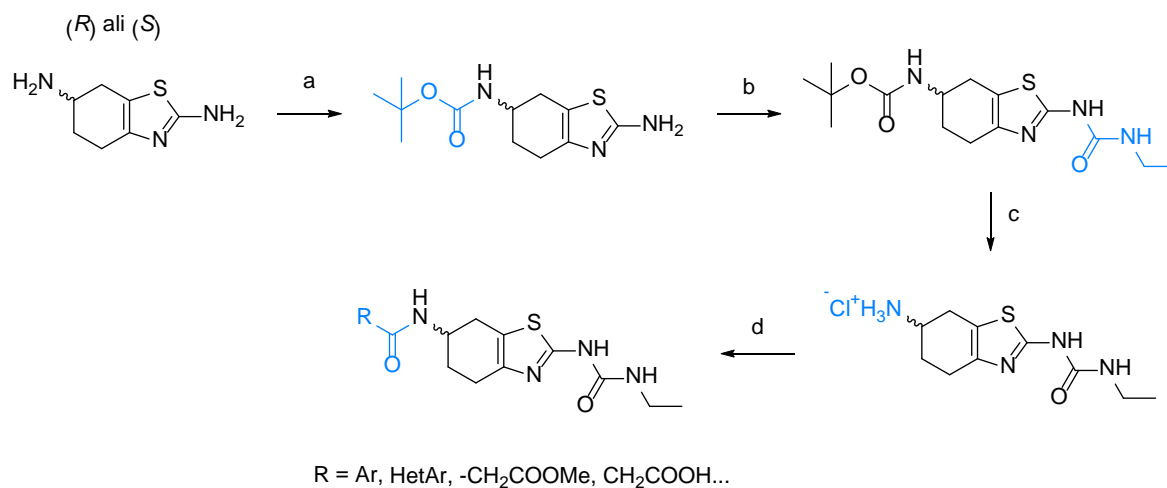
Z uvedbo ostalih substituentov bomo skušali zaviralno aktivnost na izoliranem encimu še izboljšati. Na amino skupino na mestu 6, bomo uvajali substituentne za interakcijo z Arg76 in/ali Arg136. Primer načrtovanega inhibitorja in njegove vezave, predvidene s pomočjo molekulskega sidranja, je prikazan na Sliki 10. Poleg močnega zaviranja DNA giraze želimo optimizirati tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin in s tem zagotoviti protibakterijsko delovanje proti G- in G+ bakterijam. Sintetiziranim spojinam bomo

ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na izoliranem encimu DNA girazi iz bakterije *Escherichia coli* in jakost protibakterijskega delovanja na bakterijah *E. coli* ter *S. aureus*.



Slika 10: Predvidena vezava načrtovanega etilsečninskega zaviralca DNA giraze v ATP vezavnem mestu encima. Molekulsko sidranje je delo doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Sintezno pot (Shema 1) bomo začeli z zaščito alifatske amino skupine pri spojini (*S*)- ali (*R*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu, saj želimo doseči selektivno uvedbo etilsečninske skupine na amino skupino na mestu 2. Nadaljevali bomo z uvedbo etilizocianata na prosto nukleofilno aminske skupino, s čimer bomo dobili načrtovano etilsečninsko skupino. Predpostavljamo, da bomo imeli tu največ težav, saj ne vemo točno, pri katerih pogojih bo reakcija najboljše potekala. V naslednji stopnji bomo odstranili Boc zaščitno skupino iz aminske skupine na mestu 6 in nato nanjo pripenjali različne substituentne, s katerimi želimo doseči tvorbo vodikovih vezi z Arg76 in/ali Arg136. Omenjeno amidno vez bomo tvorili ob prisotnosti sklopitvenih reagentov. Izbrali bomo tiste, pri katerih bo končni izkoristek sinteze najboljši. Sintetizirane spojine bomo identificirali s spektroskopskima metodama NMR in MS.



Shema 1: Reagenti in pogoji. a) Boc₂O, THF, 0°C, nato sobna T, 24 h; b) etilizocianat, CHCl₃, refluks, 18 h; c) AcCl, MeOH, 0°C, nato sobna T; d) kislinski klorid, Et₃N, dioksan, 2-24 h ali karboksilna kislina, TBTU, Et₃N, diklorometan, sobna T, 3-24 h.

Najprej bomo sintetizirali *S*-enantiomerne oblike spojin, glede na rezultate bioloških testiranj pa še *R*-enantiomerne oblike tistih spojin, ki bodo na encimskem testu izkazovale najboljšo aktivnost.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 REAGENTI IN TOPILA

Pri laboratorijskem delu smo uporabili reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Sigma Aldrich in Maybridge.

Brezvodni kloroform in piridin smo pripravili s pomočjo aktiviranih molekularnih sit. Tako pripravljena topila smo shranjevali zaščitena pred svetlobo v argonovi atmosferi.

3.2 KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda ločevanja zmesi. Glede na lastnosti vzorca, ki ga želimo ločiti na posamezne komponente, izberemo najbolj optimalno stacionarno in mobilno fazo. Zaradi širokih možnosti prilagoditev, učinkovitosti in hitrosti ločbe je zelo pogosto uporabljena metoda.

3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Pri eksperimentalnem delu smo kot metodo prve identifikacije spojin uporabljali tankoplastno kromatografijo. Na ta način smo določali homogenost vzorca, prisotnost spojine v zmesi in sledili poteku kemijske reakcije (24). Reakcija je potekla do konca, ko je lisa ene od izhodnih spojin povsem izginila. Glede na intenziteto lise smo lahko sklepali na delež spojine v zmesi. Bolj kot je bila lisa močna, več produkta je nastalo. Sintetizirane spojine so absorbirale UV svetlobo pri valovni dolžini 254 nm.

Ločevanje spojin s tankoplastno kromatografijo temelji na procesu adsorpcije snovi na stacionarno fazo in raztapljanju adsorbiranih snovi v mobilni fazi. V postopku ločevanja najhitreje potujejo spojine, ki se najmanj adsorbirajo in so hkrati najbolj topne v mobilni fazi (24). Za stacionarno fazo smo izbrali silikagel, kot mobilno fazo pa največkrat zmes diklorometana in metanola v razmerju 9 : 1.

3.2.2 Kolonska (»flash«) kromatografija

Kolonska kromatografija je učinkovita metoda ločevanja in čiščenja spojin v zmesi. Za uspešno ločbo je zelo pomembna pravilna izbira mobilne faze (MF). Če izberemo preveč

nepolarno MF, spojine ne bodo potovale po koloni, če pa je ta preveč polarna, bodo potovale prehitro in bo ločba slabša (24). Pri izbiri MF za kolonsko kromatografijo nam je bila v pomoč TLC. Razvili smo kromatograme v različnih MF in izbrali tisto, pri kateri je bil retencijski faktor produkta majhen (0,2-0,3), ločba med posameznimi komponentami vzorca pa še vedno dobra. Izvajanje kolonske kromatografije smo pospešili z zračnim nadtlakom, kot stacionarno fazo pa smo uporabili silikagel z manjšimi delci (Silica gel 60: 0,040-0,063 mm).

3.3 SPEKTROSKOPSE METODE

Rezultat TLC analize je na kromatografski ploščici vidna lisa, ki pod UV-lučko lahko predstavlja želeno spojino ali pa zgolj neželen stranski produkt. Kadar je vidnih več lis, ne moremo vedno zagotovo trditi, katera izmed njih je tista prava. Lahko se zgodi, da se pojavi samo ena lisa, vzorec pa ima kljub temu še veliko primesi. Ker ne absorbirajo vse snovi pri isti valovni dolžini, na ta način ne izvemo veliko o čistosti vzorca. Zato, da dokončno ugotovimo ali smo sintetizirali in očistili želeno spojino, uporabljamo spektroskopske metode za določanje strukture spojin.

3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Jedrska magnetna resonanca je zelo učinkovita metoda določevanja struktur organskih spojin. Iz posnetega protonskega ^1H spektra, ki smo ga posneli za naše spojine, smo izvedeli število prisotnih vodikovih atomov in informacijo o njihovem kemijskem okolju v molekuli (25).

^1H - in ^{13}C -NMR spektre smo snemali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Bruker AVANCE III 400 spektrometru (Bruker Corporation, Billerica, MA, ZDA). Najpogosteje smo kot topilo uporabili devterirano topilo DMSO- d_6 .

3.3.2 Masna spektroskopija (MS)

Prednost masne spektroskopije kot identifikacijske metode je ta, da lahko z minimalnimi količinami vzorca določimo relativno molekulsko maso, elementno sestavo (bruto formulo) spojine in preko fragmentacije prisotnost določenih skupin v molekuli (25).

Masni spektri naših spojin so bili posneti v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan na VG Analytical Autospec Q masnem spektrometru (Fisons, VG Analytical, Manchester, Velika Britanija).

3.4 POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0 podjetja CambridgeSoft.

3.5 MOLEKULSKO SIDRANJE

Molekulsko sidranje je izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm., s pomočjo programa LeadIT podjetja BioSolveIT. Za grafični prikaz vezave spojin je bil uporabljen program PyMOL (Delano Scientific LLC).

3.6 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

Temperaturo tališča sintetiziranih spojin smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.7 BIOKEMIJSKA TESTIRANJA

Zaviralno aktivnost spojin na izoliranem encimu DNA girazi iz bakterije *Escherichia coli* je določal izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Testiranje je bilo izvedeno v skladu z objavljenim postopkom (23).

Protibakterijsko delovanje inhibitorjev DNA giraze na izbranih bakterijskih sevih (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bodo določali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem.

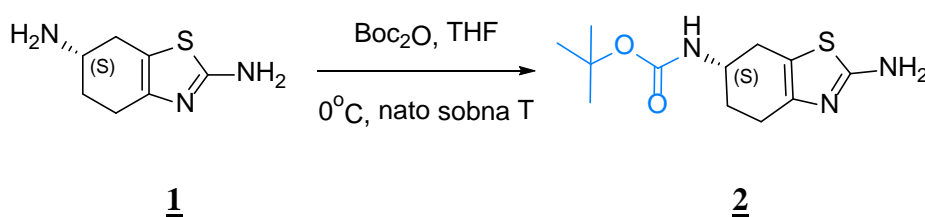
4 EKSPERIMENTALNO DELO

Prikazani in opisani so sintezni postopki, ki smo jih izvedli v sklopu eksperimentalnega dela v laboratoriju. Na označenih mestih smo po enakem postopku izvedli reakcijo z *S*- in *R*-enantiomerno obliko spojine.

4.1 Sinteza *tert*-butil (*S*)- ali (*R*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

Izhodni (*S*)- ali (*R*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin smo raztopili v tetrahidrofuranu (THF), ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in ves čas mešali na magnetnem mešalu. S kapalnikom smo počasi (15 min) po kapljicah dodajali predhodno raztopljeni Boc₂O (di-*t*-butil dikarbonat 1,05 Eq) v THF. Po 24-ih urah smo odparili topilo pod nižanim tlakom.

a) (*S*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata



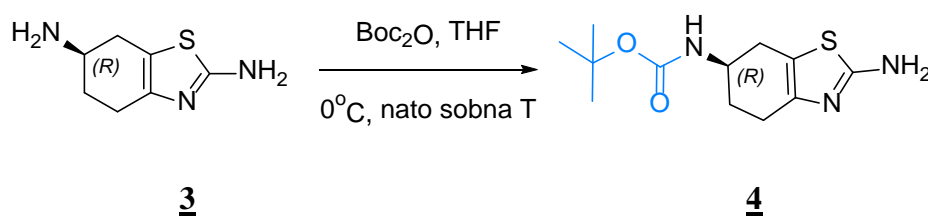
Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
(<i>S</i>)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2,6-diamin (169,25 g/mol)	3,002 g	17,80 mmol (1)
tetrahidrofuran (72,11 g/mol)	100 mL + 30 mL (0,8892)	1,60 mmol
di-<i>t</i>-butil dikarbonat (218,25 g/mol)	4,068 g	18,70 mmol (1,05)

- Izkoristek: 100,0 %; m (izoliranega produkta) = 4,79 g.
- Izgled: bela oborina.
- R_f: 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).

- T_{tal} : $140 \pm 2^\circ\text{C}$.
- $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):

δ 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.54-1.65 (m, 1H, H_A -7), 1.80-1.86 (m, 1H, H_B -7), 2.31-2.47 (m, 3H, H_A -4, H-5), 2.68 (dd, 1H, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H_B -4), 3.57-3.69 (m, 1H, CHNH), 6.64 (s, 2H, NH_2), 6.94 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH) ppm.

b) (*R*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
(<i>R</i>)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2,6-diamin (169,25 g/mol)	1,000 g	5,92 mmol (1)
tetrahidrofuran (72,11 g/mol)	33 mL + 10 mL (0,8892)	0,043 mmol
di-<i>t</i>-butil dikarbonat (218,25 g/mol)	1,360 g	6,21 mmol (1,05)

- Izkoristek: 100,0 %; m (izoliranega produkta) = 1,59 g.
- Izgled: belo-oranžna oborina.
- R_f : 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):

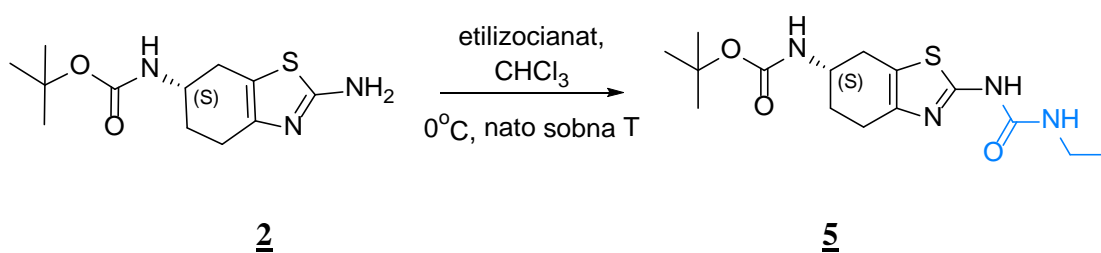
δ 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.54-1.65 (m, 1H, H_A -7), 1.80-1.86 (m, 1H, H_B -7), 2.31-2.47 (m, 3H, H_A -4, H-5), 2.68 (dd, 1H, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H_B -4), 3.57-3.69 (m, 1H, CHNH), 6.64 (s, 2H, NH_2), 6.94 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, NH) ppm.

4.2 Sinteza *tert*-butil (*S*)- ali (*R*)-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

Tert-butil (2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata smo najprej raztopili v kloroformu, prepihali z argonom, nato pa počasi po kapljicah dodali še etilizocianat (1,1 Eq). Mešali smo na ledeni kopeli v argonovi atmosferi 18 h.

Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, topilo pa odstranili pod znižanim tlakom. Izvedli smo prekrizalizacijo produkta iz etilacetata z dodatkom heksana. Nastale kristale, ki so izpadli čez noč pri znižani temperaturi (2-8 °C), smo odfiltrirali s presesavanjem.

a) (*S*)-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

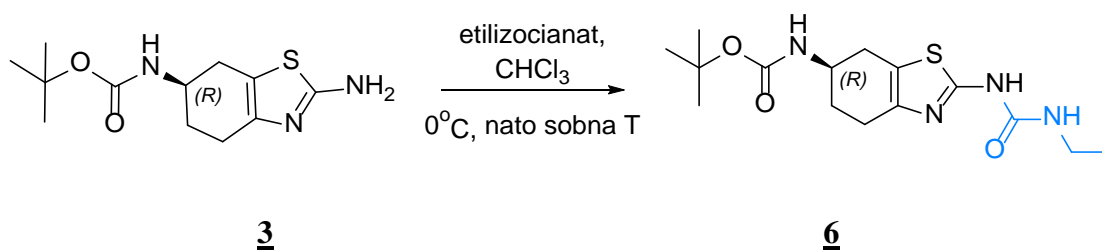


Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
<i>t</i>-butil (<i>S</i>)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata (269,36 g/mol)	0,500 g	1,86 mmol (1)
kloroform (119,37 g/mol)	15 mL (1,489)	0,19 mmol
etilizocianat (71,08 g/mol)	0,162 mL (0,898)	2,04 mmol (1,1)

- Izkoristek: 15,0 %; m (izoliranega produkta) = 0,09 g.
- Izgled: beli kristali.
- R_f: 0,5 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal}: 180 ± 2°C.

- HRMS (ESI⁺) za C₁₅H₂₄N₄O₃S ([M+H]⁺): izmerjena masa 341,1652; izračunana masa 341,1647.
- ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):
 δ 1.05 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.40 (s, 9H, 3 × CH₃), 1.61-1.71 (m, 1H, H_A-7), 1.86-1.94 (m, 1H, H_B-7), 2.38-2.47 (m, 1H, H_A-5), 2.55-2.71 (m, 2H, H_B-5, H_A-4), 2.81 (dd, 1H, *J*₁ = 15.7 Hz, *J*₂ = 5.0 Hz, H_B-4), 3.09-3.16 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.58-3.76 (m, 1H, CHNH), 6.50 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz, NHCH₂CH₃), 6.99 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, NHCH), 10.11 (s, 1H, NHCO) ppm.

b) (*R*)-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
<i>t</i>-butil (<i>R</i>)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)karbamat (269,36 g/mol)	1,341 g	4,99 mmol (1)
kloroform (119,37 g/mol)	40 mL (1,489)	0,50 mmol
etilizocianat (71,08 g/mol)	0,434 mL (0,898)	5,48 mmol (1,1)

- Izkoristek: 34,5 %; m (izoliranega produkta) = 0,59 g.
- Izgled: beli kristali.
- R_f: 0,5 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal}: 186 ± 2°C.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₅H₂₄N₄O₃S ([M+H]⁺): izmerjena masa 341,1641; izračunana masa 341,1647.
- ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):

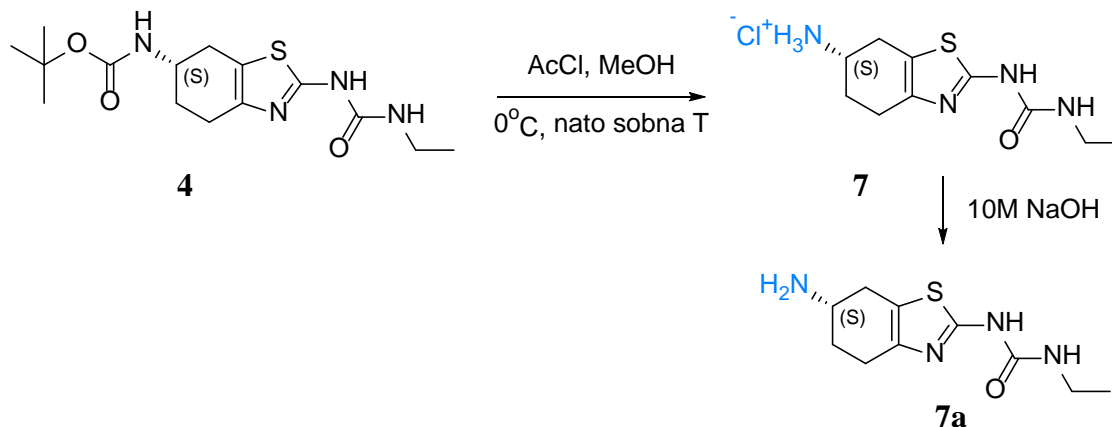
δ 1.24 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3), 1.48 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1.86-1.96 (m, 1H, H_A-7), 2.08-2.15 (m, 1H, H_B-7), 2.54 (dd, 1H, $J_1 = 16.1$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, H_A-5), 2.82-2.89 (m, 2H, H_A-4 , H_B-5), 3.05 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H_B-4), 3.34-3.43 (m, 2H, NHCH_2CH_3), 4.01-4.12 (m, 1H, CHNH), 4.63 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, CHNH), 6.88-6.98 (m, 1H, NH) ppm.

4.3 Sinteza (S)- ali (R)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijevega klorida

Metanolu smo med mešanjem na ledeni kopeli počasi po kapljicah dodali acetil klorid (10 Eq) in počakali 30 min, da je potekla reakcija nastanka HCl.

Raztopini smo nato dodali še *tert*-butil (2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat, ki smo ga predhodno raztopili v MeOH. Vse skupaj smo mešali 24 h pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili odščiteno spojino, ki smo jo uporabili v naslednji stopnji brez predhodnega čiščenja.

a) (S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid

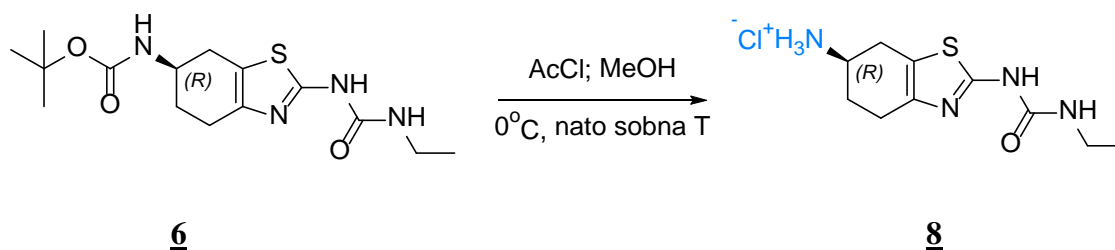


Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
metanol (32,04 g/mol)	17 mL + 10 mL (0,792)	0,67 mmol
acetilklorid (78,50 g/mol)	1,063 mL (1,104)	14,90 mmol (10)
<i>t</i> -butil (S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamat (340,44 g/mol)	0,500 g	1,50 mmol (1)

- Izkoristek: 100,0 %; m (izoliranega produkta) = 0,42 g.
- Izgled: umazano bela oborina.
- R_f : 0 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} (**7a**): $110 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₀H₁₆N₄OS ([M+H]⁺): izmerjena masa 241,1117; izračunana masa 241,1123.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.06 (t, 3H, $J = 7.20$ Hz, CH₂CH₃), 1.83-1.92 (m, 1H, H_A-7), 2.06-2.14 (m, 1H, H_B-7), 2.56-2.72 (m, 3H, H_A-4, H-5), 3.01 (dd, $J_1 = 15.9$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H_B-4), 3.11-3.17 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.43-3.57 (m, 1H, CHNH), 7.07 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 8.33 (d, 3H, $J = 3.7$ Hz, NH₃⁺), 10.82 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

b) (*R*)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
metanol (32,04 g/mol)	18 mL + 10 mL (0,792)	0,69 mmol
acetilklorid (78,50 g/mol)	1,164 mL (1,104)	16,30 mmol (10)
<i>t</i>-butil (<i>R</i>)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)karbamat (340,44 g/mol)	0,555 g	1,63 mmol (1)

- Izkoristek: 100,0 %; m (izoliranega produkta) = 0,45 g.
- Izgled: umazano bela oborina.
- R_f : 0 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $158 \pm 2^\circ\text{C}$.

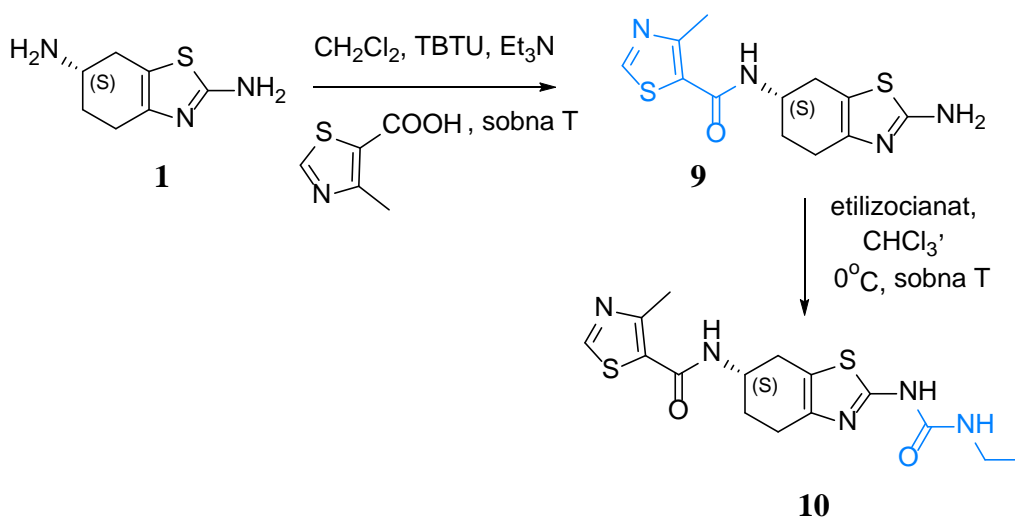
➤ HRMS (ESI⁺) za C₁₀H₁₆N₄OS ([M+H]⁺): izmerjena masa 241,1121; izračunana masa 241,1123.

➤ ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.06 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.83-1.92 (m, 1H, H_A-7), 2.06-2.14 (m, 1H, H_B-7), 2.56-2.72 (m, 3H, H_A-4, H-5), 3.01 (dd, *J*₁ = 15.9 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 1H, H_B-4), 3.11-3.17 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.43-3.57 (m, 1H, CHNH), 7.07 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 8.33 (d, 3H, *J* = 3.7 Hz, NH₃), 10.82 (razširjen s, 1H, NHCO) ppm.

4.4 Sinteza (S)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida

a) Najprej sklopitev, potem reakcija z etilizocianatom



4-Metiltiazol-5-karboksilno kislino (105 mg; 0,733 mmol; 1 Eq) smo raztopili v diklorometanu (10 mL), nato pa ob stalnem mešanju dodali TBTU (283 mg; 0,880 mmol; 1,2 Eq) in trietilamin (0,204 mL; 1,47 mmol; 2 Eq). Po 20 min smo dodali še (S)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin **1** (124 mg; 0,733 mmol; 1 Eq) ter trietilamin (0,102 mL; 0,733 mmol; 1 Eq). Mešali smo 24 h pri sobni temperaturi, oborjeni produkt (S)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamid **9** odfiltrirali na nuči, raztopljenega v matičnici pa očistili s kolonsko kromatografijo.

➤ Izkoristek: 17,2 % m (izoliranega produkta) = 0,037 g.

- Izgled: belo-rumena oborina.
- R_f : 0,2 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $200 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₂H₁₄N₄OS₂ ([M+H]⁺): izmerjena masa 295,0682; izračunana masa 295,0687.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.75-1.85 (m, 1H, H_A-7), 1.91-1.98 (m, 1H, H_B-7), 2.52-2.54 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2.56 (s, 3H, CH₃), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H_B-4), 4.09-4.15 (m, 1H, CHNH), 6.68 (s, 2H, NH₂), 8.32 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, CHNH), 9.05 (s, 1H, ArH) ppm.

V naslednjem koraku smo izvedli reakcijo z etilizocianatom po enakem postopku kot pri sintezi spojin **5** in **6**. Vzorec smo očistili s kolonsko kromatografijo, kot mobilno fazo pa uporabili DKM : MeOH = 20 : 1. Identificirali smo spojino **10**.

Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
(S)-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)-4-metil-tiazol-5-karboksamid (365,47 g/mol)	0,017 g	0,058 mmol (1)
kloroform (119,37 g/mol)	1 mL (1,489)	0,012 mmol
etilizocianat (71,08 g/mol)	0,005 mL (0,898)	0,064 mmol (1,1)

- Izkoristek: 9,5 %; m (izoliranega produkta) = 0,002 g.
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,3 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $198 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₅H₁₉N₅O₂S₂ ([M+H]⁺): izmerjena masa 366,1058; izračunana masa 366,1058.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

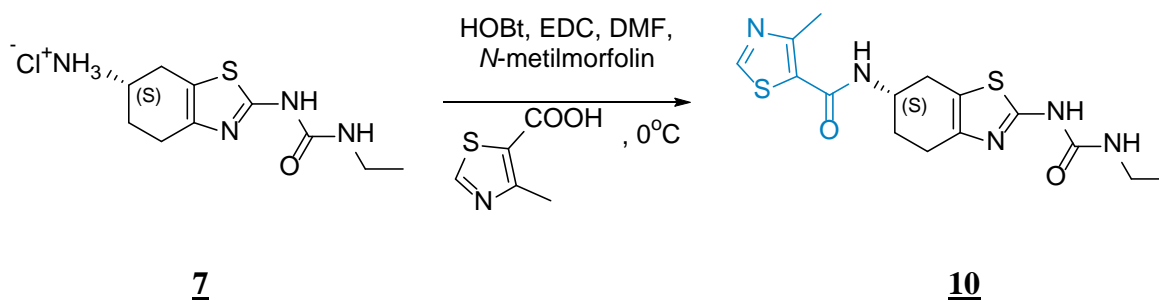
δ 1.(t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₃), 1.80-1.90 (m, 1H, H_A-7), 1.96-2.03 (m, 1H, H_B-7), 2.56 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.58-2.69 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2.92 (dd, 1H, $J_1 = 15.3$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz,

H_B-4), 3.09-3.16 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.11-4.21 (m, 1H, CHNH), 6.73 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 8.37 (d, 1H, *J* = 7.70 Hz, CHNH), 9.05 (s, 1H, Ar-H), 10.25 (s, 1H, NHCO) ppm.

b) Sklopitev kot končna stopnja

Kislinski derivat (1 Eq) smo raztopili v *N,N*-dimetilformamidu (DMF). Med mešanjem na ledeni kopeli smo dodali EDC (1,2 Eq), HOBt (1,3 Eq) in bazo *N*-metilmorfolin (1 Eq). Počakali smo 30 min, da je potekla aktivacija kisline. Reakcijski zmesi smo dodali še 2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid (**7**) (1 Eq) ter z *N*-metilmorfolinom uravnali pH na vrednost 8. Pustili smo mešati čez noč na sobni temperaturi.

Naslednji dan smo zmesi dodali etilacetat (20 mL) in izvedli ekstrakcijo z 10 % citrsko kislino (20 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (20 mL) in NaCl (20 mL). Organsko fazo smo sušili z Na-sulfatom, topilo pa odparili pod znižanim tlakom.



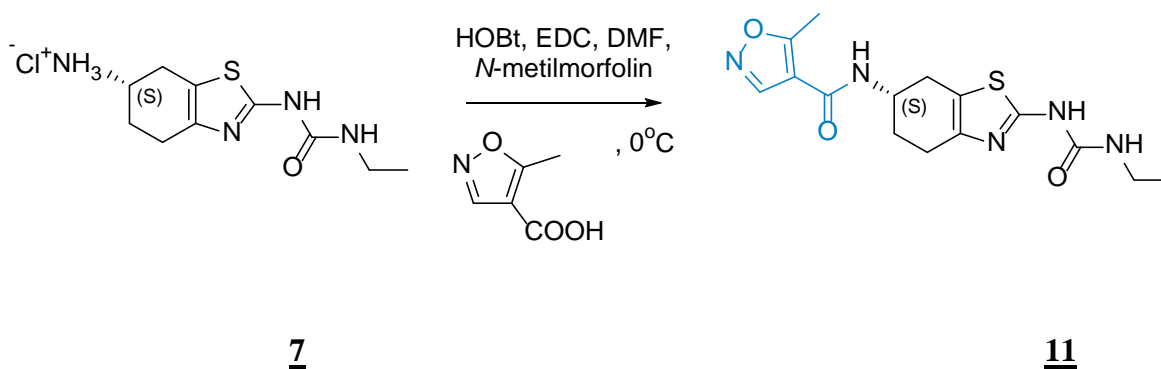
Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
4-metiltiazol-5-karboksilna kislina (143,16 g/mol)	0,050 g	0,35 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,0652 g	0,42 mmol (1,2)
HOBt (153,12 g/mol)	0,0697 g	0,45 mmol (1,3)
<i>N</i>-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,0385 mL (0,920)	0,35 mmol (1)
(<i>S</i>)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,0966 g	0,35 mmol (1)

- Izkoristek: 72 %; m (izoliranega produkta) = 0,092 g.

4.5 Sinteza (S)-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-5-metilizoksazol-4-karboksamida

Postopek enak kot pri sintezi spojine **10** (4.4 b).

Ker po ekstrakciji nismo dobili čistega produkta, smo izvedli kristalizacijo iz MeOH. Ta je slabo potekla, zato smo vzorec očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo DKM : MeOH = 40 : 1.



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
5-metilizoksazol-4-karboksilno kislina (127,10 g/mol)	0,050 g	0,34 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,074 g	0,47 mmol (1,2)
HOBt (153,12 g/mol)	0,069 g	0,51 mmol (1,3)
N-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,043 mL (0,920)	0,34 mmol (1)
(S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,108 g	0,34 mmol (1)

- Izkoristek: 21,8 %; m (izoliranega produkta) = 0,030 g.

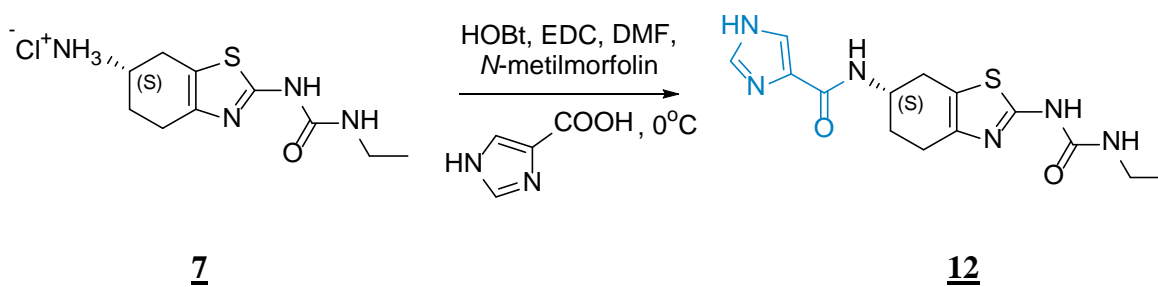
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $160 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izmerjena masa 350,1286; izračunana masa 350,1287.
- ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ 1.05 (dt, 3H, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, CH_2CH_3), 1.65-1.72 (m, 1H, $\text{H}_{\text{A-7}}$), 1.76-1.93 (m, 1H, $\text{H}_{\text{B-7}}$), 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.54-2.64 (m, 3H, $\text{H}_{\text{A-4}}$, H-5), 2.92 (dd, 1H, $J_1 = 16.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $\text{H}_{\text{B-4}}$), 3.09-3.16 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.52-3.61 (m, 1H, CHNH), 6.77 (s, 1H, NHCH_2CH_3), 6.98 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, CHNH), 8.41 (s, 1H, Ar-H), 10.27 (s, 1H, NHCO) ppm.

4.6 Sinteza (S)-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-1*H*-imidazol-4-karboksamida

Postopek enak kot pri sintezi spojine **10** (4.4 b).

Ker po ekstrakciji nismo dobili čistega produkta, smo vzorec očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo mobilno fazo DKM : MeOH = 9 : 1.



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
1<i>H</i>-imidazol-4-karboksilno kislino (112,09 g/mol)	0,050 g	0,45 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,083 g	0,54 mmol (1,2)
HOBT (153,12 g/mol)	0,078 g	0,58 mmol (1,3)

<i>N</i>-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,049 mL (0,920)	0,45 mmol (1)
(<i>S</i>)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,123 g	0,45 mmol (1)

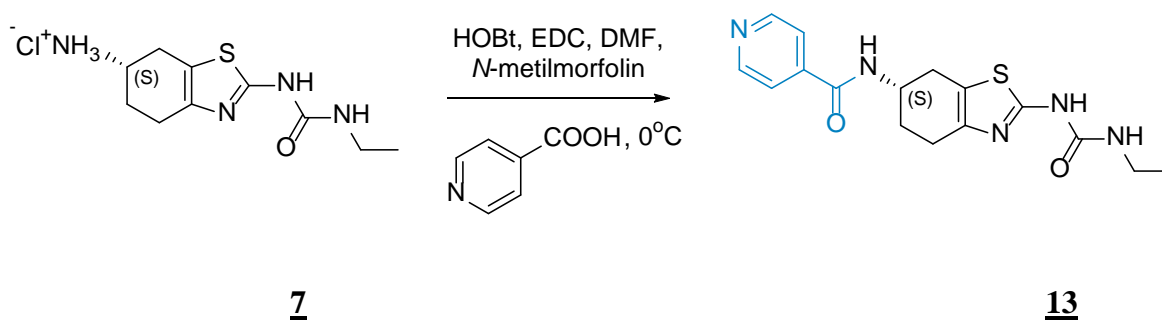
- Izkoristek: 3,4 %; m (izoliranega produkta) = 0,005 g.
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,1 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $180 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₄H₁₈N₆O₂S ([M+H]⁺): izmerjena masa 335,1297; izračunana masa 335,1290.
- ¹H NMR (400 MHz, MeOD):

δ 1.19 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₃), 1.97-2.04 (m, 1H, H_{A-7}), 2.12-2.19 (m, 1H, H_{B-7}), 2.68-2.82 (m, 3H, H_{A-4}, H-5), 3.08 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, CH₂), 3.23-3.31 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.37-4.43 (m, 1H, CHNH), 7.70 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz, Ar-H), 7.74 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz, Ar-H) ppm.

4.7 Sinteza (*S*)- ali (*R*)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)izonikotinamida

a) (*S*)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)izonikotinamid

Postopek enak kot pri sintezi spojine **10** (4.4 b).



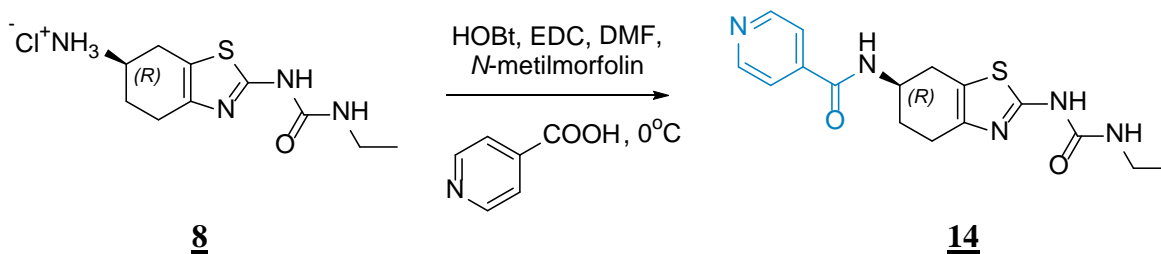
Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
Izonikotinska kislina (123,11 g/mol)	0,042 g	0,34 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,064 g	0,41 mmol (1,2)
HOBt (153,12 g/mol)	0,060 g	0,45 mmol (1,3)
N-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,038 mL (0,920)	0,34 mmol (1)
(S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,095 g	0,34 mmol (1)

- Izkoristek: 11,0 %; m (izoliranega produkta) = 0,013 g.
- Izgled: bela oborina.
- R_f : 0,2 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $125 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₆H₁₉N₅O₂S ([M+H]⁺): izmerjena masa 346,1330; izračunana masa 346,1338.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.06 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₃), 1.82-1.92 (m, 1H, H_{A-7}), 1.98-2.05 (m, 1H, H_{B-7}), 2.61-2.69 (m, 3H, H_{A-4}, H-5), 2.95 (dd, 1H, $J_1 = 15.3$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, CH₂), 3.10-3.17 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.17-4.27 (m, 1H, CHNH), 6.51 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NHCH₂CH₃), 7.77 (dd, 2H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, Ar-H), 8.73 (dd, 2H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, Ar-H), 8.77 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, CHNH), 10.14 (s, 1H, NHCO) ppm.

b) (*R*)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)izonikotinamid

Postopek enak kot pri sintezi spojine **10** (4.4 b).



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
izonikotinska kislina (123,11 g/mol)	0,062 g	0,50 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,093 g	0,60 mmol (1,2)
HOBt (153,12 g/mol)	0,100 g	0,65 mmol (1,3)
<i>N</i>-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,055 mL (0,920)	0,50 mmol (1)
(<i>R</i>)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,120 g	0,50 mmol (1)

- Izkoristek: 6,7 %; m (izoliranega produkta) = 0,010 g.
- Izgled: rumeno-bela oborina.
- R_f : 0,2 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $90 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₆H₁₉N₅O₂S ([M+H]⁺): izmerjena masa 346,1332; izračunana masa 346,1338.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.06 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₃), 1.81-1.93 (m, 1H, H_{A-7}), 1.96-2.08 (m, 1H, H_{B-7}), 2.58-2.73 (m, 3H, H_{A-4}, H-5), 2.95 (dd, 1H, $J_1 = 15.2$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H_{B-4}), 3.08-3.20 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.16-4.31 (m, 1H, CHNH), 6.58 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 7.77 (d, 2H, $J = 4.6$

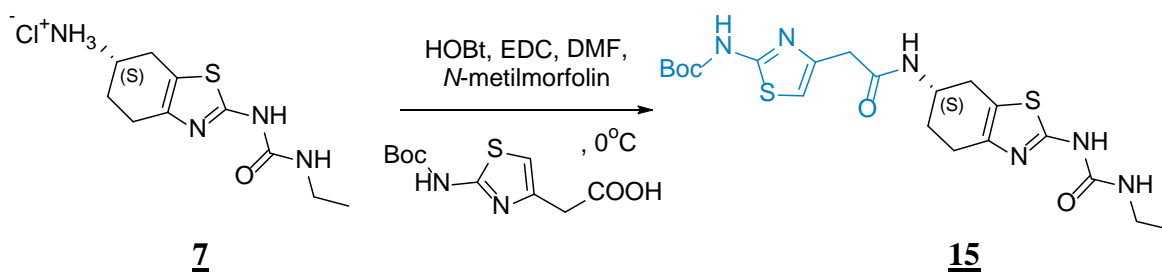
Hz, Ar-H), 8.73 (d, 2H, $J = 4.6$ Hz, Ar-H), 8.77 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, CHNH), 10.20 (s, 1H, NHCO) ppm.

➤ ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6):

δ 15.2, 24.5, 28.1, 28.5, 34.1, 46.2, 117.2, 121.4 (2C), 141.5, 150.1 (2C), 153.7, 157.7, 157.9, 164.4 ppm.

4.8 Sinteza *tert*-butil (S)-(4-(2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbamata

Postopek enak kot pri sintezi spojine **10** (4.4 b).



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
2-(2-((t-butoksikarbonil)amino)tiazol-4-il)ocetna kislina (258,28 g/mol)	0,071 g	0,28 mmol (1)
DMF (73,10 g/mol)	1 mL (0,948)	0,013 mmol
EDC (155,24 g/mol)	0,051 g	0,33 mmol (1,2)
HOBt (153,12 g/mol)	0,048 g	0,36 mmol (1,3)
N-metilmorfolin (101,15 g/mol)	0,030 mL (0,920)	0,28 mmol (1)
(S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-aminijev klorid (276,78 g/mol)	0,076 g	0,28 mmol (1)

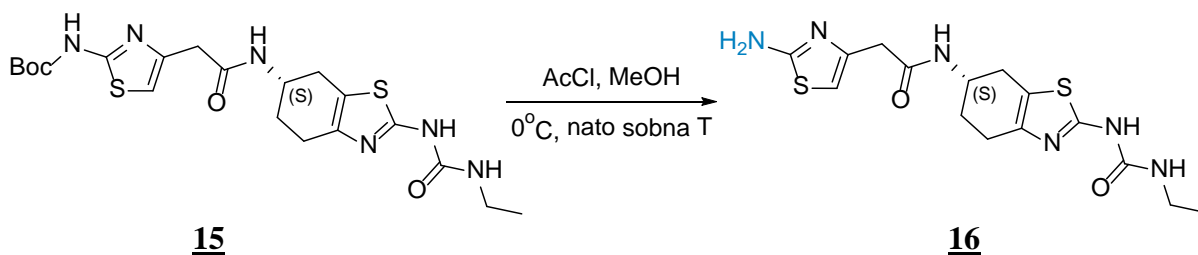
➤ Izkoristek: 74,2 %; m (izoliranega produkta) = 0,098 g.

- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $140 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izmerjena masa 481,1685; izračunana masa 481,1692.
- ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

δ 1.05 (t, $J = 7.18, 7.18$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.68-1.79 (m, 1H, $\text{H}_{\text{A-7}}$), 1.84-1.94 (m, 1H, $\text{H}_{\text{B-7}}$), 2.39-2.47 (m, 1H, H-4/5), 2.54-2.70 (m, 2H, $\text{H}_{4/5}$), 2.86 (dd, 1H, $J_1 = 16.1$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, $\text{H}_{\text{B-4}}$), 3.08-3.17 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.43 (s, 2H, Ar- CH_2), 3.95-4.02 (m, 1H, CHNH), 6.51 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, NHCH_2CH_3), 6.81 (s, 1H, Ar-H), 8.11 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, CHNH), 10.12 (s, 1H, NHCO), 11.39 (s, 1H, NHCO) ppm.

4.9 Sinteza (S)-2-(2-aminotiazol-4-il)-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)acetamida

Postopek enak kot pri sintezi spojin **7** in **8** (4.3).



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
metanol (32,04 g/mol)	2 mL + 2 mL (0,792)	98,9 mmol
acetilklorid (78,50 g/mol)	0,108 mL (1,104)	1,52 mmol (10)
<i>t</i>-butil (S)-4-(2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)karbammat (480,60 g/mol)	0,073 g	0,152 mmol (1)

- Izkoristek: 55,2 %; m (izoliranega produkta) = 0,032 g.
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).

- T_{tal} : $120 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): izmerjena masa 381,1162; izračunana masa 381,1167.
- ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):

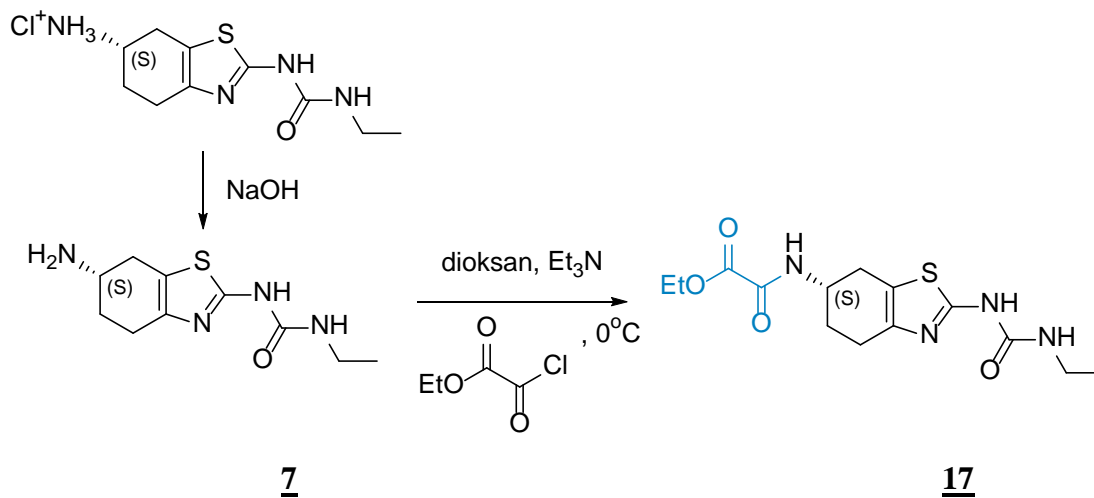
δ 1.03 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 1.67-1.78 (m, 1H, H_A -7), 1.84-1.93 (m, 1H, H_B -7), 2.53-2.60 (m, 3H, H_A -4, H-5), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 15.2$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H_B -4), 3.06-3.12 (m, 2H, CH_2CH_3), 3.26 (s, 2H, Ar- CH_2), 3.92-4.00 (m, 1H, CHNH), 6.21 (s, 1H, Ar-H), 6.89 (s, 2H, Ar- NH_2), 7.99 (s, 1H, NH), 8.14 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, CHNH), 11.08-11.53 (razširjen s, 1H, NH) ppm.

4.10 Sinteza etil (*S*)- ali (*R*)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata

(*S*)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid (200 mg; 0,725 mmol) smo raztopili v minimalni količini demineralizirane vode. Raztopino smo naalkalili z 10 M NaOH do pH = 12-13, jo ekstrahirali z EtAc (4×15 mL) in združenim organskim fazam odparili topilo.

Izhodno spojino, sedaj v obliki prostega amina (1 Eq), smo raztopili v 1,4-dioksanu z dodanim trietilaminom (1,5 Eq) in ohladili na ledeni kopeli. Ob vzpostavljeni argonovi atmosferi smo dodali etil oksalil klorid (1,3 Eq) ter reakcijsko zmes mešali 24 h pri sobni T. Izvedli smo ekstrakcijo z EtAc (20 mL) in organsko fazo spirali z 10 % citronsko kislino (20 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Nato smo pod znižanim tlakom odstranili topilo in surov produkt še dodatno očistili s kolonsko kromatografijo.

a) (S)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat



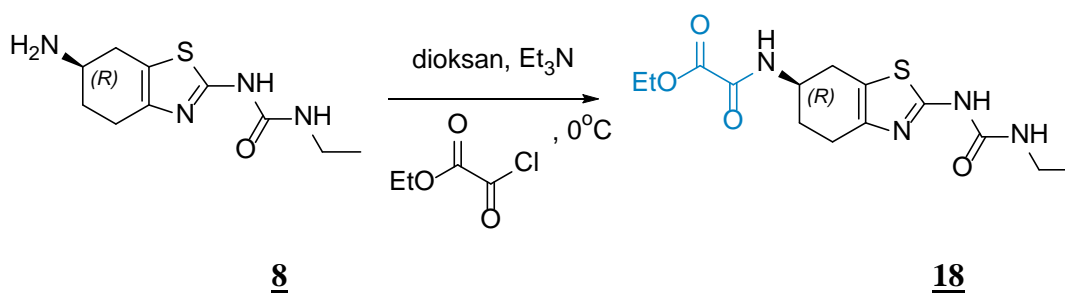
Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
(S)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)-3-etilurea (240,33 g/mol)	0,090 g	0,38 mmol (1)
1,4-dioksan (88,11 g/mol)	3-5 mL (1,033)	0,047 mmol
triethylamin (101,19 g/mol)	0,078 mL (0,726)	0,56 mmol (1,5)
etiloksalilklorid (136,53 g/mol)	0,055 mL (1,220)	0,49 mmol (1,3)

- Izkoristek: 9,3 %; m (izoliranega produkta) = 0,012 g.
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f : 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal} : $190 \pm 2^\circ\text{C}$.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₄H₂₀N₄O₄S ([M+H]⁺): izmerjena masa 341,1286; izračunana masa 341,1284.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.05 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NHCH₂CH₃), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, COCH₂CH₃), 1.77-1.95 (m, 2H, H-7), 2.56-2.66 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2.82 (dd, 1H, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, H_B-4), 3.08-3.18 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 3.98-4.10 (m, 1H, CHNH), 4.24 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz,

COCH₂CH₃), 6.51 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz, NHCH₂CH₃), 8.99 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, CHNH), 10.13 (s, 1H, NHCO) ppm.

b) (*R*)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat



Reagenti (molska masa)	Masa ali volumen (relativna gostota)	Množina (št. ekvivalentov)
(<i>R</i>)-1-(6-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)-3-etilurea (240,33 g/mol)	0,180 g	0,75 mmol (1)
1,4-dioksan (88,11 g/mol)	10 mL (1,033)	0,12 mmol
triethylamin (101,19 g/mol)	0,157 mL (0,726)	1,13 mmol (1,5)
etiloksalilklorid (136,53 g/mol)	0,109 mL (1,220)	0,98 mmol (1,3)

- Izkoristek: 9,0 %; m (izoliranega produkta) = 0,023 g.
- Izgled: svetlo rumena oborina.
- R_f: 0,4 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal}: 192 ± 2°C.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₄H₂₀N₄O₄S ([M+H]⁺): izmerjena masa 341,1277; izračunana masa 341,1297.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 1.05 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, NHCH₂CH₃), 1.28 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, COCH₂CH₃), 1.77-1.95 (m, 2H, H-7), 2.56-2.70 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2.82 (dd, 1H, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, H_B-4), 3.09-3.18 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 3.98-4.10 (m, 1H, CHNH), 4.24 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz,

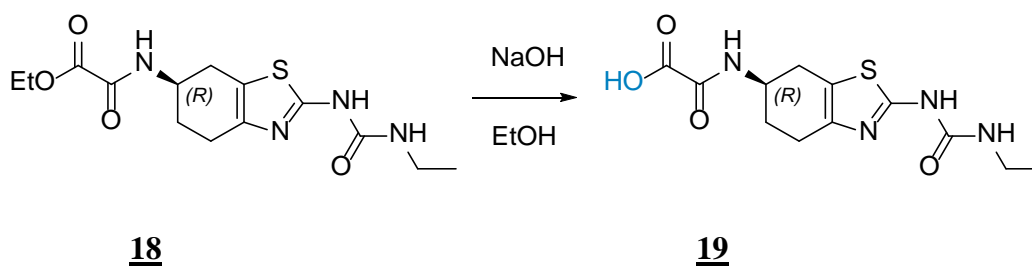
COCH₂CH₃), 6.51 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NHCH₂CH₃), 8.99 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, CHNH), 10.13 (s, 1H, NHCO) ppm.

➤ ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 13.8, 15.2, 27.6, 28.1, 34.1, 45.9, 61.9, 79.3, 117.1, 142.9, 156.9, 160.9 ppm.

Sinteza (R)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetilne kisline

Etil (R)-2-((2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat (10 mg, 0,03 mmol) smo raztopili v EtOH (1 mL) in dodali 1 M NaOH (0,059 mL; 0,059 mmol; 2 Eq). S TLC-jem smo spremljali potek hidrolize estra. Reakcija je bila končana po 3 h. Pod znižanim tlakom smo odstranili topilo, suh vzorec pa raztopili v deionizirani vodi (0,5 mL) in vodno raztopino nakisali z 1 M HCl do pH = 2. Oborjen produkt smo odfiltrirali s presesavanjem.



- Izkoristek: 77,8 %; m (izoliranega produkta) = 0,007 g.
- Izgled: rumena oborina.
- R_f: 0,0 (diklorometan : metanol = 9 : 1).
- T_{tal}: 166 ± 2°C.
- HRMS (ESI⁺) za C₁₂H₁₆N₄O₄S ([M+H]⁺): izmerjena masa 313,0964; izračunana masa 313,0971.
- ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

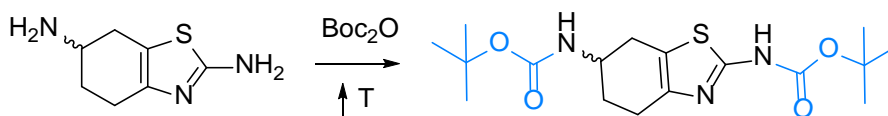
δ 1.05 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₂CH₃), 1.76-1.96 (m, 2H, H-7), 2.57-2.17 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 15.7$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H_B-4), 3.08-3.17 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.96-4.08 (m, 1H, CHNH), 6.52 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NHCH₂CH₃), 8.90 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, CHNH), 10.14 (s, 1H, NHCO), 13.39-14.45 (razširjen s, 1H, HOOC) ppm.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1 Uvedba karbamatne zaščitne skupine

Izhodnemu (*S*)- ali (*R*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu smo najprej zaščitili alifatsko amino skupino (spojini **2** in **4**). Alifatski amini so odlični nukleofili, zato jih je potrebno zaščititi, če ne želimo, da reagirajo v naslednji sintezni stopnji. Z izbranimi reakcijskimi pogoji (počasno dodajanje reagenta, nizka temperatura) smo usmerjali reakcijo zaščite, da je potekla selektivno samo na alifatski amino skupini in ne tudi na aromatski amino skupini. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli, di-*t*-butildikarbonat pa smo zelo počasi dokapavali v raztopino izhodnega diamina. S tem smo preprečili, da bi reakcija potekala neselektivno in bi reagirala tudi aromatska amino skupina, ki je sicer slabši nukleofil od alifatske (Slika 10).

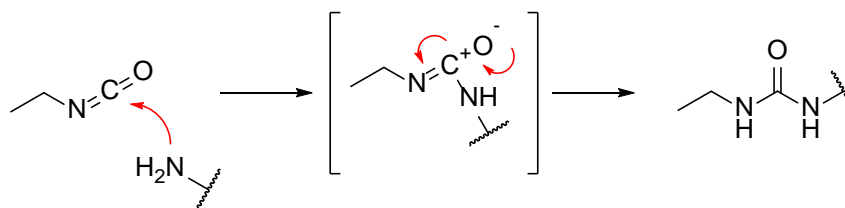


Slika 11: Neselektivna vezava Boc zaščitne skupine na obe amini skupini.

Med reakcijo je nastajal plin CO₂, zato smo pri sinteznem postopku namesto zamaška na bučko namestili septum in balon, s čimer smo omogočili izhajanje plina in imeli hkrati zaprto reakcijsko zmes.

5.1.2 Reakcija z etilizocianatom

Reakcijo smo izvajali v digestoriju, saj etilizocianat lahko povzroči solzenje in pekoč občutek v očeh ter dihalih. Nastanek etilsečninskega fragmenta je prikazan na Sliki 12.



Slika 12: Reakcija etilizocianata z aminom, nastanek etilsečninskega fragmenta.

V prvem poskusu sinteze spojine **5** nismo izolirali ustreznega produkta. Reakcijsko zmes smo 18 h mešali pod refluxom na oljni kopeli (60°C), kar se je izkazalo za vzrok neselektivne vezave etilizocianata na različna mesta v molekuli. S spremenjenimi reakcijskimi pogoji, mešanjem na ledeni kopeli, pa smo dosegli boljšo selektivnost.

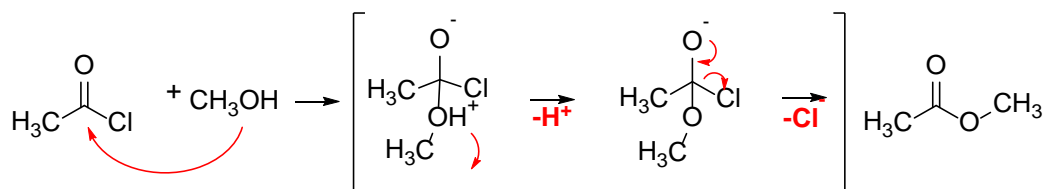
Pri ekstrakciji z nasičeno raztopino NaHCO_3 smo se znebili prebitnega etilizocianata, z nasičeno raztopino NaCl pa odtegnili vodo iz organske faze, ki smo jo na koncu še dodatno sušili z Na_2SO_4 .

Dobljeni surov produkt smo poskusili očistiti na dva različna načina, in sicer s kolonsko kromatografijo in s pomočjo prekrystalizacije iz etilacetata z dodatkom heksana. Slednja metoda se je izkazala za veliko bolj učinkovito, saj so izpadli čisti kristali zelenega produkta (spojini **5** in **6**). Izkoristek smo dodatno še povečali tako, da smo matičnico, iz katere so predhodno že izpadli kristali, prekrystalizirali še enkrat.

5.1.3 Odščita karbamatne zaščitne skupine z acidolizo

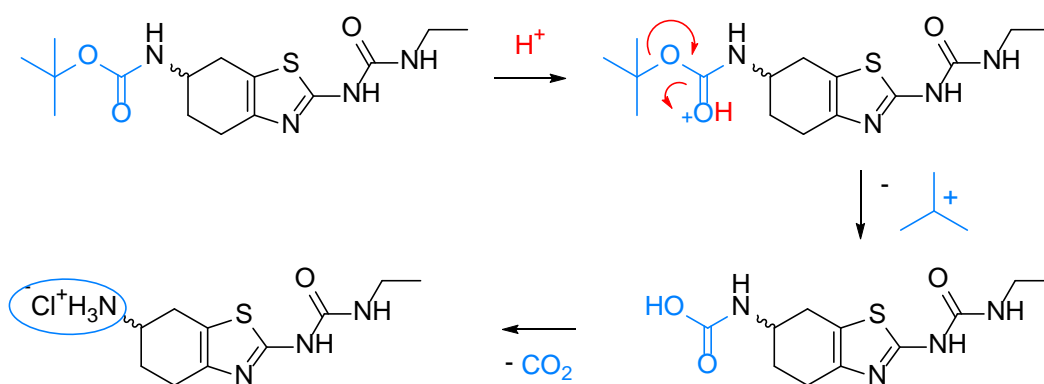
Selektivna odstranitev Boc zaščitne skupine poteče pri kisljih pogojih acidolize. Acidolizo lahko izvajamo s plinastim HCl v izbranem topilu ali s pomočjo trifluoroacetne kisline. Pri eksperimentalnem delu smo za odščito uporabili plinasti HCl , ki smo ga tvorili *in situ* z nukleofilno substitucijo med metanolom in acetyl kloridom (Slika 12).

Kislinski kloridi so zelo dovzetni za nukleofilni napad, saj halogenidi na splošno veljajo za zelo dobro izstopajoče skupine. To še dodatno poveča elektrofilnost na karbonilnem C-atomu, ki ima primanjkljaj elektronske gostote. Reakcija poteče stopenjsko preko tetraedričnega intermedata (Slika 13).



Slika 13: Reakcija Nu-substitucije in nastanek HCl (prirejeno po 26).

Naš končni produkt (spojini **7** in **8**) je bil v obliki soli, saj pride zaradi kislih pogojev do protoniranja odščitene aminske skupine. Mehanizem odščite Boc zaščitne skupine z acidolizo je prikazan na spodnji sliki (Slika 14).

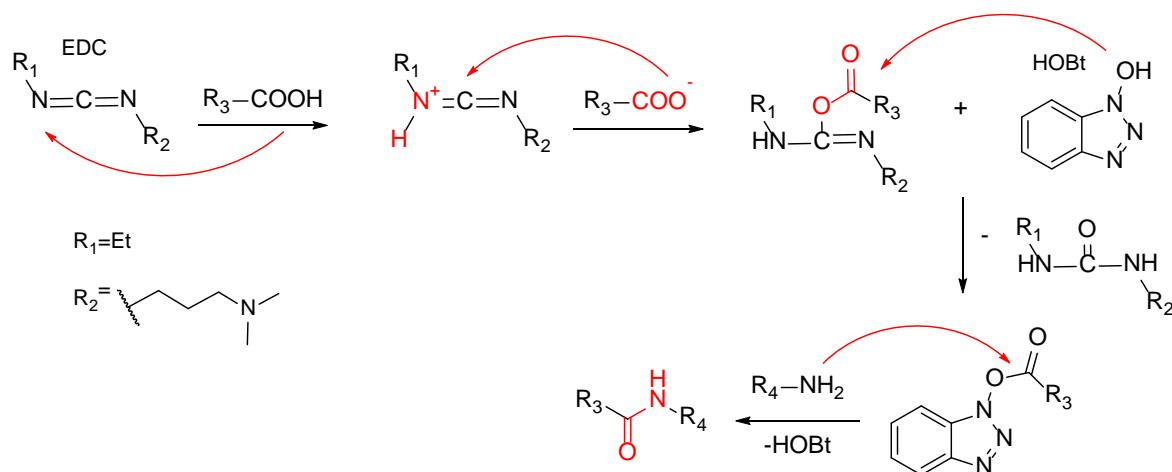


Slika 14: Odščita Boc zaščitne skupine z acidolizo (prirejeno po 27, 28).

5.1.4 Sintezna metoda sklopitve pri tvorbi amidne vezi

Sklopitveni reagenti omogočijo selektivno aktivacijo karboksilne kisline, ki v nadaljevanju z dodanim aminom tvori amidno vez (24). Pri svojem delu smo uporabili *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (TBTU) ali 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBt). Slednji je še dodatno povečal učinkovitost nastanka vezi ter preprečil morebitno racemizacijo.

Na Shemi 2 je prikazan nastanek amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta. Najprej poteče aktivacija karboksilne kisline z EDC (metoda *N*-aciliranja), tako da z nukleofilno adicijo nastane aktiviran ester. Ta reagira s HOBt reagentom in se na koncu poveže z izbranim aminom z reakcijo nukleofilne substitucije.



Shema 2: Nastanek amidne vezi ob prisotnosti sklopitvenega reagenta EDC in HOBT (prirejeno po 24, 29).

5.1.5 Sinteza (*S*)-*N*-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida (spojina 9)

Na izhodnem (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminu 1 smo z dodatkom sklopitvenega reagenta TBTU, 4-metiltiazol-5-karboksilne kisline, diklorometana in trietilamina sintetizirali amidno vez s 4-metiltiazolnim obročem (spojina 9). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo nastalo oborino stehali in dosegli visok izkoristek 91,2 %. Žal smo kasneje z metodo NMR ugotovili, da je v oborini prisotnega le malo produkta (majhna vsebnost). Izgube so bile precejšnje, zato smo poskusili še z izolacijo produkta iz matičnice.

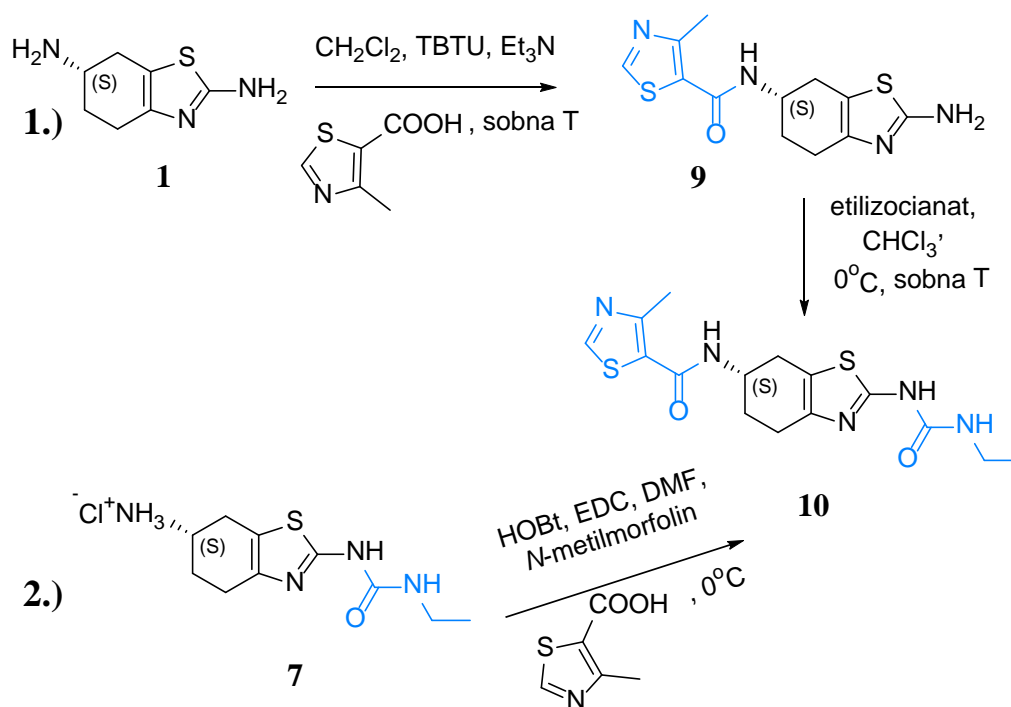
Matičnico z diklorometanom smo spirali z 0,01 M HCl (2 x 20 mL) in nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (20 mL), s čimer smo se znebili nezreagirane izhodnega amina in kisline. Ker je precej produkta ostalo v obeh vodnih fazah, smo ponovili ekstrakcijo, tokrat z etilacetatom. Z etilacetatom smo ekstrahirali tako vodno fazo s HCl, kot tudi vodno fazo z NaHCO₃. Združene organske faze (diklorometan + 2 x etilacetat) smo uparili, trden produkt pa raztopili v mobilni fazi DKM : MeOH = 20 : 1 ter ga očistili s kolonsko kromatografijo. Uspeli smo izolirati čist produkt, čeprav je bil dosežen končni izkoristek precej nizek (17,2 %).

5.1.6 Sinteza (*S*)-*N*-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)-4-metiltiazol-5-karboksamida (spojina **10**)

Sintezno pot nastanka spojine **10** smo izvedli na dva različna načina, s čimer smo želeli preveriti, katera sintezna pot daje višje izkoristke in lažje čiščenje produkta (Shema 3).

V prvem primeru smo najprej nastavili reakcijo sklopitve kislinskega derivata z izhodnim aminom (spojina **1**). Kot sklopitveni reagent smo uporabili TBTU, kot bazo pa Et₃N. V naslednjem koraku smo izvedli reakcijo z etilizocianatom.

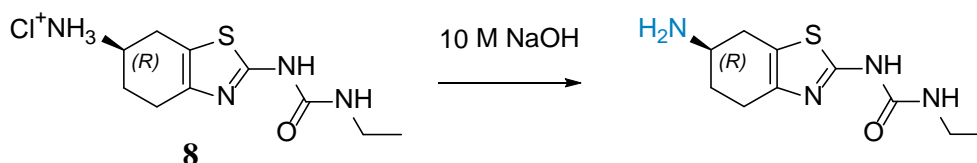
V drugem primeru smo vrstni red zamenjali. Sklopitev smo izvedli z aminom, ki je že predhodno reagiral z etilizocianatom. Uporabili smo tudi druge reagente, in sicer EDC, HOBt in močnejšo bazo *N*-metilmorfolin. S tem postopkom smo dosegli boljše rezultate in imeli manj problemov z izolacijo ter čiščenjem produkta (spojina **10**). Glede na to, da smo pri sintezi vseh končnih spojin (spojine **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**) uporabili metodo sklopitve, je bilo bolj ugodno na isto osnovo samo dodajati različne substituentе, kot pa osnovo nato naknadno še substituirati z dodatkom etilizocianata. Delo z etilizocianatom zahteva določeno mero previdnosti, zato je tudi iz stališča manjšega rokovanja z njim ta pot bolj smiselna.



Shema 3: Sinteza pot nastanka spojine **10**.

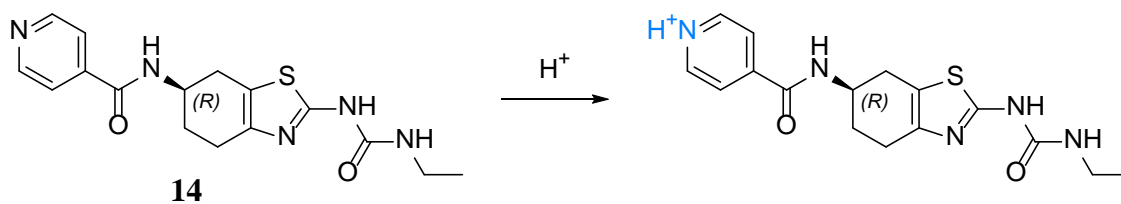
5.1.7 Sinteza (S),(R)-N-(2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)izonikotinamida

Spojino **8** smo predhodno pretvorili v obliko s prostim aminom, saj je tako reakcija potekla z večjim izkoristkom (Slika 15). Raztopili smo jo v minimalni količini demineralizirane vode, naalkalili z 10 M NaOH do pH 12 in nastalo oborino odnučali. Nadaljnji postopek sinteze (sklopitve) je ostal nespremenjen.



Slika 15: Protonacija aminske skupine z NaOH.

Pri ekstrakciji z 10 % citrsko kislino smo opazili velike izgube produkta (spojini **13** in **14**) v vodni fazi. Prisotnost produkta v vodni fazi smo spremljali s TLC. Domnevno je lahko prišlo do protoniranja obročnega dušika s kislino (Slika 16). Temu smo se nekoliko izognili tako, da smo namesto kislega medija uporabili demineralizirano vodo. Za boljši izkoristek smo vodno fazo še dodatno ekstrahirali z etilacetatom.

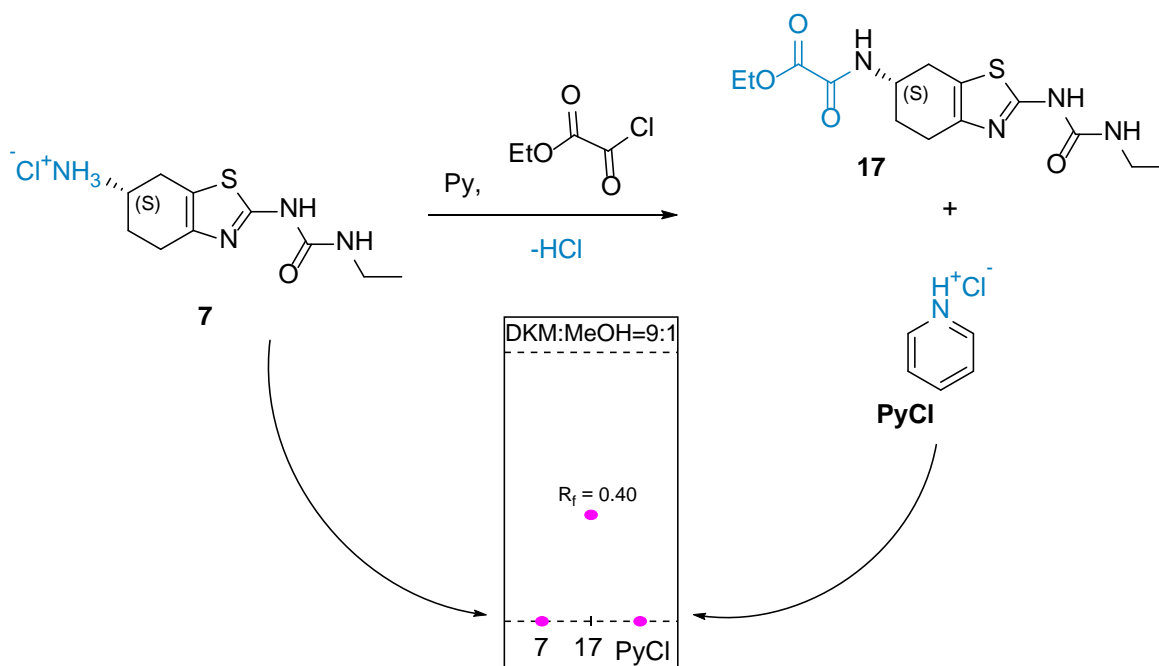


Slika 16: Protonacija obročnega dušika s citrsko kislino.

5.1.8 Reakcija z etiloksalil kloridom

Izhodno spojino, (S)-2-(3-etilureido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid **7**, ki je v obliki soli, je bilo potrebno pretvoriti v prost amin, da bi lahko potekla reakcija nukleofilne substitucije z etiloksalil kloridom.

Prvič smo reakcijo nastavili tako, da smo uporabili izhodno spojino v obliki soli **7**, pretvorba v prost amin pa je potekla tekom reakcije s pomočjo dodanega piridina v diklorometan, ki smo ga uporabili kot topilo za izvajanje reakcije. Imeli smo velike probleme z raztapljanjem (dodati smo morali še 1,4-dioksan in DMF, da smo dosegli topnost). S kromatogramom smo težko spremljali, do katere stopnje je potekla reakcija, saj se med reakcijo tvori piridinijeva sol, ki ima tako kot naša izhodna spojina $R_f = 0$.

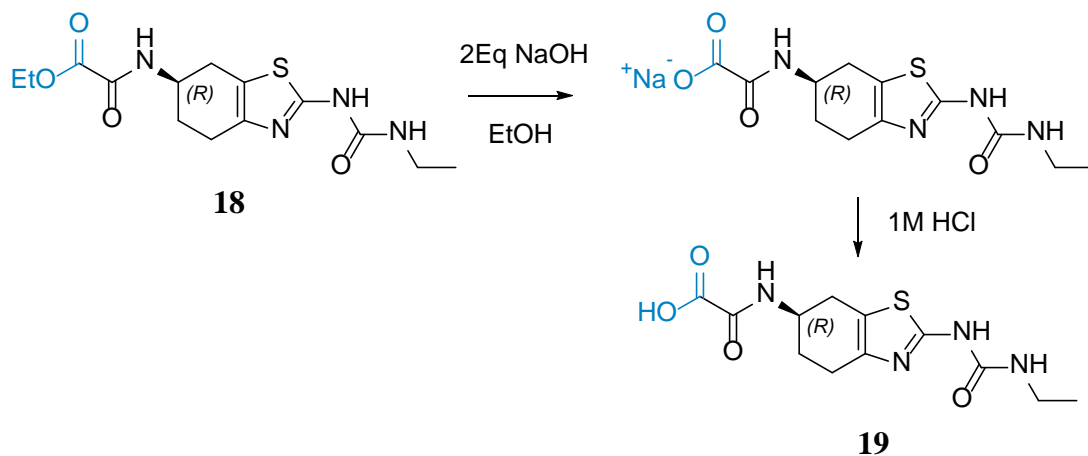


Slika 17: Reakcija z etiloksalil kloridom in prikaz potovanja spojin na kromatogramu.

V drugem poskusu smo že v začetni stopnji uporabili izhodno spojino v obliki prostega amina. S tem smo se izognili problemom z raztapljanjem (amin se je raztopil v 1,4-dioksanu ob dodatku Et_3N) in bili bolj uspešni tudi pri končnem izkoristku sinteze.

5.1.9 Reakcija alkalne hidrolize

Spojino **18** smo raztopili v EtOH in dodali 2 Eq 1 M NaOH. Potek hidrolize estra smo lahko spremljali s TLC, saj se je zaradi prebitnega NaOH tvorila sol z $R_f = 0$. Po končani hidrolizi smo pod znižanim tlakom odparili topilo in suh produkt nakisali z 1 M HCl, da je nastala spojina **19**. Na TLC je bil njen R_f še vedno nič, zaradi polarne -COOH skupine, tako da smo ustreznost sinteze dokazali z metodo NMR.



Shema 4: Sinteza spojine **19** z alkalno hidrolizo in dodatnim nakisanjem s HCl.

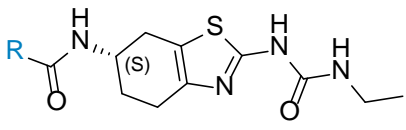
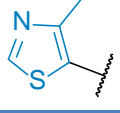
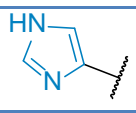
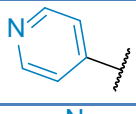
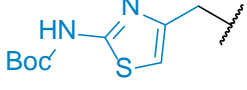
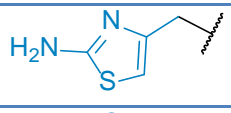
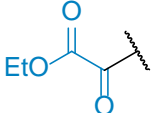
5.2 REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

Testiranje spojin je potekalo na izolirani DNA girazi iz bakterije *E. coli*. V prvem krogu smo za testiranje izbrali prvih šest končnih spojin (spojine **10**, **11**, **12**, **13**, **15**, **16**) s potencialnim inhibitorskim delovanjem.

Rezultati v Preglednici II so podani glede na to, kakšno aktivnost je ohranil encim po delovanju inhibitorja. Manjši procent rezidualne aktivnosti kaže na boljše inhibitorske lastnosti spojine.

$$RA_{\text{spojine}} = 100 \% \text{ delovanje encima} - \% \text{ inhibicije encima pri določeni koncentraciji inhibitorja}$$

Preglednica II: Inhibicija DNA giraze iz bakterije *E. coli* S-izomernih spojin **10**, **11**, **12**, **13**, **15**, **16** in **17**.

Oznaka spojine	Struktura	Rezidualna aktivnost encima (RA)	
		100 μ M	10 μ M
10		65 %	105 %
11		47 %	93 %
12		50 %	89 %
13		51 %	42 %
15		10 %	80 %
16		79 %	97 %
17		90 %	109 %

Testirali smo aktivnost inhibitorjev pri dveh koncentracijah, 100 μM in 10 μM . Smiselno je, da ima spojina močnejšo aktivnost pri višji koncentraciji. Neskladje se je pokazalo pri spojini **13**, zato bo meritev potrebno ponoviti. Njena RA je nižja pri koncentraciji 10 μM , a ne odstopa veliko od izmerjene vrednosti pri 100 μM . Iz dobljenih rezultatov encimskega testa lahko zaključimo, da so spojine **10**, **11**, **12**, **13**, **15** in **16** dokaj šibki inhibitorji DNA giraze iz *E. coli*, saj zavirajo njeno delovanje v mikromolarnem območju. Rezultati so podani kot RA encima pri dveh koncentracijah spojine. IC_{50} za spojine z RA nižjo od 50 % pri 100 μM koncentraciji testirane spojine bodo določene kasneje. Jakost inhibicije se ni bistveno spremenila ob uvajanju različnih aromatskih substituentov, s katerimi smo želeli doseči interakcije z Arg76 in/ali Arg136. Spojina **15**, ki je zaščiteni derivat spojine **16**, presenetljivo pri 100 μM koncentraciji kaže boljšo inhibitorno aktivnost od spojine **16**. Spojina **13** je izkazovala najmočnejšo inhibicijo DNA giraze pri 10 μM , zato smo se odločili sintetizirati še *R*-izomer te spojine in preizkusiti njegovo aktivnost (spojina **14**).

Pri do sedaj znanih inhibitorjih sintetiziranih na Fakulteti za farmacijo so izkazovale dobro aktivnost spojine z etiloksalilnim fragmentom (23). Aktivni so bili tako estri, kot tudi z naslednjo stopnjo hidrolize nastale kisline. Poskusili smo z uvedbo tega fragmenta na etilsečninskih derivatih in upali na dobro inhibitorno aktivnost.

V drugem krogu smo testirali spojine **14**, **17**, **18** in **19**.

Preglednica III: Inhibicija DNA giraze iz bakterije *E. coli* *R*-izomernih spojin **14**, **18** in **19**.

Oznaka spojine	Struktura	Rezidualna aktivnost encima (RA)	
		100 μM	10 μM
14		71 %	108 %
18		72 %	101 %
19		76 %	86 %

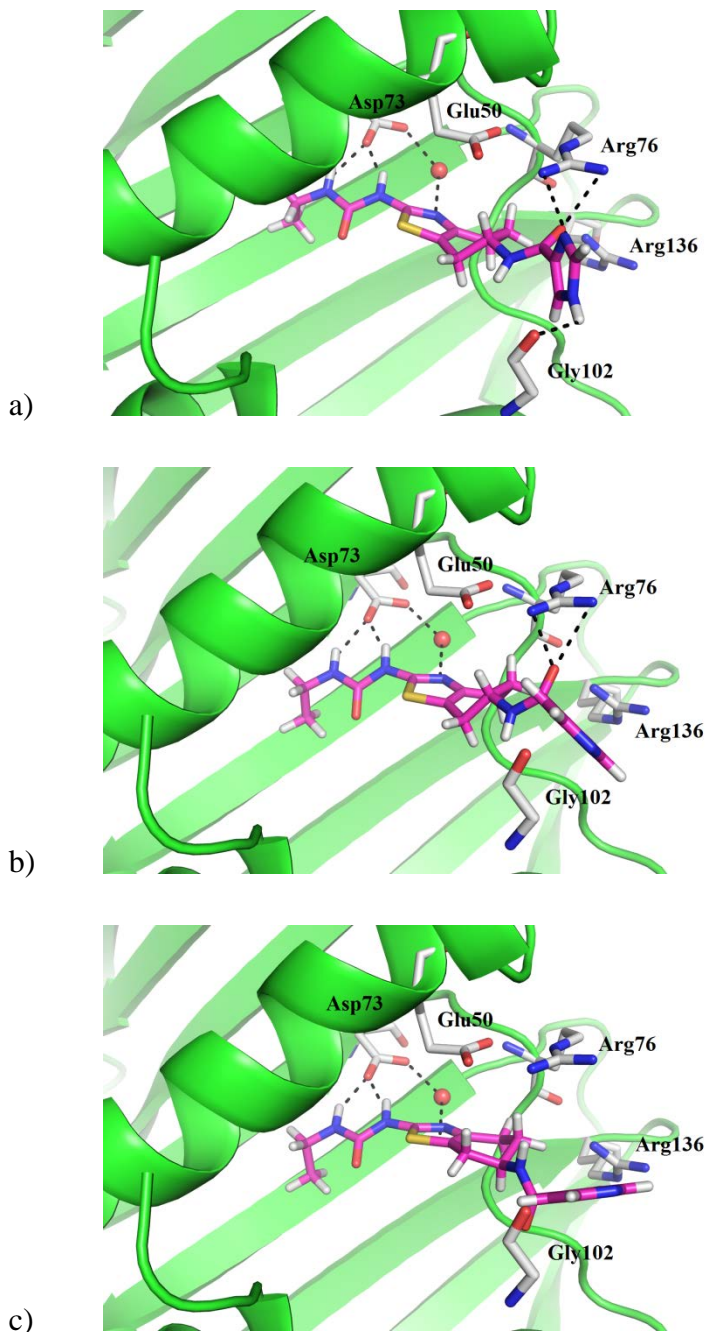
Etiloksalilni fragment uveden v spojinah **17** in **18** ni bistveno vplival na izboljšanje aktivnosti spojin. Tako *S*-, kot tudi *R*-enantiomer namreč izkazujeta precej slabo inhibitorno delovanje (Preglednici II, III). Spojina **19**, ki je v obliki kisline, ima pri 10 μ M koncentraciji malenkost večjo inhibitorno aktivnost v primerjavi s spojino **18**, ki je v obliki estra, čeprav je tudi ta precej nizka. Glede na izmerjeno zaviralno aktivnost spojine **13**, ki vsebuje fragment izonikotinske kisline, smo pričakovali veliko več od rezultatov njene *R*-enantiomerne oblike. Spojina **14** ima namreč pri obeh merjenih koncentracijah izraženo slabšo inhibitorno aktivnost od spojine **13**. Primerjava aktivnosti sintetiziranih *S*- in *R*-enantiomerov izbranih spojin kaže, da imajo *S*-enantiomeri boljšo aktivnost kot njihovi *R*-enantiomeri.

Spojine so bile poslone tudi na Fakulteto za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem na *in vitro* testiranje njihove protibakterijske aktivnosti napram dvem G+ bakterijam, *S. aureus* in *E. faecalis*, in dvem G- bakterijam, *E. coli* in *P. aeruginosa*.

Vezavo sintetiziranih spojin v vezavno mesto za ATP DNA giraze iz bakterije *E. coli* smo predvideli s pomočjo molekulskega sidranja, ki smo ga izvedli s programom FlexX, ki je del programskega paketa LeadIT (BioSolveIT). Sidranje je v vseh primerih predvidelo ugodno vezavo etilsečninske skupine v hidrofobni žep vezavnega mesta za ATP, saj le-ta tvori dve vodikovi vezi s stransko verigo Asp73. Dodatna vodikova vez se tvori med obročnim dušikovim atomom tiazolnega obroča in preko strukturno ohranjene molekule vode do stranske verige Asp73. Ta mreža vodikovih vezi je značilna za vezavo adeninskega obroča ATP in etilsečninske, pirolamidne in drugih skupin znanih zaviralcev DNA giraze (23). Molekulsko sidranje predpostavi tudi tvorbo vodikove vezi med karbonilno skupino amidne vezi in stransko verigo Arg76 (Slika 18).

Natančnejša analiza vezave dodatnih aromatskih obročev in oksalilne skupine je pokazala, da v večini primerov ne tvorijo zelene interakcije z Arg136, ki je ponavadi ključna za doseganje jakosti inhibicije v nanomolarnem območju. Izjema je imidazolni obroč spojine **12**, ki lahko tvori vodikovo vez z Gly102 (Slika 18a). Piridinski obroč spojine **13** ne tvori nobenih dodatnih vodikovih vezi, ampak verjetno le hidrofobne interakcije (Slika 18b). Spojina **14**, ki je *R*-enantiomer spojine **13**, ne tvori vodikovih vezi z Arg76, kar je verjetno razlog za njeno slabšo aktivnost v primerjavi s spojino **13** (Slika 18c).

Cilj optimizacije v naslednjih stopnjah načrtovanja in sinteze je torej uvedba takšnih substituentov, ki bodo lahko tvorili vodikovo vez z Arg136 in zaradi tega predvidoma izkazovali močnejšo inhibicijo encima. Glede na rezultate sidranja je sinteza *S*-enantiomerov bolj smiselna od sinteze *R*-enantiomerov.



Slika 18: Predvidena vezava spojin a) 12, b) 13 in c) 14 v vezavnem mestu za ATP DNA giraze iz bakterije *E. coli*. Encim je prikazan z zeleno, ključni aminokislinski ostanki s sivo, inhibitor z vijolično, vodikove vezi pa s črno barvo (molekulsko sidranje je delo doc. dr. Tihomirja Tomašiča mag. farm).

6 SKLEP

S svojo izjemno sposobnostjo prilagajanja na okoljske spremembe so bakterije v prednosti pred že obstoječimi protibakterijskimi učinkovinami, zato je sinteza vedno novih učinkovin izrednega pomena. Encim DNA giraza je dobra tarča UČ s protibakterijskim delovanjem, saj je življenjskega pomena za bakterije, ki so na tem mestu še vedno ranljive.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove derivate 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina z etilsečninskim fragmentom kot inhibitorje DNA giraze. Etilsečninski fragment smo izbrali zato, ker v kristalnih strukturah kompleksov DNA giraza-inhibitor tvori ključne interakcije v vezavnem mestu za ATP DNA giraze. Z uvajanjem dodatnih substituentov na drugem koncu molekule smo želeli izboljšati zaviranje encima in fizikalno-kemijske lastnosti spojin, da bi dosegli protibakterijsko delovanje. Uspešno smo sintetizirali deset končnih spojin (spojine **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**) in njihovo strukturo potrdili z metodama NMR in MS. Sintezno pot smo načrtovali tako, da smo v prvih treh sinteznih stopnjah pripravili osnovni skelet z etilsečninskim fragmentom (spojini **7** in **8**), nato pa z metodo sklopitve nanj pripenjali različne substituentne.

Nekaj manjših težav smo imeli pri vmesni stopnji sinteze spojine **5** (Boc zaščitena spojina **7**), ki so bile posledica neustrezno izbranih reakcijskih pogojev in ugotavljanja učinkovitega načina izolacije. Zaradi segrevanja reakcijske zmesi je prišlo do neselektivne vezave reagenta na več mest v molekuli. Selektivnost smo dosegli z mešanjem na ledeni kopeli. Spojino **5** smo sprva čistili s kolonsko kromatografijo, a smo kasneje ugotovili, da smo lahko uspešnejši z metodo kristalizacije. Uvajanje substituentov za interakcijo z Arg76/Arg136 smo izvedli z različnimi sklopitvenimi reagenti. Kombinacija HOBt, EDC in *N*-metilmorfolin se je pri tem izkazala za bolj učinkovito kot TBTU in Et₃N. Dosegli smo boljši izkoristek reakcije, pri izolaciji spojin pa smo imeli manj težav. Poskusili smo tudi z različnim zaporedjem sinteznih korakov. Sklopitev kot predzadnja ali kot zadnja stopnja sinteze. Glede na končni izkoristek, potrebno previdnost pri delu z etilizocianatom in lažje čiščenje spojin, je bilo pripenjanje substituentov bolj ugodno izvesti v zadnji sintezni stopnji na molekuli s predhodno že sintetiziranim etilsečninskim fragmentom.

Rezultati biokemijskih testiranj so potrdili aktivnost nekaterih naših končnih spojin na izolirani DNA girazi, vendar žal samo v mikromolarnem območju. *S*-enantiomerne oblike spojin so srednje dobri inhibitorji, saj je bila njihova povprečna RA pri koncentraciji 100 μM okrog 50 %. Najboljšo zaviralno aktivnost je pokazala spojina **13**, ki je imela pri koncentraciji 10 μM najnižjo RA. IC_{50} vrednosti, ki bodo določene kasneje, bodo pokazale dejansko aktivnost spojin. Sintetizirali smo tudi *R*-enantiomere spojin, saj nas je zanimala njihova aktivnost v primerjavi z *S*-enantiomeri, a ta žal ni bila nič boljša.

Poleg dokazane zaviralne aktivnosti na izoliranem encimu morajo biti naše spojine sposobne zaobiti še vse bakterijske obrambne mehanizme in svojo aktivnost doseči tudi na celični ravni. Kljub zaenkrat dokaj šibki inhibiciji DNA giraze sintetiziranih etilsečninskih derivatov, dobljeni rezultati vseeno predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo spojin tega strukturnega tipa kot inhibitorjev DNA giraze.

7 LITERATURA

1. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406: 775-781.
2. <http://www.scientificamerican.com/article/how-do-antibiotics-kill-b/>, dostopano dne 24.8.2015.
3. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, Flower R J: *Pharmacology*, 6. izdaja, Churchill Livingstone, Elsevier, London, 2007: 609-687.
4. Tenover F C: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 2006; 119: S3-S10.
5. Neuhauser M M, Weinstein R A, Rydman R, Danziger L H, Karam G, Quinn J P: Antibiotic Resistance Among Gram-Negative Bacilli in US Intensive Care Units Implications for Fluoroquinolone Use. *The Journal of the American Medical Association* 2003; 289: 885-888.
6. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 2033-2047.
7. Boyer R: *Temelji biokemije*, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 13-337.
8. Tomašič T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14: 130-151.
9. Mayer C, Janin Y L: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chemical Reviews* 2014; 114: 2313-2342.
10. Škedelj V, Tomašič T, Peterlin Mašič L, Zega A: ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 54: 915-929.
11. Gubaev A, Klostermeier D: DNA-induced narrowing of the gyrase N-gate coordinates T-segment capture and strand passage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(34): 14085-14090.
12. Brino L, Urzhumtsev 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 ATPase Catalytic Center. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 9468-9475.
13. Lamour V, Hoermann L, Jeltsch J M, Oudet P, Moras D: An Open Conformation of the *Thermus thermophilus* Gyrase B ATP-binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 18947-18953.
 14. Jackson A P, Maxwell A: Identifying the catalytic residue of the ATPase reaction of DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 11232-11236.
 15. Schechner M, Sirockin F, Stote R H, DeJaegere A P: Functionality Maps of the ATP Binding Site of DNA Gyrase B: Generation of a Consensus Model of Ligand Binding. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004; 47: 4373-4390.
 16. Teague S J: Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2: 527-541.
 17. Wermuth C G: *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3. izdaja, Elsevier, Illkirch, 2008: 125-155.
 18. Charifson P S, Grillot A L, Grossman T H, Parsons J D, Badia M, Bellon S, Deininger D D, Drumm J E, Gross C H, LeTiran A, Liao Y, Mani N, Nicolau D P, Perola E, Ronkin S, Shannon D, Swenson L L, Tang Q, Tessier P R, Tian S K, Trudeau M, Wang T, Wei Y, Zhang H, Stamos D: Novel Dual-Targeting Benzimidazole Urea Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV Possessing Potent Antibacterial Activity: Intelligent Design and Evolution through the Judicious Use of Structure-Guided Design and Structure-Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51: 5243-5263.
 19. Grossman T H, Bartels D J, Mullin S, Gross C H, Parsons J D, Liao Y, Grillot A L, Stamos D, Olson E R, Charifson P S, Mani N: Dual Targeting of GyrB and ParE by a Novel Aminobenzimidazole Class of Antibacterial Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 657-666.
 20. Mani N, Gross C H, Parsons J D, Hanzelka B, Müh U, Mullin S, Liao Y, Grillot A L, Stamos D, Charifson P S, Grossman T H: In Vitro Characterization of the Antibacterial Spectrum of Novel Bacterial Type II Topoisomerase Inhibitors of the Aminobenzimidazole Class. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 1228-1237.

21. Kale M G, Raichurkar A, Hameed P S, Waterson D, McKinnley D, Manjunatha M R, Kranthi U, Koushik K, Jena L K, Shinde V, Rudrapatna S, Barde S, Humnabadkar V, Madhavapeddi P, Basavarajappa H, Ghosh A, Ramya VK, Guptha S, Sharma S, Vachaspati P, Kumar M, Giridhar J, Reddy J, Panduga V, Ganguly S, Ahuja V, Gaonkar S, Kumar N, Ogg D, Tucker J A, Boriack-Sjodin P A, Sousa S M, Sambandamurthy V K, Ghorpade S R: Thiazolopyridine Ureas as Novel Antitubercular Agents Acting through Inhibition of DNA Gyrase B. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56: 8834-8848.
22. Patrick G L: *An introduction to Medicinal Chemistry*, 3. izdaja, Oxford, New York, 2005: 163-265.
23. 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. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(14): 5501-21.
24. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmacevtska kemija III Vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
25. Pavia D L, Lampman G M, Kriz G S, Vyvyan J R: *Introduction to spectroscopy*, 4. izdaja, Brooks/Cole, Cengage Learning, USA, 2009: 105-519.
26. Tišler M: *Organska kemija*, 2. Izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1988: 193-245.
27. Isidro-Llobet A, Álvarez M, Albericio F: Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* 2009; 109: 2455-2504.
28. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E: *Chemical approaches of the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, United States of America, 1997: 7-25.
29. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm, dostopano dne 16.6.2015.