

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA LORBER

**VPLIV SUBSTITUENTOV NA PIROLNEM OBROČU NA  
AKTIVNOST 4,5,6,7-TETRAHIDROBENZO[1,2-*d*]TIAZOLNIH  
ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA LORBER

**VPLIV SUBSTITUENTOV NA PIROLNEM OBROČU NA  
AKTIVNOST 4,5,6,7-TETRAHIDROBENZO[1,2-*d*]TIAZOLNIH  
ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

**INFLUENCE OF SUBSTITUENTS ON THE PYRROLE RING ON  
THE ACTIVITY OF 4,5,6,7-TETRAHYDROBENZO[1,2-*d*]THIAZOLE-BASED DNA GYRASE B INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko 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 bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Biološko testiranje je potekalo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkihi.

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za njegovo prizadevnost, potrpežljivost in nasvete tekom praktičnega dela v laboratoriju in pri samem pisanju magistrske naloge.

Zahvala gre tudi mojim staršem za vso njihovo podporo in zaupanje.

### **Izjava**

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

Jasna Lorber

# VSEBINA

POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM KRAJŠAV .....	VIII
1. UVOD .....	1
1.1 BAKTERIJSKA CELICA .....	1
1.2 BAKTERIJSKA DNA .....	3
1.3 PROTIBAKTERIJSKO DELOVANJE UČINKOVIN .....	4
1.4 BAKTERIJSKA REZISTENCA .....	6
1.5 TOPOIZOMERAZE .....	7
1.5.1 DNA GIRAZA .....	8
1.5.1.1 DNA GIRAZA B .....	9
1.5.2 UČINKOVINE, KI DELUJEJO NA TOPOIZOMERAZE TIPA IIA .....	10
1.5.3 NAČRTOVANJE NOVIH INHIBITORJEV DNA GIRAZE .....	11
2. NAMEN DELA .....	14
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 REAGENTI IN TOPILA .....	17
3.2 KROMATOGRAFSKE METODE .....	17
3.2.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC) .....	17
3.2.2 »FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA .....	17
3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE .....	18
3.3.1 JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA (NMR) .....	18
3.3.2 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR) .....	18
3.3.3 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS) .....	18
3.4 DOLOČANJE TALIŠČ SPOJIN .....	18
3.5 MIKROVALOVNI REAKTOR .....	18
3.6 RISANJE STRUKTUR SPOJIN IN KEMIJSKIH REAKCIJ .....	18
3.7 BIOLOŠKO TESTIRANJE .....	19
3.8 MOLEKULSKO SIDRANJE .....	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL .....	20
4.1 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline .....	20
4.1.1 Sinteza spojine <u>2</u> : 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanon .....	21

4.1.2 Sinteza spojine <u>3</u> : 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanon ...	22
4.1.3 Sinteza spojine <u>6</u> : etil 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilat .....	24
4.1.4 Sinteza produkta <u>9</u> : 3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilna kislina .....	27
4.2 Sinteza spojine <u>13</u> : ( <i>S</i> )-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-aminijev klorid .....	28
4.2.1 Sinteza spojine <u>11</u> : ( <i>S</i> )- <i>terc</i> -butil (2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-il)karbamat .....	29
4.2.2 Sinteza spojine <u>12</u> : ( <i>S</i> )-metil 3-((6-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat .....	30
4.2.3 Sinteza spojine <u>13</u> : ( <i>S</i> )-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-6-amonijev klorid.....	31
4.3 Sinteza končnih spojin .....	32
4.3.1 Sinteza ( <i>S</i> )-3-((6-(1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline.....	32
4.3.2 Sinteza ( <i>S</i> )-metil 3-((6-(5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata .....	33
4.3.3 Sinteza ( <i>S</i> )-3-((6-(5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline .....	34
4.3.4 Sinteza ( <i>S</i> )-3-((6-(4-kloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline .....	35
4.3.5 Sinteza spojine ( <i>S</i> )-metil 3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata .....	36
4.3.6 Sinteza spojine ( <i>S</i> )-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojske kisline.....	37
4.4 Poskus sinteze spojine ( <i>S</i> )-metil 3-((6-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)oksi)benzoata .....	38
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	41
5.1 KOMENTAR SINTEZNEGA DELA .....	41
5.2 KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA .....	46
6. SKLEP.....	52
7. LITERATURA.....	54

## POVZETEK

Odkritje antibiotikov je predstavljalo revolucionaren napredek na področju zdravljenja bakterijskih okužb. Do nedavnega smo se bakterijskim infekcijam zoperstavljali dokaj uspešno, v zadnjih letih pa se vse pogosteje srečujemo s problemom razvoja bakterijske rezistence. Protibakterijske učinkovine, ki so trenutno na voljo v terapiji infekcij, niso več dovolj učinkovite pri zdravljenju nekaterih okužb, zato moramo razmišljati v smeri razvoja učinkovin, proti katerim bi bakterije težje postale odporne. To lahko dosežemo tako, da stremimo k učinkovinam, ki za svoje delovanje nimajo samo enega tarčnega mesta. Med takšne učinkovine sodijo dualni inhibitorji DNA giraze in topoizomeraze IV. DNA giraza je encim, ki je nujen za normalno podvajanje bakterijske celice. Sestavljena je iz dveh podenot A, ki sta odgovorni za podvajanje DNA, in dveh podenot B, ki s hidrolizo ATP omogočata energijsko oskrbo enote A. DNA girazi je strukturno in funkcionalno podobna topoizomeraza IV, katere funkcija je razdružitev hčerinskih verig po koncu podvajanja. Zaradi strukturne homolognosti lahko encima predstavljata potencialni tarči inhibitorjev z dualnim delovanjem.

V magistrski nalogi smo sintetizirali in biološko vrednotili nove analoge inhibitorjev DNA giraze s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim ogrodjem in 4,5-dibromo-2-pirolamidno skupino. Sintetizirane spojine smo testirali na izoliranih encimih DNA giraze in topoizomeraze IV bakterijskih sevov *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* ter tudi na izbranih bakterijskih sevih, in sicer po Gramu pozitivnih *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* in po Gram negativnih *E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*. S spremenjanjem substituentov na pirolnem obroču smo preučevali povezavo med strukturo in delovanjem ter ugotovili, da je inhibitorna aktivnost močno odvisna od lipofilnosti, saj je imela bolj lipofilna spojina s 3,4-dikloro-5-metil-2-pirolamidnim fragmentom veliko boljšo aktivnost od manj lipofilne spojine s 5-metil-2-pirolamidno skupino. Derivati karboksilne kisline so boljše zavirali delovanje encimov v primerjavi z njihovimi metilnimi estri. Pri testiranju na bakterijah se je izkazalo, da metilni ester lažje prehaja bakterijsko celično steno in je bila zato njegova protibakterijska aktivnost boljša kot pri kislini. Z optimizacijo interakcij substituiranega pirolamida v hidrofobnem žepu encimov smo dosegli ne samo močnejšo inhibicijo encima, ampak tudi protibakterijsko delovanje proti

po Gramu pozitivnem *S. aureus*, kar predstavlja odlično izhodišče za nadaljnje raziskovalno delo.

**Ključne besede:** bakterijska rezistenca, DNA giraza, inhibitor, protibakterijske učinkovine, topoizomeraza IV

## ABSTRACT

The discovery of antibiotics represents a big progress in the treatment of bacterial infections. Until recently, bacterial diseases were quite successfully suppressed by the use of antibiotics, but in the last few years, we have been facing with the problem of bacterial resistance development. Antibiotics that are currently on the drug market are not efficient anymore. Therefore, we have to develop substances, against which it would be much harder for bacteria to become resistant. One of the possible solutions is the discovery of compounds targeting more than one essential bacterial macromolecule. Some dual inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV possess such characteristics. DNA gyrase is an enzyme that is essential for the normal replication of bacterial cell. It is composed of two DNA gyrase A subunits, which are responsible for replication of DNA, and of two DNA gyrase B subunits, which provide the energy for normal function of the subunit A. Topoisomerase IV is structurally and functionally very similar to the DNA gyrase and is responsible for the separation of daughter chains at the end of replication. Because of the structural similarity between these two enzymes, they represent interesting targets for development of dual inhibitors.

In our Master's thesis we synthesized and biologically evaluated a series of new analogs of 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole- and 4,5-dibromo-2-pyrrolamide- based DNA gyrase B inhibitors. All synthesized compounds were tested on isolated DNA gyrase and topoisomerase IV from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains and against selected Gram-positive (*S. aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative strains (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Our aim was to study the structure-activity relationship by modification of substituents on the pyrrole ring. We have discovered that the inhibitory activity highly depends on the lipophilicity, because the most lipophilic compound with the 3,4-dichloro-5-methyl-2-pyrrolamide fragment was more potent than the less lipophilic compounds with the 5-methyl-2-pyrrolamide group. Carboxylic acid derivatives showed better inhibition of enzymes compared to their methyl esters. However, evaluation of antibacterial activity of the synthesized inhibitors has shown that the methyl ester supposedly passes the bacterial cell wall more efficiently than its acid derivative resulting in its better antibacterial activity against *S. aureus*. By optimizing the interactions of the substituted pyrrolamide moiety in the hydrophobic

pocket of the enzyme we have achieved not only a stronger inhibition of the enzyme, but also antibacterial activity against Gram-positive *S. aureus*, which represents an excellent starting point for further research.

**Keywords:** bacterial resistance, DNA gyrase, inhibitor, antibacterial substances, topoisomerase IV

## **SEZNAM KRAJŠAV**

ADPNP: adenozin 5'-( $\beta,\gamma$ -imino)trifosfat

Arg136: arginin 136

Asn46: asparagin 46

Asp73: aspartat 73

Asp81: aspartat 81

ATP: adenozin-5'-trifosfat

DKM: diklorometan

EA: etilacetat

EKV: ekvivalent

ER: endoplazemski retikulum

ESI: ionizacija z razprševanjem v električnem polju

$\text{Et}_3\text{N}$ : trietilamin

GyrA: A podenota DNA giraze

GyrB: B podenota DNA giraze

HATU: 1-[bis(dimetilamino)methilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin 3-oksid  
heksafluorofosfat

HEX: heksan

Ile94: izolevcin 94

IR: infrardeča spektroskopija

MeOH: metanol

MF: mobilna faza

MS: masna spektroskopija

NaOEt: natrijev etanoat

NaOH: natrijev hidroksid

NCS: *N*-klorosukcinimid

NMR: jedrska magnetna resonanca

PABA: *para*-aminobenzojska kislina

ParC: C podenota topoizomeraze IV

ParE: E podenota topoizomeraze IV

SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: sulfurilklorid

*t*-BuONO: *t*-butilnitrit

THF: tetrahidrofuran

Thr165: treonin 165

TLC: tankoplastna kromatografija

Val43: valin 43

Val120: valin 120

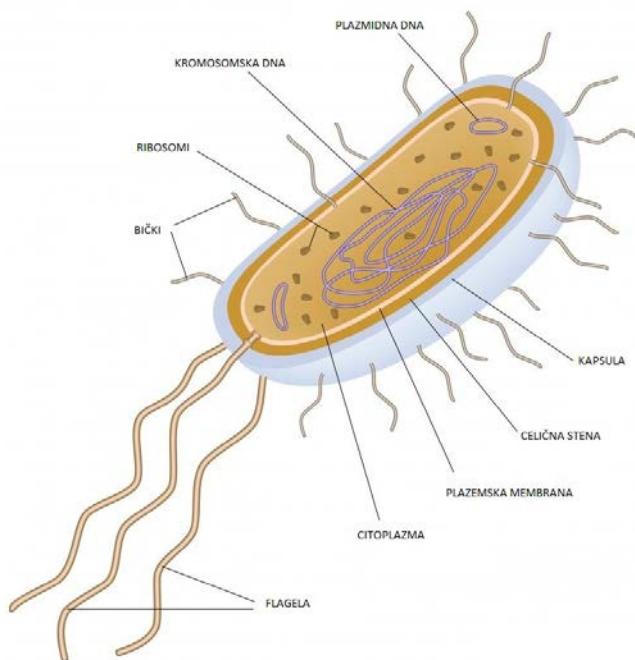
Val167: valin 167

# 1. UVOD

## 1.1 BAKTERIJSKA CELICA

Z bakterijami se nezavedno srečujemo povsod v svojem okolju. Prisotne so tudi na koži in sluznicah in tako predstavljajo sestavni del normalne flore. Za človeka večinoma niso nevarne, toda poznamo tudi mikroorganizme, ki so ob vdoru v telo škodljivi za človeški organizem. Povzročijo lahko številne bolezni, kot so pljučnica, angina, infekcije urinarnega trakta, meningitis, bronhitis, klamidijska in razna vnetja (1).

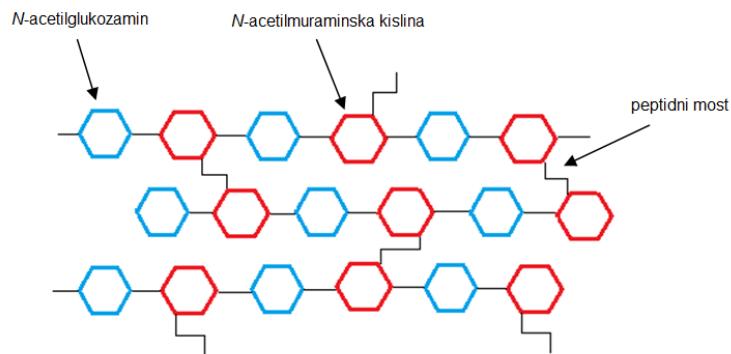
Prokariotska bakterijska celica je v primerjavi z evkariotsko človeško celico precej manjša in dokaj preproste strukture. Ne vsebuje jedra, ampak se njen genetski material, ki je dolga, enojna, krožno zvita kromosomska molekula DNA, nahaja v citoplazmi v močno agregiranem stanju. V celici lahko najdemo tudi manjše, krožne molekule DNA, ki jih imenujemo plazmidi, v citoplazmi pa so prisotni tudi ribosomi. Za prokariotsko celico so značilni še bički, encimi, kapsula, plazemska membrana in celična stena (slika 1) (2).



Slika 1: Zgradba prokariotske celice (37)

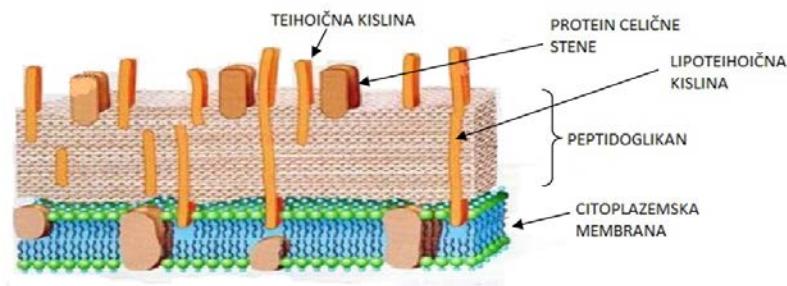
Celična stena predstavlja za bakterijo pomemben element, saj celico ščiti pred zunanjostjo, omogoča ustrezni osmotski tlak in ji daje obliko. Sestavljena je iz

kompleksnega polimera mukopeptida – peptidoglikana, ki je sestavljen iz polisaharidov *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline ter tesno prečno povezanih polipeptidnih verig (slika 2) (2).

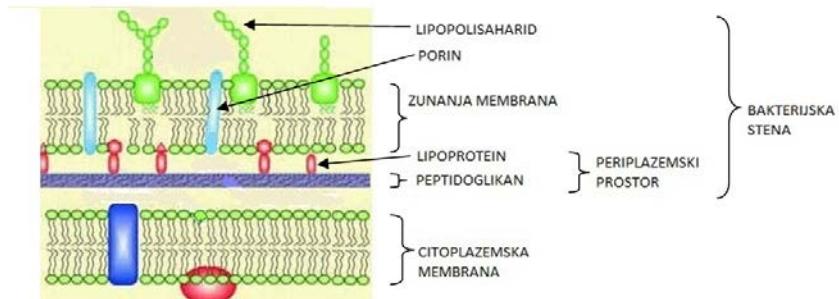


Slika 2: Struktura peptidoglikana (38)

Celične stene pri človeških celicah ne najdemo. Struktura bakterijske celične stene se močno razlikuje pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah. Po Gramu pozitivne bakterije imajo tudi do 40 plasti peptidoglikana (50% celične stene) (slika 3), po Gramu negativne pa imajo le nekaj plasti peptidoglikana (5-10% celične stene) (slika 4) (2).



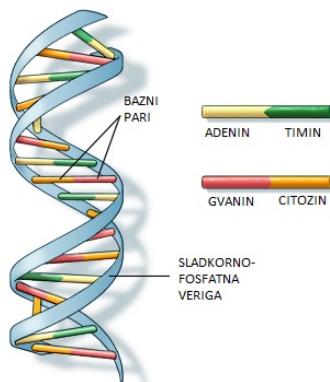
Slika 3: Celična stena po Gramu pozitivne bakterije (39)



Slika 4: Celična stena po Gramu negativne bakterije (40)

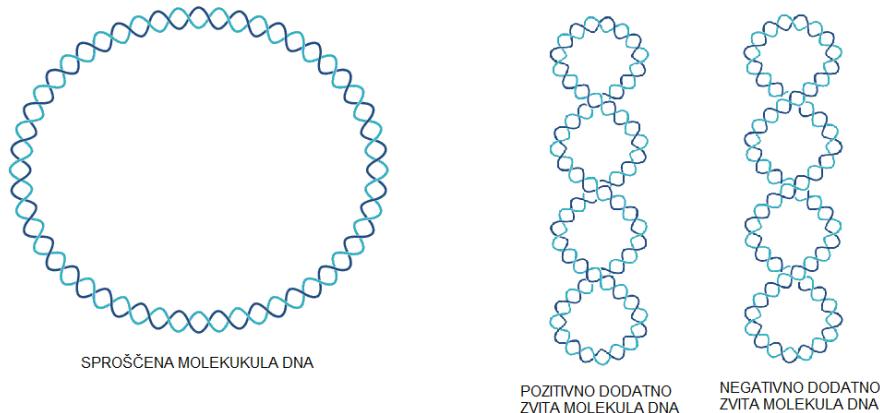
## 1.2 BAKTERIJSKA DNA

Za bakterije je značilno nespolno razmnoževanje, imenovano cepitev. Pri razmnoževanju se genska informacija prenese na potomce. Genom predstavlja celotna bakterijska DNA, ki vsebuje zapis za vse lastnosti bakterije (oblika celice, sinteza beljakovin, presnovne poti, itd.) in ima obliko dvojne vijačnice (slika 5).



Slika 5: Dvojna vijačnica DNA (41)

Pri številnih mikroorganizmih se linearna oblika DNA vijačnice na obeh koncih poveže in tako nastane zaprta, krožna dvojna vijačnica, ki velja za sproščeno obliko (slika 6). Če se linearna oblika, tik preden se zapre, vsaj še enkrat zasuka okrog svoje osi, dobimo dodatno zvito obliko, ki predstavlja terciarno strukturo DNA.



Slika 6: Terciarna struktura DNA (42)

Pretvarjanje med obema oblikama katalizirajo encimi topoizomeraze, med katere sodita tudi DNA giraza in topoizomeraza IV. S pojavom dodatnega zvitja preide molekula DNA v manj sproščeno obliko, ki zavzame manj prostora v celici (2, 3, 4).

### 1.3 PROTIBAKTERIJSKO DELOVANJE UČINKOVIN

Za zdravljenje bakterijskih okužb uporabljamo protibakterijske učinkovine, ki so lahko naravnega, polysinteznega ali sinteznega izvora. Pri tem si želimo, da učinkovina deluje tarčno in le na bakterijske celice, ne pa tudi na človeške celice. Govorimo o principu selektivne toksičnosti, ki pomeni, da je spojina oz. učinkovina škodljiva za bakterijo, za gostitelja pa ne. Da lahko dosežemo selektivno toksičnost, moramo zelo dobro poznati razlike med bakterijskimi in človeškimi celicami, ki jih nato lahko izkoriščamo za načrtovanje protibakterijskih učinkovin.

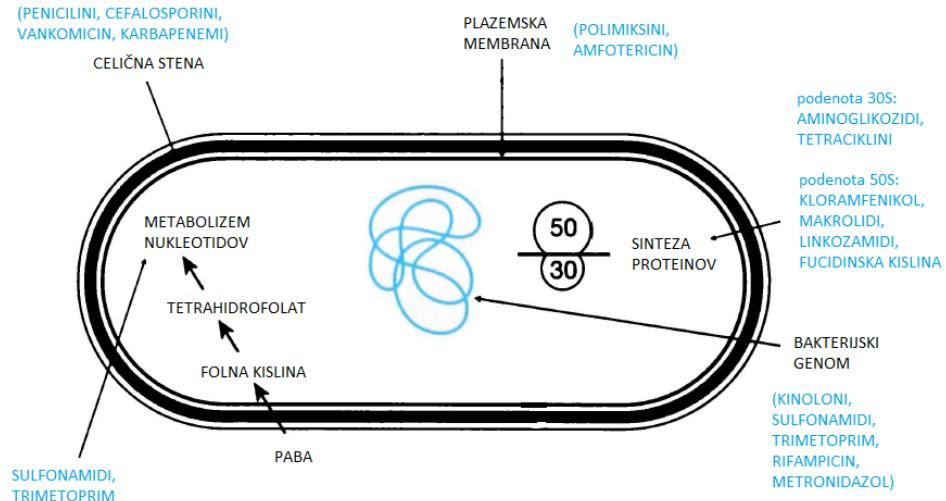
V preglednici I so naštete nekatere bistvene razlike med bakterijsko in človeško celico.

Preglednica I: Razlike med bakterijsko in človeško celico (2, 3, 14).

Lastnost	Bakterijska celica	Človeška celica
celična stena iz peptidoglikana	✓	✗
jedro	✗	✓
ribosomi	70 S	80 S
kromosomi	en sam	več
organeli v citoplazmi	✗	mitochondriji, ER, Golgijev aparat, lizosom
zunajkromosomska DNA	plazmidi	v organelih (mitochondriji)
DNA veriga	krožna	linearna
RNA polimeraza	I	I, II, III

tetrahydrofolat	celotna sinteza v celici	pridobivanje tudi s hrano
transpeptidaza	✓	✗
DNA giraza	✓	✗

Poznamo več različnih tarčnih mest, na katera delujejo protibakterijske učinkovine (slika 7).



Slika 7: Ciljna mesta delovanja protibakterijskih učinkovin (5)

V terapiji bakterijskih infekcij se pogosto srečujemo z zaviralci sinteze bakterijske celične stene, pri čemer najpogosteje zaviramo encim transpeptidazo (npr. penicilini, cefalosporini). Poznamo tudi učinkovine, ki se vežejo na ribosomske podenote in preprečijo sintezo proteinov (npr. aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi). Eden izmed mehanizmov delovanja protibakterijskih spojin je zaviranje delovanja celične membrane, med katere uvrščamo polimiksine, ki z vezavo na membrano spremenijo njeno strukturo in povečajo njeno permeabilnost. Pogosto pa se uporablja tudi zaviralci sinteze jedrnih kislin. Bakterijski genom je odlična tarča za protibakterijsko delovanje, saj obstaja več različnih mehanizmov vpliva na sintezo nukleinskih kislin. Protibakterijske učinkovine lahko namreč inhibirajo sintezo nukleotidov, delujejo kot interkalatorji DNA, inhibirajo DNA ali RNA polimerazo, imajo direktni vpliv na samo DNA, ali pa inhibirajo topoizomeraze (npr. fluorokinoloni) (2, 5, 6).

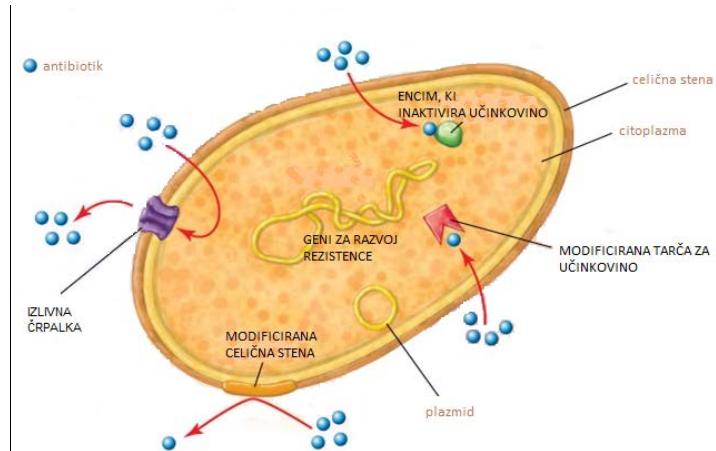
## **1.4 BAKTERIJSKA REZISTENCA**

Odkritje antibiotikov pred približno 60 leti je pomenilo velik mejnik v boju proti bakterijskim okužbam in posledično smrtnim izidom zaradi infekcijskih bolezni. S tem se je kakovost javnega zdravja bistveno izboljšala. V preteklosti smo bili priča odkritju in uvedbi v terapijo številnih novih učinkovin, v zadnjih desetletjih pa se je število novih terapevtsko uporabnih protibakterijskih učinkovin močno zmanjšalo.

To niti ne bi predstavljalo takšnega problema, če se ne bi bakterije prilagodile na obstoječe učinkovine. Vedno več sevov bakterij se na določene protibakterijske učinkovine ali na več teh ne odziva več, saj so razvile odpornost nanje. Rezistenca je sposobnost mikroorganizma, da se izogne učinku protibakterijske učinkovine. Rezistenci se je sčasoma skoraj nemogoče popolnoma izogniti zaradi evolucijskega odziva mikroorganizmov, zelo verjetno pa do tega pojava prihaja tudi zaradi nerazsodne, pretirane in prepogoste uporabe teh učinkovin. Najbolj iznajdljivi, za nas pa seveda najbolj problematični, so predvsem mikroorganizmi sevov *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki so odporni proti meticilinu, enterokoki (VRE), odporni proti vankomicinu, pnevmokoki, odporni proti penicilinu ter po Gramu negativne bakterije, odporne na več vrst protibakterijskih učinkovin, kot so *Escherichia coli* (odpornost proti penicilinom, tetraciklinom, sulfonamidom, vedno pogosteje tudi fluorokinolonom), *Klebsiella pneumoniae* (odpornost proti karbapenemom, aminoglikozidom, fluorokinolonom, tetraciklinom, kloramfenikolu), *Enterobacter* sp. (odpornost proti penicilinom, cefalosporinom, karbapenemom, fluorokinolonom) in *Pseudomonas aeruginosa* (odpornost proti penicilinom, fluorokinolonom) (7).

Bakterije so razvile številne mehanizme, ki povzročajo njihovo rezistenco proti protibakterijskim učinkovinam (slika 8). Zmanjša se lahko prepustnost bakterijske membrane, pri čemer prihaja do oteženega ali preprečenega vstopa učinkovine v celico. Poleg tega lahko bakterije proizvajajo posebne encime, ki razgradijo učinkovino (npr. betalaktamaze), imajo spremenjene presnovne poti, preko katerih deluje učinkovina, ali pa spremenijo vezavno – tarčno mesto učinkovine (2, 7, 22).

Rezistenca bakterij na fluorokinolone se večinoma pojavi zaradi mutacij genov za podenoto GyrA ali ParC encimov DNA giraze in topoizomeraze IV. Če se eden ali oba encima spremenita, se učinek fluorokinolonov zmanjša. Učinkovitost fluorokinolonov zmanjšajo tudi izlivne črpalke, ki jih odstranjujejo iz celice, in spremembe v prepustnosti celične stene (2, 8).



Slika 7: Mehanizmi razvoja bakterijske rezistence (43)

Da bi se v prihodnosti lahko uspešno borili in zoperstaviti bakterijski rezistenci, je pomembno, da protibakterijske učinkovine uporabljamo dosledno in si prizadevamo za odkrivanje vedno novih protibakterijskih učinkovin. Pomemben pristop k tej problematiki predstavlja tudi kolobarjenje s protibakterijskimi učinkovinami, saj rezistenca lahko izgine, če učinkovina nekaj časa ni v uporabi. Uporabljamo pa lahko tudi kombinacijo večih protibakterijskih učinkovin hkrati (2, 7).

## 1.5 TOPOIZOMERAZE

Topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo spremembe topoloških stanj DNA, torej pretvarjanje med sproščeno krožno in dodatno zvito obliko molekule DNA (slika 6). Prehod med različnima oblikama je možen le s cepitvijo ene ali obeh verig dvostranske DNA in kasnejšo povezavo cepljenih verig. Ker je dodatno zvita oblika manj stabilna od sproščene, pri njej lažje pride do odvijanja verig, kar je nujen pojav pri podvajanju. Pretvarjanje med oblikama je esencialnega pomena za podvajanje, popravljanje in razplet verig DNA (3, 10, 14, 18).

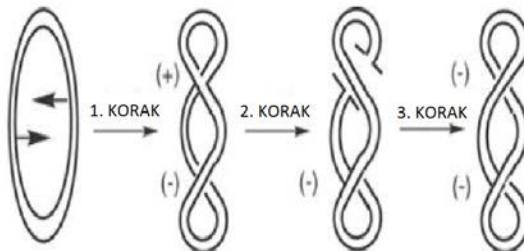
Poznamo topoizomeraze tipa I, ki odvijajo dodatno zvito DNA in cepijo le eno verigo dvovijačne DNA. Drugo skupino pa predstavljajo topoizomeraze tipa II, ki dodatno zvijajo molekulo DNA, tvorijo negativno dodatno zvitje in cepijo obe verigi dvojne vijačnice hkrati. Bakterije vsebujejo dva različna tipa topoizomeraz IIA, in sicer DNA girazo, ki dodatno zvija DNA (posledično se zmanjša napetost med podvajanjem DNA), in topoizomerazo IV, ki je odgovorna za razpletanje hčerinskih DNA verig na koncu

podvojitev kromosoma, nadzira pa tudi dodatno zvijanje verig. Evkariontski tip topoizomeraze II je dolg enoenotni encim, ki je aktivен kot homodimer, medtem ko je encim pri prokariotih sestavljen iz dveh podenot (8, 14, 18).

### 1.5.1 DNA GIRAZA

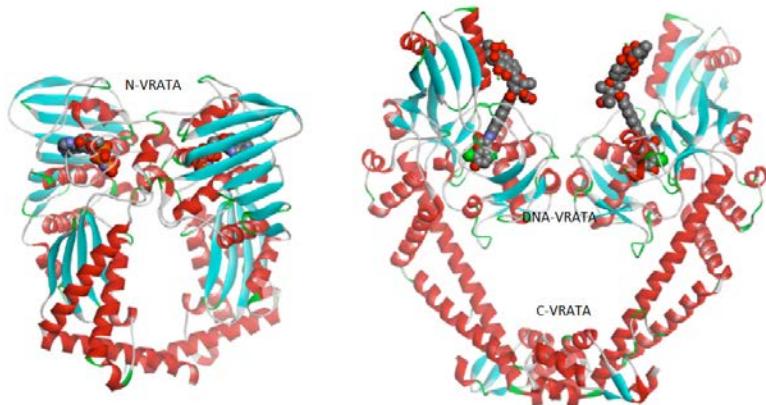
Bakterijska DNA giraza je encim, ki katalizira uvajanje dodatnih negativnih zavojev pri podvajjanju bakterijske DNA. Za svoje delovanje izkorišča energijo, ki jo pridobi s hidrolizo molekule ATP. DNA giraza je prisotna pri vseh bakterijskih sevih.

Sestavljena je iz štirih podenot, in sicer iz dveh podenot A (GyrA) in dveh podenot B (GyrB), ki skupaj oblikujejo funkcionalni heterotetramer  $A_2B_2$ . Podobno strukturo ima topoizomeraza IV, ki jo tvorita po dve podenoti ParC, homologni GyrA, in dve podenoti ParE, ki sta podobni GyrB. Podenota A je odgovorna za razplet in ponovno združitev DNA verig, za kar potrebuje energijo, ki ji jo priskrbi podenota B, in sicer s pomočjo hidrolize molekule ATP. DNA giraza omogoči, da se v enem ciklu v krožno molekulo DNA vpeljeta dva negativna zavoja. V prvem koraku dobimo iz krožne zvito obliko, v drugem koraku se prekine zadnji segment, v tretjem pa sledi ponovna povezava na sprednji strani (slika 9). Končni rezultat je torej dvojno, negativno dodatno zvita molekula DNA (8,11,12, 13, 17, 19, 20, 33).



Slika 8: Pričekanje dodatnega zvijanja krožne molekule DNA (8)

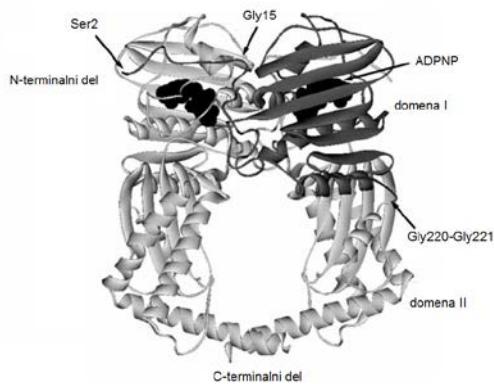
V strukturi DNA giraze lahko identificiramo troje vrat, in sicer N-vrata, DNA vrata in C-vrata, ki se zaporedno odpirajo in zapirajo, kar omogoča prehod dvojne vijačnice DNA. Podenota GyrB ustreza N-koncu, podenota GyrA pa ustreza C-koncu evkariantskega encima. Pri tem N-vrata oblikujeta podenoti GyrB, ki vežeta ATP. Podenoti A oblikujeta DNA-vrata in C-vrata (slika 10) (14).



Slika 9: Kristalna struktura DNA giraze B (levo) in DNA giraze A (desno) iz *E. coli* (14)

### 1.5.1.1 DNA GIRAZA B

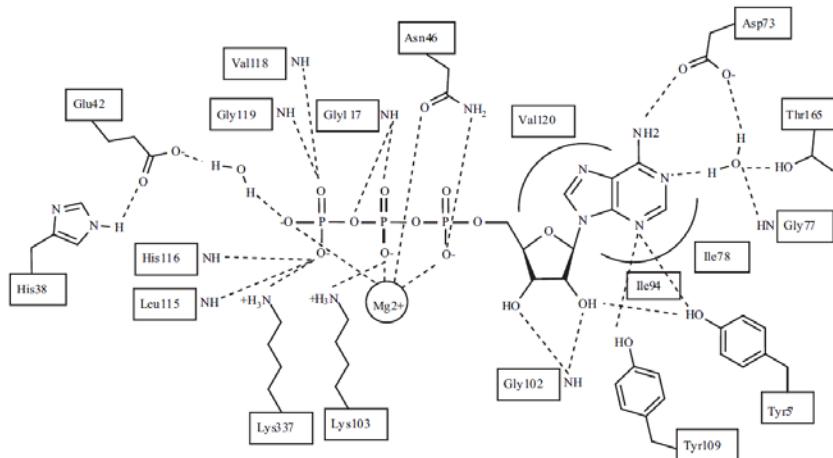
Podenota GyrB DNA giraze ima vezavno mesto za ATP. S hidrolizo te molekule omogoča energijsko preskrbo za nemoteno delovanje podenote A. Vezavno mesto za ATP predstavlja N-konec podenote B. Ta del je zgrajen iz dveh strukturnih podenot, in sicer iz N-končne GHKL domene (**Giraza**, **Hsp90**, histidin **kinaza**, **MutL**) iz 220-ih aminokislin (domena I) in iz C-končne pretvorne domene, ki je sestavljena iz 170-ih aminokislinskih ostankov (domena II) (slika 11) (14).



Slika 10: Kristalna struktura N-končnega dela dimera DNA giraze B iz bakterije *E. coli* v kompleksu z ADPNP (17)

Na sliki 12 lahko vidimo številne interakcije med DNA girazo B in molekulo ATP.

(14)



Slika 11: Shematski prikaz interakcij med molekulo ATP in DNA girazo B (H-vezi: črtane črte; hidrofobne interakcije: polne črte) (17)

### 1.5.2 UČINKOVINE, KI DELUJEJO NA TOPOIZOMERAZE TIPA IIA

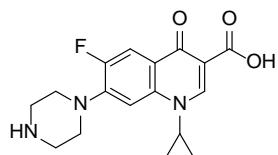
V terapiji bakterijskih infekcij pogosto uporabljamo inhibitorje topoizomeraz tipa IIA, ki običajno inhibirajo tako DNA girazo kot tudi topoizomerazo IV (odvisno od same učinkovine in bakterijskega seva). Kljub temu da obstajajo številni strukturni tipi inhibitorjev DNA giraze in topoizomeraze IV, ki delujejo na podenoti GyrA in ParC (npr. fluorokinoloni, izotiazolokinoloni, 3-aminokinazolindioni, aminopiperidini), pa so registrirani za zdravljenje samo fluorokinoloni (14). Prav tako na podenoto GyrB in ParE delujejo številne spojine, vendar je bil v terapiji uporabljan samo aminokumarinski antibiotik novobiocin, ki pa je bil kasneje zaradi neučinkovitosti in pojavljanja neželenih učinkov umaknjen s trga.

#### a) Fluorokinoloni

Fluorokinoloni so dualni inhibitorji DNA giraze in topoizomeraze IV in se kot taki edini uporabljajo v protimikrobnii terapiji. Vežejo se na podenoti GyrA in ParC. Pogosto so predpisani predvsem za urinarne, respiratorne in gastrointestinalne okužbe, pa tudi pri infekcijah kože, kosti in sklepov. Delujejo bakteriostatično in baktericidno. Njihova baktericidna aktivnost ni samo posledica inhibicije DNA replikacije, ampak povzročajo tudi poškodbe DNA, motijo sintezo proteinov, inducirajo oksidativne poškodbe in prožijo mehanizme celične apoptoze (celične smrti). Princip delovanja fluorokinolonov temelji na

njihovem vrivanju med bazne pare kompleksa DNA in DNA giraze, s čimer vplivajo na stabilizacijo kompleksa (kompleks postane bolj stabilen) (14).

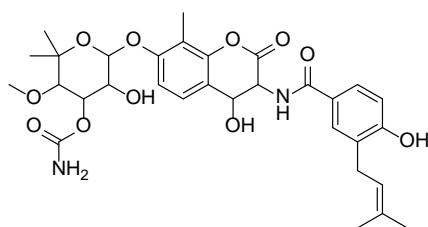
Aktivnost se kaže tako na po Gramu pozitivnih kot tudi pri po Gramu negativnih bakterijah. Tudi pri fluorokinolonih se vse pogosteje srečujemo s problemom rezistence. Rezistenca je po navadi povezana s spontanimi mutacijami dveh genov, to sta GyrA in GyrB, ki kodirata tarčni protein fluorokinolonov, torej DNA girazo. Možna mehanizma rezistence so tudi izlivne črpalke in pa zmanjšana prepustnost membrane bakterije. To gre bolj pričakovati pri po Gram negativnih mikroorganizmih, ki imajo bolj kompleksno celično steno (6, 8, 14, 15, 18). Na sliki 13 je prikazan ciprofloksacin kot primer učinkovine iz skupine fluorokinolonov.



Slika 12: Ciprofloksacin (35)

### b) Aminokumarini

Aminokumarini se vežejo na podenoti GyrB in ParE. Edina učinkovina, ki se je nekaj časa uporabljala v klinične namene, je bil novobiocin (slika 14). Zaradi toksičnih učinkov je bil kmalu umaknjen s trga, nadomestili pa so ga fluorokinoloni in  $\beta$ -laktami (14).

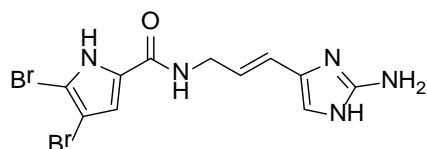


Slika 13: Novobiocin (36)

### 1.5.3 NAČRTOVANJE NOVIH INHIBITORJEV DNA GIRAZE

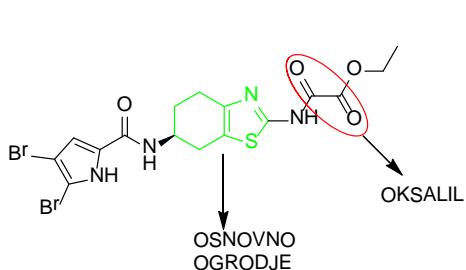
Bakterijska rezistenca od nas zahteva nenehno iskanje novih protibakterijskih učinkovin, ki delujejo na bakterije preko novih, manj poznanih tarčnih mest, saj smo v zadnjem času imeli le redke uspešne primere novih učinkovin. Naraščajoča rezistenca proti fluorokinolonom, ki imajo za tarčo katalitično mesto encimov DNA giraze in topoizomeraze IV, omejuje njihov terapevtski potencial. Vezavno mesto za ATP na

podenotah GyrB in ParE predstavlja zanimivo, še neizkoriščeno mesto za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. To je bila tudi osnovna ideja raziskovalcev na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Sintetizirali so knjižnico spojin, ki so analogi morskega alkaloida oroidina (slika 15), in vrednotili njihovo aktivnost na napetostno odvisnih natrijevih kanalih, njihovo protibakterijsko aktivnost, inhibicijo tvorbe bakterijskih biofilmov in sposobnost proženja apoptoze v rakavih celičnih linijah (18).

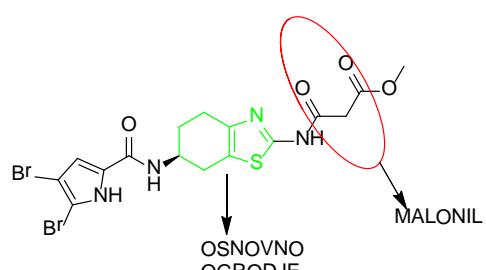


Slika 15: Struktura oroidina (18)

V knjižnici omenjenih spojin so odkrili tudi inhibitorje DNA giraze iz *E. coli* z aktivnostjo v mikromolarnem območju. Temu je sledila strukturno podprta optimizacija. Strukturo odkritega inhibitorja so optimizirali z uvedbo dodatnih substituentov in tako dosegli nanomolarno inhibicijo DNA giraze iz bakterije *E. coli*. Nekatere spojine so inhibirale tudi topoizomerazo IV iz *E. coli* ter oba encima iz *S. aureus*, vendar z veliko slabšo inhibitorno aktivnostjo v mikromolarnem območju (18). Nadaljnje študije so potrdile, da inhibicija DNA giraze iz *E. coli* izhaja iz vezave spojine v ATP vezavno mesto encima (18). Najmočnejši inhibitorji, ki so jih sintetizirali, so bile spojine, ki imajo poleg 4,5-dibromo-2-pirolamidne skupine, vezane na 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diaminsko ogrodje, vezano še oksalilno ali malonilno skupino. Strukturi najboljših dveh inhibitorjev sta prikazani na slikah 16 in 17 (18).



Slika 16: (S)-ethyl 2-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydronbenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetate (18)



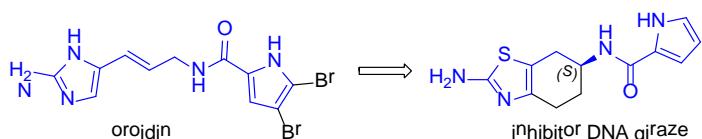
Slika 17: (S)-methyl 3-((6-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahydronbenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oxopropanoate (18)

Med optimizacijo različnih analogov in biološkim vrednotenjem spojin so raziskovalci prišli do številnih ugotovitev. Inhibitorji delno posnemajo vezavo ATP, tako

da tvorijo vodikove vezi z aminokislino Asp73 in strukturno ohranjeno molekulo vode, s čimer oponašajo vezavo adeninskega obroča ATP. Spojine zato posedujejo akceptor in donor vodikove vezi. 4,5-dibromo-1*H*-pirolamid se veže v hidrofobni žep encima DNA giraze in tvori vodikove vezi z Asp73 in z molekulo vode ter številne hidrofobne interakcije. Oksalilni, malonilni ali sukcinilni del, ki je vezan na 2-amino skupino na 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnem ogrodju, ima primerno dolžino za tvorbo vodikove vezi z Arg136. Inhibicijo DNA giraze iz *E. coli* v nanomolarnem območju izkazujejo tako estrski kot kislinski derivati spojin. Izboljšana aktivnost v primerjavi s spojinami, ki niso substituirane na mestu 2, je verjetno posledica tvorbe vodikovih vezi z Arg136. Substituenti na pirolnem obroču imajo pomemben vpliv na inhibicijo. Brom zagotavlja hidrofobne interakcije in je komplementaren hidrofobnemu žepu v ATP vezavnem mestu DNA giraze iz *E. coli*. Hkrati poveča tudi kislost pirolne amino skupine, posledično pa tudi moč vodikove vezi, ki se tvori z Asp73. S izomeri so boljši inhibitorji v primerjavi z R izomeri. Dibromo-substituirani piroli so izkazovali le šibko aktivnost na encimu topoizomeraze IV iz *E. coli* in obeh encimih iz *S. aureus*. Iz primerjave kristalnih struktur vseh štirih encimov so sklepali, da ima DNA giraza iz *E. coli* največji hidrofobni žep, medtem ko je le-ta pri ostalih treh premajhen, da bi se vanj lahko vezal 4,5-dibromopirol (18).

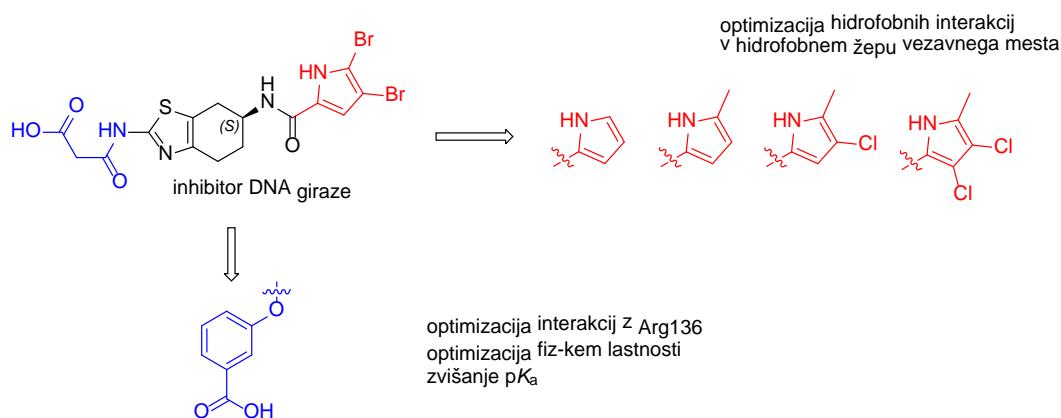
## 2. NAMEN DELA

Namen dela je optimizirati nov strukturni tip inhibitorjev DNA giraze, ki so bili nedavno odkriti in sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Spojine so strukturni analogi oroidina, alkaloida iz spužve *Agelas* sp (shema 1). Sintetizirali bomo nove, potencialne ATP kompetitivne zaviralce DNA giraze B s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim ogrodjem.



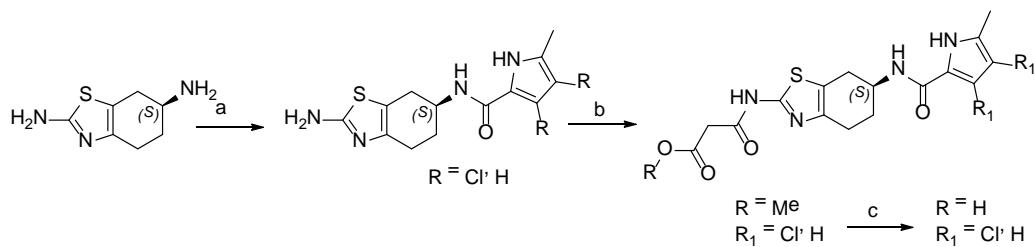
Shema 1: Struktura oroidina in novega inhibitorja DNA giraze.

S tem namenom bomo uvedli različne substituente na pirolni obroč (shema 2). Z zmanjšanjem pirolamidnega dela molekule želimo doseči tudi inhibicijo DNA giraze iz *S. aureus* in topoizomeraze IV iz *S. aureus* in *E. coli*., ki imajo v primerjavi z DNA girazo iz *E. coli* manjši hidrofobni žep. V nadaljevanju bomo poskušali z uvedbo aromatske karboksilne kisline povečati lipofilnost in  $pK_a$  spojin in s tem doseči boljše prehajanje v citoplazmo bakterijske celice.

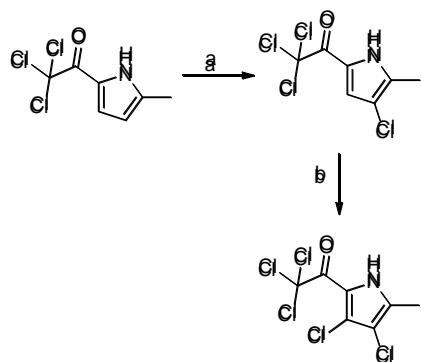


Shema 2: Splošna shema načrtovanih strukturnih sprememb.

Najprej bomo poskušali 4,5-dibromopirol zamenjati s pirolom, 5-metilpirolom, 4-kloro-5-metilpirolom in 3,4-dikloro-5-metilpirolom (shema 3). Različno substituirane pirole bomo sintetizirali iz 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanona, ki je bil že predhodno sintetiziran (shema 4). Tako dobljeni produkt bomo uporabili pri sintezi novih inhibitorjev (shema 3).

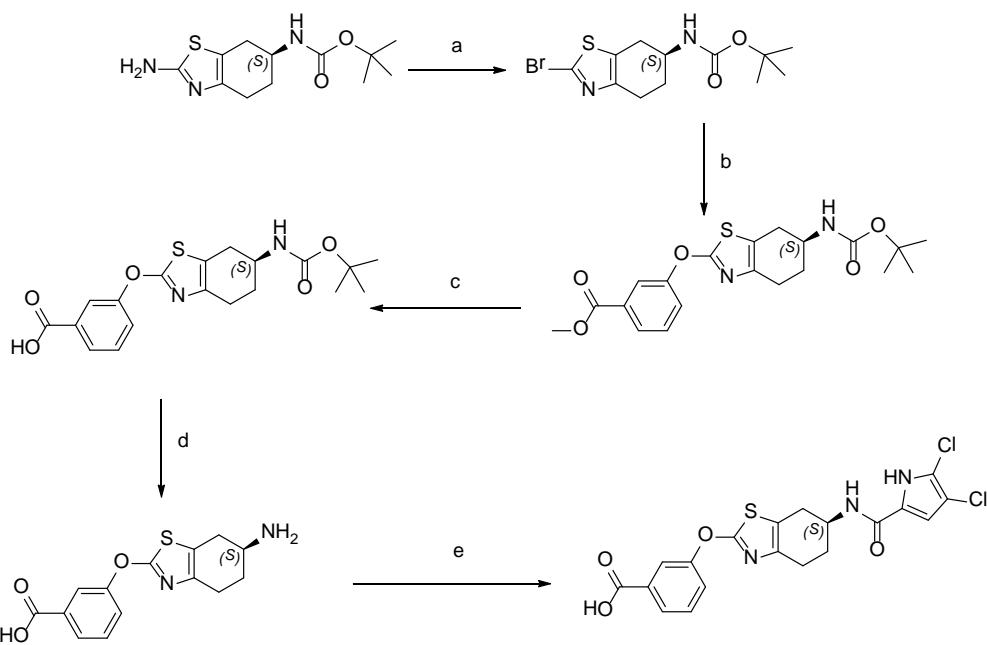


Shema 3: Reagenti in pogoji: a) 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon ali 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon ali 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon ali 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etanon,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF; b) metilmalonilklorid ( $\text{ClCOCH}_2\text{COOCH}_3$ ),  $\text{Et}_3\text{N}$ , dioksan; c) 1M  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ .



Shema 4: Reagenti in pogoji: a)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ; b) *N*-klorosukcinimid ali  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ .

Nadalje bomo sintetizirali nove potencialne inhibitorje DNA giraze, pri katerih bomo malonilni fragment zamenjali z benzojsko kislino (shema 5). Izhajali bomo iz predhodno sintetizirane spojine (*S*-*tert*-butil (2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata. Najprej bomo izhodno spojino pretvorili v aril diazonijevo sol in izvedli elektrofilno substitucijo ter tako pridobili 2-bromo analog. Nato bo sledila nukleofilna substitucija z metil 3-hidroksibenzoatom. V naslednjem koraku bomo izvedli alkalno hidrolizo estra in kasneje odščito Boc-karbamata. V zadnji stopnji bomo aminske skupine acilirali z 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanonom.



Shema 5: Reagenti in pogoji. a) *terc*-BuONO, CuBr<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN; b) metil 3-hidroksibenzoat, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, mikrovalovi, c) 1M NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O; d) HCl, THF; e) 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF.

Predvideno vezavo načrtovanih spojin bomo preučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP vezavno mesto DNA giraze. Z uvedbo različno substituiranih pirolov bomo poskušali izboljšati njihovo zaviralno aktivnost na DNA girazi iz *S. aureus* in s tem protibakterijsko delovanje. Sintetizirane spojine bomo testirali na izoliranih encimih DNA giraze in topoizomeraze IV bakterijskih sevov *E. coli* in *S. aureus* ter tudi na izbranih bakterijskih sevih, in sicer po Gramu pozitivnih *S. aureus* ter *E. faecalis* in po Gram negativnih *E. coli* in *P. aeruginosa*.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 REAGENTI IN TOPILA**

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

#### **3.2 KROMATOGRAFSKE METODE**

##### **3.2.1 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA (TLC)**

S pomočjo tankoplastne kromatografije smo med samim eksperimentalnim delom spremljali potek reakcije. S pomočjo te metode smo tudi izbirali najustreznejšo mobilno fazo za čiščenje spojin s pomočjo kolonske kromatografije. Glede na polarnost/nepolarnost pričakovanih spojin smo izbrali najprimernejšo mobilno fazo. Za stacionarno fazo smo uporabljali plošče Merck Silica Gel 60 F254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Plošče smo nato pogledali pod UV lučko pri valovnih dolžinah 254 nm ali 366 nm. Pri zadnjem sinteznem postopku smo na koncu uporabili tudi orositveni reagent  $\text{FeCl}_3$  (za fenole).

##### **3.2.2 »FLASH« KOLONSKA KROMATOGRAFIJA**

Pri metodi kolonske kromatografije smo najprej izbrali ustrezeno velikost steklene kolone, ki smo jo zamašili z vato ter jo prelili z izbrano mobilno fazo. Nato smo v čašo odmerili silikagel 60 (50-100x količino glede na maso zmesi, ki smo jo ločevali na koloni) proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,040 - 0,063 mm. Silikagel smo omočili z mobilno fazo in ga prenesli v kolono. To je prestavljalo našo stacionarno fazo. Na vrh kolone smo nanesli produkt, ki je bil raztopljen v čim manjšem volumnu mobilne faze. Nato smo spojine spirali z mobilno fazo in jih zbirali v epruvetah. Sestavo eluata v epruvetah smo sproti preverjali tudi pod UV lučko.

### **3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE**

#### **3.3.1 JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA (NMR)**

S pomočjo jedrske magnetne resonanse smo preverjali identiteto in čistost sintetiziranih spojin. Na spektrometu Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani smo posneli  $^1\text{H}$  spektre. Vzorce smo raztopili v topilih dimetilsulfoksid (DMSO)- $d_6$ , in kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ). Spektre smo procesirali z računalniškim programom MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mesterlab Research S. L.

#### **3.3.2 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA (IR)**

IR metodo smo uporabili za identifikacijo sintetiziranih spojin. Spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

#### **3.3.3 MASNA SPEKTROMETRIJA (MS)**

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

### **3.4 DOLOČANJE TALIŠČ SPOJIN**

Vsem našim končnim spojinam smo določili tališče. Za ta namen smo uporabili Koflerjev mikroskop z ogrevalno mizico Leica.

### **3.5 MIKROVALOVNI REAKTOR**

Za nekatere sinteze smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR načinom merjenja temperature.

### **3.6 RISANJE STRUKTUR SPOJIN IN KEMIJSKIH REAKCIJ**

Za risanje strukturnih formul spojin, kemijskih reakcij in poimenovanje po IUPAC nomenklaturi smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12.0 podjetja CambridgeSoft.

### **3.7 BIOLOŠKO TESTIRANJE**

Biološko testiranje je izvedel izr. prof. Janez Ilaš, mag. farm. na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, protibakterijsko testiranje pa sta izvedli Sofia Montalvão in dr. Päivi Tammela na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinki na Finskem.

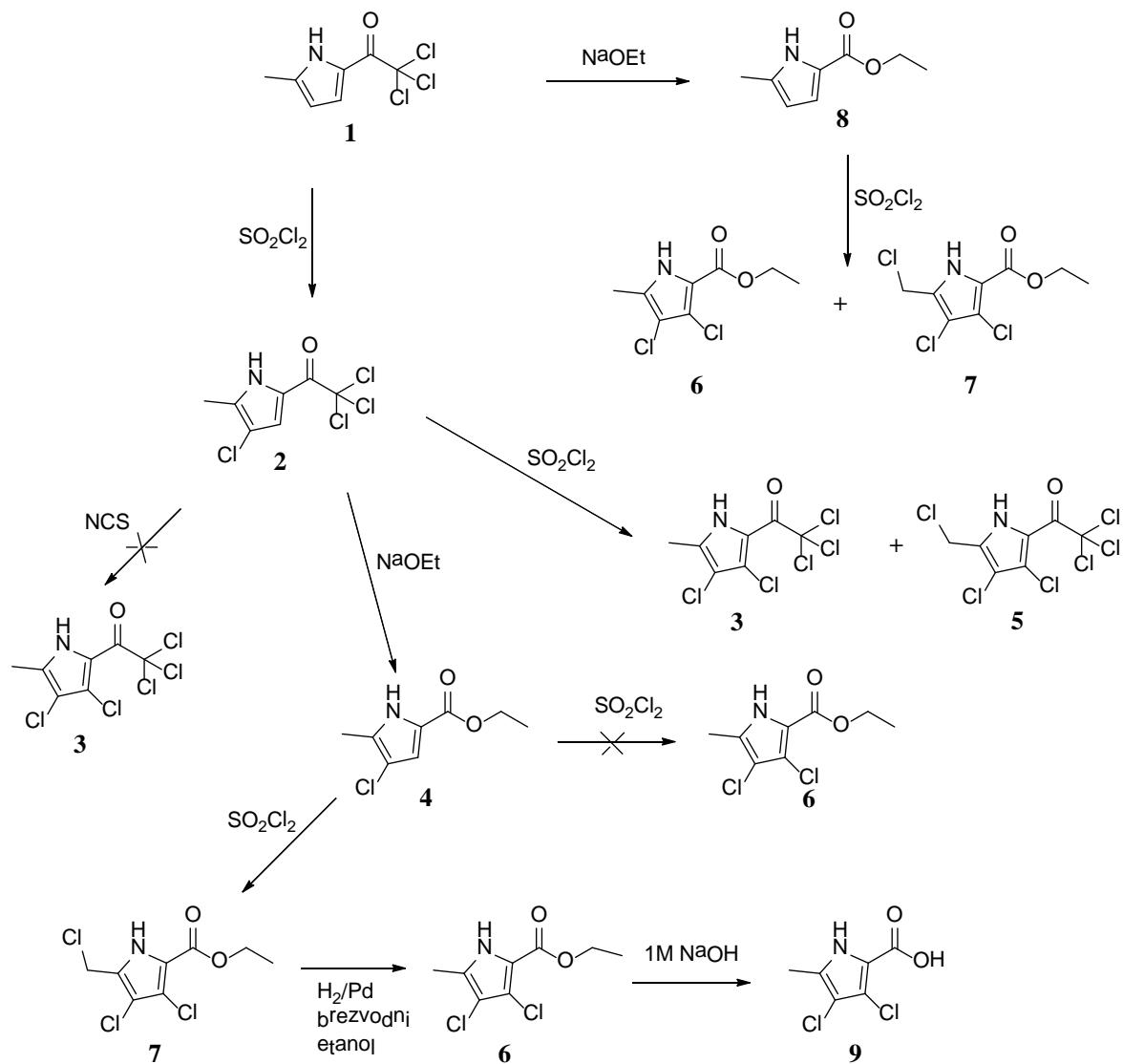
### **3.8 MOLEKULSKO SIDRANJE**

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).

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

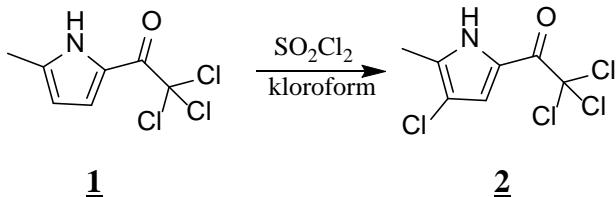
### 4.1 Sinteza 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline

Najprej smo se lotili sinteze ustrezno substituiranega dikloriranega pirola - spojina **9**. V shemi 6 so predstavljene vse reakcijske poti, s katerimi smo se srečali tekom eksperimentalnega dela pirolov. Izhajali smo iz predhodno sintetizirane spojine **1**: 2,2,2-trikloro-1-(5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon.



Shema 6: Sinteza pirolov.

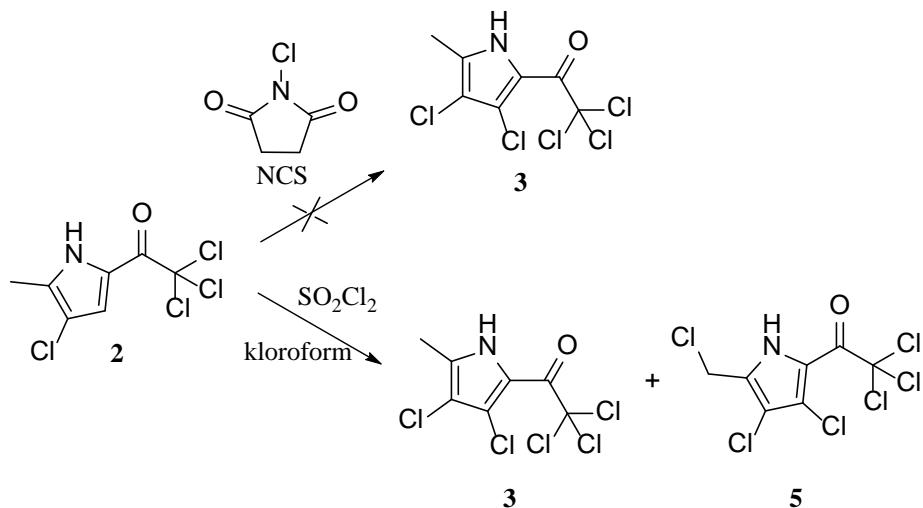
#### 4.1.1 Sinteza spojine **2**: 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon



V bučko smo natehtali izhodno spojino **1** (2,002 g, 8,84 mmol, 1 ekv), jo raztopili v kloroformu (50 mL) in ohladili na ledeni kopeli. Reakcijsko zmes smo prepihalili z argonom in nato počasi, po kapljicah, z brizgo približno 10 minut dodajali sulfurilklorid ( $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ) (785  $\mu\text{L}$ , 9,72 mmol, 1,1 ekv). Na ledeni kopeli smo mešali še eno uro. Ker je reakcija potekla do konca, smo se lotili izolacije. Reakcijski zmesi smo dodali nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL), ki je nevtralizirala stranski produkt  $\text{HCl}$ . Organsko fazo smo nato sprali z nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (25 mL) in jo sušili še nad brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Organsko fazo smo filtrirali in uparili kloroform pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kristalizacijo. V bučko s surovim produkтом smo dodali malo etilacetata in heksana (v heksanu je produkt zelo slabo topen), na bučko namestili zračni hladilnik in segrevali z žarilno pištolo. Nato smo tako dobljeno nasičeno raztopino pustili na sobni temperaturi približno eno uro ter jo shranili v hladilniku čez noč. Naslednji dan smo videli, da so začeli izpadati veliki kristali, zato smo raztopino v hladilniku pustili še eno noč. Raztopino s kristali smo filtrirali z odsesavanjem. Ker je v matičnici po prvi kristalizaciji ostalo še veliko produkta, smo kristalizacijo še enkrat ponovili. Masa produkta po 1. kristalizaciji je znašala 409 mg, po 2. kristalizaciji 287 mg, po uparevanju matičnice pa smo pridobili še 604 mg produkta **2**.

<b>Produkt <b>2</b>: 2,2,2-trikloro-1-(4-kloro-5-metil-1<i>H</i>-pirol-2-il)etanon</b>	
<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_4\text{NO}$ <b>M<sub>r</sub>:</b> 260,93 g/mol <b>Izgled:</b> rjavi kristali	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,32 (MF: EA/HEX=1/7) <b>Tališče:</b> 114-116 °C <b>Izkoristek:</b> 26,2 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> $\delta$ 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3$ ), 7.26 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H), 12.67 (s, 1H, NH) ppm	

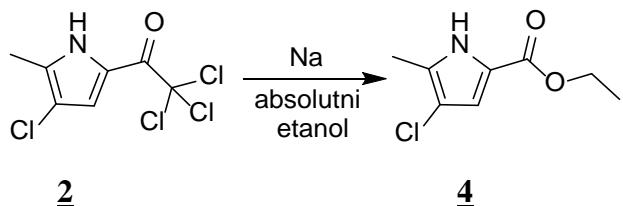
#### 4.1.2 Sinteza spojine **3**: 2,2,2-trikloro-1-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-il)etanon



V bučko smo natehtali spojino **2** (260 mg, 1 mmol, 1 ekv), dodali kloroform (10 mL) in pustili mešati na ledeni kopeli. Prepihali smo z argonom in dodali *N*-klorosukcinimid (NCS) (160 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekv) ter mešali najprej pri 0 °C in nato še preko noči pri sobni temperaturi. Sinteza je bila neuspešna, saj smo na TLC kromatogramu (MF: EA/HEX=1/4) videli, da so pri reakciji nastale številne spojine in naš produkt le v manjši meri.

Sintezo spojine **3** smo ponovili pod drugačnimi reakcijskimi pogoji. V bučko smo natehtali spojino **2** (103 mg, 0,395 mmol, 1 ekv), dodali kloroform (10 mL) in ohladili na ledeni kopeli. Prepihali smo z argonom in nato dodali sulfurilklorid (32  $\mu\text{L}$ , 0,395 mmol, 1 ekv). Vsakih 15 minut smo reakcijsko zmes nanesli na TLC (MF: EA/HEX=1/7). Reakcija je potekala zelo počasi. Umaknili smo ledeno kopel in zmes pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Reakcija čez noč ni potekla do konca, dodali smo še 2 ekvivalenta  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (64  $\mu\text{L}$ , 0,790 mmol, 2 ekv), in potek reakcije večkrat preverjali s TLC kromatogramom. V reakcijski zmesi smo videli lise izhodnega monokloriranega produkta ter lisi dikloriranega in trikloriranega produkta in še lise nekaj nečistot.

Odločili smo, da bomo reakcijsko zmes zavrgli in kislino **9** sintetizirali po modificirani sintezni poti:

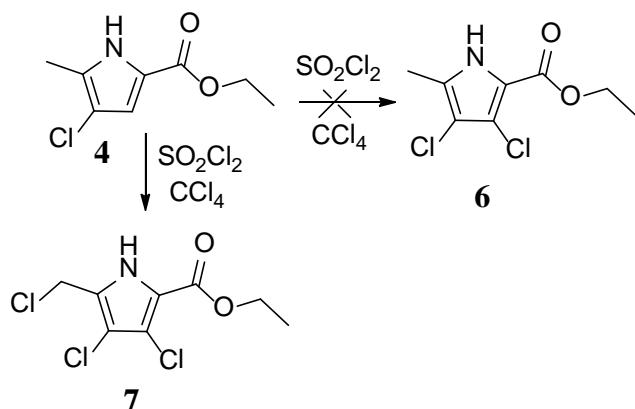


Najprej smo pripravili natrijev etilat. V bučko smo nalili absolutni etanol (20 mL), nato pa dodali koščke natrija (69 mg, 2,96 mmol, 1,2 ekv) in bučko pokrili s klorkalcijevo cevko. Spojino **2** (644 mg, 2,47 mmol, 1ekv) smo raztopili v brezvodnem etanolu in raztopino po kapljicah dodajali raztopini natrijevega etilata. Glede na TLC kromatogram (MF: EA/HEX=1/4) smo sklepali, da je reakcija potekla do konca v manj kot 1 uri. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Surovemu produktu smo dodali destilirano vodo (2 mL), nato pa 1 M HCl do pH 3. Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z etilacetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sprali še z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), na koncu pa še z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Posušili smo jo nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 410 mg spojine **4**.

#### Produkt **4**: etil 4-kloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilat

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> Cl	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,42 (MF: EA/HEX=1/4)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 187,62 g/mol	<b>Tališče:</b> 97-99 °C
<b>Izgled:</b> svetlo rjava oborina	<b>Izkoristek:</b> 88,7 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 1.27 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.18 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.22 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 6.70 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Ar-H), 12.05 (s, 1H, NH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3273, 2939, 1682, 1624, 1550, 1522, 1412, 1336, 1256, 1209, 1124, 1070, 1046, 735 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI<sup>+</sup> za C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>Cl ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunana: 188,0478; izmerjena: 188,0475	

#### 4.1.3 Sinteza spojine **6**: etil 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilat

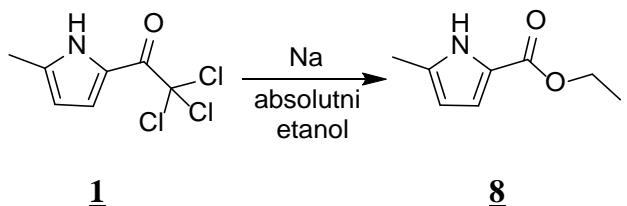


V bučko smo natehtali produkt **4** (410 mg, 2,18 mmol, 1 ekv), dodali tetraklorometan (5 mL), ohladili na ledeni kopeli, bučko pokrili s septumom in prepihali z argonom. Z brizgo smo po kapljicah skozi septum dodajali  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (176  $\mu\text{L}$ , 2,18 mmol, 1 ekv). Reakcija je bila končana po približno eni uri. Produkt smo filtrirali z odsesavanjem. Ko smo posneli NMR spekter, smo videli, da nismo dobili pričakovanega produkta **6**, temveč triklorirani produkt **7**, in sicer ga je nastalo 254 mg.

#### Produkt **7**: etil 3,4-dikloro-5-(klorometil)-1*H*-pirol-2-karboksilat

<b>Elementna sestava:</b> $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2\text{Cl}_3$	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,22 (MF: EA/HEX=1/4)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 256,51 g/mol	<b>Tališče:</b> 107-109 °C
<b>Izgled:</b> bež oborina	<b>Izkoristek:</b> 45,4 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> $\delta$ 1.32 (t, 3H, <i>J</i> = 7.1 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.31 (q, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.72 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 12.89 (s, 1H, NH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> $\nu$ 3246, 2361, 1669, 1625, 1552, 1524, 1443, 1328, 1259, 1214, 1127 $\text{cm}^{-1}$	
<b>MS (ESI<sup>+</sup>) m/z:</b> 220 (100%), 222 (60%), 224 (20%), 252 (25%), 254 (15%), 256 (5%)	

Lotili smo se še alternativne sinteze dikloriranega pirola iz izhodne spojine preko estrenja oziroma nukleofilne substitucije.

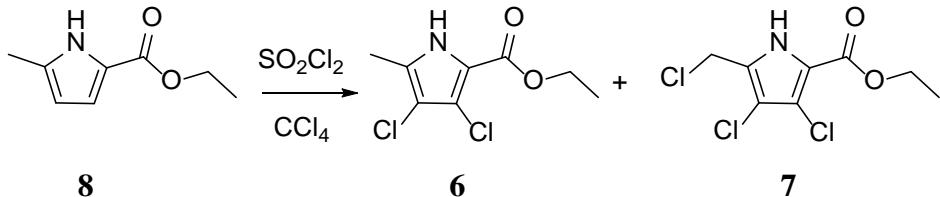


Najprej smo pripravili natrijev etilat. V bučko smo nalili absolutni etanol (20 mL), nato pa dodali koščke natrija (87,6 mg, 3,81 mmol, 1,2 ekv) in bučko pokrili s klorkalcijevo cevko. Izhodno spojino **1** (719 mg, 3,17 mmol, 1 ekv) smo raztopili v brezvodnem etanolu in raztopino po kapljicah dodajali raztopini natrijevega etilata. Glede na TLC kromatogram (MF: EA/HEX=1/4) smo sklepali, da je reakcija potekla do konca v manj kot 1 uri. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Surovemu produktu smo dodali destilirano vodo (2 mL), nato pa 1 M HCl do pH 3. Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z etilacetatom (2 x 20 mL). Organsko fazo smo sprali še z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), na koncu pa še z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Posušili smo jo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in filtrirali ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 341 mg spojine **8**.

#### Produkt **8**: etil 5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilat

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,37 (MF: EA/HEX=1/4)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 153,81 g/mol	<b>Tališče:</b> 87-89 °C
<b>Izgled:</b> rjava oborina	<b>Izkoristek:</b> 70,2 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 1.26 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.21 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.20 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 5.87-5.88 (m, 1H, Ar-H), 6.66 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.6 Hz, J <sub>2</sub> = 3.3 Hz, Ar-H), 11.58 (s, 1H, NH) ppm	

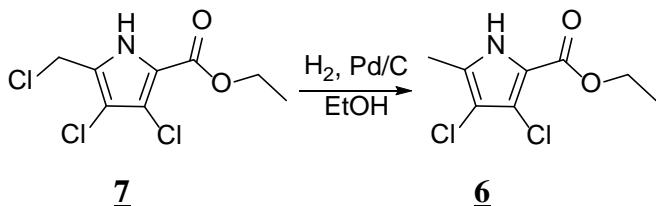
Nato smo produkt **8** klorirali:



Spojino **8** (172 mg, 1,12 mmol, 1 ekv) smo raztopili v tetraklorometanu (5 mL) in mešali na ledeni kopeli. Zmes smo prepihali z argonom in nato počasi, po kapljicah, dodajali sulfurilklorid (191  $\mu$ L, 2,36 mmol, 2,1 ekv). Vsakih 10 minut smo razvili TLC kromatogram (MF: EA/HEX=1/4). Po eni uri smo odstavili ledeno kopel in mešali pri sobni temperaturi. Po 100-tih minutah smo ustavili reakcijo, in sicer tako, da smo dodali nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), s čimer smo nevtralizirali nastalo kislino HCl. Nato smo ekstrahirali z diklorometanom (2 x 10 mL). Organski fazi smo združili in posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 180 mg spojine **6**. Nato smo izvedli še kolonsko kromatografijo našega produkta **6**. Stacionarno fazo je predstavljal silikagel, mobilno fazo pa zmes EA/HEX=1/7. Frakcije smo lovili v penicilinke in elucijo spremljali s TLC (MF: EA/HEX=1/7). Frakcije, kjer je bil prisoten diklorirani produkt, smo združili in pod znižanim tlakom uparili topilo. Za nekatere preostale frakcije smo sklepali, da imamo prisoten triklorirani produkt, zato smo jih shranili in uparili topilo pod znižanim tlakom. Ko smo posneli NMR obeh vzorcev, smo potrdili svojo domnevo. Masa dikloriranega produkta **6** je bila 31 mg, trikloriranega **7** pa 65 mg.

Ker z izkoristkom nismo bili zadovoljni, smo še enkrat nastavili enako reakcijo dikloriranja. Spojino **8** (120 mg, 0,774 mmol, 1 ekv) smo raztopili v tetraklorometanu (5 mL) in mešali na ledeni kopeli. Zmes smo prepihali z argonom in nato počasi, po kapljicah, dodajali sulfurilklorid (63,4  $\mu$ L, 0,774 mmol, 1 ekv). Vsake pol ure smo razvili TLC (MF: EA/HEX=1/4). Reakcija je potekala zelo počasi, zato smo zmes pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo naredili TLC z enako mobilno fazo. Nastala je oborina, zato smo oborino odfiltrirali z odsesavanjem. Naš produkt je bil prisoten v matičnici. Pod znižanim tlakom smo matičnici uparili tetraklorometan. Suhemu preostanku smo dodali nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) in diklorometan (10 mL) ter ločili fazi. Vodni fazi smo ponovno ekstrahirali z diklorometanom (10 mL). Združili smo organski fazi in posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Diklorometan smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 81 mg produkta. Nato smo posneli NMR, ga primerjali z NMR spojine **6** in videli, da smo na žalost zopet pridobili triklorirani produkt **7**.

Odločili smo se, da bomo klorometilno skupino spojine **7** reducirali do metilne s katalitskim hidrogeniranjem – redukcija alkilklorida do alkana:



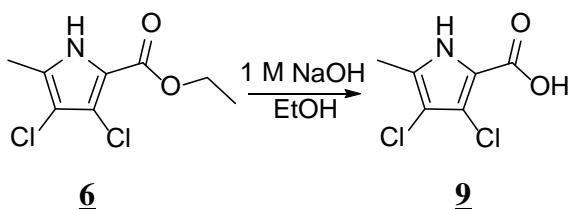
Spojino **7** (101 mg, 0,394 mmol, 1 ekv) smo raztopili v brezvodnem etanolu (10,0 mL) in raztopino prepihali z argonom. Na plastični čolniček smo s plastično žličko natehtali paladij na ogljiku (Pd/C) (10 mg, 10% w/w) in ga dodali reakcijski zmesi. Reakcijsko zmes smo prepihali z vodikom in nato mešali v vodikovi atmosferi še 3 h. Paladij na ogljiku smo odfiltrirali z odsesavanjem. Matičnico smo nato uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 73 mg produkta in posneli NMR spekter, ki je potrdil, da smo dobili diklorirani produkt **6**.

Reakcijo smo po enakem postopku ponovili še z večjo maso izhodne spojine **7** (200 mg, 0,780 mmol) in dobili 129 mg produkta **6**.

#### Produkt **6**: etil 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilat

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,28 (MF: EA/HEX=1/4)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 222,07 g/mol	<b>Tališče:</b> 122-124 °C
<b>Izgled:</b> rumena oborina	<b>Izkoristek:</b> 74,5 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> δ 1.30 (t, 3H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2.21 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.27 (q, 2H, <i>J</i> = 7.1 Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 12.32 (s, 1H, NH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3281, 2941, 1681, 1624, 1550, 1522, 1411, 1338, 1254, 1211, 1124, 1073, 1046, 736, 619 cm <sup>-1</sup>	
<b>MS (ESI<sup>+</sup>) m/z:</b> 220 (100%)	

#### 4.1.4 Sinteza produkta **9**: 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina



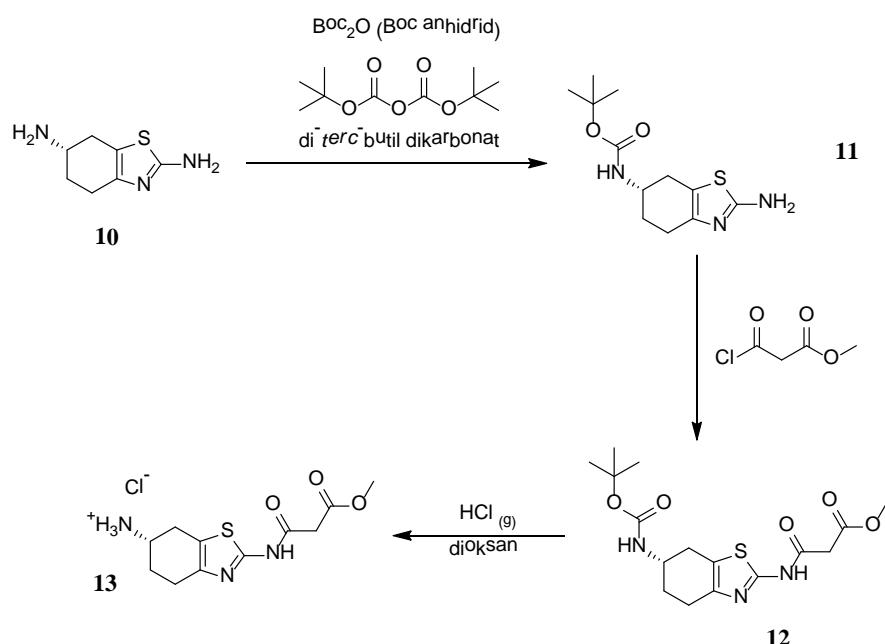
Spojino **6** (119 mg, 0,536 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 96 % etanolu (10 mL) in dodali 1 M NaOH (4,3 mL, 4,3 mmol, 8 ekv) in reakcijsko zmes mešali čez noč pri 70 °C. Naslednji dan smo razvili TLC kromatogram reakcijske zmesi (MF: EA/HEX=1/4) in videli, da reakcija ni potekla do konca, zato smo zopet dodali 1 M NaOH (1,1 mL, 1,07 mmol, 2 ekv) in pustili reakcijo potekati čez noč. Naslednji dan smo odstranili etanol z uparevanjem pod znižanim tlakom. Produktu smo nato dodali destilirano vodo (5 mL) in ekstrahirali z etilacetatom (10 mL), da bi se znebili morebitnih nečistot. Vodno fazo smo nakisali z 1 M HCl do pH 1-2 in jo nato ekstrahirali z etilacetatom (3 x 10 mL). Združili smo organske faze in jih posušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobili 67 mg produkta **9**.

**Produkt **9**: 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0 (MF: EA/HEX=1/4)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 194,02 g/mol	<b>Tališče:</b> 144-146 °C
<b>Izgled:</b> temno rjava oborina	<b>Izkoristek:</b> 64,4 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 2.19 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 12.20 (s, 1H, NH), 12.69 (br s, 1H, COOH) ppm	

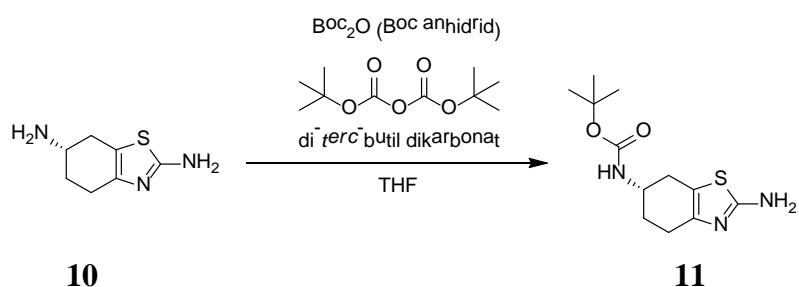
#### 4.2 Sinteza spojine **13**: (S)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-aminijev klorid

Spojino **13** smo sintetizirali v več sinteznih korakih (shema 7).



Shema 7: Sintezna spojine **13**.

#### 4.2.1 Sinteza spojine **11**: (*S*)-*terc*-butil (2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat

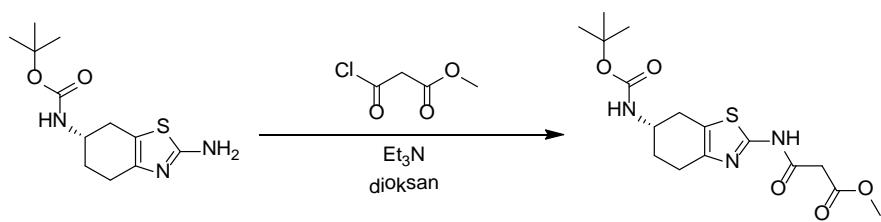


V bučko smo natehtali spojino **10** (816 mg, 4,86 mmol, 1 ekv), jo raztopili v THF (50 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Di-*terc*-butil dikarbonat (Boc<sub>2</sub>O) (1,157 g, 5,30 mmol, 1,1 ekv) smo raztopili v THF (20 mL) in ga nato počasi dokapavali v reakcijsko zmes. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo razvili TLC (MF: DKM/MeOH=9/1) in videli, da je reakcija končana. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,364 g produkta **11**.

**Produkt 11: (S)-*terc*-butil (2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,44 (MF: DKM/MeOH=9/1)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 269,36 g/mol	<b>Tališče:</b> 130-132 °C
<b>Izgled:</b> bela oborina	<b>Izkoristek:</b> 104,2 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> 1.38 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.54-1.65 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.80-1.86 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.31-2.47 (m, 3H, H <sub>A</sub> -4, H-5), 2.68 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 14.8 Hz, J <sub>2</sub> = 5.5 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.57-3.69 (m, 1H, CHNH), 6.64 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.94 (d, 1H, J = 7.9 Hz, NH) ppm	

**4.2.2 Sinteza spojine 12: (S)-metil 3-((6-((*terc*-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat**



**11**

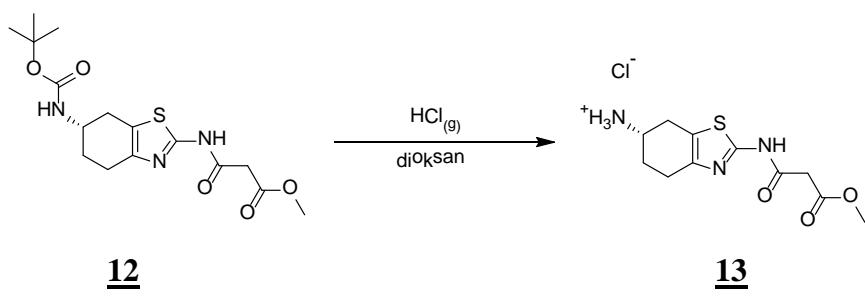
**12**

V bučko smo natehtali spojino **11** (401 mg, 1,49 mmol, 1 ekv), jo raztopili v 1,4-dioksanu (20 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali trietylamin (310 µL, 2,23 mmol, 1,5 ekv) ter bučko zamašili s septumom. Skozi septum smo z injekcijsko brizgo dokapavali metil malonil klorid (239 µL, 2,23 mmol, 1,5 ekv). Nato smo odstavili ledeno kopel in mešali pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo razvili TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH=9/1) in videli, da je reakcija končana. Produkt smo filtrirali z odsesavanjem. Na ta način smo se znebili stranskega produkta, ki je nastajal med reakcijo, in sicer trietylamonijevega klorida. Matičnici smo uparili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo raztopili v etilacetatu (50mL) in spirali z 10% citronsko kislino (25 mL) ter nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (25 mL). Organsko fazo smo posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali ter z uparevanjem pod znižanim tlakom odstranili etilacetat. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo uporabili zmes topila DKM/MeOH=40/1, za stacionarno fazo pa silikagel. Pridobljene frakcije smo nanašali na TLC kromatogram, ki smo ga razvili v MF: DKM/MeOH=40/1. Frakcije, ki so vsebovale čisti produkt, smo združili in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 89 mg spojine **12**.

**Produkt 12: (S)-metil 3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0.37 (MF: DKM/MeOH=15/1)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 369,44 g/mol	<b>Tališče:</b> 93-95 °C
<b>Izgled:</b> bela oborina	<b>Izkoristek:</b> 16,2 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 1.40 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.65-1.75 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.91-1.96 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.61-2.72 (m, 3H, H <sub>A</sub> -4, H-5), 2.90 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 16.2 Hz, J <sub>2</sub> = 4.5 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.57 (s, 2H, COCH <sub>2</sub> CO), 3.66 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 3.68-3.76 (m, 1H, CHNH), 7.02 (d, 1H, J = 7.7 Hz, BocNH), 12.13 (s, 1H, NHCO) ppm	
<b>IR (ATR):</b> $\nu$ 3282, 2939, 1682, 1624, 1550, 1521, 1438, 1410, 1338, 1254, 1211, 1171, 1125, 1047, 735 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>):</b> izračunana: 368,1280; izmerjena: 368,1285	

**4.2.3 Sinteza spojine 13: (S)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijev klorid**



V bučko smo natehtali spojino **12** (66 mg, 0,179 mmol, 1 ekv), jo raztopili v 1,4-dioksanu (5 mL), pokrili s septumom in prepihali z argonom. Nato smo dokapavali 4 M HCl v 1,4-dioksanu (447 µL, 1,79 mmol, 10 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Pri tem je nastajala bela oborina. Naslednji dan smo preverili potek reakcije s TLC kromatogramom (MF: DKM/MeOH=9/1) in videli, da še ni končana, zato smo dodali še dodatno količino 4 M HCl (447 µL, 1,79 mmol, 10 ekv). Zopet smo pustili mešati čez noč. Reakcija ni bila končana niti naslednji dan, zato smo še enkrat dodali 4 M HCl (447 µL, 1,79 mmol, 10 ekv) in pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo produktu uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 50 mg produkta **13**.

**Produkt 13: (*S*)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-amonijev klorid**

**Elementna sestava:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S

**M<sub>r</sub>:** 305,78 g/mol

**Izgled:** bela oborina

**R<sub>f</sub>:** 0 (MF: DKM/MeOH=9/1)

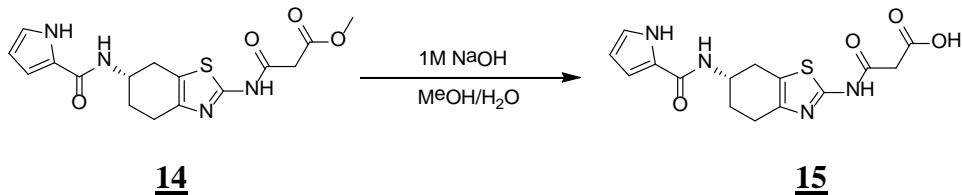
**Tališče:** 173-175 °C

**Izkoristek:** 91,3 %

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** 1.85-1.95 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 2.10-2.19 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2.67-2.79 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 3.08 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15.9 Hz, J<sub>2</sub> = 4.9 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3.47-3.56 (m, 1H, CHNH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 3.60 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>CO), 3.66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 8.32 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 12.23 (s, 1H, NHCO) ppm

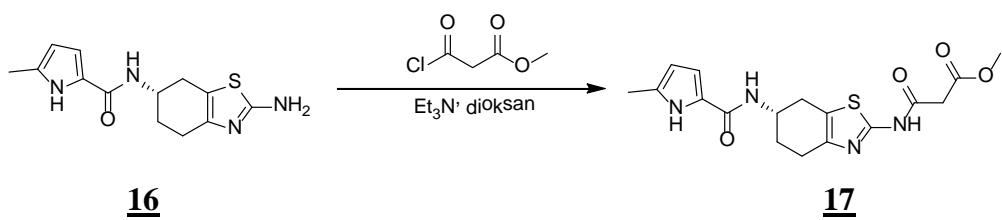
### 4.3 Sinteza končnih spojin

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



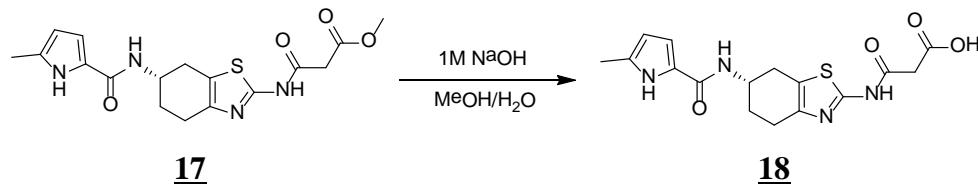
V bučko smo natehtali spojino **14** (135 mg, 0,373 mmol, 1 ekv). Dodali smo metanol (10 mL), da se je spojina raztopila in nato še 1 M NaOH (745 µL, 0,745 mmol, 2 ekv). Dodali smo magnetno mešalo in pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije smo naslednji dan preverili tako, da smo razvili TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH=9/1). Reakcija ni potekla do konca, zato smo ponovno dodali 1 M NaOH (745 µL, 0,745 mmol, 2 ekv) in pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo se lotili izolacije. Pod znižanim tlakom smo uparili metanol. Nato smo produktu dodali destilirano vodo (2 mL). Produkt je bil v obliki soli, zato je bil dobro topen v vodi. Ekstrahirali smo z etilacetatom (10 mL). S tem smo se znebili nečistot, le-te so ostale v organski fazi. Vodni fazi smo dokapavali 1 M HCl do pH 1-2, s čimer smo produkt pretvorili v obliko kisline, s tem pa zmanjšali topnost v vodi. Dvakrat smo ekstrahirali z etilacetatom (2 x 10 mL). Organska in vodna faza se nista dobro ločili, zato smo produkt samo filtrirali z odsesavanjem. Produkt smo nato sušili na 80 °C v sušilniku 1 h. Dobili smo 43 mg končnega produkta **15**.

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



Spojino **16** (244 mg, 0,883 mmol, 1 ekv) smo raztopili v dioksanu (15 mL) in dodali Et<sub>3</sub>N (185 µL, 1,324 mmol, 1,5 ekv), ki je nevtraliziral med reakcijo nastajajoči HCl. 5 minut smo hladili na ledu in nato dodali metil malonil klorid (142 µL, 1,324 mmol, 1,5 ekv) ter pustili mešati na sobni temperaturi do naslednjega dne. Naslednji dan smo pričeli z izolacijo produkta. Reakcijsko zmes smo najprej filtrirali z odsesavanjem in se tako znebili oborine trietilamonijevega klorida, ki je nastal pri stranski reakciji nevtralizacije. Nato smo odstranili topilo z uparevanjem pod znižanim tlakom. Surov produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo z uporabo etilacetata kot mobilne faze. V epruvete smo zbirali eluate in jih sproti preverjali s pomočjo TLC kromatogramov, ki smo jih razvijali v mobilni fazni DKM/MeOH=9/1. Vsebino vseh epruvet, kjer je bil prisoten produkt, smo združili in pod znižanim tlakom uparili etilacetat. Dobili smo 161 mg končnega produkta

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

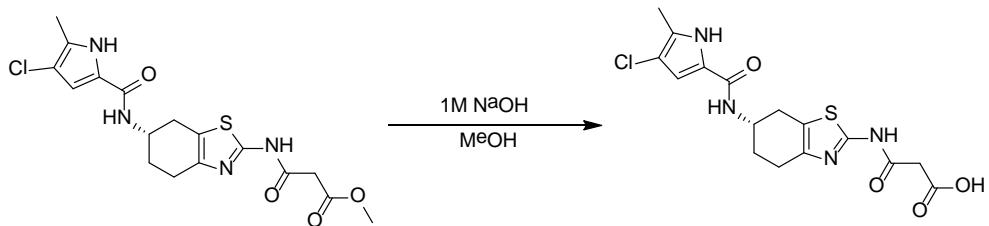


V bučko smo natehtali spojino **17** (133 mg, 0,353 mmol, 1 ekv). Dodali smo metanol (10 mL), da se je vse raztopilo, nato pa 1 M NaOH (707 µL, 0,707 mmol, 2 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali 2 dni pri sobni temperaturi. Ker reakcija glede na kromatogram (MF: DKM/MeOH=9/1) še ni potekla do konca, smo dodali dodatno količino 1 M NaOH (707 µL, 0,707 mmol, 2 ekv). Naslednji dan smo reakcijski zmesi uparili metanol pod znižanim tlakom. Nato smo dodali destilirano vodo (2 mL) - produkt v obliki soli je bil v vodi topen - in ekstrahirali z etilacetatom (10 mL). Nečistote smo ekstrahirali v organsko fazo. Vodno fazo smo nato nakisali z 1 M HCl do pH 1-2, produkt se je začelobarjati. Produkt smo nato filtrirali z odsesavanjem in ga posušili. Dobili smo 81 mg končnega produkta **18**.

**Produkt 18: (S)-3-((6-(5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0 (MF: DKM/MeOH=1/9)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 362,40 g/mol	<b>Tališče:</b> >300 °C
<b>Izgled:</b> rumena oborina	<b>Izkoristek:</b> 63,3 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 1.80-1.90 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.96-2.04 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.18 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.61-2.71 (m, 3H, H-5, H <sub>A</sub> -4), 2.97 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 5.1 Hz, J <sub>2</sub> = 15.6 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.46 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.15-4.24 (m, 1H, H-6), 5.77-5.79 (m, 1H, Ar-H), 6.69 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 2.6 Hz, J <sub>2</sub> = 3.3 Hz, Ar-H), 7.82 (d, 1H, J = 7.9 Hz, CONH), 11.20 (s, 1H, NH), 12.06 (s, 1H, NH), 12.78 (s, 1H, COOH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> v 3281, 2940, 1682, 1624, 1549, 1523, 1438, 1339, 1253, 1211, 1125, 1046, 736 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI<sup>+</sup> za C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunana: 363,1127; izmerjena: 363,1126	

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



**19**

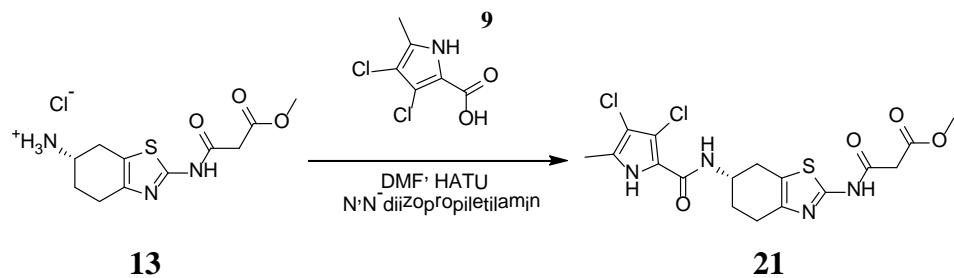
**20**

V bučko smo natehtali spojino **19** (38 mg, 0,0925 mmol, 1 ekv), ki smo jo pred tem očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza je bila etilacetat). Spojino **6** smo nato raztopili v metanolu (5 mL) in dodali 1 M NaOH (370 µL, 0,37 mmol, 4 ekv) ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi 2 dni. Najprej smo pod znižanim tlakom uparili metanol. Produktu smo dodali destilirano vodo (2 mL), kjer je bil dobro topen, saj je bil v obliki soli, in ekstrahirali z etilacetatom (10 mL), da smo se znebili nečistot, ki so ostale v organski fazi. Vodni fazi smo dokapavali 1 M HCl do pH 1-2, pri čemer se je produkt oboril. Po sušenju produkta v sušilniku smo dobili 14 mg končnega produkta **20**.

**Produkt 20: (S)-3-((6-(4-kloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> SCl	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0 (MF: DKM/MeOH=1/9)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 396,85 g/mol	<b>Tališče:</b> 274-276 °C
<b>Izgled:</b> rumena oborina	<b>Izkoristek:</b> 38,1 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> δ 1.80-1.91 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.96-2.03 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.64-2.77 (m, 3H, H-5, H <sub>A</sub> -4), 2.98 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 4.7 Hz, J <sub>2</sub> = 15.4 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.46 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.14-4.24 (m, 1H, H-6), 6.81 (d, 1H, J = 2.7 Hz, Ar-H), 7.98 (d, 1H, J = 8.0 Hz, CONH), 11.64 (s, 1H, NH), 12.07 (s, 1H, NH), 12.81 (s, 1H, COOH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> v 3296, 2941, 1683, 1625, 1550, 1521, 1410, 1338, 1255, 1211, 1124, 1074, 1046, 736, 676 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI<sup>+</sup> za C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SCl ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunana: 397,0737; izmerjena: 397,0734	

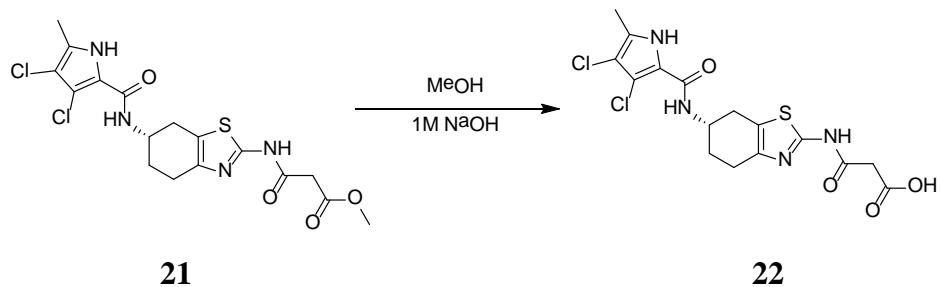
#### **4.3.5 Sinteza spojine (S)-metil 3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata**



V bučko smo natehtali spojino **9** (67 mg, 0,345 mmol, 1 ekv) in jo raztopili v DMF (5 mL). Dodali smo *N,N*-diizopropiletilamin (0,114 mL, 0,690 mmol, 2 ekv) in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali HATU (157,4 mg, 0,414 mmol, 1,2 ekv), ki je služil kot sklopitveni reagent. Počakali smo 20 minut, da je potekla aktivacija kisline in nato dodali spojino **13** (106 mg, 0,345 mmol, 1 ekv), ki smo jo pred tem raztopili v DMF (2 mL) in jo na ta način lažje dodali v reakcijsko zmes. Še enkrat smo dodali *N,N*-diizopropiletilamin (57  $\mu$ L, 0,345 mmol, 1 ekv). Na ledeni kopeli smo mešali še 30 minut, nato smo kopel odstavili in pustili mešati pri sobni temperaturi še 1,5 h. Uparili smo topilo in surov produkt raztopili v etilacetatu (30 mL). Organsko fazo smo spirali z 10% citronsko kislino (2 x 20 mL), z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  (2 x 20

mL). Na koncu smo produkt posušili še z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Nato smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo. Stacionarna faza je bil silikagel, mobilna faza pa zmes  $\text{DKM}/\text{MeOH}=40/1$ . Frakcije, ki smo jih zbirali, smo nanašali na TLC ploščico, ki smo jo razvili v MF:  $\text{DKM}/\text{MeOH}=20/1$ . Frakcije s čistim produktom smo združili in jim pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 40 mg spojine **21**.

<b>Produkt 21:</b> (S)-metil 3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> SCl <sub>2</sub>	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,56 (MF: DKM/MeOH=20/1)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 445,32 g/mol	<b>Tališče:</b> 116-118 °C
<b>Izgled:</b> temno rumena oborina	<b>Izkoristek:</b> 26,0%
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> 1.90-1.98 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.99-2.06 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.19 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.68-2.76 (m, 3H, H <sub>A</sub> -4, H-5), 3.03 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 15.9 Hz, J <sub>2</sub> = 4.7 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.59 (s, 2H, COCH <sub>2</sub> CO), 3.66 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 4.24-4.29 (m, 1H, CHNH), 7.34 (d, 1H, J = 7.6 Hz, CONH), 12.02 (s, 1H, NH), 12.16 (s, 1H, NH) ppm <b>IR (ATR):</b> ν 3279, 2940, 1682, 1624, 1550, 1522, 1410, 1338, 1254, 1211, 1124, 1074, 1046, 736 cm <sup>-1</sup> <b>HRMS ESI<sup>+</sup> za C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SCl<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunana: 445.0504; izmerjena: 445.0513	



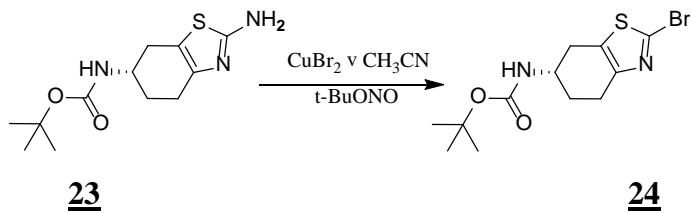
Produkt **21** (30 mg, 0,067 mmol, 1 ekv) smo raztopili v metanolu (5 mL) in dodali 1 M NaOH (404  $\mu$ L, 0,404 mmol, 6 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati dva dni pri sobni temperaturi. Razvili smo TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH=20/1) in videli, da

je reakcija potekla do konca. Z uparevanjem pod znižanim tlakom smo odstranili metanol. Produktu smo dodali destilirano vodo (2 mL) in ekstrahirali z etilacetatom (10 mL). Produkt je bil v obliki soli, zato je ostal raztopljen v vodni fazi, v organski fazi pa so ostale nečistote. Vodni fazi smo dokapavali 1 M HCl do pH 1-2. Nato smo vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom (3 x 10 mL). Združene organske faze smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (10 mL) in posušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Z uparevanjem pod znižanim tlakom smo odstranili etilacetat. Dobili smo 12 mg produkta **22**.

**Produkt 22: (S)-3-((6-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanojska kislina**

<b>Elementna sestava:</b> C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> SCl <sub>2</sub>	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0 (MF: DKM/MeOH=20/1)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 431,29 g/mol	<b>Tališče:</b> 167-169 °C
<b>Izgled:</b> rumena oborina	<b>Izkoristek:</b> 41,3 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> 1.93-2.05 (m, 2H, H-7), 2.19 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.71-2.77 (m, 3H, H <sub>A</sub> -4, H-5), 3.02 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 15.9 Hz, J <sub>2</sub> = 4.9 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.46 (s, 2H, COCH <sub>2</sub> CO), 4.24-4.29 (m, 1H, CHNH), 7.34 (d, 1H, J = 7.8 Hz, CONH), 12.02 (s, 1H, NH), 12.08 (s, 1H, NH), 12.79 (s, 1H, COOH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3282, 2940, 1682, 1624, 1549, 1522, 1410, 1337, 1254, 1211, 1124, 1074, 1046, 735 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI za C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SCl<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>):</b> izračunana: 429,0191; izmerjena: 429,0198	

#### 4.4 Poskus sinteze spojine (S)-metil 3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)oksi)benzoata



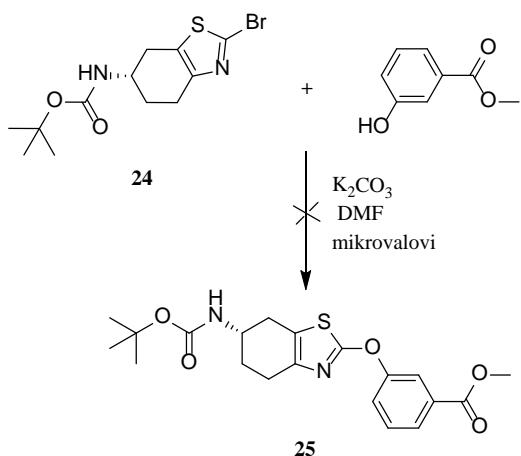
CuBr<sub>2</sub> (333 mg, 1,49 mmol, 2 ekv) smo raztopili v acetonitrilu (10 mL). Nato smo dodali *t*-BuONO (176 µL, 1,49 mmol, 2 ekv) in 10 min mešali pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes segreli na 60 °C in dodali spojino **23** (200 mg, 0,743 mmol, 1 ekv) v večih delih. Po pol ure smo še enkrat dodali *t*-BuONO (176 µL, 1,49 mmol, 2 ekv) in

pustili mešati na 60 °C. Čez pol ure smo razvili TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH=20/1). Ker reakcija še ni potekla do konca, smo po eni uri zopet dodali CuBr<sub>2</sub> (166 mg, 0,745 mmol, 1 ekv) in pustili mešati čez noč. Naslednji dan je bila reakcija končana. Produktu smo dodali destilirano vodo (20 mL) in ga odfiltrirali z odsesavanjem, saj je bil v obliki oborine. Ker je glede na TLC kromatogram v matičnici ostalo še ogromno produkta, smo uparili acetonitril. Preostalo vodno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (20 mL). Uparili smo topilo in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo (MF = diklorometan). Frakcije s produktom smo združili in uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 22 mg oljnatega, rjavega produkta **24**.

Reakcijo smo še enkrat ponovili z večjo količino spojine **23** (698 mg, 2,591 mmol) in dobili 107 mg čistega produkta **24**.

<b>Produkt 24: (S)-terc-butil (2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)karbamat</b>	
<b>Elementna sestava:</b> C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SBr	<b>R<sub>f</sub>:</b> 0,59 (MF: DKM/MeOH=20/1)
<b>M<sub>r</sub>:</b> 333,24 g/mol	<b>Tališče:</b> >300 °C
<b>Izgled:</b> rjava oborina	<b>Izkoristek:</b> 12,4 %
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):</b> 1.40 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1.68-1.77 (m, 1H, H <sub>A</sub> -7), 1.88-1.95 (m, 1H, H <sub>B</sub> -7), 2.56-2.82 (m, 3H, H <sub>A</sub> -4, H-5), 2.98 (dd, 1H, J <sub>1</sub> = 16.3 Hz, J <sub>2</sub> = 4.9 Hz, H <sub>B</sub> -4), 3.69-3.78 (m, 1H, CHNH), 7.07 (d, 1H, J = 7.2 Hz, BocNH) ppm	
<b>IR (ATR):</b> ν 3285, 2940, 1683, 1624, 1550, 1522, 1411, 1338, 1254, 1211, 1124, 1074, 1046, 736 cm <sup>-1</sup>	
<b>HRMS ESI<sup>+</sup> za C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SBr ([M+H]<sup>+</sup>):</b> izračunana: 333,0272; izmerjena: 333,0280	

Nato smo se lotili reakcije, ki je predstavljena na spodnji shemi:



V mikrovalovni reaktor smo natehtali metil 3-hidroksibenzoat (33,98 mg, 0,223 mmol, 1,2 ekv) in  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (33,41 mg, 0,242 mmol, 1,3 ekv). Spojino **24** (62 mg, 0,186 mmol, 1 ekv) smo raztopili v DMF (500  $\mu\text{L}$ ) in jo dodali reakcijski zmesi. Za pol ure smo postavili reakcijsko zmes v mikrovalovni reaktor na 100 °C. Po pol ure smo razvili TLC kromatogram (MF: DKM/MeOH=40/1) ter ga orosili z orositvenim reagentom  $\text{FeCl}_3$ . Sklepali smo, da reakcija še ni potekla do konca, zato smo zmes ponovno postavili v mikrovalovni reaktor za eno uro na 150 °C. Ponovno smo razvili TLC kromatogram (DKM/MeOH=9/1) in uporabili enak orositveni reagent  $\text{FeCl}_3$ . Uparili smo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopili v etilacetatu (15 mL). Nato smo spirali z 10% citronsko kislino (2 x 15 mL) in nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 15 mL). Etilacetat smo uparili pod znižanim tlakom in surov produkt čistili s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=20/1. Polarnost mobilne faze smo med elucijo povečali z uporabo mobilne faze DKM/MeOH=9/1 in na koncu še DKM/MeOH=5/1. Ustrezne frakcije smo združili v bučko in pod znižanim tlakom uparili topilo. Dobili smo 4 mg produkta. Glede na NMR spekter smo lahko sklepali, da nismo izolirali pravega produkta, vendar dejanske strukture izolirane spojine nismo mogli določiti.

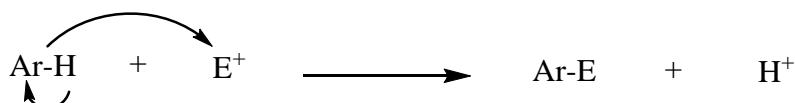
## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR SINTEZNEGA DELA

#### 5.1.1 SINTEZA SPOJINE **9**

##### Kloriranje

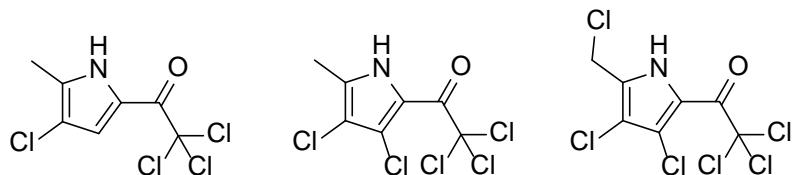
Spojino **2** (sinteza 4.1.1) smo sintetizirali s pomočjo kloriranja s sulfurilkloridom. Mehanizem reakcije je elektrofilna aromatska substitucija, ki je predstavljena na shemi 8. Aromatski obroč kot nukleofil reagira s sulfurilkloridom, ki je vir elektrofilnega kloridnega iona.



Shema 8: Elektrofilna aromatska substitucija.

Reakcijsko zmes smo pred dodatkom sulfurilklorida prepahali z argonom, saj v reakcijski zmesi ne sme biti prisotnega zraka, ker je pirol občutljiv na oksidacijo s kisikom. S tem smo izgnali tudi zračno vlago, ki bi lahko povzročila hidrolizo sulfurilklorida. Reakcijo smo ustavili z dodatkom vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$ , da smo nevtralizirali stranski produkt  $\text{HCl}$  in hkrati hidrolizirali nezreagirani sulfurilklorid.

Spojino **3** (sinteza 4.1.2) smo najprej želeli sintetizirati s kloriranjem z uporabo *N*-klorosukcinimida (NCS), ki se uporablja kot vir klora v radikalnih reakcijah in pri različnih elektrofilnih adicijah. Reakcija ni uspela, saj smo najverjetneje dobili zmes mono-, di- in trikloriranega produkta (slika 18) ter še dodatne stranske produkte.



Slika 18: Mono-, di- in trikloriran produkt

Sinteza spojine **6** (sinteza 4.1.3) je potekala analogno sintezi spojine **2**, razlika je bila le v topilu. Tetraklorometan je bolj halogenirano topilo, pri katerem lažje in hitreje poteče halogeniranje, a hkrati je tudi bolj toksično topilo. Z izbiro kloroformja pri sintezi spojine **2** smo sklepali, da bi upočasnili reakcijo halogeniranja in bi bila zato reakcija bolj selektivna in bi potekala v smeri nastajanja več dikloriranega produkta, toda to nam žal ni uspelo.

### Katalitsko hidrogeniranje

Drugi način sinteze spojine **6** (iz spojine **7**) je bila redukcija alkilklorida (klorometilne skupine trikloriranega produkta) do alkana s katalitskim hidrogeniranjem. Paladij na ogljiku (Pd/C) je služil kot katalizator reakcije. Najprej smo iz reakcijske zmesi odstranili zrak s pomočjo argona, saj bi se katalizator ob prisotnosti kisika in vodika v reakcijski zmesi lahko vžgal. Ko smo dodali katalizator, smo argon izgnali iz reakcijske zmesi s prepihovanjem z vodikom in nato reakcijo pustili potekati v vodikovi atmosferi.

### Estrenje

Reakcijski mehanizem pri sintezi spojine **4** je estrenje oziroma nukleofilna substitucija, pri kateri triklorometilna skupina deluje kot dobro izstopajoča skupina. Najprej reagirata natrij in etanol v redoks reakciji, pri čemer nastane natrijev etoksid ( $\text{NaOEt}$ ), ki nato kot nukleofil napade karbonilni ogljik trikloroacetilne skupine. Sinteza spojine **8** je analogna sintezi spojine **4**.

## 5.1.2 SINTEZA SPOJINE **13**

### Zaščita aminske skupine

Sintezo spojine **11** (sinteza 4.2.1) smo začeli z zaščito spojine **10**. Izhodna spojina 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin ima dve amino skupini, in sicer aromatsko na mestu 2 in alifatski primarni amin na mestu 6. Aminsko skupino na mestu 6 smo želeli zaščititi zato, da bi omogočili kasnejšo selektivno reakcijo na aminski skupini na mestu 2. Aminsko skupino na mestu 6 smo zaščitili tako, da smo tvorili *t*-butilkarbamat s pomočjo Boc-anhidrida. Zaradi veliko večje nukleofilnosti amino skupine na mestu 6 lahko reakcijo selektivno izvedemo samo na tem mestu pri ustreznih pogojih (nizka temperatura). Če bi reakcija potekala pri višji temperaturi, bi najverjetneje zreagirala oba amina, torej tudi

aromatski. Amino skupina deluje kot nukleofil, ki se adira na elektrofilni ogljikov atom karbonilne skupine Boc-anhidrida, pri čemer nastane tetraedrični intermediat. Gre za reakcijo, ki je po mehanizmu analogna sintezi spojine **17**.

### N-aciliranje

Produkt **12** (sinteza 4.2.2) smo pridobili po mehanizmu nukleofilne substitucije, oziroma N-aciliranja. Organsko fazo pri ekstrakciji smo spirali s citronsko kislino, da smo odstranili morebitni nezreagirani izhodni amin in prebitek Et<sub>3</sub>N, pri čemer nastane v vodi topna sol. Organsko fazo smo nato sprali še z NaHCO<sub>3</sub>, da smo nevtralizirali preostanek citronske kisline in morebitni monometil malonat, ki nastane pri hidrolizi metil malonil klorida.

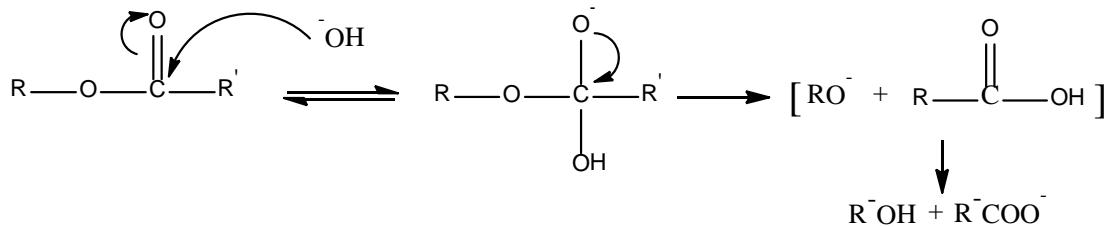
### Odščita aminske skupine

Pri sintezi spojine **13** (sinteza 4.2.3) smo odščitili amino skupino na mestu 6, in sicer z acidolizo. Produkt smo zaradi kislega medija izolirali v obliki soli. Pri tem sta nastala stranska produkta ogljikov dioksid in *terc*-butanol.

### 5.1.3 SINTEZA KONČNIH SPOJIN

#### Alkalna hidroliza estra

Pri sintezi končnih spojin **15**, **18**, **20**, **22** smo izvedli alkalno hidrolizo estra. Mehanizem reakcije je predstavljen v shemi 9.



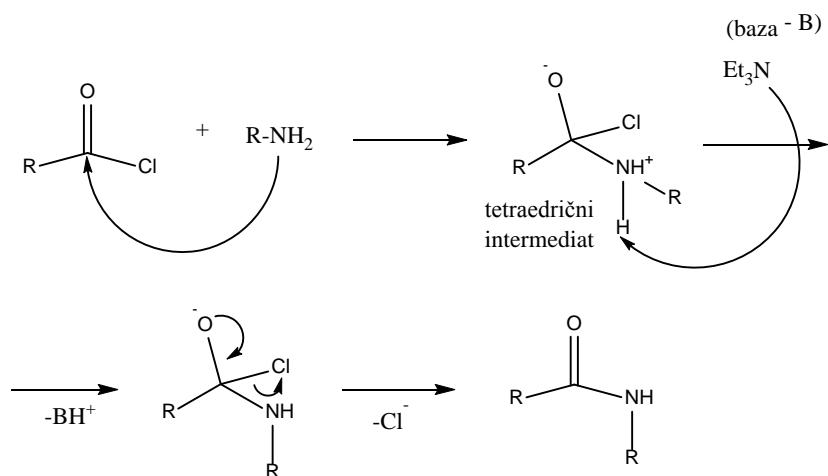
Shema 9: Alkalna hidroliza estra.

Hidroksilni ion predstavlja nukleofil, ki napade ogljik v karbonilni skupini estra. Rezultat hidrolize je karboksilna kislina (ker imamo bazično okolje zaradi NaOH, je v obliki natrijeve soli) in alkohol, ki je v našem primeru metanol. Natrijevo sol produkta smo s pomočjo nakisanja s HCl pretvorili v nedisociirano karboksilno kislino, ki smo jo zaradi

zmanjšane topnosti v vodi lahko izolirali z ekstrakcijo v organsko topilo ali pa smo jo odfiltrirali, če se je oborila.

### N-aciliranje

Produkt 17 pri reakciji 4.3.2 smo pridobili s pomočjo N-aciliranja (shema 10).



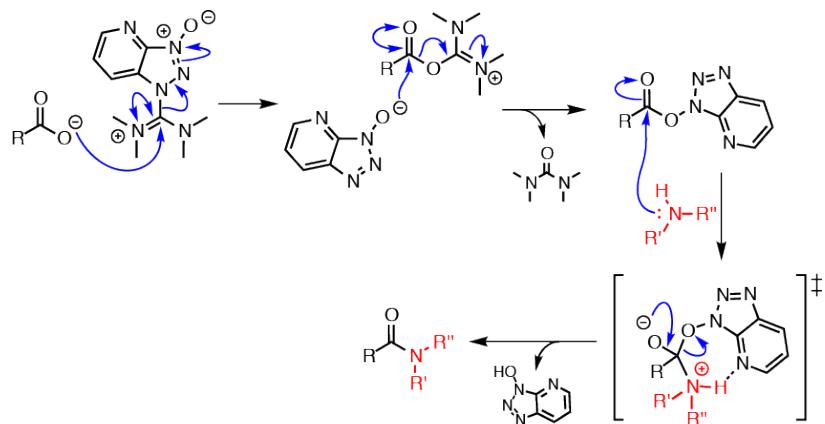
Shema 10: Mehanizem N-aciliranja.

Aminska skupina na mestu 2 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazolnega obroča ima vlogo nukleofila, karbonilna skupina metil malonil klorida pa predstavlja elektrofilni center. Aminska skupina se nukleofilno adira na karbonilno skupino metil malonil klorida, pri čemer nastane tetraedrični intermediat. Končni rezultat je amid in stranski produkt  $\text{HCl}$ , ki smo ga nevtralizirali s pomočjo baze  $\text{Et}_3\text{N}$ .

1,4-dioksan smo uporabili kot topilo zato, da smo izboljšali topnost reaktantov. Uporabili smo topilo, ki ni nukleofilno, kajti če bi uporabili na primer alkohol (metanol, etanol), bi topilo vstopalo kot kompetitivni nukleofil v samo reakcijo.

Pri sintezi spojine 21 (sinteza 4.3.5) je ponovno poteklo N-aciliranje, vendar smo v tem primeru amidno vez tvorili s pomočjo sklopitvenega reagenta 1-[bis(dimetylamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev-3-oksid heksafluorofosfata (HATU). Vloga HATU je, da aktivira kislino, tako dobimo aktivirani ester, s čimer povečamo elektrofilnost karboksilne kisline in omogočimo nadaljnjo reakcijo z aminom do amida (slika 19). *N,N*-diizopropyletilamin dodamo zato, da dosežemo pH 8, ki je potreben za pretvorbo karboksilne kisline  $\text{R}-\text{COOH}$  do karboksilata  $\text{R}-\text{COO}^-$ . Slednji kot nukleofil reagira s karbodiimidnim ogljikom HATU, pri čemer nastane aktiviran ester, ki se v

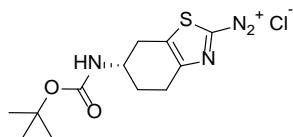
naslednji stopnji preestri z  $1H$ -1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijevim-3-oksidom. Pri tem nastane še bolj elektrofilen aktiviran ester, ki reagira z aminom preko tetraedričnega intermediata do amida.



Slika 19: Mehanizem tvorbe amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU (32)

#### 5.1.4 SINTEZA SPOJINE 25

Pri sintezi spojine 25 (sinteza 4.4) smo v prvi stopnji izvedli pretvorbo amino skupine v aril diazonijkevo sol z dodatkom *t*-butilnitrita (slika 20). V naslednji stopnji je ob dodatku CuBr<sub>2</sub> potekla Sandmeyerjeva reakcija po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije, pri čemer smo dobili derivat 2-bromotiazola.



Slika 20: Aril diazonijeva sol spojine 23

V naslednji stopnji smo želeli izvesti nukleofilno aromatsko substitucijo broma na mestu 2 s substituiranim fenolatom, ki smo ga tvorili iz fenola ob dodatu kalijevega karbonata kot baze. Pri sintezi smo uporabili mikrovalovni reaktor. Pri segrevanju z mikrovalovi poteka prenos energije z valovanjem neposredno do molekul topila in molekul reaktantov. Na ta način skrajšamo reakcijski čas in dobimo višje izkoristke. Za detekcijo poteka reakcije smo uporabili tako UV svetlobo valovne dolžine 254 nm kot tudi orositveni reagent FeCl<sub>3</sub>, ki je primeren za identifikacijo fenolne OH skupine, s katero

tvori vijolično-rdeče obarvane komplekse. Reakcija ni uspela, kar lahko pripisemo večim razlogom, kot so neustrezni reakcijski pogoji (temperatura, čas, topilo) ali tudi nekomplementarna nukleofilnost oz. elektrofilnost izhodnih spojin. Zaradi časovne omejitve smo reakcijo izvedli samo enkrat. Potrebno bi bilo preizkusiti še različne druge pogoje, da bi morda po tem postopku sintetizirali želeni produkt.

Posledično se seveda nismo lotili nadaljnje sinteze novih potencialnih inhibitorjev DNA giraze, pri katerih bi malonilni fragment zamenjali z benzojsko ali drugimi aromatskimi kislinami, kot smo predvidevali v našem načrtu dela.

## 5.2 KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA

### 5.2.1. VREDNOTENJE NA IZOLIRANIH ENCIMIH

Ovrednotili smo biološko aktivnost vseh končnih sintetiziranih spojin na DNA girazi in topoizomerazi IV iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Rezultati so prikazani v preglednici II. Rezultati so podani kot vrednosti IC<sub>50</sub>, ki pomenijo tisto koncentracijo spojine/inhibitorja, ki povzroči 50% zaviranje reakcije, ki jo katalizira encim.

Preglednica II: Inhibitorne aktivnosti spojin **15**, **17**, **18**, **20**, **21**, **22** na izoliranih encimih DNA giraze in topoizomeraze IV (topoIV) iz bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*.

Oznaka spojine	Struktura formula spojine	<i>E. coli</i> DNA giraza IC <sub>50</sub>	<i>S. aureus</i> DNA giraza IC <sub>50</sub>	<i>E. coli</i> topoIV IC <sub>50</sub>	<i>S. aureus</i> topoIV IC <sub>50</sub>
<b>15</b>		neaktivno	neaktivno	neaktivno	neaktivno
<b>17</b>		neaktivno	neaktivno	neaktivno	neaktivno
<b>18</b>		21 μM	neaktivno	neaktivno	neaktivno
<b>20</b>		0,078 μM	2,0 μM	neaktivno	~50 μM

<u>21</u>		0,29 µM	~5 µM	neaktivno	neaktivno
<u>22</u>		0,020 µM	0,56 µM	~100 µM	~50 µM

Iz rezultatov testiranj vidimo, da je spojina 15, ki vsebuje nesubstituirani pirol, neaktivna na vseh štirih encimih. Če jo primerjamo s spojino 18, vidimo, da je edina strukturna razlika med njima dodatna metilna skupina na pirolnem obroču, ki je očitno že dovolj, da spojina 18 izkazuje inhibicijo DNA giraze iz *E. coli*, na drugih encimih pa je neaktivna. Iz tega lahko sklepamo, da je metilna skupina na pirolnem obroču pomembna za delovanje na DNA girazo iz *E. coli*. Vloga metilne skupine pri vezavi v tarčno mesto je tvorba hidrofobnih interakcij v hidrofobnem žepu encima. Spojina 17, ki je metilni ester spojine 18, pa je še vedno neaktivna, kar kaže na pomembnost končne karboksilne kisline za močno inhibicijo encima. Z inhibitorno aktivnostjo te spojine vseeno ne moremo biti popolnoma zadovoljni, saj je še vedno v mikromolarnem območju, kar ponavadi ni dovolj za doseganje protibakterijske aktivnosti.

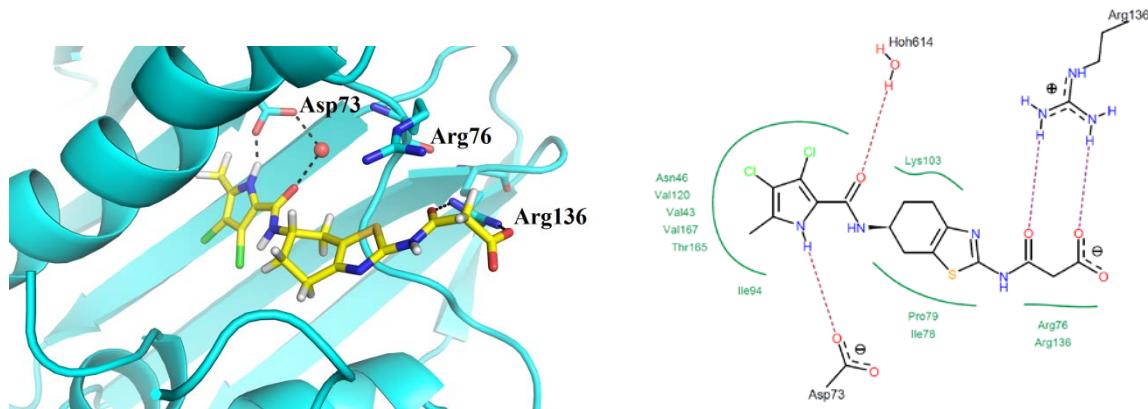
Z uvedbo dodatnih lipofilnih substituentov na pirolni obroč (klorirane spojine 20, 21 in 22) lahko opazimo precejšnje izboljšanje inhibitorne aktivnosti, saj so  $IC_{50}$  vrednosti v nanomolarnem območju. Spojina 20, ki v svoji strukturi vsebuje en klorov atom, doseže  $IC_{50}$  vrednost 78 nM na DNA girazi iz *E. coli* in 2,0 µM na DNA girazi iz *S. aureus*, medtem ko je aktivnost na topoizomerazi IV še vedno zelo šibka. Iz tega lahko sklepamo, da ima klorov atom zelo pomembno vlogo pri inhibiciji omenjenih encimov. Razlog za večjo aktivnost je lahko povečan hidrofobni značaj substituiranega pirolnega obroča, saj lahko klorov atom tvori hidrofobne interakcije v hidrofobnem žepu ATP vezavnega mesta encima. Poveča pa lahko tudi kislost pirolne amino spojine, s čimer se poveča moč vodikove vezi, ki nastane s stransko verigo aspartata (Asp73 pri DNA girazi iz *E. coli*, Asp81 pri DNA girazi iz *S. aureus*).

Če spojino 20 primerjamo s spojino 22, ki ima na pirolnem obroču vezana dva klorova atoma, vidimo, da je aktivnost le-te še dodatno izboljšana, saj dosega  $IC_{50}$  vrednost na DNA girazi iz *E. coli* 20 nM, močno pa se izboljša tudi inhibicija DNA giraze iz *S. aureus*, saj dosežemo  $IC_{50}$  vrednost 560 nM. Jakost inhibicije spojine 22 je v primerjavi z vsemi ostalimi spojinami tako največja. In ne samo to, aktivnost se pojavi kar na vseh

štirih izoliranih encimih. Dva klorova atoma, ki sta vezana na pirol, imata torej pomembno vlogo pri vezavi v tarčno mesto. Vse potencialne interakcije z vezavnim mestom encima, ki smo jih omenili pri spojini **20**, so pri diklorirani spojini **22** še bolj potencirane.

Spojina **21**, ki je metilni ester spojine **22** in prav tako vsebuje diklorosubstituirani pirolni obroč, izkazuje izboljšano inhibicijo DNA giraze iz *E. coli* z IC<sub>50</sub> vrednostjo 290 nM. Ker je predvidena vloga končne skupine, estra ali karboksilne kisline, tvorba interakcij s stransko verigo Arg136, lahko sklepamo, da ester **21** tvori s to AK vodikove vezi, medtem ko karboksilna skupina spojine **22** tvori verjetno tudi solni mostiček in/ali ionsko interakcijo. Kljub vsemu pa rezultati kažejo na pomembno vlogo interakcij v hidrofobnem žepu ATP vezavnega mesta. Z zmanjšanjem pirolamidnega dela iz 4,5-dibromopirolamida (18) do 4-kloro-5-metilpirolamida in 3,4-dikloro-5-metilpirolamida smo dosegli izboljšano aktivnost na DNA girazi iz *S. aureus*, kar potrjuje našo domnevo, da je hidrofobni žep pri tem encimu manjši kot pri encimu iz *E. coli*.

Vezavo najmočnejšega inhibitorja DNA giraze iz *E. coli* (spojina **22**) smo preučevali s pomočjo sidranja inhibitorja v vezavno mesto za ATP encima s programom FlexX (LeadIT, BioSolveIT, GmbH). Sidranje je potrdilo našo domnevo, da pirolamidni del spojine tvori dve vodikovi vezi, in sicer eno med amino skupino pirola in karboksilatom Asp73 ter drugo med karbonilno skupino inhibitorja in kristalno molekulo vode. Ta del molekule tvori tudi številne hidrofobne interakcije z aminokislinami Asn46, Val43, Ile94, Val120, Thr165 in Val167. 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol tvori v vezavnem mestu samo hidrofobne interakcije, medtem ko končni malonilni substituent tvori dve vodikovi vezi s stransko verigo Arg136 (slika 21).

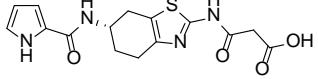
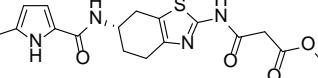
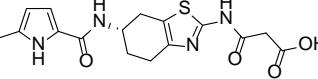
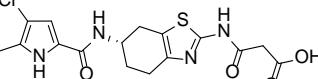
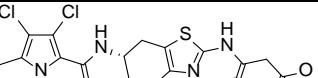
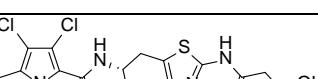


Slika 21: Predvidena vezava spojine **22** v vezavnem mestu za ATP DNA giraze iz *E. coli*. (levo) 3D prikaz vezave, pri čemer je encim označen modro, inhibitor rumeno, vodikove vezi pa črno. (desno) Shematski prikaz interakcij, pri čemer so vodikove vezi označene z rdečo, hidrofobne interakcije pa zeleno.

## 5.2.2 VREDNOTENJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Vse sintetizirane končne spojine smo testirali tudi na bakterijah *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* in *E. coli* (preglednica III).

Preglednica III: % inhibicije rasti na bakterijskih sevih *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* in *P. aeruginosa* pri spojinah 15, 17, 18, 20, 21, 22.

Oznaka spojine	Struktturna formula spojine	% inhibicije rasti pri 50 µM koncentraciji spojine			
		<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) – 24h	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) – 24h	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) – 24h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) – 24h
<u>15</u>		15,23	21,64	1,54	2,68
<u>17</u>		-5,22	8,02	1,63	10,33
<u>18</u>		-4,93	3,03	3,72	8,41
<u>20</u>		-8,23	2,71	2,54	1,96
<u>21</u>		90,47	96,85	0,16	6,99
<u>22</u>		-22,22	-11,88	4,42	-2,43

Iz rezultatov, predstavljenih v preglednici III, lahko sklepamo, da kljub dobrni inhibiciji DNA giraze, samo spojina 21 izkazuje protibakterijsko aktivnost proti po Gramu pozitivnim *S. aureus* in *E. faecalis*, saj je bil % inhibicije rasti večji od 90% pri 50 µM koncentraciji samo pri tej spojini. Rezultati ne korelirajo z encimsko aktivnostjo. V nasprotju z encimsko aktivnostjo je v tem primeru bolj aktivna spojina 21, ki je v obliki estra in ne kisline (primerjava spojin 21 in 22). Ester izkazuje boljšo protibakterijsko aktivnost, saj predvidoma lažje prehaja celično membrano bakterije zaradi njegove večje lipofilnosti. Spojini 21 smo določili tudi njen minimalno inhibitorno koncentracijo

(MIC<sub>90</sub>), ki je pri bakterijah *S. aureus* in *E. faecalis* znašala 50 µM, medtem ko je bila minimalna baktericidna koncentracija (MBC) večja od 75 µM.

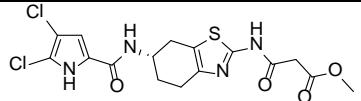
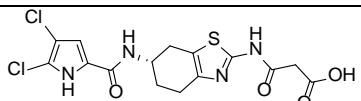
Rezultati nakazujejo tudi na to, da 4,5-dibromopirolamidi (18) niso izkazovali protibakterijske aktivnosti proti *S. aureus*, ker je bila inhibicija DNA giraze in topoizomeraze IV prešibka.

Če povzamemo, da smo prvič dosegli protibakterijsko aktivnost proti *S. aureus* derivatov 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazola, je bilo ključno izboljšanje inhibicije encimov, kar smo dosegli z optimizacijo substituentov na pirolnem obroču.

Nobena od testiranih spojin ni izkazovala protibakterijske aktivnosti proti po Gramu negativnim *E. coli* in *P. aeruginosa*. Glede na objavljene rezultate prve generacije 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnih inhibitorjev DNA giraze z 4,5-dibromo- in 4,5-dikloropirolamidno skupino (18) je razlogov verjetno več. Prvi razlog so neugodne fizikalno-kemijske lastnosti, predvsem kislost najboljših inhibitorjev **20** in **22**, ki onemogoča učinkovito prehajanje bakterijske celične stene.

Testiranje prej omenjenih spojin iz 1. generacije inhibitorjev (18) (preglednica IV) na sevu impA *E. coli*, ki ima povečano prepustnost celične stene, je pokazalo, da imajo nekatere spojine boljšo MIC vrednost (npr. pri spojini **26** se je MIC vrednost izboljšala iz >256 µg/mL na 32 µg/mL). Predvidevali smo tudi, da so spojine substrati izlivne črpalke tolC, saj so imele nekatere spojine boljšo MIC vrednost na sevu *E. coli*, ki je imel izbrisani gen, ki kodira to črpalko (npr. spojina **26**).

Preglednica IV: Primerjava MIC<sub>90</sub> spojin **26** in **27** na sevih tolC, impA in divjem sevu *E. coli*.

Oznaka spojine	Strukturna formula spojine	MIC <sub>90</sub> [µg/mL] na različnih sevih <i>E. coli</i>		
		divji sev	tolC	impA
<b>26</b>		>256	32	32
<b>27</b>		>256	>256	>256

Če povzamemo vse ugotovitve, brez substituentov na pirolu ni encimske in s tem tudi protibakterijske aktivnosti. Za aktivnost na encimu je optimalno, da imamo na

pirolnem obroču dva klorova substituenta in metilno skupino in da spojine nimamo v obliki estra, temveč kisline. Obratno je pri aktivnosti na bakterijah. Bolj aktivni so sicer prav tako analogi z dvema klorovima substituentoma, spojina pa mora biti v tem primeru v obliki estra, da lažje prehaja membrano.

Ne vemo, ali estrska oblika spojine v bakteriji dejansko deluje kot ester in v taki obliki interagira z encimom, ali pa se morda v citoplazmi bakterije hidrolizira in pravzaprav deluje kot kislina.

Zanimivo bi bilo tudi vedeti, kakšen vpliv na encimsko in protibakterijsko aktivnost bi imel analog z aromatsko karboksilno kislino, ki nam ga žal ni uspelo sintetizirati. Takšen analog bi imel višji pKa in večjo lipofilnost, kar bi lahko izboljšalo vstop v citoplazmo bakterij in s tem na mesto delovanja ter bi ob dovolj močni inhibiciji encimov lahko rezultiralo v boljši protibakterijski aktivnosti. Vse to je lahko odlična iztočnica za nadaljnje raziskovanje.

## 6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali 6 potencialnih inhibitorjev DNA giraze in topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*, pri čemer smo izhajali iz strukture nedavno odkritih inhibitorjev DNA giraze iz *E. coli* s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim ogrodjem. Namen je bil optimizacija substituentov na pirolnem obroču, s čimer bi povečali lipofilnost pirolnega fragmenta in tako izboljšali vezavo ozziroma hidrofobne interakcije spojin na encimu DNA giraza in topoizomeraza IV. Zanimalo nas je predvsem ali lahko z optimizacijo substituentov na pirolnem obroču izboljšamo inhibicijo DNA giraze iz *S. aureus* in s tem dosežemo protibakterijsko aktivnost.

Vseh 6 spojin smo testirali na izoliranih encimih DNA giraza in topoizomeraza IV iz *E. coli* in *S. aureus* in tudi na izbranih bakterijskih sevih *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* in *P. aeruginosa*. Naš cilj smo izpolnili, saj smo z uvajanjem dodatnih klorovih atomov in metilne skupine na pirolni obroč izjemno izboljšali inhibitorno aktivnost na izoliranih encimih. Spojina **15**, ki na pirolnem obroču ni vsebovala nobenih substituentov, je bila neaktivna na vseh štirih izoliranih encimih. Spojina **22**, ki je imela na pirol vezana dva klorova atoma in metilno skupino, se je izkazala kot najuspešnejša, saj je inhibirala oba encima sevov *E. coli* in *S. aureus*, vrednosti IC<sub>50</sub> pa so pri DNA girazi prešle v nanomolarno območje, medtem ko je bila inhibicija topoizomeraze IV še vedno v mikromolarnem območju. Kislinska oblika - spojina **22** se je v izkazala kot močnejši inhibitor v primerjavi z estrsko spojino **21**. S primerjavo rezultatov inhibicije bromopirolnih analogov, ki so bili predhodno sintetizirani na fakulteti, smo potrdili domnevo, da je hidrofobni žep pri DNA girazi iz *S. aureus* manjši v primerjavi s tistim pri DNA girazi iz *E. coli*, zato so za inhibicijo DNA giraze seva *S. aureus* klorirani analogi boljši inhibitorji kot bromirani, pri čemer je pomemben tudi položaj halogenov na pirolu.

Pri testiranju na bakterijah smo ugotovili, da je za aktivnost prav tako ključnega pomena metilna skupina in dikloro substitucija na pirolnem obroču. Spojina mora biti v tem primeru v obliki estra, zato da lahko prehaja bakterijsko celično steno. Aktivnost je pokazala le spojina **21**, in sicer na sevih *S. aureus* in *E. faecalis* (več kot 90% inhibicija pri 50 µM koncentraciji spojine), na *E. coli* in *P. aeruginosa* pa ni bilo aktivnosti.

Strukturo inhibitorja bi se morda dalo še izboljšati s substitucijo karboksilne kisline s kakšnim drugim kislinskim derivatom, ki bi še povečal lipofilnost spojine, to pa je lahko odlična ideja za nadaljnje raziskovanje.

## **7. LITERATURA**

- (1) Cerar T.: Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2010, str. 15.
- (2) Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002, str. 3-31, 33-47, 427-446.
- (3) Boyer R.: Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba, 2005, str. 244-257.
- (4) Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 1. izd. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007, str. 28-29.
- (5) Dale M.: Pharmacology condensed. 2. izd. Churchill Livingstone, 2009, str. 106-112.
- (6) Rang and Dale's Pharmacology. 7. izd. Churchill Livingstone, 2012, str. 613-637.
- (7) Janeš D.: Odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin v lesnih glivah. Farmacevtski vestnik, 2008, 95, str. 239-240.
- (8) Foye's principles of medicinal chemistry. 6. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, str. 1577-1583.
- (9) Chopra I.: New antimicrobial agents: Why we need them and what molecular targets should we choose? Farmacevtski vestnik, 2007, 58, str. 20.
- (10) Bax B. D., Chan P. F., Eggleston D. S., Fosberry A., Gentry D. R., Gorrec F., Giordano I., Hann M. M., Hennessy A., Hibbs M., Huang J., Jones E., Jones J., Brown K. K., Lewis C. J., May E. W., Saunders M. R., Singh O., Spitzfaden C. E., Shen C., Shillings A., Theobald A. J., Wohlkonig A., Pearson N. D., Gwynn M. N.: Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. Nature, 2010, Vol 466, str. 935-939.
- (11) Maxwell A.: DNA gyrase as a drug target. Trends Microbiol, 1997, 5, str. 102-109.
- (12) Champoux J.J.: DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. Annu Rev Biochem, 2001, 70, str. 369-413.
- (13) Sherer B. A., Hull K., GreenO., BasarabG., Hauck S., Hill P., Loch III J. T., Mullen G., Bist S., Bryant J., Boriack-Sjodin A., Read J., DeGrace N., Uria-Nickelsen M., Illingworth R. N., Eakin A. E.: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21, str. 7416-7420.
- (14) Tomašič T., Peterlin Mašič L.: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. Curr Top Med Chem, 2014, Vol. 14, No. 1., str. 1-21.

- (15) Graham L. P.: An Introduction to Medicinal Chemistry. New York: Oxford University Press, 1995, str. 166-217.
- (16) Mayer C., Janin Y. L.: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chem Rev*, 2014, 114, str. 2313-2342.
- (17) Oblak M., Kotnik M., Solmajer T.: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Curr Med Chem*, 2007, 14, str. 2033-2047.
- (18) Tomašič T., Katsamakas S., Hodnik Ž., Ilaš J., Brvar M., Solmajer T., Montalvão S., Tammela P., Banjanac M., Ergović G., Anderluh M., Peterlin Mašič L., Kikelj D.: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-*d*] thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *J Med Chem*, 2015, 58, str. 5501-5521.
- (19) Brvar M., Perdih A., Renko M., Anderluh G., Turk D., Solmajer T.: Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *J Med Chem*, 2012, 55, str. 6413-6426.
- (20) Gubaev A., Klostermeier D.: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA Repair*, 2014, 16, str. 23-34.
- (21) Ronkin S. M., Badia M., Bellon S., Grillot A-L., Gross C. H., Grossman T. H., Mani N., Parsons J. D., Stamos D., Trudeau M., Wei Y., Charifson P. S.: Discovery of pyrazolthiazoles as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase. *Biorg Med Chem Lett*, 2010, 20, str. 2828-2831.
- (22) Eakin A. E., Green O., Hales N., Walkup G. K., Bist S., Singh A., Mullen G., Bryant J., Embrey K., Gao N., Breeze A., Timms D., Andrews B., Uria-Nickelsen M., Demeritt J., Loch III J. T. , Hull K., Blodgett A., Illingworth R. N., Prince B., Boriack-Sjodin P. A., Hauck S., MacPherson L. J., Ni H., Sherer B.: Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. *Ant Age Chem*, 2012, 56, str. 1240–1246.
- (23) Introduction to Spectroscopy. 3. izd. Washington: Thomson Learning, 2001.
- (24) Rücker G., Neugebauer M., Willems G. G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2001.
- (25) Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M., Pečar S.: Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010.
- (26) Tišler M.: Organska kemija. Ljubljana: DZS, 1982.

- (27) Požgan F., Štefane B.: Uvod v laboratorijsko organsko kemijo. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2009.
- (28) [http://sl.wikipedia.org/wiki/Sandmeyerjeva\\_reakcija](http://sl.wikipedia.org/wiki/Sandmeyerjeva_reakcija) (dostopano: 23.8.2015)
- (29) <https://sl.wikipedia.org/wiki/Hidroliza> (dostopano: 23.8.2015)
- (30) [https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophilic\\_substitution](https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophilic_substitution) (dostopano: 23.8.2015)
- (31) [https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleophilic\\_substitution](https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleophilic_substitution) (dostopano: 23.8.2015)
- (32) <https://en.wikipedia.org/wiki/HATU> (dostopano 30.8.2015)
- (33) Basarab G. S., Hill P. J., Garner C. E., Hull K., Green O., Sherer B. A., Dangel P. B., Manchester J. I., Bist S., Hauck S., Zhou F., Uria-Nickelsen U., Illingworth R., Alm R., Rooney M., Eakin A. E.: Optimization of Pyrrolamide Topoisomerase II Inhibitors Toward Identification of an Antibacterial Clinical Candidate (AZD5099). *J Med Chem*, 2014, 57, str. 6060-6082.
- (34) Bisacchi G.S., Manchester J.I.: A New-Class Antibacterial Almost Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infect Dis*, 2015, 1, str. 4-41.
- (35) <https://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin> (dostopano: 6.9.2015)
- (36) <https://en.wikipedia.org/wiki/Aminocoumarin> (dostopano: 2.9.2015)
- (37) <http://science-tuition.co.uk/bacterial-cell/> (dostopano: 23.5.2015)
- (38) <http://study.com/academy/lesson/peptidoglycan-definition-function-structure.html> (dostopano: 23.5.2015)
- (39) <https://www.studyblue.com/notes/note/n/4-staphlococci/deck/5254568> (dostopano: 23.5.2015)
- (40) [http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/04a\\_Gram/Gram.htm](http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/04a_Gram/Gram.htm) (dostopano: 23.5.2015)
- (41) <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/dna1.htm> (dostopano: 23.8.2015)
- (42) [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/box/nrmicro1088\\_BX1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/box/nrmicro1088_BX1.html) (dostopano: 24.5.2015)
- (43) <https://www.linkedin.com/pulse/20140827022606-81529689-cbst-the-cliffhanger-or-fortune-500-sleeper> (dostopano: 23.5.2015)