

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KOGOJ

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

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KOGOJ

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

**SYNTHESIS OF PYRROLAMIDE DERIVATIVES OF
4,5,6,7-TETRAHYDROBEZNO[1,2-*d*]THIAZOLE-2,6-DIAMINE AS A DNA GYRASE B INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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 Jožefa Štefana v Ljubljani. *In vitro* testiranja so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (encimska testiranja) in na Univerzi v Helsinki (določanje protibakterijske aktivnosti).

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za strokovno posredovanoto znanje in izkušnje, trud, predanost mentorskemu delu ter prijaznost in ustrežljivost pri izdelavi magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi staršem in prijateljem, ki so mi stali ob strani tekom celotnega študija in me pri tem spodbujali.

Izjava

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

Anja Kogoj

Ljubljana, 2016

VSEBINA

1.	UVOD	1
1.1.	Bakterijska celica	1
1.2.	Razvoj odpornosti proti prribakterijskim učinkovinam.....	2
1.3.	Topoizmomeraze II	3
1.3.1.	DNA-giraza in topoizomeraza IV	4
1.3.2.	Podrobnejši opis strukture DNA-giraze.....	5
1.3.3.	Mehanizem delovanja DNA-giraze	6
1.3.4.	ATP-vezavno mesto	7
1.4.	Prribakterijske učinkovine, ki delujejo na topoizomeraze II	9
1.4.1.	Zavralci GyrA/ParC - fluorokinoloni	9
1.4.2.	Zavralci GyrB/ParE – novobiocin	9
1.5.	Razvoj pirolamidnih zavralcev.....	10
2.	NAČRT ZA DELO	16
3.	MATERIALI IN METODE.....	20
3.1.	Materiali	20
3.2.	Kromatografske metode	20
3.2.1.	TLC: tankoplastna kromatografija	20
3.2.2.	Kolonska »flash« kromatografija.....	21
3.2.3.	HPLC	21
3.3.	Spektroskopske metode.....	22
3.3.1.	Jedrska magnetna resonanca – NMR	22
3.3.2.	Infrardeča spektroskopija – IR	22
3.3.3.	Masna spektrometrija – MS	22
3.4.	IUPAC NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN	23
3.5.	NAČRTOVANJE SPOJIN-MOLEKULSKO SIDRANJE.....	23
3.6.	MERJENJE TEMPERATURE TALIŠČA	23
3.7.	BIOLOŠKA TESTIRANJA	23
4.	EKSPERIMENTALNI DEL	24

4.1. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata.....	24
4.2. Sinteza metil (<i>S</i>)-3-((6-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata	25
4.3. Sinteza (<i>S</i>)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-amonijevega klorida	26
4.4. Sinteza metil (<i>S</i>)-3-((6-(benzilamino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata	27
4.5. Sinteza metil 3-(((<i>S</i>)-6-((2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-2-okso-1-feniletil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata	28
4.6. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobrenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il-karbamata	29
4.7. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-azido-4,5,6,7,tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il karbamata.....	30
4.8. Sinteza metil (<i>S</i>)-3-((6-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)benzoata.....	31
4.9. Sinteza etil (<i>S</i>)-(2-((6((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetata.....	31
4.10. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-(2-hidrazinil-2-oksoacetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata	32
4.11. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il) karbamata.....	33
4.12. Sinteza (<i>S</i>)-2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-amonijevega klorida	34
4.13. Sinteza reagenta: 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etan-1-ona	35
4.14. Sinteza (<i>S</i>)-4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-(metilsulfonamido)-4,5,6,7-tetrahidro[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.....	35
4.15. Sinteza (<i>S</i>)-3,4-dikloro-5-metil- <i>N</i> -(2-(metilsulfonamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	36

4.16. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il) karbamata	37
4.17. Sinteza (<i>S</i>)-2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -1-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-amonijevega klorida	39
4.18. Sinteza metil (<i>S</i>)-3-((2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksadimo)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoata	40
4.19. Sinteza (<i>S</i>)-3-((2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanojske kisline	42
4.20. Sinteza etil (<i>S</i>)-2-((2-(((4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)metil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata	43
4.21. Sinteza (<i>S</i>)-2-((2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetne kisline	44
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1. Komentar sinteznih postopkov	45
5.1.1. Zaščita aminske skupine na mestu 6	45
5.1.2. Sinteza amida s kislinskim kloridom (N-aciliranje)	45
5.1.3. Odščita amina.....	47
5.1.4. Reduktivno aminiranje.....	47
5.1.5. Sinteza metil 3-(((6 <i>S</i>)-6-((2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-2-okso-1-feniletil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata (spojina 6)	49
5.1.6. Reakcije s sklopitvenimi reagenti	49
5.1.7. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il-karbamata (spojina 7).....	51
5.1.8. Sinteza z natrijevim azidom	52
5.1.9. Sinteza metil (<i>S</i>)-3-((6-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-2-il)amino)benzoata.....	53
5.1.10. Reakcija s hidrazin monohidratom	53
5.1.11. Sinteza sulfonamidov	54
5.1.12. Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2- <i>d</i>]tiazol-6-il)karbamata.....	54

5.1.13. Hidroliza estra.....	55
5.1.14. Ekstrakcija.....	56
5.2. Rezultati in komentar bioloških testiranj.....	57
6. SKLEP	61
7. LITERATURA.....	63

Kazalo slik

Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivne bakterije.	1
Slika 2: Zgradba celične stene po Gramu negativne bakterije.....	2
Slika 3: Kristalni strukturi heterotetramerne oblike encima DNA-giraze in topoizomeraze IV.....	4
Slika 4: Struktura DNA-giraze kot glavne tarče sintetiziranih zaviralcev.	5
Slika 5: Mehanizem delovanja DNA-giraze.	6
Slika 6: Kristalna struktura GHKL domene DNA-giraze v kompleksu z ADPNP.	7
Slika 7: Podrobnejši prikaz interakcij ATP-vezavnega mesta GyrB podenote <i>E. coli</i> in molekule ATP.....	8
Slika 8: Prikaz interakcij vezave novobiocina v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze B....	10
Slika 9: Kristalna struktura klorobiocina v ATP-vezavnem mestu ter prikaz ključnih interakcij med zavircem in tarčo.....	11
Slika 10: Primerjava vezave pirolnega fragmenta in molekule ATP v ATP-vezavno mesto GyrB <i>S. aureus</i>	12
Slika 11: Spojina vodnica: prikaz tvorbe interakcij zaviralca (spojine 7) v ATP-vezavnem mestu GyrB iz <i>E. coli</i>	15
Slika 12: Analogi oroidina: optimizacija obstoječih zaviralcev DNA-giraze in razvoj obratnih analogov s 4,5-dibromopirolnim fragmentom na mestu 2 osnovnega ogrodja....	16
Slika 13: Prikaz vezave novega potencialnega zaviralca DNA-giraze B v ATP-vezavno mesto.....	17
Slika 14: Prikaz želenega in neželenega produkta reakcije zaščite amina v obliki Boc-karbamata.....	45
Slika 15: Reakcija tvorbe amidne vezi s kislinskim kloridom.....	46
Slika 16: Odščita Boc zaščitne skupine z acidolizo.....	47
Slika 17: Reakcija <i>in situ</i> nastanka HCl med acetilkloridom in metanolom.	47
Slika 18: Reakcija reduktivnega aminiranja med aminom in benzaldehidom.....	48

Slika 19: Prikaz stranskih produktov reduktivnega aminiranja.....	49
Slika 20: Mehanizem aktivacije kisline s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU in sinteza spojine 6	50
Slika 21: Mehanizem aktivacije kislinskega derivata s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC in HOBr in sinteza spojine 17	51
Slika 22: Mehanizem nastanka 2-bromotiaznolnega produkta (spojava 7) po mehanizmu Sandmeyerjeve reakcije.....	52
Slika 23: Reakcija nukleofilne aromatske substitucije z natrijevim azidom.	52
Slika 24: Reakcija med hidrazin monohidratom in karbonilno skupino estra-želen produkt reakcije in karbonilno skupino amida-dejanski produkt reakcije.....	54
Slika 25: Reakcija sinteze sulfonamida.	54
Slika 26: Primer spojine, ki absorbira pri 254 nm in spojine, ki tudi fluorescira pri 366 nm.	55
Slika 27: Alkalna hidroliza estra in nastanek kislinskega derivata.....	56
Slika 28: Prikaz tvorbe vodikovih vezi med DNA-girazo iz <i>E. coli</i> in spojinama 20 in 21	59

Kazalo shem in preglednic

Shema 1: Pogoji in reagenti predvidene reakcijske poti 1.....	17
Shema 2: Pogoji in reagenti predvedene reakcijske poti 2.....	18
Shema 3: Pogoji in reagenti predvidene reakcijske poti 3.....	19
Preglednica I: Knjižnica fragmentov iz podjetja AstraZeneca.	12
Preglednica II: Primerjava zaviralnih aktivnosti in protibakterijskega delovanja spojin 1 , 2 in 3	13
Preglednica III: Primerjava zaviralne aktivnosti spojin 5 , 6 , 7 , 8 in 9	14
Preglednica IV: Pregled uporabljenih sklopitvenih reagentov.	50
Preglednica V: Rezultati zaviralnih aktivnosti končnih sintetiziranih spojin podani kot RA [%] in IC ₅₀ [μ M] vrednosti	58

POVZETEK

Odpornost proti protibakterijskim učinkovinam predstavlja v svetu vedno večji problem, zato poteka v farmacevtski industriji pospešeno raziskovanje novih tarč in mehanizmov delovanja protibakterijskih učinkovin. Kot tarča, ki omogoča selektivno toksičnost za razvoj novih učinkovin s protibakterijskim delovanjem, se je izkazal encim DNA-giraza, ki pripada skupini topoizomeraz IIA. Gre za skupino encimov, ki so zadolženi za spremjanje topološkega stanja molekule DNA. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB, ki skupaj tvorijo heterotetramerno strukturo A₂B₂. Njena naloga je uvajanje dodatnih negativnih zavojev v molekulo DNA in je nujno potrebna pri procesu podvojevanja DNA.

Pri razvoju novih potencialnih zaviralcev smo izhajali iz naravne spojine oroidina, alkaloida iz spužve *Agelas sp.* Ta deluje na podenoto B DNA-giraze in se veže v ATP-vezavno mesto. Zaviralec tako prepreči vezavo molekule ATP in s tem njeno hidrolizo ter tako prepreči podvojevanje DNA in nadaljnjo rast in razmnoževanje bakterij. Edini zaviralec DNA-giraze B, ki je bil do sedaj v uporabi v klinični praksi, je novobiocin.

Sinteze končnih spojin so temeljile na optimizaciji spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskim osnovnim ogrodjem, ki so bile predhodno odkrite in sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. S pomočjo strukturno podprtega načrtovanja spojin smo načrtovali in nato sintetizirali analoge že obstoječih spojin, ki imajo 4,5-dibromopirolni obroč vezan na mestu 6 osnovnega ogrodja ter obratne analoge, ki imajo 4,5-dibromopirolni del vezan na mestu 2 osnovnega ogrodja. Sintetizirani zaviralcji oponašajo vezavo molekule ATP v ATP-vezavno mesto prek tvorbe dveh H-vezi z aminokislinskim ostankom Asp73. Dodatne interakcije med zavircem in encimom se tvorijo v hidrofobnem žepu ATP-vezavnega mesta ter z aminokislinskima ostankoma Arg76 in/ali Arg136.

Spojine smo sintetizirali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Po optimizaciji sinteznih postopkov smo dobili 6 (*S*)-enantiomernih končnih spojin. Spojine smo ovrednotili s pomočjo NMR in IR spektroskopije ter masne spektrometrije. Potencialnim novim zavircem so bile izmerjene tudi zaviralne aktivnosti na izolirani DNA-girazi B iz bakterije *Escherichia coli* in protibakterijske aktivnosti na 4 različnih bakterijskih sevih. Vse spojine, razen spojine **21**, so izkazovale zaviralno aktivnost v

mikromolarnem območju. Vrednost IC_{50} najmočnejšega zaviralca **21** pa je segala v nanomolarno območje. Vseh 6 končnih spojin ima šibko protibakterijsko aktivnost.

ABSTRACT

Nowadays, resistance to antibiotics represents a worldwide growing problem and therefore stimulates pharmaceutical industry to explore new targets and mechanisms of action of new antibacterial agents. DNA gyrase has proved to be a potential and selective target for development of new substances with antibacterial activity. Enzyme belongs to a group of bacterial IIA topoisomerases, which are responsible for changing the topological state of DNA molecules. DNA gyrase is a heterotetrameric protein with two GyrA and two GyrB subunits (A_2B_2) and is involved in negative supercoiling of DNA during replication. This process is necessary for continuation of replication of DNA molecules.

In the design of new potential inhibitors of DNA gyrase we proceeded from the natural compound oroidin, which is an alkaloid from sponge *Agelas sp.* Inhibitor binds into the ATP-binding site of B subunit of DNA gyrase. This prevents the binding and hydrolysis of ATP molecules, which is necessary for DNA replication and bacterial growth. The only GyrB inhibitor, which has been used in clinical practice was novobiocin.

Synthesis of our compounds was based on the optimization of compounds with 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[1,2-*d*]thiazole-2,6-diamine scaffold, which was previously discovered and synthesized at the Chair of pharmaceutical chemistry at the Faculty of Pharmacy. With the help of structure-based design we have designed and synthesized analogs of existing compounds that have 4,5-dibromopyrrole fragment at position 6 of the scaffold and their inverse analogs with 4,5-dibromopyrrole fragment at position 2 of the scaffold. Inhibitors of GyrB partially mimic the binding of ATP molecule in the ATP-binding site by the formation of two hydrogen bonds with the Asp73. Other important interactions between the enzyme and inhibitor are formed in a hydrophobic pocket of the ATP-binding site and with Arg76 and Arg136.

All our compounds were synthesized at the Faculty of Pharmacy. Through the optimization of the synthetic procedures we prepared 6 final compounds as (*S*)-enantiomers. Their structures were confirmed by using NMR and IR spectroscopy and mass spectrometry techniques. Final compounds were tested for their inhibitory activity on *Escherichia coli* DNA gyrase and antibacterial activity against four bacterial strains. All tested compounds show micromolar inhibitory activity, with the exception of compound **21**, which displayed nanomolar inhibition, and they possess weak antibacterial activity.

SEZNAM OKRAJŠAV

- ♦ **ADPNP** *adenozin-5'-[β,γ-imido]-trifosfat*
- ♦ **ATP** *adenozin trifosfat*
- ♦ **CDI** *1,1'-karbonildiimidazol*
- ♦ **d** *doublet*
- ♦ **DBU** *1,8-diazobiciklo[5.4.0]undek-7-en*
- ♦ **Dd** *doublet doubleta*
- ♦ **DIPEA** *N,N-diizoetilpropilamin*
- ♦ **DKM** *diklorometan*
- ♦ **DMF** *N,N-dimetilformamid*
- ♦ **DMAP** *4-dimetilaminopiridin*
- ♦ **DNA** *deoksiribonukleinska kislina*
- ♦ **EDC** *N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid*
- ♦ **GHKL** *Giraza, Hsp90, histidin kinaza, MutL*
- ♦ **GyrA** *DNA-giraza A*
- ♦ **GyrB** *DNA-giraza B*
- ♦ **HATU** *1-(bis(dimetilamino)metilen)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin 3-oksid heksafluorofosfat*
- ♦ **HOBr** *1-hidroksibenzotriazol*
- ♦ **IC₅₀** *koncentracija zaviralca, ki povzroči 50% zaviranje encima*
- ♦ **IR** *infrardeča spektroskopija*
- ♦ **m** *multiplet*
- ♦ **MF** *mobilna faza*
- ♦ **MIC** *minimalna zaviralna koncentracija*
- ♦ **MRSA** *methicilline-resistant *Staphylococcus aureus*; proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus**
- ♦ **MS** *masna spektrometrija*
- ♦ **NMR** *jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)*
- ♦ **ParC** *podenota C topoizomeraze IV*
- ♦ **ParE** *podenota E topoizomeraze IV*
- ♦ **QRDR** *Quinolone-resistance determining region; regija, ki kodira odpornost proti kinolonom*

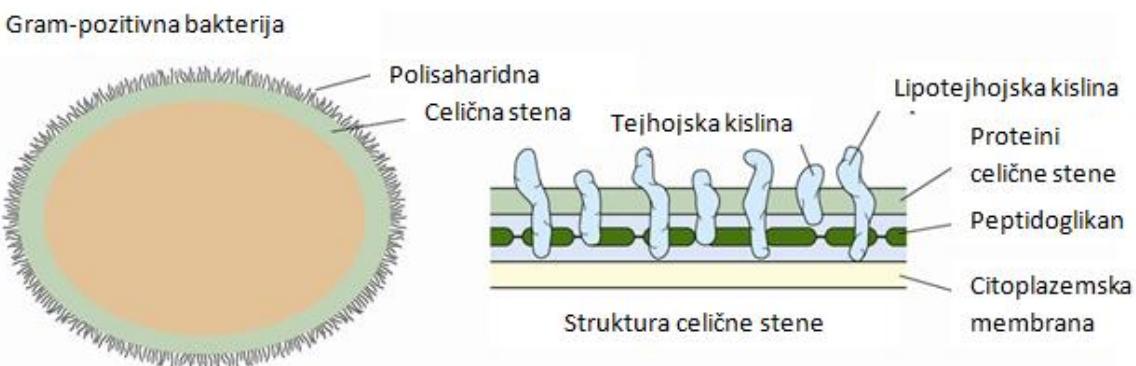
- ♦ **RA** rezidualna aktivnost (100% delovanje encima - % zaviranja encima pri določeni koncentraciji)
- ♦ **RF** retencijski faktor
- ♦ **s** singlet
- ♦ **THF** tetrahidrofuran
- ♦ **VRSA** vancomycin resistant *S. aureus*; proti vankomicinu odporen *S. aureus*

1. UVOD

1.1. Bakterijska celica

Bakterijska celica se po svoji zgradbi razlikuje od človeške. Prva spada med tako imenovane prokarionte, ki imajo nekoliko preprostejšo strukturo, medtem ko človeško celico uvrščamo med evkarionte. Prokariontske celice so manjše, imajo manjše število celičnih organelov, obdane so s celično membrano in nimajo jedra. Vsaka celica ima en sam kromosom, v katerem se nahaja dvovijačna krožna molekula DNA. Poleg tega ima bakterijska celica lahko prisotne tudi plazmide, kjer se nahaja izven kromosomske molekule DNA. Ta se razmnožuje neodvisno od centralnega genoma in je pogosto odgovorna za odpornost proti protibakterijskim učinkovinam. (1, 3)

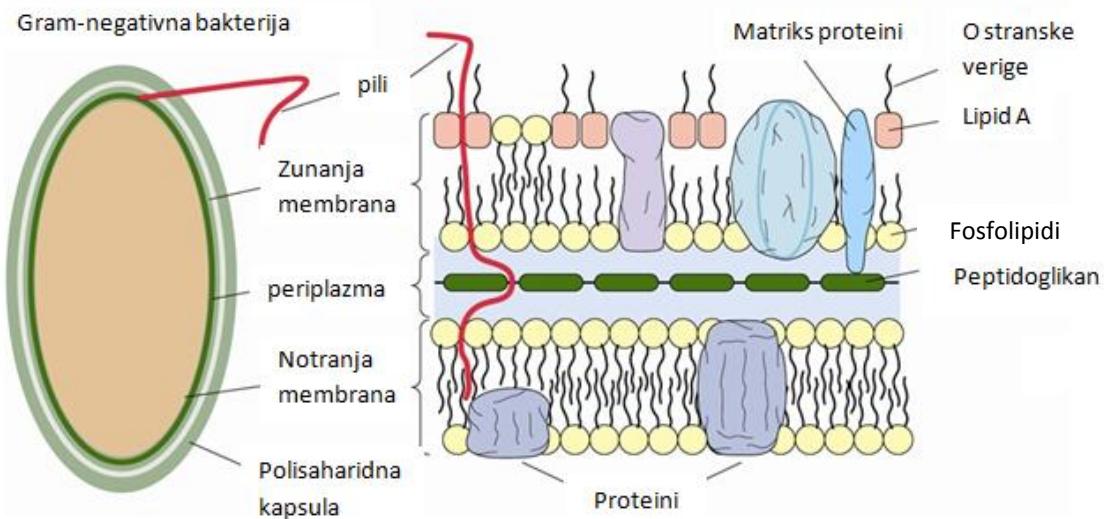
Tudi bakterijske celice se med seboj razlikujejo, zato jih delimo na po Gramu pozitivne (G+) in po Gramu negativne (G-) bakterije. Obe vrsti imata podobne notranje celične strukture, razlikujeta se predvsem v zgradbi celične stene. G+ bakterije imajo debelo plast peptidoglikana in lahko tvorijo pore, ki jim omogočajo preživetje v stresnih pogojih. Peptidoglikan daje celici obliko, nujen je za njeno preživetje in replikacijo ter je pomembna tarča nekaterih protibakterijskih učinkovin. Pri G+ bakterijah sta v celični steni prisotni tejhojska in lipotejhojska kislina (**Slika 1**). (3)



Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivne bakterije. (Prirejeno po (17))

G- bakterije so strukturno nekoliko kompleksnejše. Imajo tanko plast peptidoglikana, ki predstavlja od 5-10% mase celice. Njihova posebnost je dodatna zunanjega membrana (**Slika 2**). Ta ohranja celično strukturo in deluje kot pregrada pri prehodu hidrofobnih molekul in makromolekul. Njena glavna komponenta so endotoksi, ki so skupni vsem G- bakterijam in so ključni za preživetje celice. Med peptidoglikansko membrano in zunanjim

membrano je periplazemski prostor, kjer se nahajajo številni hidrolitični encimi: proteaze, lipaze, nukleaze, fosfataze in drugi. Ti povzročijo hidrolizo makromolekul na manjše enote, ki nato vstopijo v metabolizem. (2, 3)



Slika 2: Zgradba celične stene po Gramu negativne bakterije. (Prirejeno po (17))

1.2. Razvoj odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam

Povečan pojav odpornosti bakterij proti protibakterijskim učinkovinam predstavlja velik svetovni problem. Z njim se srečujemo tako v bolnišnicah, kot tudi zunaj njih. (5) O klinični odpornosti proti protibakterijskim učinkovinam govorimo, ko vrednost MIC protibakterijske učinkovine za določen sev bakterij presega koncentracijo učinkovine, ki je še varna za uporabo v klinični praksi. Razvoj odpornosti se kaže kot neuspeh pri zdravljenju in ima pri kritično bolnih pacientih lahko resne posledice za njihovo zdravje. Velike težave predstavlja proti meticilinu (MRSA) in vankomicinu (VRSA) odporni *Staphylococcus aureus*, s katerima se srečujemo predvsem v bolnišnicah. Razširila pa se je tudi odpornost proti β -laktamskim antibiotikom. (11, 12) Posebej problematične so okužbe povzročene z odpornimi patogeni »ESKAPE« (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter species*). Te vrste bakterij povzročajo veliko obolenost in smrtnost. (5)

Pri razvoju odpornosti gre za rezultat naravne selekcije, ki ga moramo obravnavati kot pričakovan fenomen Darwinove teorije preživetja najmočnejših. Ta je lahko posledica genetske mutacije ali prevzema genetskega materiala iz druge bakterijske celice. Pri genetski mutaciji gre lahko za spremembo v molekuli DNA, kar pripelje do mutacije v

zapisu za določen gen, ki vsebuje zapis za tarčo protibakterijske učinkovine. Ta pojav opazimo pri številnih protibakterijskih učinkovinah, ki delujejo na DNA-girazo (fluorokinoloni, novobiocin). Številne bakterije vsebujejo gene, ki proizvajajo encime, ki kemijsko razgradijo učinkovino. Odpornost bakterij je lahko posledica prisotnosti izlivnih črpalk, ki aktivno črpajo učinkovino ven iz celice in onemogočajo njen delovanje v njej. Kot primer takega proteina je *tolC* protein, ki ga najdemo pri *E. coli*. Bakterija pa lahko gen za odpornost pridobi od druge bakterije s procesom konjugacije (preko plazmida), transformacije (gola DNA) ali transdukcijske (s pomočjo bakteriofaga). Pri konjugaciji gre za prenos gena s pomočjo plazmida, ki vsebuje zapis za odpornost proti protibakterijski učinkovini. Ta se razmnožuje neodvisno od kromosomske DNA in se ob stiku z drugo celico prenese. (20)

Da bi se izognili pojavi navzkrižne odpornosti protibakterijskih učinkovin, moramo pri razvoju učinkovin uporabiti druge mehanizme delovanja oziroma se osredotočiti na druge interakcije med zavircem in tarčo učinkovine. Pri načrtovanju novih spojin s protibakterijskim delovanjem moramo biti pozorni tudi na njihove ADME (A-absorpcija, D-porazdelitev, M-presnova, E-izločanje) lastnosti. (6)

Zaradi možnosti dvojnega ciljanja učinkovin in razlike v zgradbi med človeškimi in bakterijskimi topoizomerazami II, sta DNA-giraza in topoizomeraza IV zelo perspektivni tarči za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin, ki omogočata selektivno toksičnost. (6)

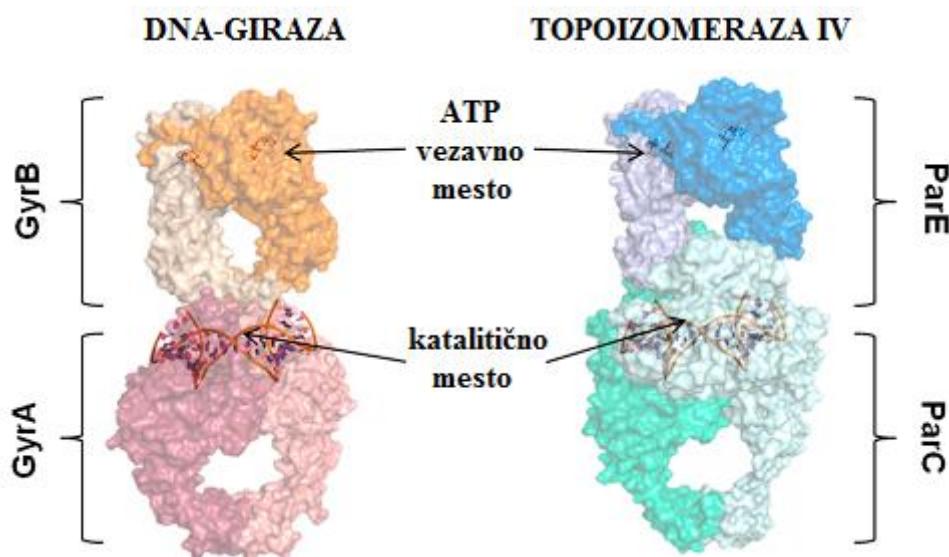
1.3. Topoizomeraze II

Bakterijska DNA je zaprta krožna molekula (sproščena oblika), kjer sta oba konca dvojne vijačnice med seboj kovalentno povezana. Če pa se linearna molekula, preden se zapre, vsaj enkrat zasuka okrog svoje osi, dobimo dodatno zvito DNA. Ta je manj stabilna kot sproščena oblika, vendar kljub temu obstaja *in vivo*. Prehode med obema oblikama DNA katalizirajo encimi topoizomeraze. Njihova naloga je spremiščanje topološkega stanja molekule. (1) Poznamo dva tipa topoizomeraz: **topoizomeraze I**, ki prekinejo eno verigo dvovijačne DNA in **topoizomeraze II**, ki prekinejo obe verigi dvovijačne DNA hkrati. (4) Med topoizomeraze IIA spadata encima DNA-giraza in topoizomeraza IV. Sta esencialna encime, ki sta nujno potrebna za preživetje bakterijske celice. Zgradba topoizomeraz pri prokariontih in evkariontih se nekoliko razlikuje. Evkariontske topoizomeraze II so homodimerne in so pomembna tarča protirakavih učinkovin, medtem

ko so prokariotske heterotetramerne strukture. Zaradi omenjenih razlik v strukturi sta encima selektivni tarči za načrtovanje protibakterijskih učinkovin z novim mehanizmom delovanja. Poleg tega sta encima zanimivi tarči zaradi možnosti dvojnega ciljanja učinkovin, kar predstavlja manjšo možnost za razvoj odpornosti proti tovrstnim učinkovinam, ker bi moralo priti do mutacije dveh genov znotraj iste generacije bakterij, kar je manj verjetno. Zaviralci pogosto zavirajo tako DNA-girazo kot tudi topoizomerazo IV, vendar z različno afiniteto. Ta je odvisna od kemijske strukture zaviralca in bakterijskega seva. Pri fluorokinolonih je kot glavna tarča pri G+ bakterijah topoizomeraza IV, pri G- pa DNA-giraza. (4, 5)

1.3.1. DNA-giraza in topoizomeraza IV

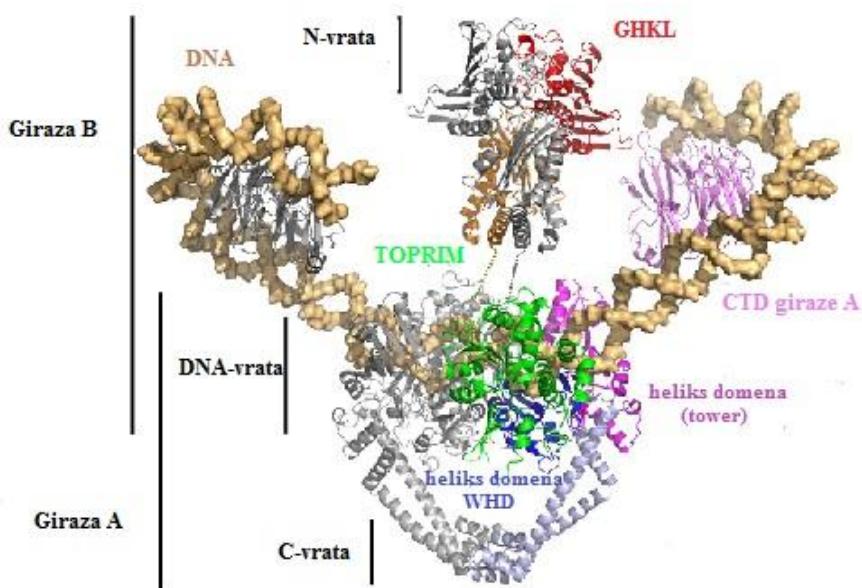
Encima sta sestavljena iz dveh podenot (**Slika 3**). DNA-girazo sestavljata dve podenoti GyrA in dve podenoti GyrB, ki skupaj tvorita aktivno heterotetramerno obliko encima A₂B₂. Topoizomeraza IV pa je iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE. Tudi ta encim ima heteroteramerno strukturo C₂E₂. Podenota ParC je homologna podenoti GyrA DNA-giraze, podenota ParE pa podenoti GyrB. Glavna naloga DNA-giraze je uvajanje dodatnih negativnih zavojev v krožno molekulo DNA in s tem zmanjšanje torzijske napetosti med procesom podvojevanja. Topoizomeraza IV pa igra glavno vlogo pri razpletanju hčerinskih verig ob koncu podvojevanja DNA in s tem nastanku dveh krožnih molekul DNA. (5)



Slika 3: Kristalni strukturi heterotetramerne oblike encima DNA-giraze (levo) in topoizomeraze IV (desno). (Prirejeno po (6))

1.3.2. Podrobnejši opis strukture DNA-giraze

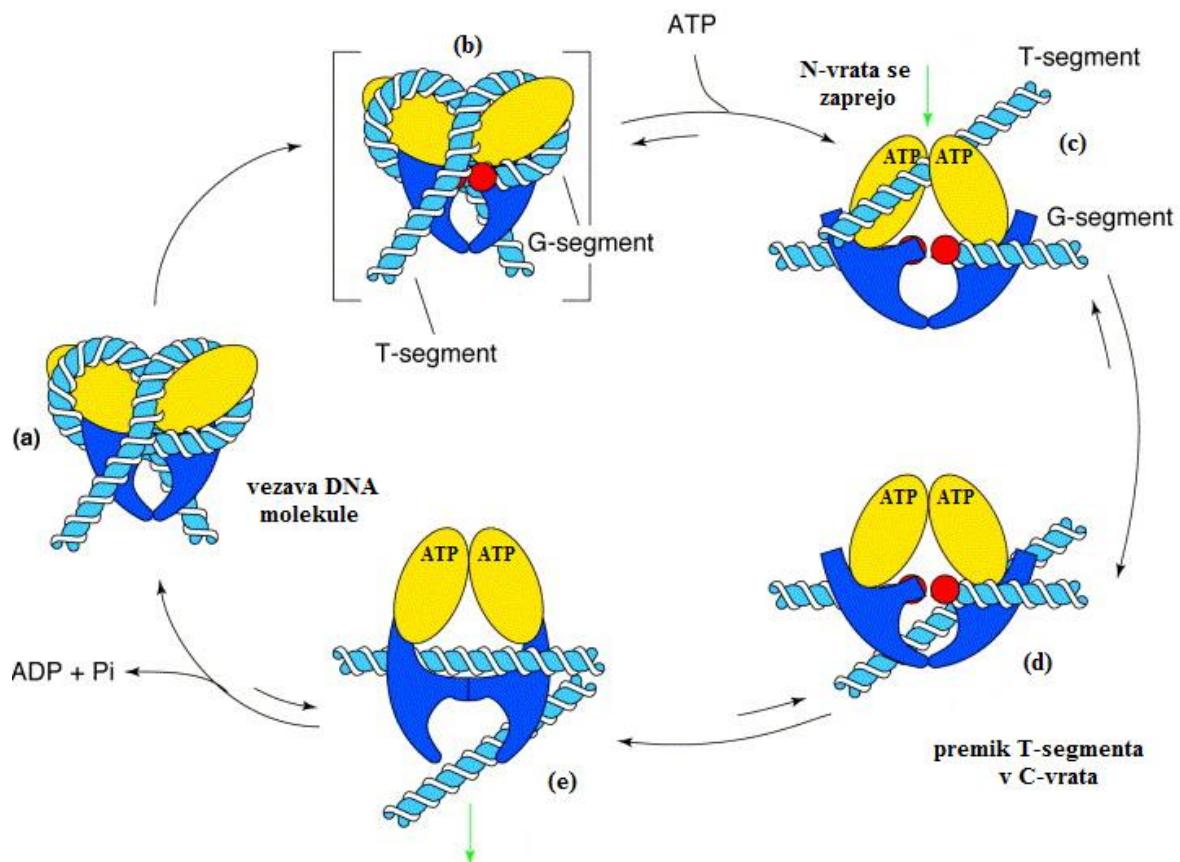
Celotna kristalna struktura topoizomeraz II še ni znana. Znani so pa posamezni deli DNA-giraze, na podlagi katerih lahko sklepamo na 3 različna področja encima: **N-vrata**, **DNA-vrata** in **C-vrata** (**Slika 4**). N-vrata sestavljata dve podenoti GyrB, podrobneje ATPazna domena in pretvornik (ang. transducer). ATPazna domena je iz naddružine GHKL proteinov (GyrB-Hsp90-histidin/serin protein kinaze-MutL). To področje encima je zadolženo za vezavo molekule ATP, ki s cepitvijo fosfodiesterske vezi dobi energijo za podvojevanje DNA, ki jo katalizira GyrA. Pretvornik služi kot komunikator med DNA- in N-vrati. DNA-vrata sestavljajo C-končna domena podenot GyrB imenovana TOPRIM, ki ima vezavno mesto za Mg^{2+} ione in N-končni heliks domeni podenot GyrA (ang. WHD and tower domain). C-vrata tvorijo majhne kroglaste domene na konici obvite vijačnice. N-končni heliks domeni GyrA in majhne kroglaste domene posredujejo nastanek dimera v obliki srca. C-končna domena GyrA (CTD) ima glavno vlogo pri zvijanju molekule DNA. Vrata se zaporedno odpirajo in zapirajo ter tako omogočijo prehod dvovijačne molekule DNA v različnih fazah katalitičnega cikla (**Slika 4**). (5, 6, 7)



Slika 4: Struktura DNA-giraze kot glavne tarče sintetiziranih zaviralcev. (Prirejeno po (7))

1.3.3. Mehanizem delovanja DNA-giraze

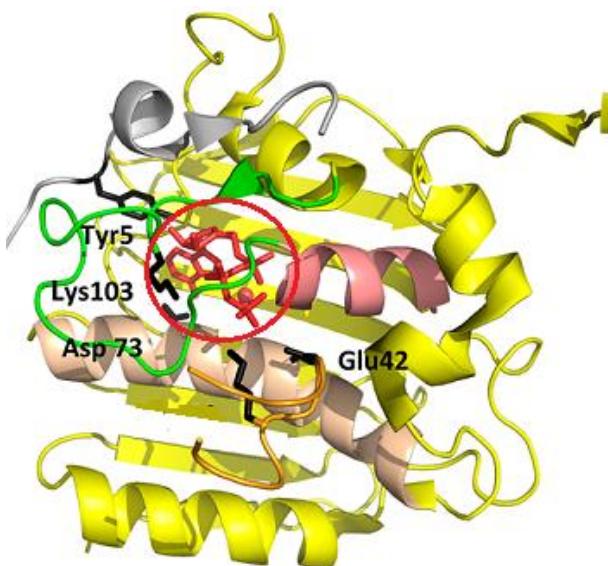
Mehanizem delovanja DNA-giraze je prikazan na **Sliki 5**. V prvi stopnji (**a**) pride do pozitivnega dodatnega zvijanja molekule DNA. To je posredovano preko CTD regije, ki predstavlja središče zvijanja DNA in od ATP odvisno relaksacijo verige. G-segment se veže v katalitično jedro encima (DNA-vrata). Z nukleofilnim napadom tirozinskega ostanka, pride do pretrganja G-sementa (**b**). Temu sledi vezava molekule ATP in dimerizacija ATPazne domene, kar povzroči zapiranje N-vrat (**c**) in ujetje T-sementa. Sledi odpiranje DNA-vrat in premik T-sementa preko razcepljenega G-sementa iz zgornje v spodnjo votlino (**d**). Po ponovnem zaprtju DNA-vrat, se oba dela G-sementa ponovno povežeta, T-sement pa izstopi skozi C-vrata (**e**). Rezultat delovanja DNA-giraze je negativno dodatno zvita molekula DNA, kar omogoča nadaljevanje podvojevanja molekule. Po hidrolizi fosfatov v obeh molekulah ATP pride do ponovnega odpiranja N-vrat in vrnitve DNA-giraze v začetno konformacijo. Encim je tako pripravljen za naslednjo reakcijo uvajanja negativnega zavoja v molekulo DNA. (6)



Slika 5: Mehanizem delovanja DNA-giraze. (Prirejeno po (24))

1.3.4. ATP-vezavno mesto

ATP-vezavno mesto DNA-giraze B je glavna tarča odkrivanja novih zaviralcev s protibakterijskim delovanjem. ATPazna domena je 43 kDa velik protein, sestavljen iz N-končnih fragmentov obeh GyrB podenot, ki tvorita v prisotnosti ATP ali ADPNP molekule dimer. Iz kristalne strukture kompleksa ADPNP in DNA-giraze vidimo, da molekula ADPNP leži na vrhu N-končne podenote na α_6 -heliku in se stika z α_4 -heliksom (**Slika 6**). (8, 9)



Slika 6: Kristalna struktura GHKL domene DNA-giraze v kompleksu z ADPNP (rdeče). α_6 -heliks-rožnata spirala, α_4 -heliks-peščena spirala, GHKL domena-rumen trak, Tyr5, Glu42, Asp73, Lys307, Lys337-črne palčke. (Prirjeno po (8))

ATP-vezavno mesto je iz dveh strukturnih podenot - N-končne GHKL domene, ki jo sestavlja približno 220 aminokislinskih (AK) ostankov, ter C-končne domene z okrog 170 AK. Večina interakcij, ki jih tvori molekula ATP z DNA-girazo izvira iz GHKL domene. (8)

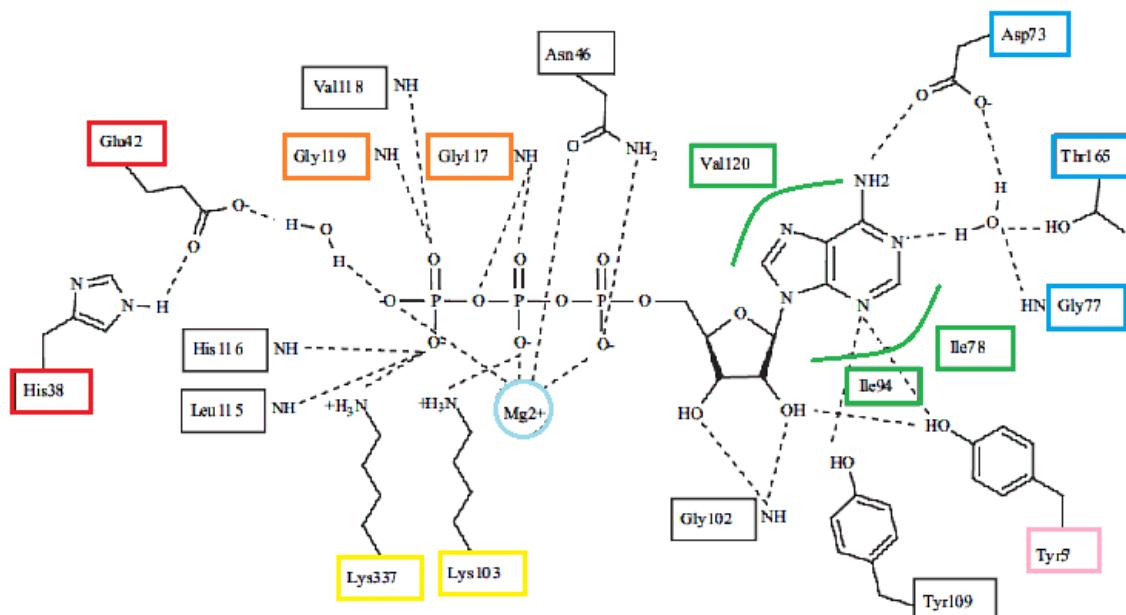
Glu42 (*E. coli*) naj bi predstavljal katalitični ostanek encima in je stabiliziran preko aminokislinskega ostanka His38 (rdeče). Glu42 (rdeče) sprejme proton od sosednje molekule vode in s tem povzroči njen aktivacijo. Aktivirana voda napade γ -fosfat molekule ATP in povzroči hidrolizo fosfata (ATP \rightarrow ADP + anorganski fosfat). (9)

Aminokislinski ostanki v vezavnem mestu lahko tvorijo interakcije z molekuljo ATP na več načinov (**Slika 7**). Iz N-končne domene (GHKL del ATPaze) se tvorijo vodikove vezi prek Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in

Gly102. Aminokislinski ostanki Val120, Ile78 in Ile94 (označeno z zeleno) tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo molekule ATP. Kristalna molekula vode, ki tvori vodikovo vez z adeninom molekule ATP in aminokislinskimi ostanki Asp73, Gly77 in Thr165 (označeno z modro) je pomemben strukturni element, saj tvori interakcije tudi z zaviralci ATPaze domene. Druga pomembna strukturna enota je z glicinom bogata zanka (aminokislinski ostanki 99-120), sestavljena iz aminokislinskih ostankov Gly114, Gly117 in Gly119 v *E. coli* (označeno z oranžno). Ob vezavi molekule ATP ta tvori zaprto konformacijo, medtem ko pri vezavi zaviralcev DNA-giraze B (npr. novobiocin) ostane konformacija odprta.

Aminokislinski ostanek Lys103 (označeno z rumeno) N-končne domene tvori interakcije s kisikom β -fosfata molekule ATP. Lizinski ostanek 337 (označeno z rumeno), ki je del C-končne domene (prevornik, ang. transducer) pa tvori interakcije z γ -fosfatom molekule ATP. Lys103 in Lys337 igrata pomembno vlogo pri konformacijskih spremembah v ATP-vezavnem mestu in komunikaciji med N- in C-končno domeno ATP-vezavnega mesta.

Tyr5' (označeno z roza) tvori vodikovo vez z 2'-hidroksilno skupino riboze in z dušikom adenina na poziciji 3. AK Tyr5' najdemo pri vseh bakterijskih girazah, odsoten pa je v evkariontskih in virusnih topoizomerazah II. Na drugi strani molekule ATP pride do tvorbe vodikove vezi med Asp73 in duškovim atomom adenina na poziciji 6. (8, 9)



Slika 7: Podrobnejši prikaz interakcij ATP-vezavnega mesta GyrB podenote *E. coli* in molekule ATP. (Prirejeno po (9))

1.4. Protibakterijske učinkovine, ki delujejo na topoizomeraze II

1.4.1. Zaviralci GyrA/ParC - fluorokinoloni

Fluorokinoloni so edine protibakterijske učinkovine, ki delujejo na topoizomerazo II in so v uporabi v klinični praksi. Delujejo tako na DNA-girazo (podenota GyrA) kot tudi na topoizomerazo IV (podenota ParC). Fluorokinoloni se specifično vežejo na kompleks encim-DNA ter tako stabilizirajo kovalentno vez med verigo DNA in tirozinskim ostankom v aktivnem mestu podenote GyrA. S tem preprečijo nadaljnje podvojevanje molekule DNA. Njihova osnovna struktura je 6-fluorokinolin-4-on s karboksilno skupino na mestu 3 kinolonskega obroča in s F atomom na mestu 6.

Z optimizacijo fluorokinolonov se je njihovo delovanje razširilo tako na G+ bakterije, kot tudi na G- in atipične bakterije. Fluorokinoloni delujejo bakteriostatično (preprečujejo nadaljnjo rast bakterij) in baktericidno (uničujejo bakterije), vendar pa imajo šibkejšo protibakterijsko aktivnost (mikromolarno območje) kot novoodkriti ATP kompetitivni zaviralci GyrB (nanomolarno območje zaviranja). Odpornost bakterij proti fluorokinolonom je posledica mutacije genov za podenoti GyrA in ParC. Gre za mutacijo aminokislinskih ostankov v QRDR regiji (ang. Quinolone-resistance determining region).

(5)

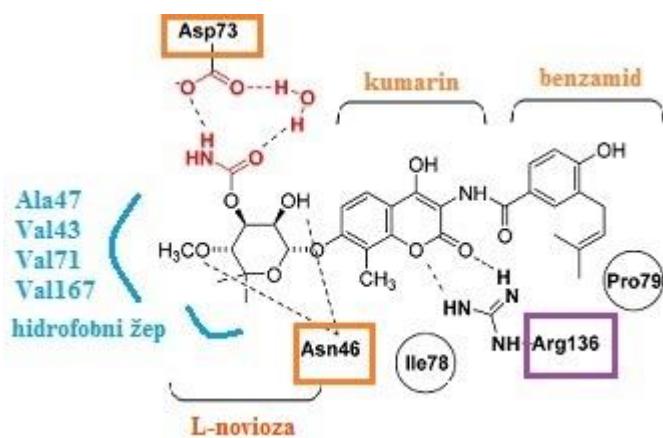
1.4.2. Zaviralci GyrB/ParE – novobiocin

Zaviralci GyrB oponašajo vezavo med DNA-girazo B in adeninskim delom molekule ATP preko tvorbe dveh vodikovih vezi z aminokislinskim ostankom Asp73. Ena H-vez se tvori direktno med Asp73 in zavircem, druga pa preko mostu s kristalno molekulo vode. Zaviralec GyrB mora tako imeti v svoji strukturi donor vodikove vezi, ki interagira s karboksilno skupino Asp73 in akceptor vodikove vezi, ki interagira z molekulo vode. Skupno vsem zavircem GyrB je tudi tvorba interakcij v hidrofobnem žepu ATP-vezavnega mesta in z aminokislinskima ostankoma Arg136 in Arg76. (5,10)

Edini zaviralec GyrB in/ali ParE, ki je bil v uporabi v klinični praksi, je aminokumarinska protibakterijska učinkovina novobiocin (**Slika 8**). Bil je izoliran iz bakterijske vrste *Streptomyces*. Njegova uporaba je bila omejena predvsem na proti penicilinu odpornim bakterijam. (5)

Iz kristalne strukture novobiocina v kompleksu z GyrB/ParE opazimo, da novobiocin le delno prekriva ATP-vezavno mesto in s tem preprečuje vezavo molekule ATP

(kompetitivna inhibicija). Vezavno mesto za novobiocin je na 24 kDa velikem proteinu na N-končnem delu podenote GyrB43. Sladkorni del novobiocina L-novioza tvori vodikove vezi z aminokislinskim ostankom Asp73 in Asn46 GyrB iz *E. coli* (označeno z oranžno). Poleg tega tvori H-vezi tudi kumarinski del molekule novobiocina s stransko verigo Arg136 (označeno z vijolično) (Slika 8). Razvoj odpornosti proti novobiocinu je posledica mutacije aminokislinskega ostanka Arg136, ki ga nadomestijo aminokisline glicin, levcin, serin, cistein ali histidin. Drugi razlog odpornosti proti temu naravnemu antibiotiku je posledica mutacij Gly77, Gly8, Ile94, Ala100, Val120, Ser121, Gly164 in Thr165 (številčeno po *E. coli*). (1, 5, 9)



Slika 8: Prikaz interakcij vezave novobiocina v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze B.
(Prirejeno po (6))

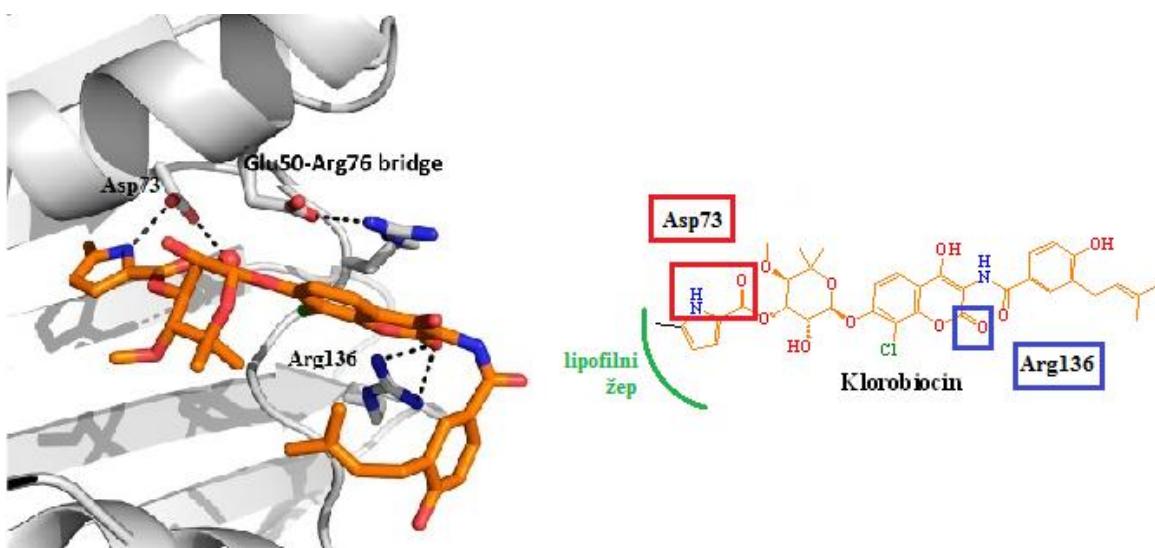
Novobiocin je izkazoval dobro protibakterijsko aktivnost proti G+ bakterijam, zato so ga uporabljali predvsem za zdravljenje okužb z MRSA. Njegova uporaba v klinični praksi je bila umaknjena zaradi toksičnosti in razvoja odpornosti. (6)

1.5. Razvoj pirolamidnih zaviralcev

Najpomembnejša predstavnika aminokumarinskih zaviralcev DNA-giraze B sta novobiocin in klorobiocin. Spojini sta postavili temelje pri načrtovanju novih zaviralcev DNA-giraze B z vezavo v ATP-vezavno mesto. S pomočjo rentgenske kristalografije in kristalnih struktur kompleksa tarče in zaviralcev so bile odkrite bistvene interakcije med spojinami in aminokislinskimi ostanki ATP-vezavnega mesta, ki so ključne za močno zaviralno in posledično protibakterijsko delovanje. (8)

Vezavi novobiocina in klorobiocina v vezavno mesto sta podobni (Sliki 8 in 9). Razlika je predvsem v tvorbi dodatnih interakcij klorobiocina v lipofilnem žepu preko

metilne skupine na pirolnem obroču. Pri novobiocinu je ta zaseden z dvema molekulama vode. Dodatne interakcije povzročajo spremembo energije in moč vezave med zavircalcem in ATP-vezavnim mestom. Pri klorobiocinu gre za entropijsko ugodnejši sistem, ki omogoča 20-krat močnejšo vezavo. (9)



Slika 9: Kristalna struktura klorobiocina v ATP-vezavnem mestu (levo) ter prikaz ključnih interakcij med zavircalcem in tarčo (desno). (Prirejeno po (8))

Zaradi pojava odpornosti bakterij proti novobocinu in toksičnosti tega antibiotika se je v letih 1960 začelo odkrivanje novih zavircalcev GyrB s protibakterijskim delovanjem. Prva serija takih učinkovin je imela aminotiazolno ogrodje. Te spojine niso izkazovale biokemijske in mikrobiološke aktivnosti, vendar jih velja omeniti, saj so prve spojine, ki niso bile naravnega izvora in so kot zavircalci delovale na podenotah GyrB/ParE topoizomeraz IIA. (6)

Skupna značilnost načrtovanih zavircalcev DNA-giraze B je strukturni motiv donor-akceptor vodikove vezi (**Slika 9**), ki je nujno potreben za tvorbo dveh vodikovih vezi z aminokislinskim ostankom Asp73 (številčenje po *E. coli*) v ATP-vezavnem mestu, in oponaša vezavo adeninskega dela molekule ATP. Nobena od načrtovanih spojin še ni prišla v klinično rabo, saj morajo spojine izkazovati močno *in vivo* in *in vitro* protibakterijsko aktivnost, ne smejo biti toksične in imeti morajo dobre ADME lastnosti. (13)

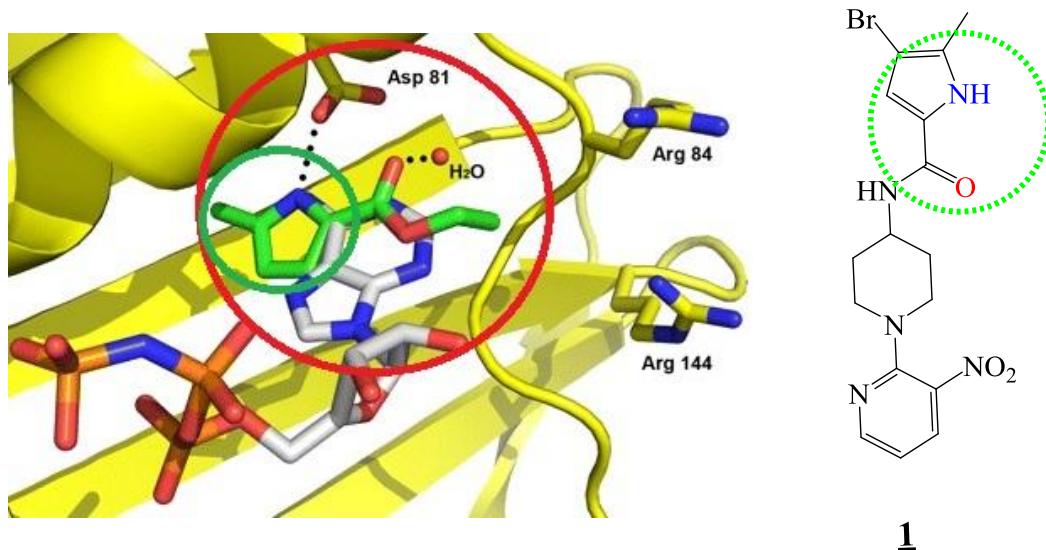
zadetek	$K_D^* [\mu M]$
	220
	340
	1,070
	2,000

* K_D : konstanta disociacije

AstraZeneca je s pomočjo tehnike načrtovanja spojin na osnovi fragmentov in 24 kDA N-končne domene *S. aureus* vrednotila knjižnico z več kot 1000 spojinami z nizko molekulsko maso (100-370 Da). (6, 14) Po testiranjih je bilo razvidno, da ima najnižjo vrednost K_D pirolni fragment (**Preglednica I**), zato je bil ta izbran za nadaljnje načrtovanje spojin z delovanjem v ATP-vezavnem mestu. (14)

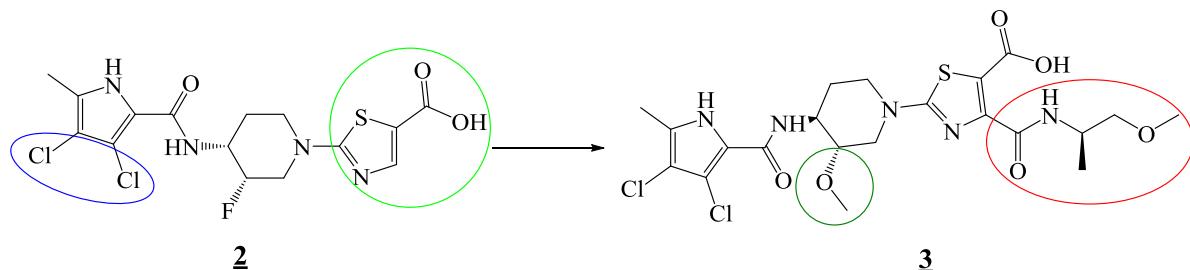
Preglednica I: Knjižnica fragmentov iz podjetja AstraZeneca. (Prirejeno po (14))

Prva sintetizirana spojina (spojava **1**) ni izkazovala protibakterijskega delovanja, vendar je postavila temelj pri načrtovanju novih pirolamidnih zaviralcev. Pirolni del spojine (**Slika 10**) se veže v adeninski del ATP-vezavnega mesta in tvori 2 vodikovi vezi z aminokislinskim ostankom Asp81 (številčeno po *S. aureus*). Piridinski obroč spojine **1** je zunaj ATP-vezavnega mesta in tvori π -interakcije, medtem ko je NO₂ skupina obdana s topilom. Na osnovi spojine **1** so načrtovali nove spojine z željo po boljši vezavi v ATP-vezavno mesto in po boljšem protibakterijskem delovanju. (14)



Slika 10: Primerjava vezave pirolnega fragmenta (zelena spojina) in molekule ATP (siva spojina) v ATP-vezavno mesto GyrB *S. aureus*. (Prirejeno po (14))

Optimizacija spojine spojine **1**:



V nadaljevanju načrtovanja so na pirolni obroč pripeli klorova atoma (spojava **2**), ki omogočata boljše interakcije v lipofilnem žepu ATP-vezavnega mesta ter povečata kislost NH skupine pirolnega obroča (nižji pK_a). To je razlog za močnejšo tvorbo H-vezi med NH skupino in aminokislinkim ostankom Asp73. Z dodatkom aminotiazolne skupine na osnovni skelet so omogočili interakcije z gvanidinsko skupino Arg84 (številčeno po *S. aureus*). Karboksilna kislina na mestu 5 tiazolnega obroča pa tvori interakcije z Arg144 (po *S. aureus*). Modificirana spojina izkazuje boljše bakteriostatično delovanje (nižji MIC), vendar ima veliko afiniteto za človeške žolčne anionske transporterje, veliko variabilnost očistka (Cl) in biološke uporabnosti (6, 22).

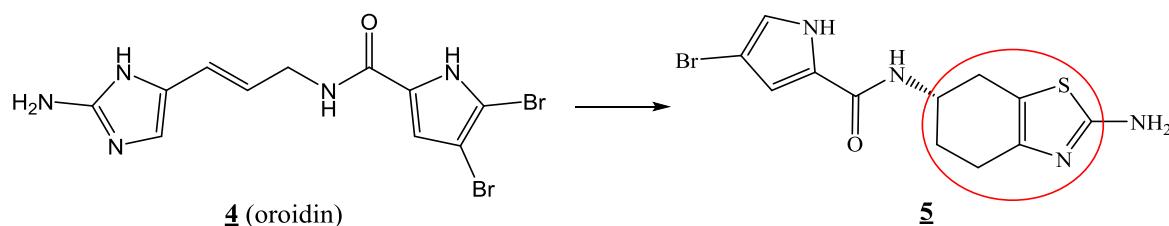
Z uvedbo novega fragmenta *N*-(1-metoksipropan-2-il)acetamida v spojni **3** je bila dosežena manjša afiniteta vezave na žolčne anionske transporterje. Spojina je izkazovala dobro zaviralno aktivnost na G+ bakterije, nekatere seve G- bakterij in dobro topnost v vodi, vendar je zaradi velike variabilnosti v delovanju med majhno skupino posameznikov AstraZeneca zaključila nadaljnji razvoj spojine. (6)

<i>Spojina</i>	IC_{50} [nM] DNA-giraza/topoIV	<i>MIC S. aureus</i> [µg/mL]	<i>MIC E. coli</i> [µg/mL]
1	3,000 (<i>DNA-giraza E. coli</i>)	>64	>64
2	25 (<i>DNA-giraza E. coli</i>)	8	>64
3	<10 (<i>DNA-giraza S. aureus</i>) 72 (<i>topo IV E. coli</i>)	0,036 (<i>S. aureus MSSA</i>)	24 (<i>E. coli 523</i>) 0,94 (<i>E. coli ΔtolC</i>)

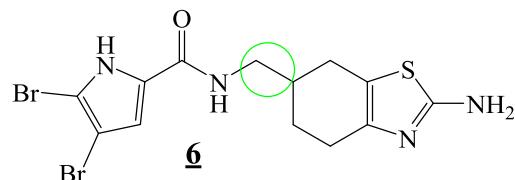
Preglednica II: Primerjava zaviralnih aktivnosti in protibakterijskega delovanja spojin **1**, **2** in **3**. (Prirejeno po (6, 14, 21))

Ker izkazujejo optimizirani pirolamidni analogi dobro dvojno tarčno delovanje, majhno možnost razvoja spontane odpornosti, nizke vrednosti MIC na G+ bakterije ter dobre farmakološke lastnosti in biološko uporabnost, se je raziskovanje te vrste zaviralcev nadaljevalo. (8)

Pri nadalnjem načrtovanju in optimizaciji so raziskovalci ohranili pirolamidno strukturo na levi strani molekule. Kot distančnik med levo in desno stranjo pa je bil vstavljen nov fragment. Kot najbolj aktivne spojine so se izkazali analogi oroidina (**Preglednica III**).



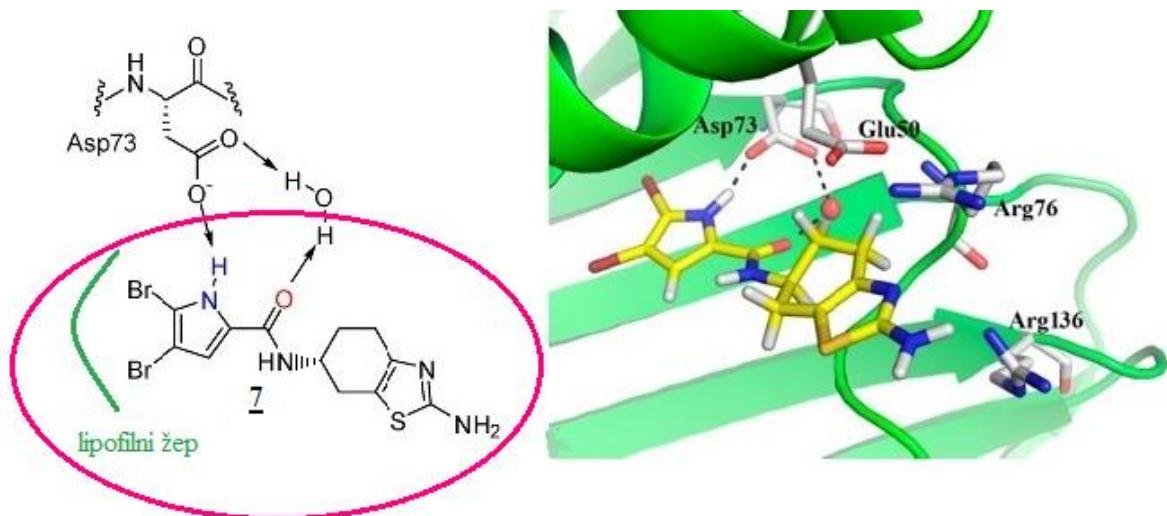
Sledila je optimizacija spojin s 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim osnovnim skeletom (označeno z rdečo). *In vitro* testiranje spojin na DNA-girazi iz *E. coli* je pokazalo, da ima metilenski most med karboksamidno skupino in 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnim ogrodjem (spojina **6**) negativen vpliv na zaviranje DNA-giraze (višja IC₅₀ vrednost) iz *E. coli*, zato je bil ta pri nadalnjem razvoju spojin odstranjen (**Preglednica III**). (10)



Spojina 7 je predstavljala primerno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo (slika 12), saj je izkazovala zmerno afiniteto do tarče v mikromolarnem območju.

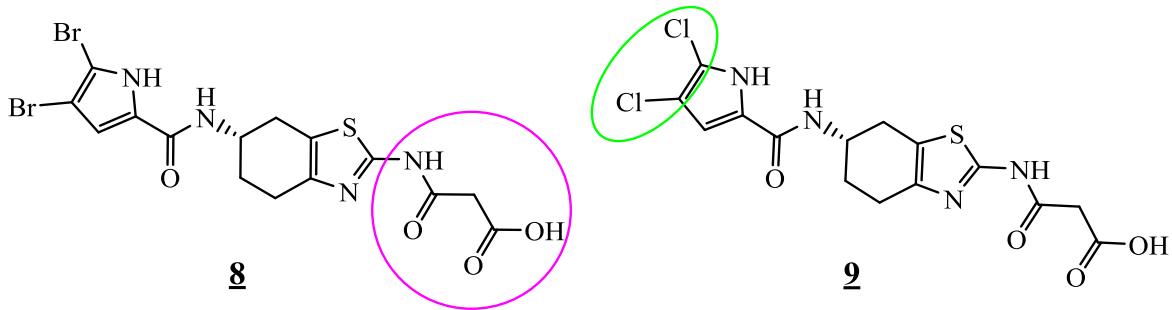
SPOJINA	DNA-GIRAZA IC ₅₀ [μM] ali RA [%]	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<u>5</u>	520 μM	-
<u>6</u>	120 μM	-
<u>7</u>	12 μM	90 %
<u>8</u>	0,069 μM	86
<u>9</u>	0,13 μM	87 %

Preglednica III: Primerjava zaviralne aktivnosti spojin **5**, **6**, **7**, **8** in **9**. (Prirejeno po (10))



Slika 11: Spojina vodnica: prikaz tvorbe interakcij zaviralca (spojine **7**) v ATP-vezavnem mestu GyrB iz *E. coli*. (Prerejeno po (10))

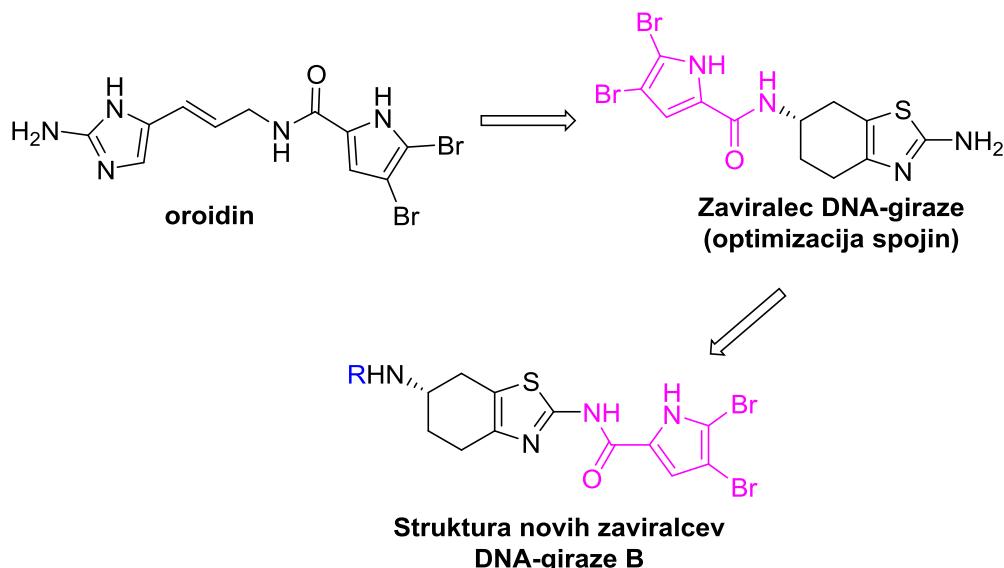
Spojine s 4,5-dibromo-1*H*-pirolnim fragmentom (spojina **8**) so izkazovale močnejše zaviranje DNA-giraze iz *E. coli*, kot spojine s 4,5-dikloro-1*H*-pirolnim delom (spojina **9**). Bromovi atomi povečajo kislost NH skupine in tvorijo interakcije z lipofilnim žepom ATP-vezavnega mesta, zato imajo dibromosubstituirane spojine boljšo encimsko zaviralno aktivnost kot diklorosubstituirane ali monobromosubstituirane (**Preglednica III**).



Dokazano je bilo, da so *S*-enantiomeri s 4,5-dibromopirolnim fragmentom na 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskem ogrodju aktivnejši od *R*-enantiomerov, ter da ima *N*-malonilni fragment pozitiven vpliv na jakost vezave zaviralca v vezavno mesto. (10)

2. NAČRT ZA DELO

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali nove ATP kompetitivne zaviralce DNA-giraze B s pirolamidnim fragmentom (roza obarvan del strukture). Izhajali bomo iz že znane osnovne strukture 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diamina, ki je bil nedavno odkrit in sintetiziran kot osnovno ogrodje zaviralcev DNA-giraze na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.

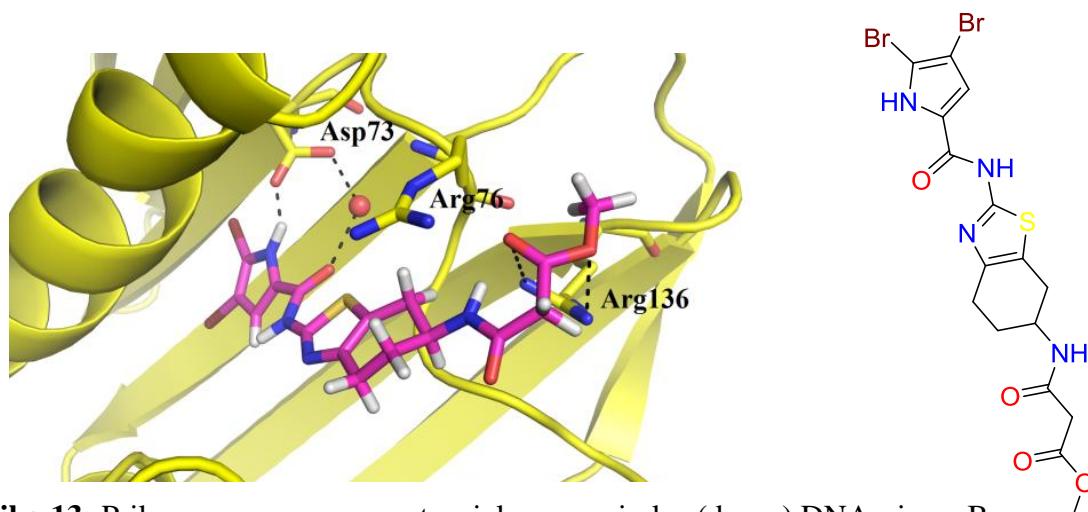


Slika 12: Analogi oroidina: optimizacija obstoječih zaviralcev DNA-giraze in razvoj obratnih analogov s 4,5-dibromopirolnim fragmentom na mestu 2 osnovnega ogrodja.

Novi potencialni zaviralci so strukturni analogi oroidina, alkaloida iz spužve *Agelas sp.* Spojine bomo načrtovali s pomočjo strukturno podprtga načrtovanja na osnovi že znanih kristalnih struktur kompleksov encim-zaviralec DNA-giraze B. Vezavo spojin in interakcije med zaviralci in tarčo spojin bomo preučevali s pomočjo sidranja ligandov v ATP-vezavno mesto. Na koncu bomo sintetiziranim spojinam določili zaviralo aktivnost na izolirani DNA-girazi iz *E. coli* ter protibakterijsko aktivnost na štirih izoliranih bakterijskih sevih. Dobljeni podatki testiranj bodo uporabljeni v naslednjem ciklu načrtovanja in sinteze spojin z delovanjem na ATP-vezavno mesto DNA-giraze.

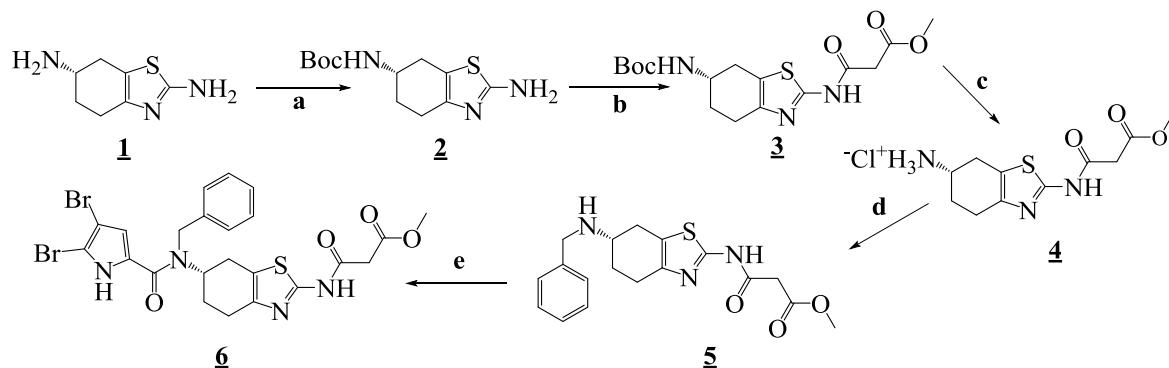
Pri načrtovanju zaviralcev DNA-giraze B je ključno, da ohranimo interakcije z aminokislinkim ostankom Asp73 vezavnega mesta. Iz kristalne strukture je razvidno, da 4,5-dibromopirolamidni del zasede ATP-vezavno mesto in tvori interakcije s stransko verigo Asp73 v DNA-girazi B iz *E.coli*. Sintetizirani so bili že strukturni analogi s 4,5-dibromopirolamidnim delom na mestu 6 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2,6-diamina.

Ti so izkazovali zaviralno aktivnost v nizkem nanomolarnem območju. Zaradi močne zaviralne aktivnosti zaviralcev bomo pri eksperimentalnem delu poskusili dodatno optimizirati analoge, ki imajo 4,5-dibromopirolni del vezan na mesto 6 osnovnega ogrodja, s pripenjanjem različnih substituentov na mesto 2 (*S*-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina (**Shemi 1** in **2**). Poleg tega bomo sintetizirali tudi obratne analoge že obstoječih spojin, ki imajo 4,5-dibromopirolamidni del na mesto 2 osnovnega ogrodja (**Shema 3**). Dodatne interakcije v vezavnem mestu DNA-giraze lahko dosežemo s pripenjanjem različnih substituentov na amino skupino na mesto 6 (označeno z modro črko R). S tem skušamo doseči močnejšo vezavo v ATP-vezavno mesto (dodatne interakcije z aminokislinskimi ostanki Arg136 in/ali Arg76) in posledično močnejšo protibakterijsko aktivnost.



Slika 13: Prikaz vezave novega potencialnega zaviralca (desno) DNA-giraze B v ATP-vezavno mesto (levo).

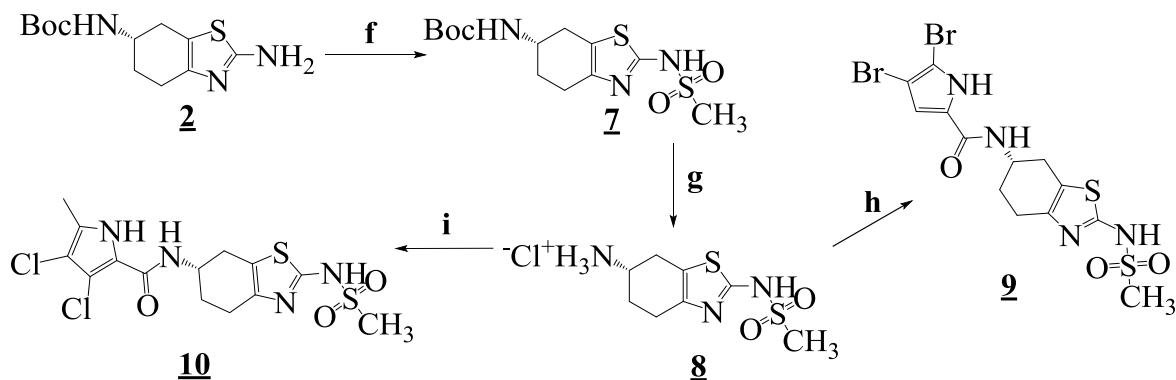
✓ Shema 1. Predvidene reakcijske poti



Shema 1: Pogoji in reagenti predvidene reakcijske poti 1.: a) Boc_2O , THF, 0 °C, sobna T za 24 h; b) Et_3N , dioksan, metil malonil klorid, sobna T za 18 h; c) HCl , dioksan, sobna T za 24 h; d) Et_3N , NaCNBH_3 , benzaldehid, sobna T za 12h; e) 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil klorid, DKM, piridin, sobna T za 1 h.

V prvi stopnji reakcije (a) bomo na (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminski obroč uvedli zaščito aminske skupine na mestu 6. V stopnji (b) bomo na aminsko skupino na mestu 2 pripeli metil malonil klorid. Sledila bo odščita aminske skupine (c) z acidolizo in reakcija reduktivnega aminiranja z benzaldehidom (d). V zadnji stopnji reakcije bomo z reakcijo N-aciliranja pripeli 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil klorid.

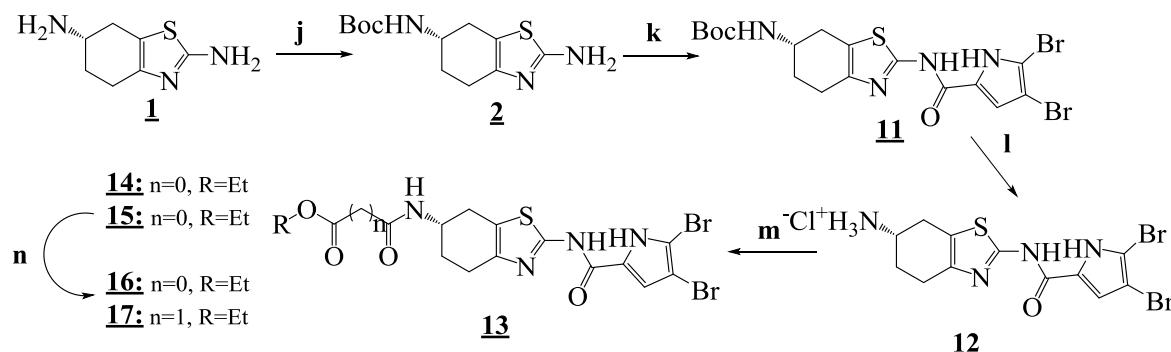
✓ Shema 2. Predvidene reakcijske poti



Shema 2: Pogoji in reagenti predvedene reakcijske poti 2.: f) piridin, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, 0 °C, počasno ohlajanje, sobna T za 18 h; g) acetilklorid, MeOH, 0 °C, 1 h, sobna T za 18 h; h) DMF, Na_2CO_3 , 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on, 40 °C, 24 h; i) DMF, EDC, HOEt, NMM, 3,4-dikloro-5-metil-*H*-pirol-2-karboksilna kislina, 30 min, sobna T za 24 h (po dodatku spojine 8).

Izhodni spojini **2** bomo v prvi stopnji sinteze na amin na mestu 2 pripeli metil sulfonil klorid (f). V stopnji (g) bo sledila odščita aminske skupine z reakcijo acidolize in pripenjanje substituentov na amin na mestu 6: 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-ona v stopnji (h) ter 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline v stopnji (i).

✓ Shema 3. Predvidene reakcijske poti



Shema 3: Pogoji in reagenti predvidene reakcijske poti 3.: j) Boc_2O , THF, sobna T, 24 h; k) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)etanon, Na_2CO_3 , DMF, 80 °C, 18 h; l) acetil klorid, MeOH , 0 °C, 1 h, sobna T za 18 h; m) etil oksalil klorid/metil malonil klorid, DBU, DMF, sobna T za 24 h; n) 1M NaOH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, sobna T za 24 h.

Na (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminski obroč bomo enako kot pri 1. predvideni reakcijski shemi najprej uvedli zaščito aminske skupine (j) na mestu 6. V naslednji stopnji bomo z reakcijo N-aciliranja na prosto aminsko skupino (k) pripeli predhodno sintetiziran 4,5-dibromopirolni obroč. V stopnji (m) bo sledila odstranitev zaščitne skupine z aciodolizo in pripenjanje metil malonil klorida ali etil oksalil klorida ter v zadnji stopnji še hidroliza estra do kisline (n).

Vsem sintetiziranim spojinam bomo posneli NMR, IR in MS spektre ter jim določili temperaturo tališča. Čistoto končnih spojin bomo ovrednotili tudi s HPLC ter določili njihovo zaviralno aktivnost na izoliranem encimu DNA-giraze iz *E. coli*. Testirali bomo tudi protibakterijsko aktivnost končnih spojin na izoliranih sevih bakterij dveh G+ bakterij (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) in dveh G- bakterij (*Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*). Dobljene IC_{50} in RA vrednosti bomo primerjali z rezultati ostalih že sintetiziranih zaviralcev DNA-giraze B, ki tekmujejo z molekulo ATP v vezavnem mestu.

✓ Delovna hipoteza:

Menimo, da bodo sintetizirani zaviralci s 4,5-dibromopirolamidnim obročem tvorili močne interakcije v ATP-vezavnem mestu in posledično izkazovali močno zaviranje encima. To sklepamo iz predhodno sintetiziranih obratnih analogov, ki imajo ta strukturni fragment na mestu 6 (*S*-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazolnega obroča in so pokazali zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

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

Pri izvedbi nekaterih reakcij smo uporabili brezvodni DMF, ki smo ga pripravili sami z uporabo aktiviranih molekularnih sit. Pripravljeno topilo smo shranjevali v temnem prostoru v argonovi atmosferi.

3.2. Kromatografske metode

Skupno vsem kromatografskim metodam je, da z njimi ločujemo snovi glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti in da je vsak kromatografski sistem sestavljen iz stacionarne in mobilne faze. Ti sta lahko v različnih agregatnih stanjih.

3.2.1. TLC: tankoplastna kromatografija

To vrsto kromatografije smo pri eksperimentalnem delu uporabljali za prvo identifikacijo spojin in poteka reakcije. (18) Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel, nanesen na aluminijasto ploščico, kot mobilno fazo pa največkrat raztopino diklorometana in metanola v razmerju 9:1. Tak kromatografski sistem nam je omogočil optimalno ločevanje spojin med seboj. Sintetizirane spojine so absorbirale UV-svetlobo pri valovni dolžini 254 nm.

Spojine se pri tankoplastni kromatografiji ločujejo glede na sposobnost tvorbe interakcij med stacionarno (adsorpcija spojin) in mobilno fazo (raztapljanje spojin). Manj kot se spojina adsorbira na stacionarno fazo in boljšo topnost kot ima v mobilni fazi, hitreje potuje po silikagelu. Rezultat potovanja spojine po silikagelu vidimo kot liso. Pri identifikaciji smo bili pozorni na jakost absorpcije in čistoto oziroma število lis. Ko je reakcija končana, eden od reagentov izgine in nastane eden ali več produktov. Če je intenziteta lise močnejša, pomeni, da je pri reakciji nastala večja količina produkta. V primeru, da še vedno vidimo več lis, si pri identifikaciji lahko pomagamo z orositvenimi reagenti, ki obarvajo spojine z različnimi funkcionalnimi skupinami. Pri eksperimentalnem delu smo uporabili orositveni reagent ninhidrin, ki značilno obarva spojine z aminske skupino. Kot rezultat tankoplastne kromatografije podamo retencijski faktor (R_f). Gre za

razmerje (v cm) med potjo, ki jo je opravila spojina in potjo, ki jo je opravila mobilna faza. (18)

3.2.2. Kolonska »flash« kromatografija

Pri kolonski kromatografiji imamo trden adsorbent (stacionarno fazo) in tekočo mobilno fazo. Stacionarno fazo napolnimo v pokonci stoečo kolono ter jo prelijemo z izbrano mobilno fazo. Vzorec nanesemo na vrh stacionarne faze. Spojine med potovanjem tvorijo različne interakcije s stacionarno in mobilno fazo, zato potujejo po koloni različno hitro in se tako ločijo med seboj. Posamezne komponente, ki prihajajo iz kolone zbiramo v manjše frakcije. Izraz »flash« kolonska kromatografija pomeni, da vzorec skozi kolono ne potuje zgolj zaradi gravitacije, ampak topilo skozi kolono dodatno potiskamo z zračnim nadtlakom. (18)

Pri eksperimentalnem delu smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 40-63 µm (Silicagel 60). Kot mobilno fazo pa največkrat zmes diklorometana in metanola. Za določitev razmerja med obema komponentama smo si pomagali s tankoplastno kromatografijo. TLC kromatograme smo razvili v MF z različnimi razmerji komponent. Za MF smo izbrali tisto razmerje komponent, kjer je bil R_f med 0,2 in 0,3. Ta vrednost R_f nam je omogočala dobro ločevanje spojin med potekom kolanske kromatografije.

3.2.3. HPLC

Metodo smo uporabili samo za vrednotenje končnih spojin, ki smo jih nato poslali na biološka testiranja. HPLC analize so bile izvedene na aparaturi Agilent Technologies 1100, z uporabo G1365B UV-VIS detektorja, G1316A termostata in G1313A avtomatskega vzorčevalnika. Pri meritvah je bila uporabljen kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5µm, 4.6 × 150 mm) z mobilno fazo: 0,1% trifluoroacetna kislina v vodi (A) in acetonitril (B). Gradientna elucija mobilne faze: 2 min 95% A, 90% A do 10% A v 12min; 10% A do 5% A v 1 min, nato 5 min 5% A; pretok mobilne faze: 1,0 mL/min; volumen iniciranja: 10 µL.

HPLC uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vzorcev. Princip ločevanja je enak kot pri kolonski kromatografiji, le da mobilno fazo pošljemo skozi kolono pod visokim pritiskom. (18)

3.3. Spektroskopske metode

Na podlagi absorbirane svetlobe spojin in lise na TLC ploščici s kromatografskimi metodami ne moramo trditi ali smo z reakcijo in postopkom čiščenja zagotovo dobili želeno spojino ali gre zgolj za stranski produkt reakcije. Pri tem so nam v pomoč spektroskopske metode, s pomočjo katerih določimo strukturo želenega produkta in čistoto sintetizirane spojine.

3.3.1. Jedrska magnetna resonanca – NMR

NMR je najprimernejša metoda za določanje strukture organskih spojin. S snemanjem ^1H spektra vidimo vse vodikove atome v spojni, ki pa imajo glede na svoje okolje in funkcionalne skupine različne kemijske premike. Analiza spektra nam omogoča določitev kemijske formule spojine.

Meritve ^1H NMR spektrov smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabili smo aparaturo Bruker Avance III 400 spektrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, ZDA). Spektre smo snemali pri 400 MHz, vzorce pa raztopili v devteriranem topilu DMSO- d_6 .

3.3.2. Infrardeča spektroskopija – IR

Vzorec presvetlimo z elektromagnetnim valovanjem IR izvora. Pri tem se absorbirana toplotna energija pretvori v molekularno gibanje. Kot rezultat gibanja dobimo IR spekter, kjer so upodobljena nihanja vezi različnih funkcionalnih skupin.

IR spektre smo posneli s spektrofotometrom Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.3.3. Masna spektrometrija – MS

Z metodo določimo relativno molekulsko maso spojine, njeno bruto formulo in prisotnost določenih spojin preko fragmentacije. Analizirano spojino med postopkom razbijemo na fragmente, ki jih vidimo na spektru kot signale.

Spektri so bili posneti na Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani z masnim spektrometrom Avtосрс (VG-Analytical) z ESI tehniko.

3.4. IUPAC NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

Spojine v magistrski nalogi so poimenovane in narisane s pomočjo programa ChemBioDraw Ultra 14.0 podjetja CambridgeSoft. Pri poimenovanju smo si pomagali tudi s skriptami Vaje iz Farmacevtske kemije II.

3.5. NAČRTOVANJE SPOJIN-MOLEKULSKO SIDRANJE

Molekulska sidranje je za potrebe magistrske naloge izvedel doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm., s programom LeadIT podjetja BioSolveIT.

3.6. MERJENJE TEMPERATURE TALIŠČA

Sintetiziranim spojinam smo izmerili temperaturo tališča s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

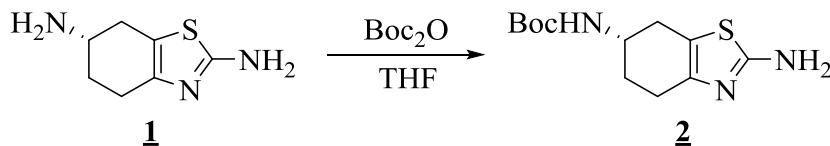
3.7. BIOLOŠKA TESTIRANJA

Končnim spojinam smo določili zaviralno aktivnost in protibakterijsko delovanje. Zaviralna aktivnost spojin je bila določena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Izmeril jo je izr. prof. dr. Janez Iliaš, mag. farm., na izoliranem encimu DNA-giraze iz bakterije *Escherichia coli*. Testiranje je bilo izvedeno v skladu z opisanim postopkom v poglavju Literatura, pod številko 10.

Protibakterijska aktivnost zaviralcev DNA-giraze je bila določena na dveh izoliranih sevih G+ bakterij: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ter dveh izoliranih G- sevih bakterij: *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Meritve so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih na Finskem.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

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

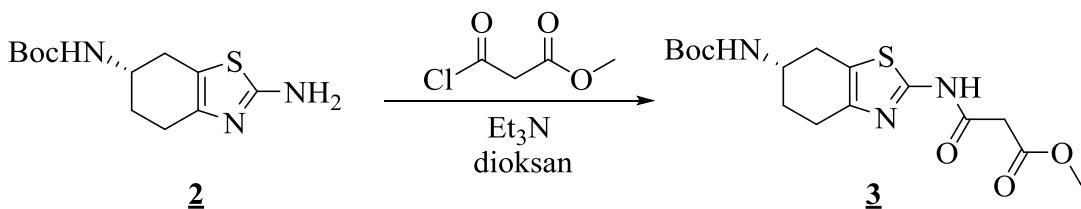


Spojino **1** (2,436 g, 14,40 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL tetrahidrofurana (THF) in zmes ohladili na ledeni kopeli (0 °C). Ohlajeni spojini smo po kapljicah dodaljali di-*terc*-butil dikarbonat (Boc₂O) (3,457 g, 15,84 mmol, 1,1 ekv.), ki smo ga predhodno raztopili v 30 mL THF. Reakcija je potekala 24 ur. Spojino smo osušili do suhega in jo očistili s pomočjo ekstrakcije. Raztopili smo jo v 50 mL etilacetat ter spiralni s 30 mL nas. razt. NaHCO₃ ter 30 mL nas. razt. NaCl. Na koncu smo dodali sušilno sredstvo (Na-sulfat) in prefiltrirali. Organsko fazo smo posušili do suhega pod znižanim tlakom. Dobili smo 3,877 g produkta **2**¹.

Ponovitev reakcije: Spojino **1** (0,627 g, 3,70 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL THF. Postopek reakcije je bil enak. Razlika je le v količini dodanega Boc₂O (0,888 g, 4,07 mmol, 1,1 ekv.). Dobili smo 0,927 produkta **2**².

<i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)karbamat		
<i>Elementna sestava</i>	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₂ S	M _r =269,36 g/mol
<i>Opis</i>	<i>beli kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	100% ¹ , 92,9% ²	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,41 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	147-149 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,38 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 1,54-1,65 (m, 1H, H _A -7), 1,80-1,86 (m, 1H, H _B -7), 2,31-2,47 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2,68 (dd, 1H, J ₁ = 14,8 Hz, J ₂ = 5,5 Hz, H _B -4), 3,57-3,69 (m, 1H, CHNH), 6,64 (s, 2H, NH ₂), 6,94 (d, 1H, J = 7,9 Hz, NH) ppm	
IR (ATR)	3363, 2976, 1684, 1634, 1514, 1445, 1365, 1307, 1282, 1249, 1229, 1167, 1090, 1050, 975, 880, 829, 783, 760, 742, 690, 690 cm ⁻¹	

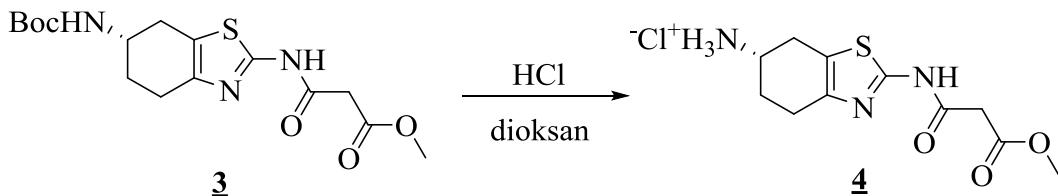
4.2. Sinteza metil (S)-3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata



Spojino **2** (1,985 g, 7,37 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL dioksana ter reakcijsko zmes med mešanjem ohladili na ledeni kopeli. Ko se je ta ohladila, smo z injekcijskima brizgama počasi dodali trietilamin (2,077 mL, 14,74 mmol, 2 ekv.) in metil malonil klorid (1,428 mL, 13,32 mmol, 1,8 ekv.). Reakcijsko zmes smo na magnetnem mešalu pustili mešati preko noči. Naslednji dan smo jo posušili do suhega in jo očistili z ekstrakcijo. Suh produkt smo raztopili v 70 mL etilacetat, ter spirali z 2 x 40 mL 10% citronske kisline. Organsko fazo smo še 2 x spirali s 40 mL nas. razt. NaHCO₃ in 40 mL nas. razt. NaCl. Na koncu smo raztopini dodali še sušilno sredstvo (Na-sulfat), prefiltrirali in odparili etilacetat do suhega. Dobili smo 2,415 g produkta **3**.

metil (S)-3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat		
<i>Elementna sestava</i>	<i>C₁₆H₂₃N₃O₅S</i>	<i>M_r = 369,44 g/mol</i>
<i>Opis</i>	<i>umazano beli kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	<i>88,7%</i>	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	<i>0,57 (MF: DKM:MeOH = 9:1)</i>	
<i>Tališče</i>	<i>61-64 °C</i>	
<i>¹H NMR</i> <i>(400 MHz, DMSO-d₆)</i>	<i>δ 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,66-1,75 (m, 1H, H_B-7), 1,92-1,95 (m, 1H, H_B-7), 2,61-2,72 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2,90 (dd, 1H, J₁=16 Hz, J₂=5,2 Hz, H_B-4), 3,57 (s, 2H, COCH₂CO), 3,66 (s, 3H, COOCH₃), 3,70-3,74 (m, 1H, CHNH), 7,02 (d, 1H, J=7,6 Hz, NHCH), 12,12 (s, 1H, NHCO) ppm</i>	
<i>IR (ATR)</i>	<i>2975, 2360, 1743, 1677, 1518, 1437, 1392, 1365, 1337, 1250, 1229, 1158, 1050, 875, 784, 687 cm⁻¹</i>	

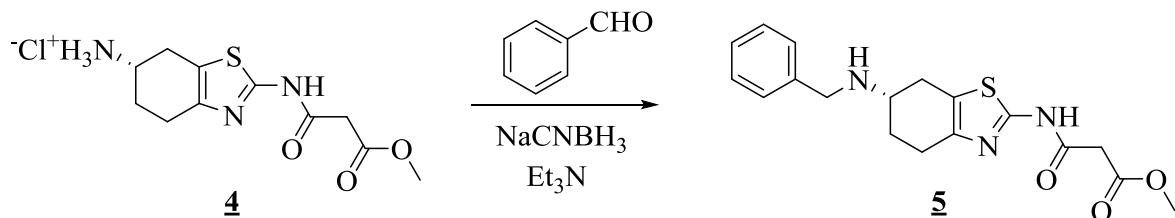
4.3. Sinteza (S)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijevega klorida



Spojini **3** (2,205 g, 5,968 mmol, 1 ekv.) smo med mešanjem prek septuma z injekcijsko brizgo dodali reagent 4 N HCl v 1,4-dioksanu (14,92 mL, 59,68 mmol, 10 ekv.). Reakcijsko zmes smo na magnetnem mešalu pustili preko noči. Po 24 urah smo dodali 3 mL reagenta, saj je bilo prisotne še veliko izhodne spojine **3**. Nato smo zmes postavili za 2 minuti na led, da je izpadel še preostanek produkta **4**. Oborino smo odnučali in posušili v sušilniku (70 °C, 35 min). Pod znižanim tlakom smo posušili tudi matičnico ter skupno dobili 1,528 g produkta **4**.

(S)-2-(3-metoksi-3-oksopropanamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijev klorid		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{11}H_{16}ClN_3O_3S$	$M_r = 305,78 \text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	rumeni kristali	
<i>Izkoristek</i>	83,7%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	235-237 °C	
$^1H\text{ NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,81-1,95 (m, 1H, H_A -7), 2,14-2,16 (m, 1H, H_B -7), 2,67-2,79 (m, 3H, H_A -4, H-5), 3,08 (dd, 1H, J_1 =16,0 Hz, J_2 =5,0 Hz, H_B -4), 3,60 (s, 2H, $COCH_2CO$), 3,66 (s, 3H, $COOCH_3$), 4,06-4,07 (m, 1H, $CHNH$), 8,33 (s, 3H, NH_3^+), 12,23 (s, 1H, $NHCO$) ppm	
<i>IR (ATR)</i>	2843, 2631, 2362, 1731, 1564, 1520, 1438, 1388, 1280, 1209, 1151, 860, 814, 871, 708 cm^{-1}	

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

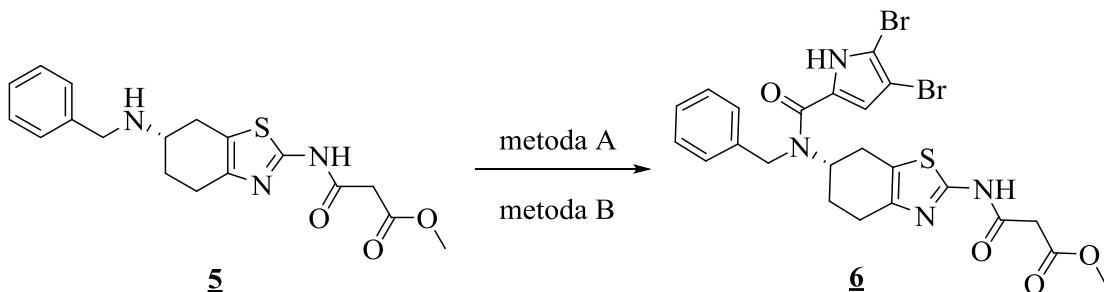


Spojino **4** (0,694 g, 2,27 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v MeOH (20 mL), ter nato med mešanjem z avtomatsko pipeto dodali trietylamin (0,790 mL, 5,68 mmol, 2,5 ekv.) in benzaldehid (0,184 mL, 1,82 mmol, 0,8 ekv.). Po eni uri mešanja smo reakcijski zmesi dodali še reducent NaCNBH₃ (0,185 g, 2,95 mmol, 1,3 ekv.). Reakcijo smo pustili mešati čez noč, drugi dan pa smo odparili topilo. Dobljeni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (20:1) ter dobili 0,081 g čistega monobenziliranega produkta in 0,157 zmesi mono- in dibenziliranega produkta.

<i>metil (S)-3-((6-(benzilamino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-<i>d</i>]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoat</i>		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{18}H_{21}N_3O_3S$	$M_r = 359,44 \text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	rumenkasto olje	
<i>Izkoristek</i>	9,9% *	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,22 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,71-1,82 (m, 1H, H_A -7), 2,13-2,17 (m, 1H, H_B -7), 2,55-2,75 (m, 3H, H_A -4, H -5), 3,11-3,24 (m, 1H, CH_2NH), 3,58 (s, 2H, COCH_2CO), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,01 (s, 2H, CH_2NH), 7,32-7,45 (m, 5H, H-Ar) ppm	
HRMS (ESI $^+$ m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$)	izračunana masa: 360,1382 izmerjena masa: 360,1374	

*samo čista frakcija 1 po kolonski kromatografiji

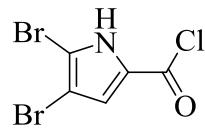
4.5. Sinteza metil 3-(((S)-6-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)-2-okso-1-feniletil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata



✓ Sintezni postopek metode A (metoda s kislinskim kloridom)

Reagenti in topila:

- Kislinski klorid*: 4,5-dibromo-1H-pirol-2-karbonil klorid
- DKM (diklorometan)
- Piridin



Pripravljen kislinski klorid smo raztopili v 2 mL DKM in 2 mL piridina. Med mešanjem smo dodali spojino **5** (0,081 g, 0,23 mmol, 1 ekv.) in reakcijsko zmes po 90 minutah začeli segrevati (50 °C, 60 min). Želeno spojino smo izolirali z ekstrakcijo. Reakcijsko zmes smo najprej posušili do suhega pod znižanim tlakom, nato pa nastali produkt raztopili v majhni količini diklorometana (2 mL). Sledilo je 3 x spiranje z 10% razt. citronske kisline in spiranje z nas. razt. NaHCO₃ (2 x 10 mL). Organsko fazo smo spirali še z 10 mL NaCl in dodali natrijev sulfat, filtrirali ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo nečist produkt, zato smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (30:1). Dobili smo zanemarljivo količino produkta. Reakcija ni uspela.

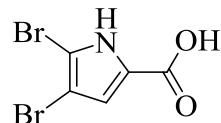
***priprava reagenta (kislinskega klorida)**

4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilno kislino (0,079 g, 0,29 mmol, 1,3 ekv. glede na spojino **5**) smo raztopili v 10 mL diklorometana ter postavili na magnetno mešalo. Ohlajeni spojini smo z injekcijsko brizgo po kapljicah dodajali oksalil klorid (0,368 mL, 0,74 mmol, 2,5 ekv. glede na izhodno kislino). Reakcijo smo pustili preko noči, nato pa smo odparili diklorometan in 2 x spirali z etrom.

✓ Sintezni postopek metode B (metoda s sklopitvenim reagentom)

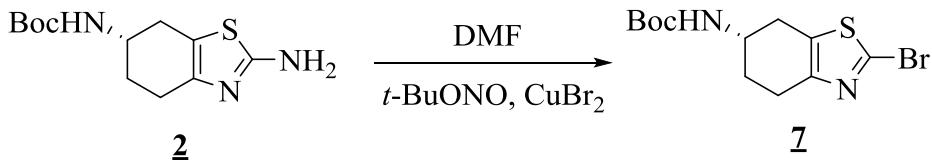
Reagenti in topila:

- N,N -dimetilformamid (DMF)
- 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina
- Et_3N (trietilamin)
- HATU: 1-(bis(dimetilamino)methilen)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin 3-oksid heksafluorofosfat



4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (0,097 g, 0,36 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 2 mL DMF in nato med mešanjem z avtomatsko pipeto dodali trietilamin (0,1 mL, 0,72 mmol, 2 ekv.). Ohlajeni zmesi smo s pipeto dodali sklopitveni reagent HATU (0,177 g, 0,47 mmol, 1,3 ekv.) ter pustili mešati 30 minut. Po aktivaciji kisline smo dodali spojino **5** (0,129 g, 0,36 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v 1 mL DMF in Et_3N (0,05 mL, 0,36 mmol, 1 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati preko noči. Naslednji dan smo odparili topilo do suhega in spojino izolirali z ekstrakcijo. Najprej smo preostanek raztopili v 10 mL etilacetata in spirali z 10% citronsko kislino (2 x 5 mL). Organsko fazo smo spirali še z nas. razt. NaHCO_3 (2 x 5 mL) in z nas. razt. NaCl (5 mL) ter na koncu dodali še sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali in uparili topilo. Po sušenju spojine smo opazili, da ta ni čista, zato je sledilo čiščenje s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (20:1). Dobili smo 0,034 g čiste spojine, vendar smo s pomočjo NMR spektra ugotovili, da to ni želen produkt, torej reakcija ni uspela.

4.6. Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobrenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il-karbamata

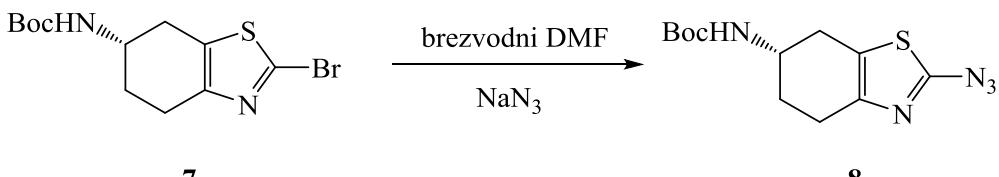


CuBr_2 (0,299 g, 1,34 mmol, 1,2 ekv.) smo raztopili v 10 mL brezvodnega N,N -dimetilformamida. Raztopini smo dodali *t*-BuONO (0,199 mL, 1,67 mmol, 1,5 ekv.) ter na koncu še spojino **2** (0,300 g, 1,11 mmol, 1 ekv.). Vse skupaj smo mešali in segrevali na oljni kopeli (50 °C) preko noči. Nato smo DMF uparili na rotavaporju in naredili ekstrakcijo. Zmes smo raztopili v 15 mL vode in dodali etilacetat (25 mL). Organsko fazo

smo spirali z 10% citronske kislino (2 x 10 mL) in dodali sušilno sredstvo (Na-sulfat). V vodni fazi je bilo še vedno prisotnega veliko produkta, zato smo ekstrakcijo ponovili (4 x 20 mL etilacetata). Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (40:1). Dobili smo 0,136 g čistega produkta **7**¹. Reakcijo smo še enkrat ponovili².

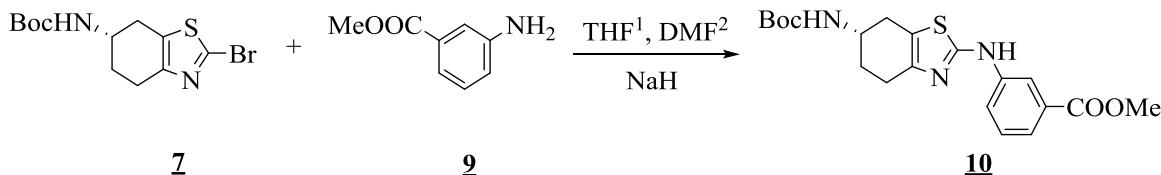
terc-butil (S)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobrenzo[1,2-d]tiazol-6-il-karbamat		
<i>Elementna sestava</i>	<i>C₁₂H₁₇BrN₂O₂S</i>	<i>Mr=333,24 g /mol</i>
<i>Opis</i>	<i>rjava oljnata spojina¹, svetlo oranžni kristali²</i>	
<i>Izkoristek</i>		<i>36,6%¹, 42,3%²</i>
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>		<i>0,67 (MF: DKM:MeOH=20:1)</i>
<i>Tališče</i>		<i>72-74 °C</i>
<i>¹H NMR</i> (400 MHz, DMSO-d ₆)		<i>δ 1,40 (s, 9H, C(CH)₃), 1,67-1,77 (m, 1H, H_A-7), 1,88-1,96 (m, 1H, H_B-7), 2,56-2,62 (m, 3H, H_A-4, H-5), 2,98 (dd, 1H, J₁=16,5 Hz, J₂=5,2 Hz, H_B-4), 3,65-3,78 (m, 1H, NHCH), 7,07 (d, 1H, J=7,5 Hz, NH) ppm</i>
<i>IR</i> (ATR)		<i>ν 3360, 2977, 2930, 1676, 1517, 1456, 1392, 1367, 1229, 1172, 1051, 1034, 873, 848, 825, 783, 672 cm⁻¹</i>

4.7. Sinteza *terc-butil (S)-2-azido-4,5,6,7-tetrahidrobrenzo[1,2-d]tiazol-6-il* karbamata



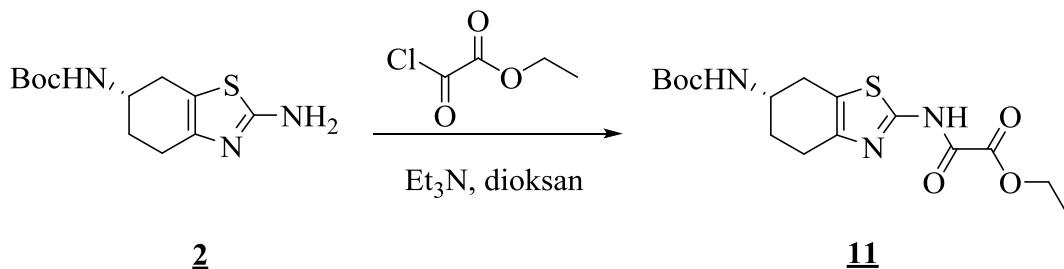
Spojino **7** (0,200 g, 0,60 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v približno 15 mL brezvodnega DMF. Nato smo dodali natrijev azid (0,117 g, 1,80 mmol, 3 ekv.). Reakcijo smo preko noči segrevali na oljni kopeli (100 °C, hladilnik, argon). Drugi dan smo spojino očistili z ekstrakcijo. Najprej smo dodali 40 mL etilacetata. Organsko fazo smo nato 2 x spirali z nas. razt. 10% citronske kisline (20 mL), z nas. razt. NaHCO₃ (2 x 20 mL) in na koncu še z nas. razt. NaCl. Dobili smo 0,091 g spojine, ki pa ni bil produkt.

4.8. Sinteza metil (S)-3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)benzoata



Spojino **9** (0,181 g, 1,20 mmol, 4 ekv.) smo raztopili v 10 mL THF. Raztopino smo ohladili (mešanje, argon) in nato dodali NaH (0,048 g, 2,00 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo postavili na oljno kopel (60°C , mešanje). Po 30 minutah smo dodali spojino **7** (0,100 g, 0,30 mmol, 1 ekv.), ki smo jo predhodno raztopili v 5 mL THF. Reakcijo smo pustili na oljni kopeli 4 ure. Nato smo izključili segrevanje in pustili reakcijsko zmes čez vikend na mešalu in jo nato še preko noči pustili na oljni kopeli (60°C). Reakcija ni potekla, zato smo sintezo modificirali (opisano v poglavju Sintezni postopki) in jo še enkrat ponovili, vendar neuspešno.

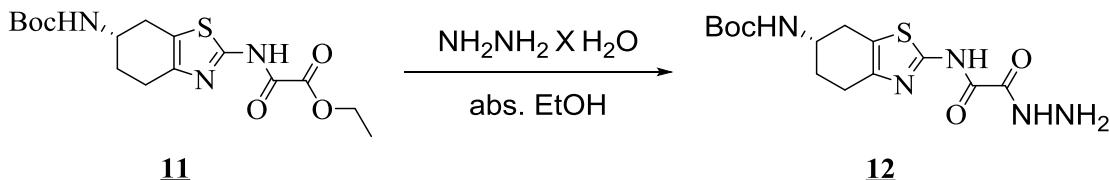
4.9. Sinteza etil (S)-(2-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetata



Spojino **2** (0,400 g, 1,49 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL dioksana. Med mešanjem smo z injekcijsko brizgo dodali Et_3N (0,310 mL, 2,23 mmol, 1,5 ekv) in etil oksalil klorid (0,220 mL, 1,93 mmol, 1,3 ekv.). Reakcijo smo pustili potekati preko noči. Nato smo reakcijsko zmes posušili do suhega in očistili z ekstrakcijo. Najprej smo jo raztopili v 20 mL etilacetata ter spirali z 10% razt. citronske kisline. Sledilo je še spiranje z nas. razt. NaHCO_3 (2 x 10 mL) in z 10 mL nas. razt. NaCl. Na koncu smo dodali še sušilno sredstvo (Na-sulfat). Po sušenju organske faze smo dobili 0,478 produkta **11**.

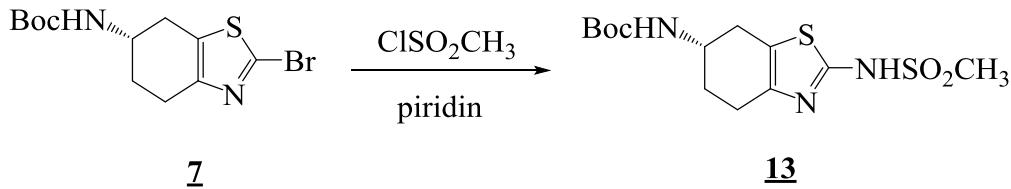
<i>etil (S)-(2-((6((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)-2-oksoacetat</i>		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{16}H_{23}N_3O_5S$	$M_r=369,44\text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>fluorescentno rumeni kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	87,0%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,72 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	68-70 °C	
<i>IR (ATR)</i>	ν 2974, 1686, 1519, 1453, 1391, 1366, 1257, 1228, 1159, 870, 818, 775 cm^{-1}	
<i>HRMS (ESI) m/z ([M-H]⁻)</i>	<i>izračunana masa: 368,1280</i> <i>izmerjena masa: 368,1282</i>	

4.10. Sinteza *terc*-butil (S)-(2-(2-hidrazinil-2-oksoacetamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)karbamata



Spojino **11** (0,470 g, 1,27 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 30 mL etanola in dodali hidrazin monohidrat (0,618 mL, 12,71 mmol, 10 ekv.). Reakcijsko zmes smo postavili na oljno kopel (mešanje, 80 °C, argon, hladilnik) in pustili preko noči. Nato smo bučko postavili na led in odnudili oborino, ki smo jo posušili v sušilnik (70 °C, 2 h). Matičnico smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan/metanol (20:1). Dobili smo 0,332 g spojine **2**, vendar reakcija ni potekla po želeni poti in po analizi NMR spektra smo videli, da nismo dobili želenega produkta.

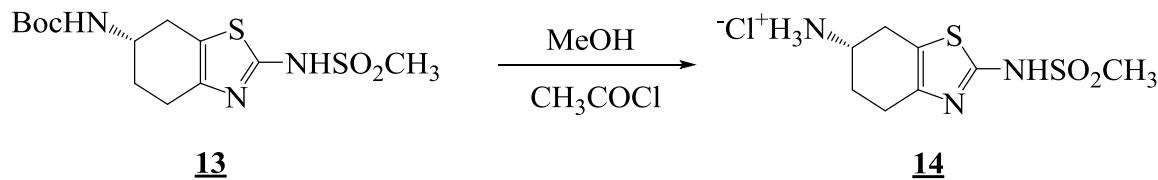
4.11. Sinteza *terc*-butil (*S*)-(2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il) karbamata



Spojino **7** (0,212 g, 0,79 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v majhnem volumnu brezvodnega piridina (2,5 mL). Med mešanjem smo raztopini dodali metilsulfonil klorid (0,067 mL, 0,87 mmol, 1,1 ekv.). Reakcijo smo pustili preko noči (mešanje, led). Naslednji dan smo spojino izolirali z ekstrakcijo. Najprej smo dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo nato 2 x spirali z 10% razt. citronske kisline (15 mL), z nas. razt. NaHCO₃ (2 x 15 mL) in na koncu še z nas. razt. NaCl (15 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na-sulfatom, filtrirali in uparili topilo. Dobili smo 0,165 g spojine **13**.

<i>terc</i>-butil (<i>S</i>)-(2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il) karbamat		
<i>Elementna sestava</i>	<i>C₁₃H₂₁N₃O₄S₂</i>	<i>Mr=347,45 g /mol</i>
<i>Opis</i>	<i>svetlo oranžni kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	<i>99,5%</i>	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	<i>0,58 (MF: DKM:MeOH=7:1)</i>	
<i>Tališče</i>	<i>158-160 °C</i>	
<i>¹H NMR</i> (400 MHz, DMSO-d ₆)	<i>δ 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,62-1,71 (m, 1H, H_A-7), 1,84-1,91 (m, 1H, H_B-7), 2,28-2,34 (m, 1H, H_A-4), 2,46-2,47 (m, 2H, H-5), 2,68 (dd, 1H, J₁=3,7 Hz, J₂=1,9 Hz, H_B-4), 2,87 (s, 3H, CH₃), 3,67-3,75 (m, 1H, CHNH), 7,05 (d, 1H, J=7,9 Hz, CHNH), 12,12 (s, 1H, NHSO₂) ppm</i>	
<i>IR (ATR)</i>	<i>ν 3367, 2934, 1681, 1512, 1391, 1365, 1297, 1248, 1165, 1123, 874, 841, 762, 712 cm⁻¹</i>	
<i>HRMS</i> (ESI) <i>m/z</i> ([M-H] ⁻)	<i>izračunana masa: 346,0895 izmerjena masa: 346,0899</i>	

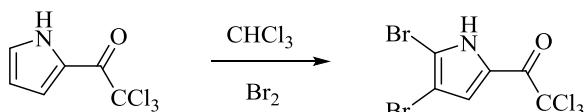
4.12. Sinteza (S)-2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijevega klorida



V bučko smo dali približno 10 mL MeOH. Nato smo prek septuma pri 0 °C dodajali acetilklorid (0,340 mL, 4,76 mmol, 10 ekv.). Po 30 minutah smo začeli dodajati spojino **13** (0,165 mg, 0,475 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v približno 10 mL MeOH. Reakcijo smo pustili potekati preko noči. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in dobili 0,158 g spojine **14**.

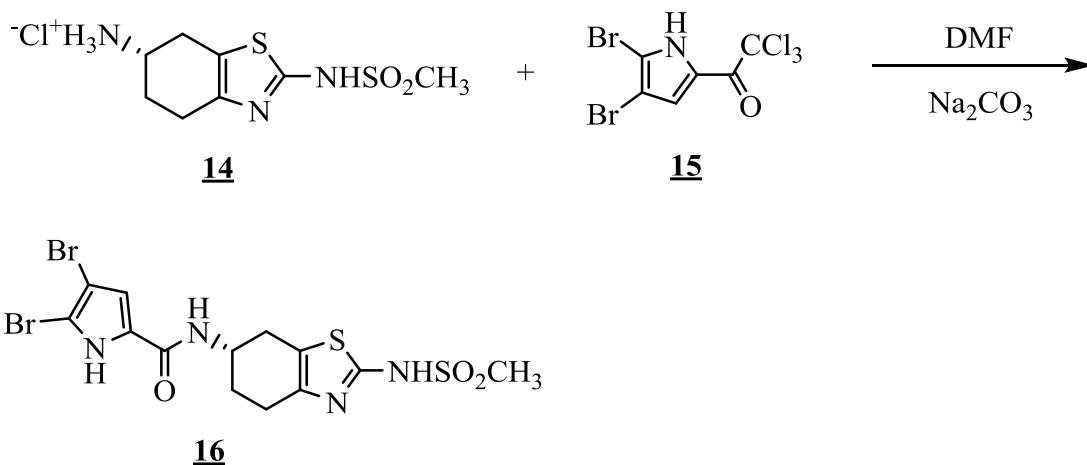
(S)-2-(metilsulfonamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijev klorid		
<i>Elementna sestava</i>	$C_8H_{14}N_3O_2S_2Cl$	$Mr=283,79 \text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>svetlo rjava oljnata spojina</i>	
<i>Izkoristek</i>	100,0%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0 (<i>MF: DKM:MeOH=7:1</i>)	
<i>1H NMR</i> (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,83-1,93 (<i>m</i> , 1 <i>H</i> , H _A -7), 2,08-2,12 (<i>m</i> , 1 <i>H</i> , H _B -7), 2,54 (<i>s</i> , 3 <i>H</i> , SO ₂ CH ₃), 2,83-8,90 (<i>m</i> , 4 <i>H</i> , H-4, H-5), 3,48-3,54 (<i>m</i> , 1 <i>H</i> , CHNH), 8,38-8,39 (<i>m</i> , 3 <i>H</i> , NH ₃ ⁺), 1243 (<i>s</i> , 1 <i>H</i> , NHSO ₂) ppm	
<i>IR</i> (ATR)	ν 2875, 1645, 1538, 1350, 1276, 1238, 1161, 1108, 992, 899, 843, 774 cm ⁻¹	
<i>HRMS</i> (ESI) m/z ([M-H] ⁻)	<i>izračunana masa:</i> 248,0527 <i>izmerjena masa:</i> 248,0522	

4.13. Sinteza reagenta: 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)etan-1-ona



2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (2,662 g, 12,53 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 50 mL kloroformu ter med mešanjem zmes ohladili na 0 °C. Na septum smo dali balonček z argonom in nato prek kapalnika v raztopino 20 minut počasi dodajali raztopino broma. Reakcija je potekala na sobni temperaturi. Drugi dan smo reakcijo ustavili z dodajanjem 20 mL 10% NaHSO₃. Reagent smo dodajali po kapljicah. Reakcijsko zmes smo prelili v lij ločnik in ločili organsko in vodno fazo ter organski fazi dodali sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali ter uparili topilo. Produkt smo brez čiščenja uporabili v naslednji stopnji.

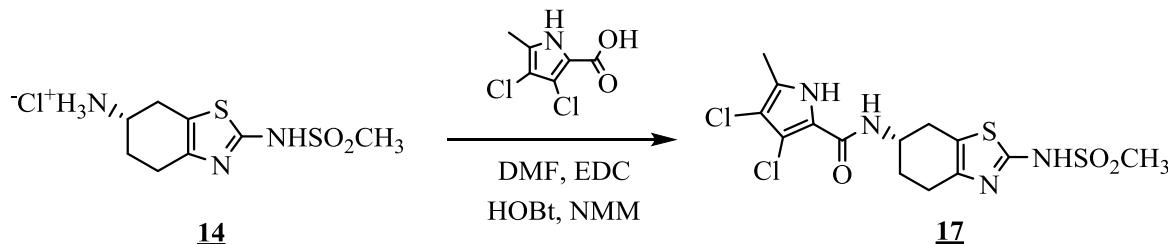
4.14. Sinteza (*S*)-4,5-dibromo-*N*-(2-(metilsulfonamido)-4,5,6,7-tetrahidro[1,2-*d*]tiazol-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida



Spojino **14** (0,065 g, 0,23 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v približno 2 mL DMF. Dodali smo natrijev karbonat (0,029 g, 0,28 mmol, 1,2 ekv.) in spojino **15** (0,093 g, 0,25 mmol, 1,1 ekv.). Reakcijo smo pustili potekati čez noč (40 °C, mešanje). Naslednji dan smo produkt izolirali z ekstrakcijo. Uparili smo topilo, surov produkt raztopili v 20 mL etilacetata, nato pa spirali z 10% razt. citronske kisline (2 x 10mL), nas. razt. NaHCO₃ (2 x 10 mL) in na koncu z 10 mL NaCl. Dobili smo 0,089 g spojine **16**.

(S)-4,5-dibromo-N-(2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamid		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{13}H_{14}N_4O_3S_2Br_2$	$Mr=498,11\text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>peščeni kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	78,1%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,48 (MF: DKM:MeOH=7:1)	
$^1H\text{ NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,77-1,87 (m, 1H, H_A -7), 1,93-1,97 (m, 1H, H_B -7), 2,40-2,45 (m, 1H, H_A -4), 2,50-2,52 (m, 2H, H -5), 2,78 (dd, 1H, J_1 =16,0 Hz, J_2 =4,8 Hz, H_B -4), .87 (s, 3H, SO_2CH_3), 4,11-4,24 (m, 1H, $CHNH$), 7,00 (d, 1H, J =2,8 Hz, <i>pirol-H</i>), 8,09 (d, 1H, J =7,8 Hz, $NHCO$), 12,31 (s, 1H, $NHSO_2$), 12,71 (d, J =2,8 Hz, <i>pirol-NH</i>) ppm	
$HRMS$ (ESI) m/z ($[M-H]^-$)	izračunana masa: 494,8796 izmerjena masa: 494,8784	
<i>HPLC</i>	$t_r = 11,73\text{ min, čistota: 95,6\% (254 nm)}$	

4.15. Sinteza (S)-3,4-dikloro-5-metil-N-(2-(metilsulfonamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamida

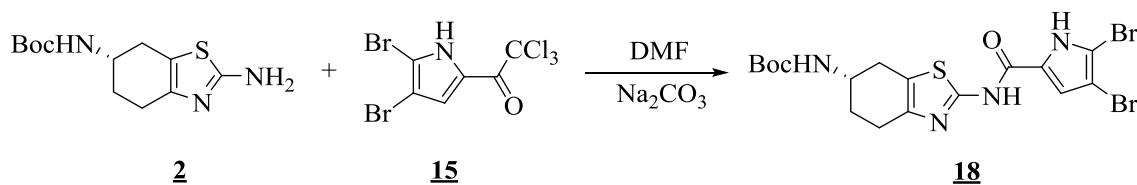


Kislinski derivat (0,041 g, 0,21 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v majhni količini DMF. Dodali smo 1-hidroksibenzotriazol (HOBT) (0,037 g, 0,27 mmol, 1,3 ekv.), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid (EDC) (0,033 g, 0,17 mmol, 1,2 ekv.) in na koncu še *N*-metilmorfolin (NMM) (0,046 mL, 0,42 mmol, 2 ekv.). Po 30 minutah smo v reakcijsko zmes dodali še spojino **14** (0,060 g, 0,21 mmol, 1 ekv.). Reakcijo smo pustili potekati preko noči (sobna T). Naslednji dan smo reakcijski zmesi dodali etilacetat (20 mL) ter produkt izolirali z ekstrakcijo. Spirali smo jo z 10% citronsko kislino (2 x 10 mL), nas. razt. NaHCO_3 (2 x 10 mL) ter na koncu še z 10 mL nas. razt. NaCl . Dodali smo še

sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,014 g spojine **17**.

(S)-3,4,dikloro-5-metil-N-(2-(metilsulfonilamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)-1H-pirol-2-karboksamid		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{14}H_{16}N_4O_3S_2Cl_2$	$Mr = 423,33 \text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>rjavi kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	15,6%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,53 (MF: DKM:MeOH=7:1)	
<i>Tališče</i>	175-177 °C	
<i>1H NMR</i> (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,89-1,99 (m, 2H, H-7), 2,19 (s, 3H, pirol-CH ₃), 2,53-2,59 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2,80 (dd, 1H, J ₁ =16,0 Hz, J ₂ =5,2 Hz, H _B -4), 2,88 (s, 3H, SO ₂ CH ₃), 4,20-4,26 (m, 1H, CHNH), 7,41 (d, 1H, J=7,8 Hz, NHCO), 12,00 (s, 1H, NHSO ₂), 12,31-12,34 (m, 1H, pirol-H) ppm	
<i>IR</i> (ATR)	ν 2883, 1624, 1541, 1351, 1294, 1239, 1118, 1045, 993, 933, 843, 764, 663 cm ⁻¹	
<i>HRMS</i> (ESI) m/z ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 420,9963 izmerjena masa: 420,9955	
<i>HPLC</i>	$t_r = 12,07 \text{ min}$, čistota: 95,1% (154nm)	

4.16. Sinteza *tert*-butil (S)-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il) karbamata

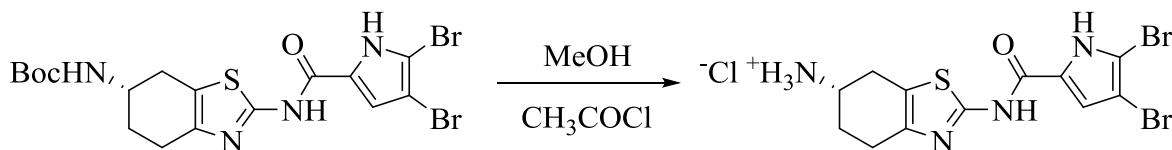


Spojino **2** (0,800 g, 2,97 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 20 mL DMF in med mešanjem dodali reagent **15** (1,100 g, 2,97 mmol, 1 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči (oljna kopel, 80 °C). Organsko fazo smo prefiltrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. Suh produkt smo raztopili v 30 mL etilacetata ter spirali z 10% citronsko kislino (2 x 20 mL), nas. razt. NaHCO₃ (2 x 20 mL) in nas. razt. NaCl (20 mL). Na koncu

smo dodali še sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali in uparili topilo. Produkt ekstrakcije ni bil čist, zato smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili diklorometan:metanol (20:1). Dobili smo 0,259 g nečistega produkta. Kolonsko kromatografijo smo morali še enkrat ponoviti, vendar z bolj nepolarno mobilno fazo. Uporabili smo diklorometan:metanol v razmerju 30:1. S pomočjo NMR spektra smo ugotovili, da spojina še vedno ni čista, zato smo reakcijo še enkrat ponovili, vendar smo postopek nekoliko modificirali (opisano v poglavju Sintezni postopki). Na koncu smo dobili 0,610 g spojine **18**.

<i>terc-butil (S)-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il) karbamat</i>		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{17}H_{20}Br_2N_4O_3S$	$M_r=520,24\text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>beli kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	39,5%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,45 (MF: EtOAC:Hex=1:1)	
<i>Tališče</i>	176-178 °C	
<i>1H NMR</i> (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,41 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1,68-1,78 (m, 1H, H_A -7), 1,91-1,99 (m, 1H, H_B -7), 2,55-2,76 (m, 3H, H_A -4, H-5), 2,91 (dd, 1H, $J_1=15,1$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H_B -4), 3,69-3,79 (m, 1H, $CHNH$), 7,01 (d, $J=7,7$ Hz, $CHNH$), 7,40 (s, 1H, pirol-H), 12,18 (s, 1H, NH), 13,08 (s, 1H, NH) ppm	
<i>IR (ATR)</i>	ν 3366, 3120, 2844, 1680, 1616, 1556, 1457, 1379, 1335, 1280, 1160, 1090, 972, 856, 779, 750, 708, 680 cm^{-1}	
<i>HRMS</i> (ESI) m/z ($[M-H]^-$)	<i>izračunana masa: 516,9549</i> <i>izmerjena masa: 516,9541</i>	

4.17. Sinteza (S)-2-(4,5-dibromo-1H-1-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijevega klorida

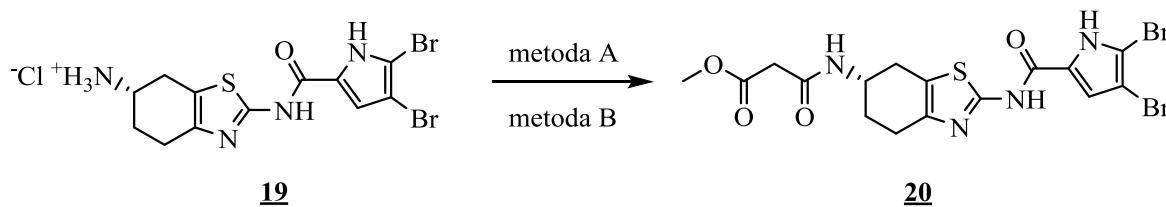
**18****19**

V 50 mL bučko smo dali 10 mL metanola, bučko pokrili s septumom ter jo postavili na magnetno mešalo. Najprej smo jo ohladili, nato pa z injekcijsko brizgo po kapljicah dodajali acetilklorid (0,691 mL, 9,71 mmol, 10 ekv.) in na ta način generirali plinasti HCl. Po pol ure smo z injekcijo dodali še spojino **18** (0,505 g, 0,97 mmol, 1 ekv.) raztopljeno v 10 mL metanola. Reakcijo smo pustili potekati preko noči. Naslednji dan smo najprej bučko postavili za 5 minut na led, da je izpadlo čim več produkta, ki smo ga nato odnučali in posušili v sušilniku (70 °C, 1,5 h). Matičnici smo odparili topilo in posušili do suhega.

Dobili smo 0,388 g spojine **19**.

<i>(S)-2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[12-d]tiazol-6-amonijev klorid</i>		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{12}H_{13}Br_2N_4OSCl$	$M_r = 456,58 \text{ g/mol}$
<i>Izkoristek</i>		87,6%
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>		0 (MF: DKM:MeOH=9:1)
<i>Tališče</i>		več kot 300 °C
$^1H\ NMR$ (400 MHz, DMSO- d_6)		δ 1,87-1,97 (m, 1H, H_A -7), 2,11-2,19 (m, 1H, H_B -7), 2,71-2,80 (m, 3H, H_4 -A, H-5), 3,10 (dd, 1H, J_1 =16,0 Hz, J_2 =5,1 Hz, H_B -4), 3,51-3,54 (m, 1H, $CHNH$), 7,40 (d, 1H, J =2,7 Hz, pirol-H), 8,28 (d, 3H, J =4,4 Hz, NH_3^+), 12,30 (s, 1H, NH), 13,14 (s, 1H, NH) ppm
<i>IR</i> (ATR)		ν 3394, 2828, 1692, 1631, 1567, 1519, 1382, 1338, 1199, 1183, 1073, 97, 904, 845, 733, 616 cm^{-1}
<i>HRMS</i> (ESI m/z $[M-H]^-$)		izračunana masa: 416,9020 izmerjena masa: 416,9030

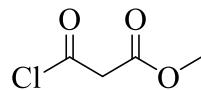
4.18. Sinteza metil (S)-3-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksadimo)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoata



✓ Sintezni postopek metode A

Reagenti in topila:

- Metil malonil klorid
- Dioksan
- Et₃N

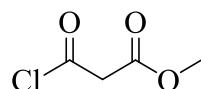


Spojino **19** (0,150 g, 0,33 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 10 mL dioksana in raztopino postavili na ledeno kopel za 5 minut. Nato smo med mešanjem z avtomatsko pipeto dodali trietilamin (0,138 mL, 0,98 mmol, 3 ekv.) in metil malonil klorid (0,045 mL, 0,42 mmol, 1,3 ekv.). Reakcijo smo pustili na sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo najprej uparili topilo, nato pa vzorec raztopili v etilacetatu (20 mL). Spirali smo z 10% citronsko kislino (2 x 10 mL), nas. razt. NaHCO₃ (2 x 10 mL), nas. razt. NaCl (10 mL) in na koncu dodali še sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali in uparili topilo. Dobili smo zanemarljivo količino spojine **20**.

✓ Sintezni postopek metode B

Reagenti in topila:

- Metil malonil klorid
- Dimetilformamid (DMF)
- 1,8-diazobiciklo(5.4.0)undek-5-en (DBU)

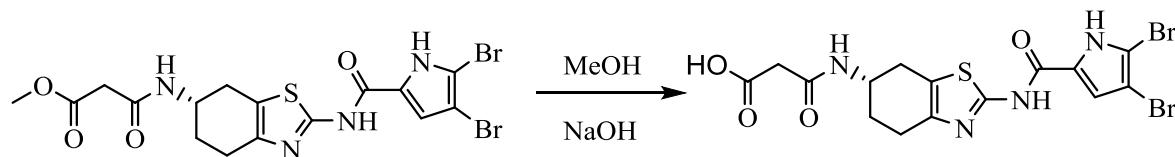


Spojino **19** (0,1 g, 0,22 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL N,N-dimetilformamida (DMF). Raztopino smo nato postavili na ledeno kopel in na magnetno mešalo. Ko se je ohladila, smo dodali DBU (0,097 mL, 0,65 mmol, 3 ekv.) in metil malonil klorid (0,031 mL, 0,29 mmol, 1,3 ekv.). Reakcijo smo spremljali 4 ure in jo nato pustili potekati preko noči. Drugi dan smo reakcijski zmesi dodali še 100 µL DBU (3 ekv.) in 12,5 µL (0,5 ekv.) metil malonil klorida. Nato smo naredili izolacijo spojine z ekstrakcijo. Reakcijski zmesi smo uparili topilo in preostanek raztopili v 20 mL etilacetata in nato spirali z 10%

raztopino citronske kisline (2 x 10 mL), nas. razt. NaHCO₃ (2 x 10 mL) in 10 mL nas. razt. NaCl. Organski fazi smo na koncu odtegnili vso vodo z dodatkom sušilnega sredstva (Na-sulfat). Po filtraciji smo odparili topilo in posušili vzorec do suhega. Dobili smo 0,062 g spojine **20**.

<i>metil (S)-3-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksadimo)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoat</i>		
<i>Elementna sestava</i>	C ₁₆ H ₁₆ Br ₂ N ₄ O ₄ S	M _r =520,20 g/mol
<i>Opis</i>	<i>beli kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	54,4%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,70 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	205-207 °C	
<i>¹H NMR</i> (400 MHz, DMSO-d ₆)	<i>δ</i> 1,74-1,84 (m, 1H, H _A -7), 1,87-1,95 (m, 1H, H _B -7), 2,51-2,57 (m, 2H, H _A -4, H _A -5), 2,67-2,73 (m, 1H, H _B -5), 2,94 (dd, 1H, J ₁ =15,8 Hz, J ₂ =5,0 Hz, H _B -4), 3,24 (d, 2H, J=1,9 Hz, COCH ₂ CO), 3,59 (s, 3H, CH ₃), 4,02-4,10 (m, 1H, CHNH), 7,8 (s, 1H, pirol-H), 8,23 (d, 1H, J=7,6 Hz, CONHCH), 12,21 (s, 1H, NH), 13,08 (s, 1H, NH) ppm	
<i>IR</i> (ATR)	<i>v</i> 3261, 3124, 2952, 1721, 1641, 1538, 1438, 1384, 1324, 1352, 1281, 1226, 1177, 1122, 1018, 991, 975, 902, 856, 832 773, 740, 696 cm ⁻¹	
<i>HRMS</i> (ESI m/z ([M-H] ⁻)	<i>izračunana masa:</i> 516,9181 <i>izmerjena masa:</i> 516,9188	
<i>HPLC</i>	<i>t_r</i> = 12,26 min, <i>čistota:</i> 95,5% (254 nm)	

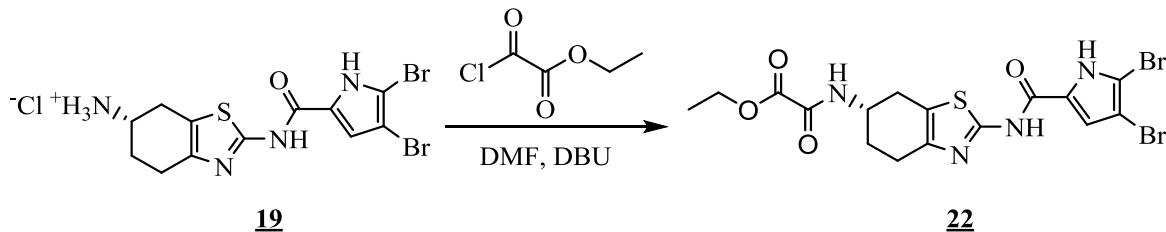
4.19. Sinteza (S)-3-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanojske kisline

**20****21**

Spojino **20** smo raztopili v 5 mL metanola ter dodali NaOH (0,192 mL, 0,38 mmol, 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili za 2 uri na magnetnem mešalu, da je reakcija v celoti potekla. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom in reakcijsko zmes nakisali z 2 M HCl do pH=1. Izpadlo oborino smo odnučali in po sušenju spojine dobili 0,0065 g spojine **21**.

(S)-3-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanojska kislina		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{15}H_{14}Br_2N_4O_4S$	$M_r = 506,17\text{ g/mol}$
<i>Opis</i>	<i>beli kristali</i>	
<i>Izkoristek</i>	16,7%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	123-125 °C	
<i>1H NMR</i> (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,77-1,87 (m, 1H, H_A -7), 1,90-2,00 (M, 1H, H_B -7), 2,64-2,76 (m, 3H, H_A -4, H-5), 2,97 (dd, 1H, J_1 =15,5 Hz, J_2 =4,7 Hz, H_B -4), 3,15 (d, 2H, J =2,6 Hz, $COCH_2CO$), 4,05-4,17 (m, 1H, $CHNH$), 7,40 (s, 1H, pirol-H), 8,21 (d, 1H, J =7,5 Hz, $CONHCH$), 12,37 (s, 1H, NH), 13,11 (s, 1H, NH) ppm	
<i>IR</i> (ATR)	ν 3287, 2924, 1711, 1656, 1558, 1383, 1328, 1304, 1260, 1213, 1182, 1099, 1014, 977, 921, 863, 836, 802, 740, 673, 632 cm^{-1}	
<i>HRMS</i> (ESI m/z [$M-H^-$])	<i>izračunana masa:</i> 502,9010 <i>izmerjena masa:</i> 502,9024	
<i>HPLC</i>	$t_r = 11,07\text{ min}$, <i>čistota:</i> 96,2% (254 nm)	

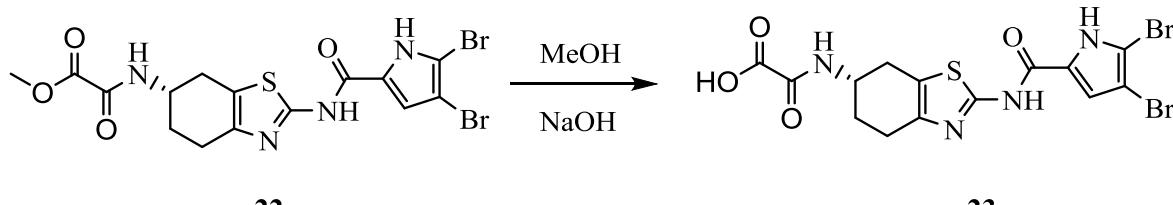
4.20. Sinteza etil (S)-2-((2-(((4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)metil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetata



Spojino **19** (0,115 g, 0,25 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL DMF in reakcijsko zmes med mešanjem ohladili na ledeni kopeli. Ohlajeni raztopini smo dodali DBU (0,226 mL, 1,51 mmol, 6 ekv.) in etil oksalil klorid (0,057 mL, 0,50 mmol, 2 ekv.). Reakcijo smo pustili potekati preko noči. Nato smo zmesi odparili topilo na rotavaporju in jo očistili z ekstrakcijo. Najprej smo jo raztopili v 20 mL etilacetata in spirali z 2 x 10 mL 10% citronske kisline. Sledilo je spiranje z 2 x 10 mL nas. razt. NaHCO₃ ter 10 mL nas. razt. NaCl. Organski fazi smo dodali sušilno sredstvo (Na-sulfat), filtrirali in pod znižanim tlakom posušili produkt do suhega. Dobili smo 0,080 g spojine **22**.

etil (S)-2-((2-(((4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)metil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat		
<i>Elementna sestava</i>	C ₁₆ H ₁₆ Br ₂ N ₄ O ₄ S	M _r =520,20 g/mol
<i>Izkoristek</i>	61,0%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0,78 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	160-162 °C	
<i>¹H NMR</i> (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ 1,28 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 1,87-1,98 (m, 2H, H-7), 2,69-2,76 (m, 3H, H _A -4, H-5), 2,93 (dd, 1H, J ₁ =15,8 Hz, J ₂ =5,5 Hz, H _B -4), 4,07-4,14 (m, 1H, CHNH), 4,25 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ CH ₃), 7,41 (s, 1H, pirol-H), 9,04 (d, 1H, H=8,1 Hz, CONHCH), 12,23 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH) ppm	
<i>IR</i> (ATR)	ν 3228, 2937, 174, 1668, 1535, 1443, 1405, 1378, 1318, 1284, 1262, 1211, 1110, 1017, 973, 933, 859, 745, 699, 639, 620 cm ⁻¹	
<i>HRMS</i> (ESI m/z ([M-H] ⁻)	izračunana masa: 516,9181 izmerjena masa: 516,9186	
<i>HPLC</i>	t _r = 12,91 min, čistota: 95,1% (254 nm)	

4.21. Sinteza (S)-2-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetne kisline



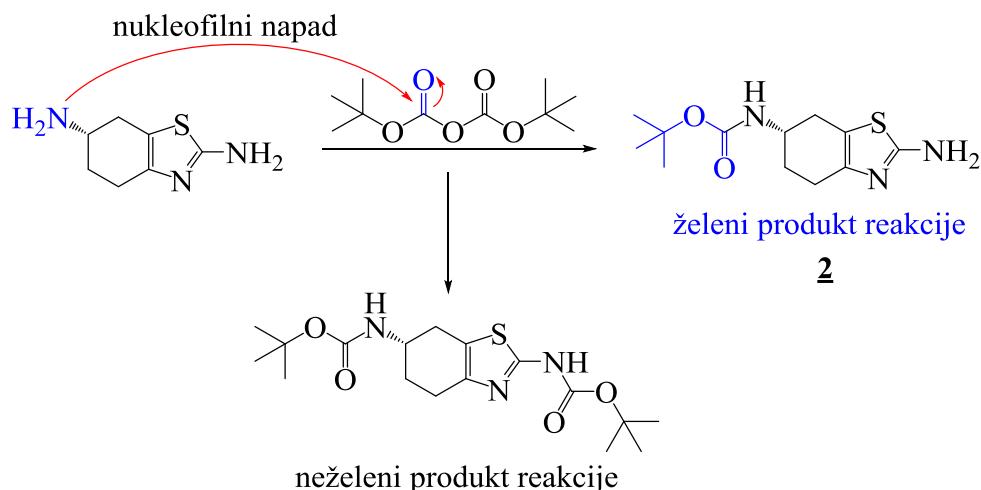
Spojino 22 (0,050 g, 0,01 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v 5 mL metanola ter z avtomatsko pipeto dodali 2 M NaOH (0,240 mL, 0,48 mmol, 5 ekv.). Reakcijsko zmes smo postavili na magnetno mešalo in pustili mešati pri sobni temperaturi. Po dveh urah smo izvedli izolacijo spojine 22. Na rotavaporju smo odparili metanol in dodali 5 mL destilirane vode. Nato smo ekstrahirali z 10 mL etilacetata in dobljeno vodno fazo nakisali z 2 M HCl do pH=1. Nakisano raztopino smo 4 x ekstrahirali z 10 mL etilacetata. Združene organske faze smo sušili nad Na-sulfatom, filtrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 0,032 g spojine 23.

<i>(S)-2-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetna kislina</i>		
<i>Elementna sestava</i>	$C_{14}H_{12}Br_2N_4O_4S$	$M_r=492,14\text{ g/mol}$
<i>Izkoristek</i>	68,1%	
<i>Retencijski faktor (R_f)</i>	0 (MF: DKM:MeOH=9:1)	
<i>Tališče</i>	236-238 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	δ 1,89-1,97 (m, 2H, H-7), 2,45-2,47 (m, 1H, H-4, H-5), 2,70-2,77 (m, 2H, H-4, H-5), 2,92 (dd, 1H, $J_1=15,6$ Hz, $J_2=5,1$ Hz, H _B -4), 4,03-4,12 (m, 1H, CHNH), 7,40 (s, 1H, pirol-H), 8,95 (d, 1H, J=8,4 Hz, CONHCH), 12,23 (s, 1H, NH), 13,11 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ATR)	ν 2941, 1657, 1555, 1408, 1383, 1325, 1223, 1171, 1079, 973, 864, 829, 742, 662, 618 cm ⁻¹	
HRMS (ESI) m/z ([M-H]) ⁻	izračunana masa: 488,8868 izmerjena masa: 488,8879	
HPLC	$t_r = 11,74$ min, čistota: 95,0% (254 nm)	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Komentar sinteznih postopkov

5.1.1. Zaščita aminske skupine na mestu 6



Slika 14: Prikaz želenega in neželenega produkta reakcije zaščite amina v obliki Boc-karbamata. (Prirejeno po (18, 25))

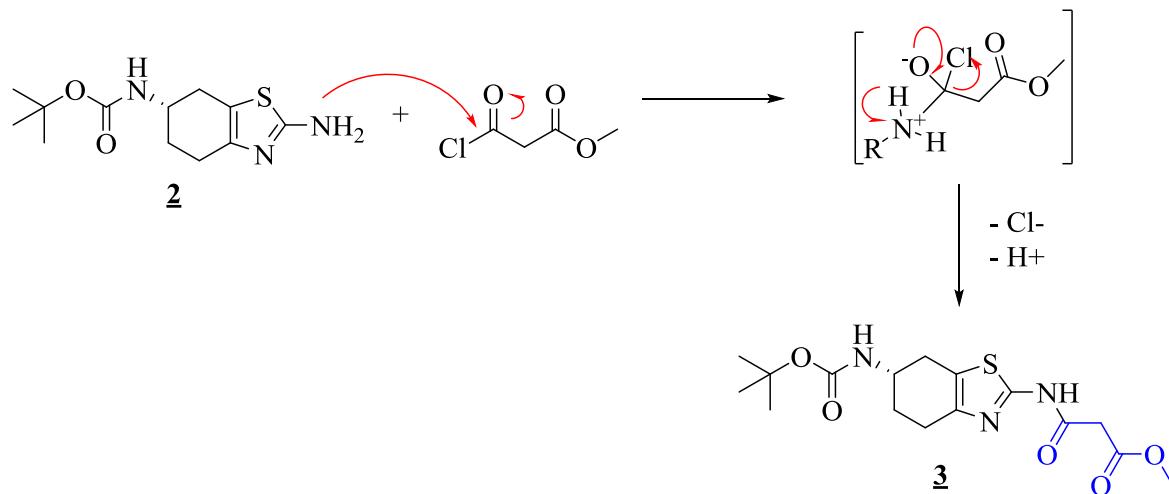
V prvi stopnji smo na (*S*)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin z reakcijo nukleofilne substitucije uvedli zaščitno amino skupine na mestu 6 (**Slika 14**). Nukleofilna amino skupina napade elektrofilni C atom (označeno z rdečo puščico). Selektivnost reakcije smo dosegli z nizko temperaturo (0 °C) in počasnim dokapavanjem di-*terc*-butil dikarbonata v raztopino izhodnega diamina. Ker je aminska skupina zelo dober nukleofil, smo z uvedbo zaščitne skupine na mestu 6 omogočili potek naslednjih stopenj reakcije po želeni poti (selektivnost). (18, 25)

5.1.2. Sinteza amida s kislinskim kloridom (N-aciliranje)

V naslednji stopnji smo na aminsko skupino na mestu 2 uvedli metil malonil klorid. To smo naredili z reakcijo N-aciliranja, ki poteče preko nestabilnega tetraedričnega intermediata (**slika 15**). (18)

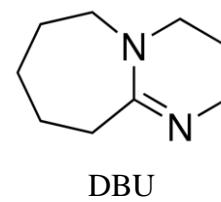
Kislinski klorid je koroziven in zelo reaktivен. Draži sluznico in oči, zato smo reakcijo izvajali v digestoriju, opremljeni z rokavicami in zaščitnimi očali. Pri reakciji je prišlo do izločanja HCl, kar smo videli kot motnost v bučki. Da ne bi prišlo do protoniranja amina, smo za nevtralizacijo sproščene HCl v reakcijsko zmes dodali bazo trietylamin v

prebitku. Po končani reakciji smo spojino raztopili v etilacetatu in spirali z 10% razt. citronske kisline. S tem je prišlo do protoniranja dodane baze in spiranja nastale soli v vodno fazo. V naslednji stopnji smo organsko fazo spirali z nas. razt. NaHCO_3 in se znebili nezreagiranega metil malonil klorida oziroma kisline, ki je nastala pri hidrolizi prebitnega kislinskega klorida. Na koncu smo organsko fazo spirali še z nasičeno raztopino NaCl , ki je odtegnila še preostanek vode v organski fazi in na koncu dobili čist produkt (spojino **3**).



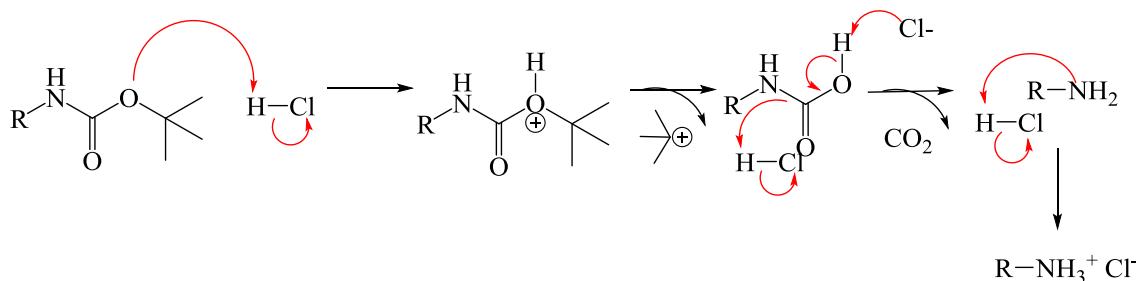
Slika 15: Reakcija tvorbe amidne vezi s kislinskim kloridom. (Pриrejeno po (18, 25))

Z reakcijo med kislinskim kloridom in aminom smo izvedli tudi sinteze spojin **6**, **11**, **20** in **22**. Spojino **6** (metoda A) smo sintetizirali s kislinskim kloridom (4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil-klorida) raztopljenem v DMF in bazo (piridin), vendar reakcija ni uspela. Sklepali smo, da je piridin prešibka baza oziroma oz. da je ta reagiral v reakciji kot nukleofil. Drugi možen vzrok je sterična oviranost spojine **5**, zato smo sintezo izvedli še z metodo B s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU (podpoglavlje 4.5.). Pri sintezah spojine **20** in **22** smo kot bazo uporabili DBU (1,8-diazabicikloundek-7-en). Prav tako kot trietilamin ($\text{pK}_\text{a}=10,75$) je tudi DBU ne-nukleofilna baza, vendar nekoliko močnejša ($\text{pK}_\text{a}=13,5$). Reakcijo sinteze spojine **20** smo najprej nastavili s trietilaminom. Ker reakcija ni potekla po želeni poti, smo njeno sintezo modificirali in trietilamin zamenjali z DBU. Reakcija je uspela, kot smo pričakovali. Iz tega lahko sklepamo, da je bil neuspeh pri prvi sintezi posledica prešibke baze, ki ni uspela pretvoriti soli izhodne spojine v prosti amin in posledično ni bilo dovolj nukleofila za reakcijo. Vse reakcije s kislinskimi kloridi potekajo po mehanizmu, kot je prikazano na **Sliki 15**.



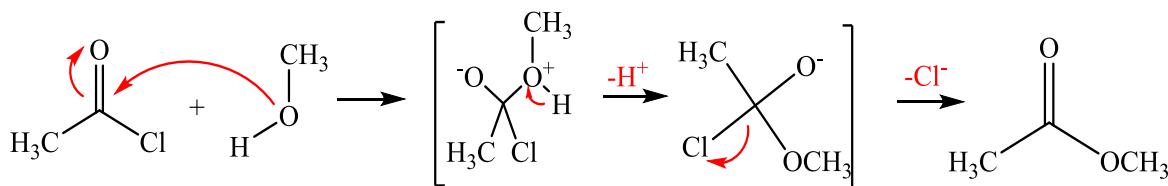
5.1.3. Odščita amina

Odščito amina smo izvedli z reakcijo acidolize z uporabo HCl. Za sintezo spojin **4** smo uporabili že pripravljeno raztopino 4 N HCl v 1,4-dioksanu. Bučko smo za kratek čas postavili na ledeno kopel ter reagentu prek septuma z injekcijsko brizgo dodali raztopino zaščitenega amina. Produkt želene reakcije je sol, saj HCl protonira amin, ki nastane pri odščiti (**Slika 16**).



Slika 16: Odščita Boc zaščitne skupine z acidolizo. (Prirejeno po (35))

Pri odščiti spojine **13** in **18** smo acidolizo izvedli tako, da smo HCl generirali *in situ* pri reakciji med acetilkloridom in metanolom (**Slika 17**). Reakcija je potekla po mehanizmu nukleofilne substitucije, preko nestabilnega tetraedričnega intermediata. Pri tem ima velik vpliv klor, ki je dobra izstopajoča skupina in poveča reaktivnost kislinskega derivata. Produkta reakcije sta HCl in metilacetat. Ker gre za eksotermno reakcijo, smo jo izvajali pri znižani temperaturi (0 °C).

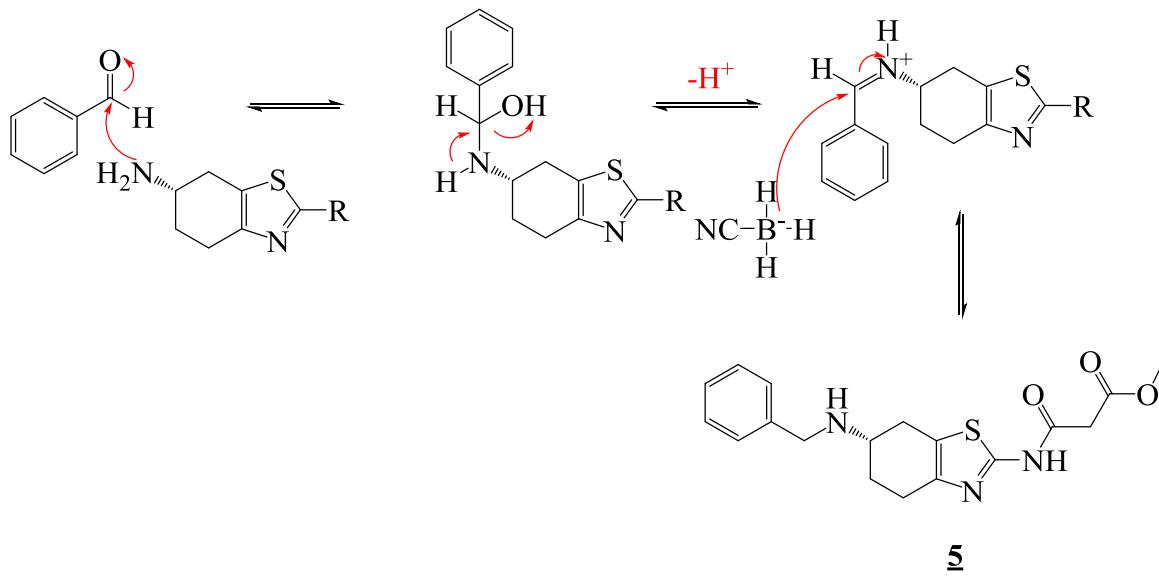


Slika 17: Reakcija *in situ* nastanka HCl med acetilkloridom in metanolom. (Prirejeno po (25))

5.1.4. Reduktivno aminiranje

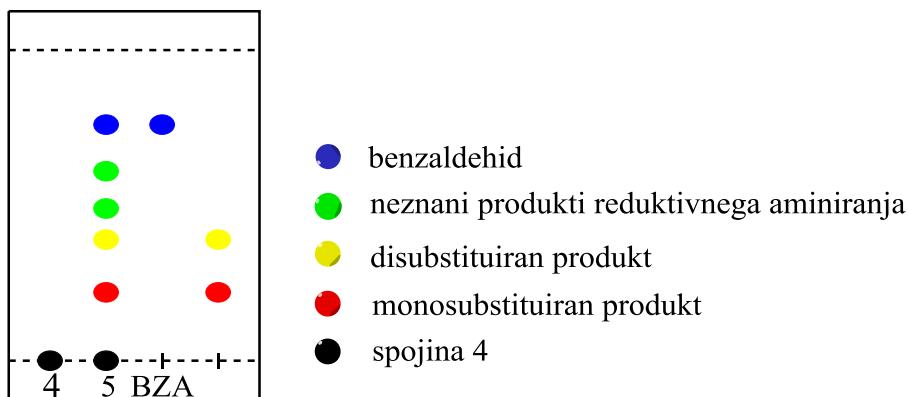
Pri sintezi spojine **5** smo k spojni **4** najprej dodali bazo (Et_3N) in s tem povzročili deprotonacijo soli, ki je nastala pri prejšnji stopnji reakcije. Reakcijski zmesi smo nato dodali benzaldehid in prišlo je do tvorbe imina. Benzaldehyda pri tej reakciji ne smemo dati v prebitku, saj bi tako omogočili tvorbo stranskega dibenziliranega produkta. Po eni uri smo v reakcijsko zmes dodali reducent NaCNBH_3 in izvedli redukcijo nastalega imina do

amina. Pri uporabi omenjenega reducenta predhodna izolacija imina ni potrebna, ampak tvorbo imina in sledoč redukcijo izvedemo *in situ*, kar imenujemo reduktivno aminiranje (**Slika 18**). Na voljo je še veliko reducentov za reduktivno aminiranje (npr. H₂, Pd/C), vendar je pri njihovi uporabi potrebna predhodna izolacija imina, kar podaljša postopek reakcije in pogosto zniža njen izkoristek. (18)



Slika 18: Reakcija reduktivnega aminiranja med aminom in benzaldehidom. (Prirejeno po (18))

Kljub majhni količini dodanega benzaldehyda smo kot neželen stranski produkt dobili dibenzilirano spojino. Ta ima višji R_f kot želeni monobenziliran produkt, saj gre za bolj lipofilno spojino (2 benzilna fragmenta, ki povečata lipofilnost spojine). Na TLC kromatogramu lahko pred čiščenjem spojine **5** opazimo prisotnost izhodne spojine **4**, benzaldehid in neznane produkte reduktivnega aminiranja (**Slika 19**). Po čiščenju spojine s kolonsko kromatografijo je združena frakcija mono- in dibenziliranega produkta vsebovala tudi trietilamonijev klorid, zato je bila masa te frakcije prevelika.



Slika 19: Prikaz stranskih produktov reduktivnega aminiranja.

5.1.5. Sinteza metil 3-(((6*S*)-6-((2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-2-okso-1-feniletil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2-il)amino)-3-oksopropanoata (spojina 6)

Sintezo spojine **6** smo skušali izvesti po dveh ločenih sinteznih poteh. V obeh primerih je šlo za reakcijo med karbonilno skupino kisline oz. kislinskega derivata ter aminsko skupino na mestu 6 osnovnega 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskega ogrodja.

Pri prvi reakciji (metoda A) smo najprej iz karboksilne kisline in oksalil klorida tvorili kislinski klorid 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil klorid. Nato smo v reakcijsko zmes dodali piridin, ki je nevtraliziral prebitno HCl. V naslednji stopnji smo v raztopino kislinskega klorida in DMF dodali spojino **5**. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo smo dobili zanemarljivo malo produkta, zato smo poskusili izvesti sintezo še s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU (metoda B-opisana v naslednjem poglavju Reakcije s sklopitvenimi reagenti).

5.1.6. Reakcije s sklopitvenimi reagenti

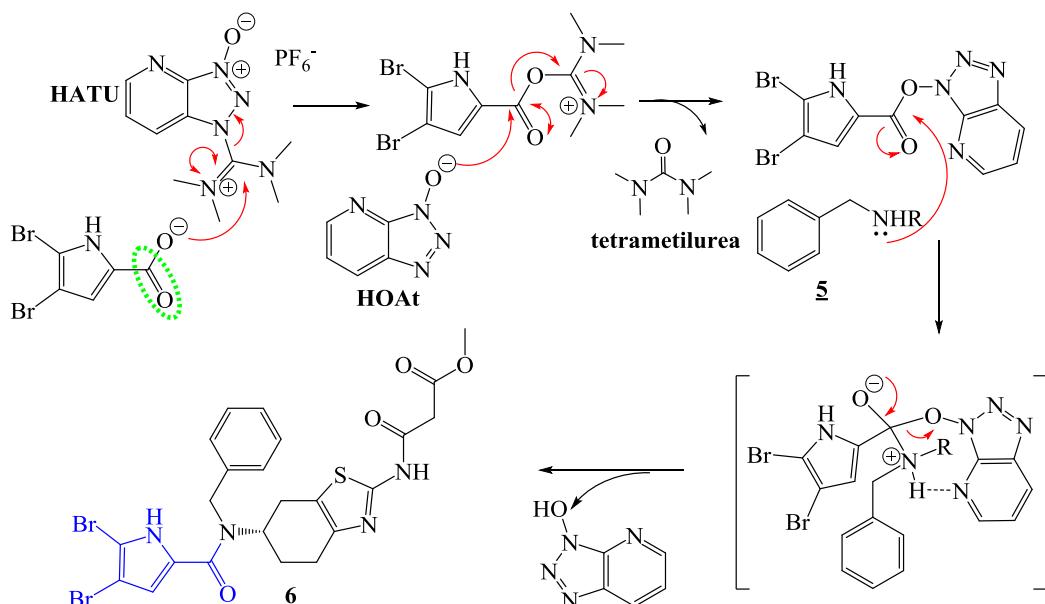
»Coupling reagente« oz. sklopitvene reagente uporabljamo za sintezo amidne vezi med aminom in karboksilno skupino. Reakcija sklopitve poteka v dveh korakih. V prvem koraku poteče aktivacija karboksilne skupine ene spojine, v drugem koraku pa pride do nukleofilnega napada NH₂ skupine druge spojine na aktivirano karboksilno skupino. Poznamo več vrst sklopitvenih reagentov. Najpogosteje uporabljeni so karbodiimidi (DCC, EDC) ter fosforjeve in amonijeve soli (HATU). (26)

Sintezi spojin **6** (metoda B) in **17** smo izvedli s pomočjo sklopitvenih reagentov.

<i>Spojina</i>	<i>Uporabljeni sklopitveni reagent/i</i>	<i>struktturna formula</i>
6	HATU: 1-(bis(dimetilamino)methilen)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin 3-oksid heksafluorofosfat	
17	EDC: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etilkarbodiimid HOEt: 1-hidroksibenzotriazol	

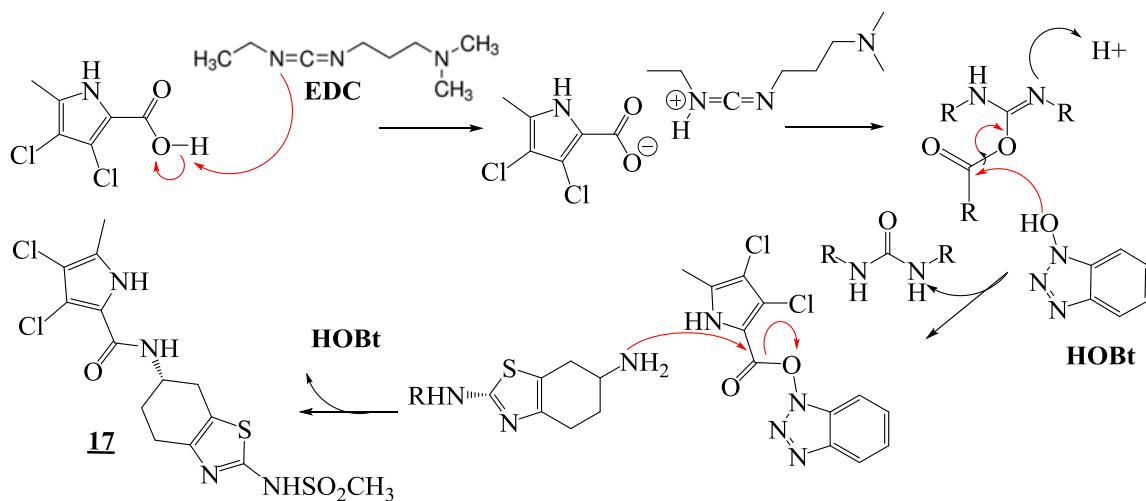
Preglednica IV: Pregled uporabljenih sklopitvenih reagentov. (Priprejeno po (26, 29))

Pri sintezi spojine **6** smo 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino raztopili v DMF (topilo) ter dodali ne-nukleofilno bazo trietylamin in sklopitveni reagent HATU. Aktivacija karboksilne kisline je potekla *in situ* (Slika 20). Baza je povzročila deprotonacijo karboksilne kisline in s tem povečala elektrofilnost karbonilne skupine (označeno z zeleno). Nato pride do napada kisikovega atoma karboksilata kot nukleofila na elektrofilen ogljikov atom sklopitvenega reagenta (HATU) in s tem do tvorbe aktiviranega estera. Ta v naslednji stopnji reagira s HOEt, pri čemer nastane nov, še bolj aktiviran ester in tetrametilurea, ki pri reakciji izstopa (Slika 20). Po 30 minutah smo v reakcijsko zmes dodali amin (spojino **5**). Prek vmesnega stanja je prišlo do tvorbe amidne vezi in nastanka produkta **6**. (26, 31)



Slika 20: Mehanizem aktivacije kisline s pomočjo sklopitvenega reagenta HATU in sinteza spojine **6**. (Priprejeno po (27))

Pri sintezi spojine **17** smo uporabili kombinacijo sklopitvenih reagentov (**Slika 21**). Kisline smo raztopili v DMF ter raztopini dodali HOBr, EDC in na koncu še bazo NMM (*N*-metilmorfolin). EDC reagira s karboksilno skupino, pri čemer pride do tvorbe O-acilizouree. Intermediat bi lahko direktno reagiral z želenim aminom in tvoril amid ter ureo kot stranski produkt, vendar bi bila izolacija zelo kompleksna. Pri reakciji pride pogosto do racemizacije in tvorbe N-aciluree. Nastanek stranskega produkta zmanjšamo z dodajanjem sklopitvenega reagenta pri 0 °C, ali pa z dodatkom izbranega pomožnega nukleofila. Najpogosteje uporabljeni nukleofili te vrste sta 4-dimetilaminopiridin (DMAP) in HOBr. Dodaten sklopitveni reagent reagira z anionom hitreje, kot poteče prenos acilne skupine. To je posledica elektron-privlačne skupine (OH) HOBr-a, ki poveča elektrofilen značaj karbonilne skupine karboksilne skupine. NMM je k reakciji dodana kot ne-nukleofilna baza, ki je poleg *N,N*-diizoetylpropilamina (DIPEA) zelo pogosto uporabljeni baza pri sklopitvenih reakcijah. V DMF poteka aktivacija kisline počasi, zato dodamo bazo, ki pospeši reakcijo aktivacije karboksilne kisline. Po 30 minutah, ko je potekla aktivacija kisline, smo dodali še spojino **14** in potekla je tvorba amidne vezi. (26, 31)

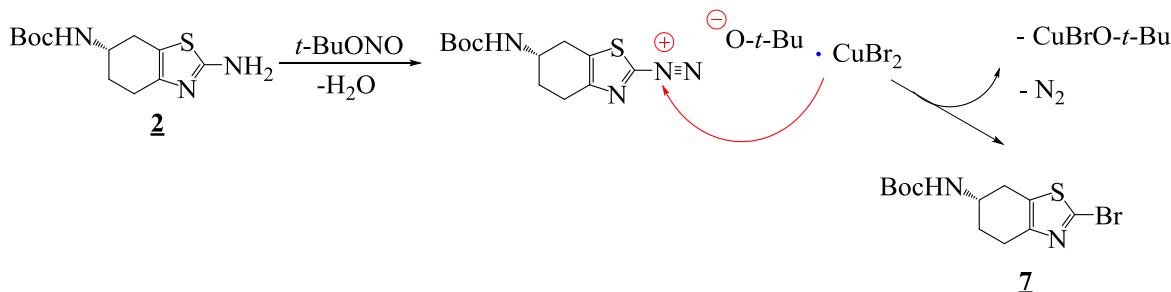


Slika 21: Mehanizem aktivacije kislinskega derivata s pomočjo sklopitvenih reagentov EDC in HOBr in sinteza spojine **17**. (Prizjeno po (30))

5.1.7. Sinteza terc-butil (*S*)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il-karbamata (spojina 7)

Pri sintezi spojine **7** je najprej potekla reakcija med aminsko skupino spojine **2** na mestu 2 in *t*-BuONO. Pri tem je prišlo do pretvorbe amino skupine v diazonijevo sol (**Slika 22**). V naslednji stopnji je prišlo do zamenjave diazo skupine z bromovim atomom z uporabo CuBr₂ reagenta. Gre za Sandmeyerjevo reakcijo, s katero lahko sintetiziramo

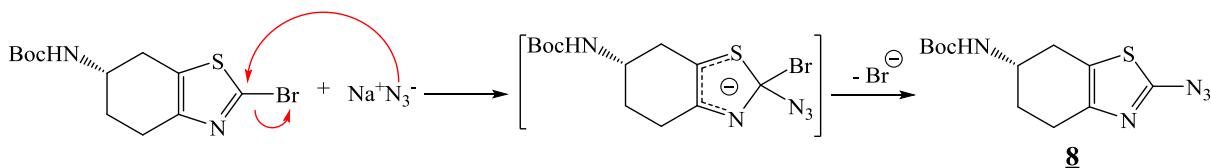
arilbromide, arilkloride in arilcianide. Ta poteka po radikalskem mehanizmu s prenosom elektronov, ki ga katalizirajo kovinske soli (v našem primeru baker (Cu)) kot je prikazano na **Sliki 22**. Pri reakciji poteče posredna vezava bromovega atoma in nastanek 2-bromotiazolnega produkta (spojina **7**). To omogoča nastanek le želenega produkta in ne zmes *ortho* in *para* substituiranih produktov, kar je značilno za neposredne reakcije vezave halogena. (23, 25)



Slika 22: Mehanizem nastanka 2-bromotiazolnega produkta (spojina **7**) po mehanizmu Sandmeyerjeve reakcije. (Prirejeno po (23, 25))

5.1.8. Sinteza z natrijevim azidom

Za sintezo spojine *terc*-butil (*S*)-2-azido-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il karbamata (spojina **8**) smo uporabili natrijev azid. Gre za dober ionski nukleofil (N_3^-), ki lahko zamenja dobro izstopajoče skupine primarnih in sekundarnih alkil halogenidov. V našem primeru pa je šlo za reakcijo, ki je potekala po mehanizmu nukleofilne aromatske substitucije ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) in sicer po adicijsko-eliminacijskem mehanizmu prek vmesnega anionskega adukta-Meisenheimerjev kompleks (Slika 23). Brom igra vlogo dobro izstopajoče skupine, N_3^- pa kot dober nukleofil napade ogljikov atom 2-bromotiazolnega obroča. (25)



Slika 23: Reakcija nukleofilne aromatske substitucije z natrijevim azidom. (Prirejeno po (25))

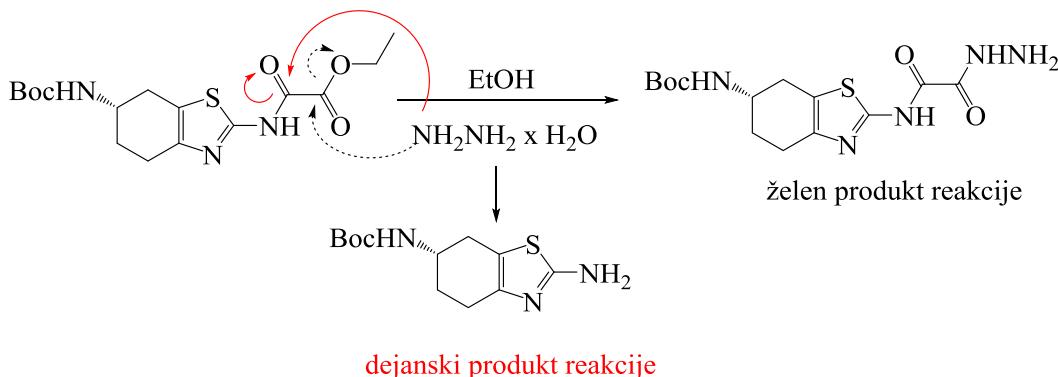
Reakcija ni uspela po želeni poti. Za njeno nadaljnjo uspešno izvedbo bi bilo treba optimizirati reakcijske pogoje.

5.1.9. Sinteza metil (S)-3-((6-((terc-butoksikarbonil)amino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-2-il)amino)benzoata

Sinteza spojine **10** je potekala po mehanizmu nukleofilne aromatske substitucije. Reakciji je bila dodana močna baza (NaH), ki je odcepila proton šibko kislemu anilinu in mu s tem povečala nukleofilnost. Natrijev hidrid (NaH) je bela higroskopna snov, ki v stiku z vodo ali vlago razpade. Pri tem se sproščajo vodik, natrijev hidroksid in ogljikov monoksid, zato ga hrаниmo zaščitenega pred vlago v eksikatorju, pri sobni temperaturi. Reakcija je bila najprej izvedena v tetrahidrofuranu (THF), vendar ni potekla po želeni poti. Menili smo, da je bil vzrok prisotnost vode v topilu in se je NaH porabil za reakcijo z vodo, namesto za cepitev protona iz anilina. Sintezo smo še enkrat ponovili, vendar smo pogoje nekoliko modificirali. THF smo zamenjali za brezvoden DMF in reakcijsko zmes prepihali z argonom ter jo segrevali pri 100 °C na oljni kopeli. Reakcija tudi po modifikaciji postopka ni uspela.

5.1.10. Reakcija s hidrazin monohidratom

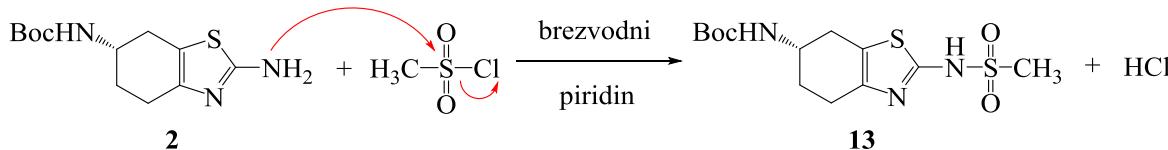
Hidrazin monohidrat je brezbarvna, oljnata tekočina z vonjem po organskih aminih. Je strupen in zelo reaktiv, zato je največkrat v obliki vodnih raztopin. Spojino **12** smo pripravili z reakcijo s hidrazin monohidratom, po mehanizmu prikazanem na **Sliki 24**. Hidrazin monohidrat reagira kot nukleofil in napade karbonilno skupino. (18) Pri tem pride do nukleofilne substitucije. Sintezi spojin nista uspeli po želeni poti. Po končani reakciji sinteze spojine **12** smo zmes očistili s kolonsko kromatografijo. Po posnetem NMR spektru smo videli, da naš produkt ni predvidena spojina, ampak spojina **2**. Iz tega lahko sklepamo, da je prišlo do napada hidrazina na karbonilno skupino amidne vezi in tako do tvorbe amina.



Slika 24: Reakcija med hidrazin monohidratom in karbonilno skupino estra-želen produkt reakcije (označeno s črtkanimi puščicami) in karbonilno skupino amida-dejanski produkt reakcije (označeno z rdečimi puščicami). (Prirejeno po (18))

5.1.11. Sinteza sulfonamidov

Sulfonamid smo sintetizirali iz amina in metil sulfonil klorida ob dodatku brezvodnega piridina. Metil sulfonil klorid je brezbarvna tekočina, ki se topi v polarnih topilih in reagira z vodo, alkoholi in amini. (18) Kot bazo smo uporabili brezvodni piridin in se s tem izognili reakciji med sulfonil kloridom in vodo. Pri tvorbi sulfonamida pride do nukleofilnega napada primarnega amina (spojina **2**) na žveplov atom metil sulfonil klorida in izstopa kloridnega aniona, kot dobro izstopajoče skupine (**Slika 25**). Ker gre za eksotermno reakcijo, jo izvajamo na ledu ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nevratalizacija nastalega HCl poteče s pomočjo dodanega piridina. Značilno je, da je omenjena metoda priprave zelo uspešna in da reakcija poteče z visokim končnim izkoristkom (v našem primeru 99,5%). (33)

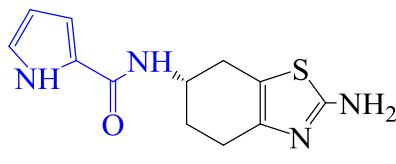


Slika 25: Reakcija sinteze sulfonamida. (Prirejeno po (34))

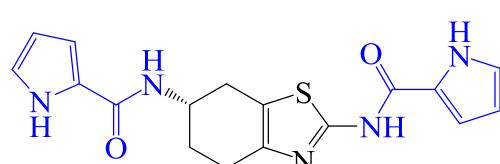
5.1.12. Sinteza terc-butil (S)-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamata

Pri prvem poskusu sinteze spojine **18** smo po kolonski kromatografiji in razvitem TLC kromatogramu pod UV lučko videli dve spojini, ki sta absorbirali pri 254 nm in ena od njiju je tudi fluorescirala pri 366 nm (**Slika 26**). To je značilno za spojine s tiazolnim

obročem, ki imajo vezan aromat. Kljub 3 kolonskim kromatografijam z različno polarnostjo mobilne faze nismo uspeli dobiti čistega produkta.



spojina absorbira pri 254 nm

spojina absorbira pri 254nm
spojina fluorescira pri 366 nm

Slika 26: Primer spojine, ki absorbira pri 254 nm (levo) in spojine, ki tudi fluorescira pri 366 nm (desno).

Sinteza spojine **18** nam v prvem poskusu ni uspela, zato smo postopek ponovili, vendar smo reakcijske pogoje nekoliko modificirali, tako da reakcijske zmesi čez noč nismo segrevali (mešanje, sobna T). Sklepali smo, da je lahko prišlo pri prejšnji reakciji do razpada izhodne spojine. Naslednji dan smo po razvitem TLC kromatogramu videli, da reakcija ni potekla in je v zmesi prisotne še veliko izhodne spojine. Reakcijsko zmes smo nato segrevali 2 uri na oljni kopeli ($T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mešanje), ampak neuspešno.

Sintezo spojine **18** smo pospešili z dodatkom natrijevega karbonata (Na_2CO_3 ; 0,314 g, 2,97 mmol, 1 ekv). Na koncu smo surov produkt raztopili v etilacetatu (30 mL) ter organsko fazo spirali z 20 mL 10% citronske kisline in z nas. razt. NaHCO_3 (30 mL). V liju ločniku smo opazili, da nam je začel izpadati produkt, zato smo belo oborino odnučali ter odparili topilo pod znižanim tlakom. Po razvitem NMR spektru smo videli, da je sinteza uspela, kot smo pričakovali.

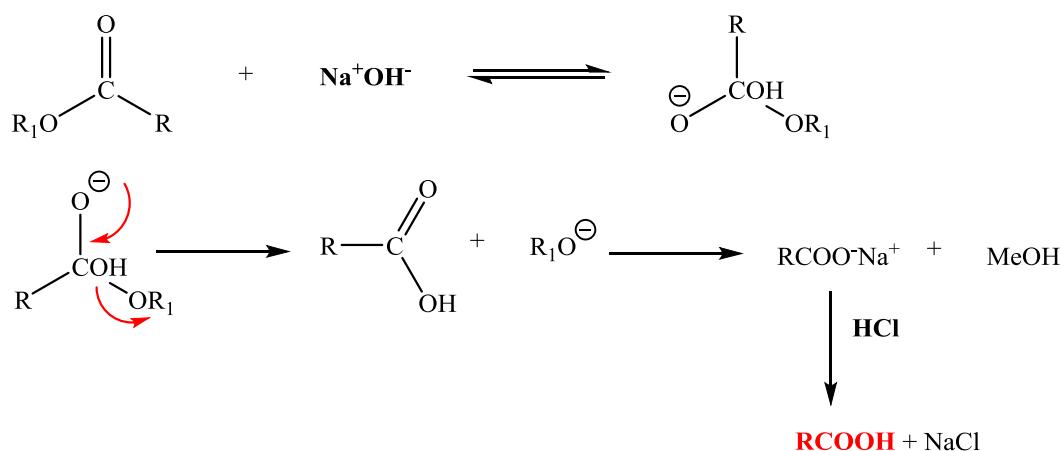
5.1.13. Hidroliza estra

Hidroliza estra je reakcija, kjer pride do razpada estra na karboksilno kislino in alkohol. Reakcija lahko poteka na več načinov. Hidrolizo estra lahko povzroči reakcija z vodo, razredčenimi kislinami (razredčena HCl) ali bazami. (32) Hidroliza estrov v kislem je reverzibilen proces, zato se v praksi večinoma poslužujemo hidrolize z bazami, kjer gre za irreverzibilno bimolekularno reakcijo. (25)

✓ Alkalna hidroliza

Pri pripravi končnih spojin **21** in **23** smo uporabili pogoje alkalne hidrolize. Spojini smo najprej raztopili v metanolu (MeOH), nato pa dodali natrijev hidroksid (NaOH) in

pustili na mešalu približno 2 uri. Iz opisanega mehanizma reakcije (**Slika 27**) vidimo, da reakcija poteka v dveh stopnjah. V zadnji stopnji nastaneta kislina in alkoholat, ki se zaradi velike razlike v kislosti takoj pretvorita v karboksilatni ion in alkohol. Ta stopnja hidrolize je ireverzibilna. (25) Po končani hidrolizi smo dobili natrijevo sol karboksilne kisline in alkohol. Alkohol smo uparili pod znižanim tlakom in nato alkalno vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom ter se tako znebili nečistot. Vodno fazo, v kateri je bila natrijeva sol kisline, smo nato nakisali z 2 M HCl do pH 1-2 in dobili kislino kot naš končni produkt sinteze (označeno na sliki s krepko rdečo).



Slika 27: Alkalna hidroliza estra in nastanek kislinskega derivata. (Prirejeno po (25))

5.1.14. Ekstrakcija

Pri čiščenju in izolaciji spojin **2**, **3**, **6**, **7**, **11**, **12**, **13**, **16**, **17**, **18**, **20**, **22** in **23** smo uporabili metodo ekstrakcije, ki temelji na porazdelitvi spojine v organsko ali vodno fazo glede na njeno topnost. Vloga uporabljenih topil in raztopin pri ekstrakciji:

- ✓ **etilacetat:** razapljanje produkta ali odstranitev nečistot
- ✓ **natrijev hidrogen karbonat** (NaHCO_3): odstranitev kislih primesi
- ✓ **natrijev sulfat** (Na-sulfat): gre za sušilno sredstvo, za brezvodno inertno anorgansko sol, ki tvori z vodo kompleksne hidrate
- ✓ **natrijev klorid** (NaCl): odstranitev polarnih oziroma ionskih primesi (v našem primeru gre za odtegnitev preostale vode)
- ✓ **10% citronska kislina** (CH_3COOH): odstranitev bazičnih primesi (18, 34)

5.2. Rezultati in komentar bioloških testiranj

Določanje zaviralne aktivnosti končnih spojin **16**, **17**, **20**, **21**, **22** in **23** je bilo izvedeno na izoliranem sevu DNA-giraze iz bakterije *E. coli* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Rezultati testiranj so podani kot rezidualne aktivnosti (RA) spojin in IC₅₀ vrednosti za bolj aktivne spojine (RA <50% pri 100 µM). RA vrednost [%] nam pove, kakšno delovanje je ohranil encim po vezavi zaviralca nanj. Nižja, kot je vrednost, boljše delovanje ima testirana spojina. Meritve so bile izvedene pri dveh različnih koncentracijah zaviralca (10 µM in 100 µM). Pri višji koncentraciji (100 µM) predvidevamo boljšo zaviralno aktivnost zaviralca in nižjo RA vrednost (**Preglednica V**).

IC₅₀ vrednost nam pove koncentracijo zaviralca, ki zavre delovanje encima za 50%. Vse spojine, razen spojine **21** izkazujejo zaviralno aktivnost v mikromolarnem območju. Spojina **21** je imela določeno najnižjo vrednost IC₅₀, ki sega v nanomolarno območje zaviranja (0,891 µM). Derivat izkazuje najboljšo zaviralno aktivnost na DNA-girazo iz *E. coli* in skoraj popolno zaviranje encima pri 100 µM (RA=2%). Njegov zaščiten analog, spojina **20** ima približno 2,5-krat slabšo jakost zaviranja encima (IC₅₀=2,34 µM). Podobno korelacijo lahko opazimo tudi pri spojinah **22** in **23**, kjer ima kislinski derivat 4-krat močnejšo zaviralno jakost kot njegov estrski analog. Iz rezultatov testiranja lahko povzamemo, da smo s hidrolizo estra dosegli boljše zaviranje encima, ki je najverjetneje posledica tvorbe močnejših interakcij v vezavnem mestu. Rezultati testiranj zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin in njihove RA [%] in IC₅₀ [µM] vrednosti so podane v **Preglednici V**.

Spojini **16** in **17** imata na mestu 2 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskega osnovnega ogrodja vezano sulfonamidno skupino izkazujeta slabšo zaviralno aktivnost kot kislinski derivati malonske in oksalne kisline (spojini **21** in **23**). Spojina **16** ima med vsemi sintetiziranimi končnimi spojinami najslabšo zaviralno aktivnost (IC₅₀=6,80 µM) in edino njena vrednost RA 100 µM presega 50%. To je najbrž posledica tvorbe šibkejših interakcij v vezavnem mestu z aminokislinskim ostankoma Arg76/Arg136.

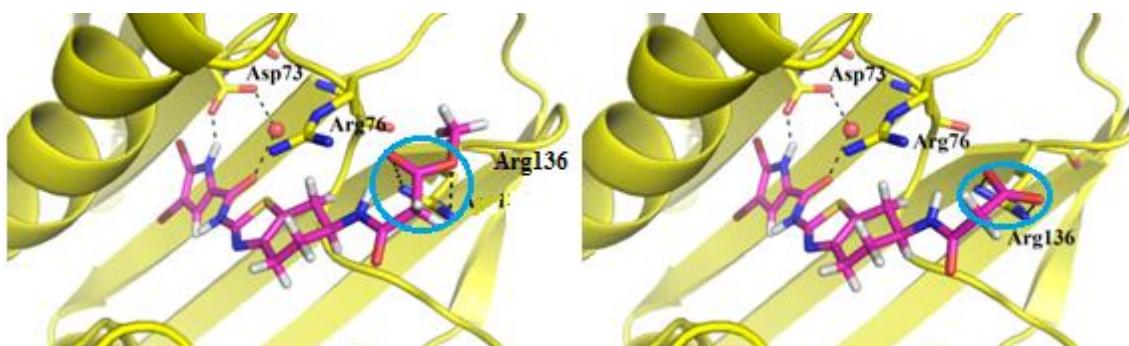
Spojina **17** izkazuje 3,5-krat močnejše zaviranje encima (IC₅₀=1,94 µM) kot spojina **16**. Razlog je lahko v dodatni metilni skupini na mestu 5 pirolnega obroča, kar omogoča močnejšo vezavo v hidrofobni žep ATP-vezavnega mesta.

Spojina			RA[%]		IC_{50} [μM]
	100%-ni zaviranja	0%-popolno zaviranje	100 μM	10 μM	
16			67 %	100 %	6,80 μM
17			25 %	100 %	1,94 μM
20			15 %	79 %	2,23 μM
21			5 %	70 %	0,891 μM
22			28 %	100 %	4,47 μM
23			0 %	84 %	1,12 μM

Preglednica V: Rezultati zaviralnih aktivnosti končnih sintetiziranih spojin podani kot RA [%] in IC_{50} [μM] vrednosti

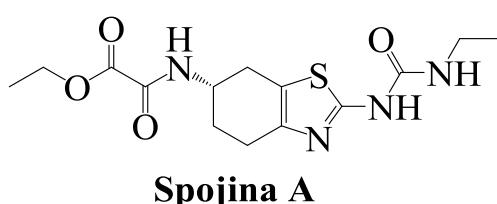
Analogi malonske kisline (spojini **20** in **21**) izkazujejo boljšo zaviralno aktivnost kot analogi oksalne kisline (spojine **22** in **23**). To je najbrž posledica tvorbe bolj optimalnih H-vezi med Arg136 v vezavnem mestu encima DNA-giraze B in sintetiziranim zavircem (**Slika 28**). Tako malonski, kot tudi oksalni derivati glede na rezultate molekulskega sidranja tvorijo z aminokislinkim ostankom Arg136 dve vodikovi vezi. Prva vodikova vez se tvori prek karbonilne skupine amida, druga pa s karboksilno skupino zavircala (**Slika 28**). Molekulsko modeliranje je bilo izvedeno s programom FlexX, ki je del programske opreme LeadIT (BioSolveIT). S pomočjo programa in prikazanih interakcij smo predvideli

način vezave zaviralcev v encim DNA-giraze B in interpretirali povezanost med strukturo in delovanjem (SAR) le teh. Vsi analizirani zaviralci tvorijo predvidoma dve H-vezi z pirolamidnim vezavnim mestom. Ena se tvori direktno z aminokislinkim ostankom Asp73, druga pa prek mostu z vodo. Razlike v vezavi opazimo v Arg76/Arg136 delu vezavnega mesta encima, kar lahko razloži razlike v SAR-u sintetiziranih zaviralcev.



Slika 28: Prikaz tvorbe vodikovih vezi (označeno z modro) med DNA-girazo iz *E. coli* in spojinama **20** (levo) in **21** (desno).

Sintetizirane spojine **20**, **21**, **22** in **23** izkazujejo slabšo zaviralno aktivnost kot njihovi obratni analogi, ki imajo 4,5-dibromopirolni del vezan na mesto 6 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]-2,6-diaminskega osnovnega ogrodja. Derivati z etilsečninskim



substituentom (spojava A) vezanim na mesto 2 izkazujejo slabšo zaviralno delovanje v primerjavi z dibromopirolnimi spojинами. Spojava A ima pri koncentraciji 100 μM vrednost RA 90%, medtem ko ima spojava **22** pri isti

koncentraciji vrednost RA 28%. To je posledica boljšega prileganja pirolnega substituenta v vezavno mesto in tvorba močnejših interakcij. Pri tem igrata ključno vlogo broma, ki sta vezana na pirolni obroč in tvorita interakcije v hidrofobnem žepu ATP-vezavnega mesta z aminokislinskimi ostanki Ala47, Val43, Val71 in Val167. Poleg tega tudi povečata kislost NH skupine pirolnega obroča in s tem omogočata tvorbo močnejše vodikove vezi s stransko verigo Asp73.

Testiranje protibakterijske aktivnosti končnih spojin je bilo izvedeno na Fakulteti za farmacijo v Helsinki na dveh G+ (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) in dveh G- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakterijskih sevih. Rezultati so pokazali, da je protibakterijsko delovanje testiranih spojin zelo šibko, saj pri koncentraciji zaviralca

50 µM izkazujejo manj kot 50% zaviranje rasti bakterij (velja za spojine **20**, **21**, **22** in **23**). Prvi razlog slabe protibakterijske aktivnosti spojin **20**, **21**, **22** in **23** je lahko posledica prenizke encimski aktivnosti ($IC_{50}=0,89\text{-}4,5\ \mu\text{M}$) za zaviranje rasti G- bakterije *E. coli*. Tudi obratni analogi, ki imajo 4,5-dibromopirolni del vezan na mesto 6 osnovnega ogrodja in izkazujejo zaviralno aktivnost DNA-giraze iz *E. coli* v nizkem nanomolarnem območju so se izkazali kot protibakterijsko neučinkoviti, saj je bilo pokazano, da so substrati za tolC izlivno črpalko, ki jo najdemo v celični steni *E. coli*. Izlivne črpalke na membrani bakterij in slabe fizikalno-kemijske lastnosti so drugi in najverjetneje glavni razlog za nizko protibakterijsko delovanje sintetiziranih zaviralcev DNA-giraze B. Ker imajo tako izhodniščni obratni analogi kot tudi naše sintetizirane spojine zelo slabo protibakterijsko delovanje na *S. aureus*, sklepamo, da je ta posledica slabega zaviralnega delovanja na DNA-girazo iz *S. aureus* zaradi prevelikega 4,5-dibromopirolnega dela. Ta se zaradi svoje velikosti ne more optimalno ujeti v hidrofobni žep ATP-vezavnega mesta DNA-giraze B iz *S. aureus*. To je posledica manjšega volumna hidrofobnega žepa pri DNA-girazi iz *S. aureus* v primerjavi s hidrofobnim žepom DNA-giraze iz *E. coli*. S tem pride do izgube pomembnih interakcij med zavircem in vezavnim mestom. (15)

6. SKLEP

Z načrtovanjem in sintezo novih zaviralcev DNA-giraze B smo želeli raziskati povezavo med strukturo in delovanjem in optimizirati že sintetizirane pirolamidne analoge s ciljem doseči zaviranje encima v nanomolarnem območju ter posledično dobro protibakterijsko aktivnost. Izhajali smo iz predhodno sintetiziranih analogov, ki so imeli 4,5-dibromopirolni substituent vezan na mestu 6 osnovnega 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskega ogrodja in so izkazovali močno zaviralno aktivnost (nizko nM območje).

Sintetizirali smo dve seriji zaviralcev. Prvi imajo pirolamidni substituent na mestu 6 osnovnega ogrodja, drugi pa na mestu 2. Reakcija sinteze nekaterih načrtovanih zaviralcev s 4,5-dibromopirolnim substituentom na mestu 6 (spojina **6**) v zadnji stopnji ni uspela. Benzilni fragment je povzročil preveliko sterično oviranost in najverjetnejše nezmožnost nadaljnje reakcije. Uspela je le sinteza ene končne spojine (spojina **16**), ki je imela opisan fragment na mestu 6, vendar je ta izkazovala zmerno zaviralno aktivnost na izoliranem sevu DNA-giraze iz *E. coli* ($IC_{50}=6,8 \mu M$). Sintetizirali smo tudi analog spojine **16**, ki ima na mestu 6 vezan 5-metil-3,4-dikloropirolni substituent (spojina **17**).

Končne spojine **20**, **21**, **22** in **23** imajo 4,5-dibromopirolni fragment na mestu 2 osnovnega ogrodja. Le spojina **21** je dosegla zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju ($IC_{50}=890 \text{ nM}$), vse ostale spojine pa so izkazovale mikromolarno zaviralno aktivnost. Iz rezultatov testiranj lahko vidimo, da imajo malonilni derivati (spojini **20** in **21**) boljšo zaviralno aktivnost na izolirani DNA-girazi iz *E. coli* kot oksalilni derivati (spojini **22** in **23**).

Predvidevali smo, da bodo spojine dosegale močnejšo zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju. To smo želeli zagotoviti s pripenjanjem različnih substituentov na osnovno ogrodje in s tem doseči močnejše interakcije z aminokislinskima ostankoma Arg76/Arg136. Vsi sintetizirani zavirci tvorijo predvidoma dve H-vezi z Asp73 v ATP-vezavnem mestu. Z optimizacijo spojin tekom načrtovanja in sinteze smo želeli izboljšati tudi fizikalno-kemijske lastnosti in doseči boljše protibakterijsko delovanje tako na G+ kot tudi na G- bakterije. Vse končne sintetizirane spojine so izkazovale šibko protibakterijsko delovanje.

Ker predstavlja odpornost na protibakterijske učinkovine zelo velik svetovni problem, gre raziskovanje in sinteza pospešeno naprej z željo po razvoju novih učinkovin s

širokim spektrom delovanja. Pri nadalnjem načrtovanju bi bilo smiselno optimizirati del spojine, ki bi tvoril močnejše interakcije z Arg76 in Arg136 v vezavnem mestu DNA-giraze B in na ta način dosegel močno zaviranje encima in ob primernejših fizikalnokemijskih lastnostih tudi močnejše protibakterijsko delovanje. Rezultati te magistrske naloge prispevajo k razširjenemu poznavanju povezave med strukturo in delovanjem in bodo v pomoč pri nadalnjem načrtovanju novih serij potencialnih zaviralcev DNA-giraze.

7. LITERATURA

1. Rodney Boyer: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 68-357
2. <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathophys/id/2009/introNotes.pdf>: dostopano 26.1.2016
3. <http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php>: dostopano 26.1.2016
4. Barbara Pogorelčnik, Matej Janežič, Andrej Perdih: Zaviralci DNA topoizpmeraze II-a-pomembne tarče protirakavih učinkovin. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 326-333
5. Tihomir Tomašić, Lucija Peterlin Mašič: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. Current Topics in Medical Chemistry 2014; 14: 130-151
6. Gregory S. Bisacchi, John I. Manchester: 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 Infectious Diseases 2015; 1: 4-41
7. Airat Gubaev, Dagmar Klostermeier: Reprint of »The mechanism of negative supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage«. DNA Repair 2014; 20: 130-141
8. Claudine Mayer, Yves L. Janin: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. Chemical Reviews 2014; 144: 2313-2342
9. Marko Oblak, Miha Kotnik, Tom Solmajer: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. Current Medicinal Chemistry 2007; 14: 2033-2047
10. Tihomir Tomašić, Sotirios Katsamakas, Žiga Hodnik, Janez Ilaš, Matjaž Brvar, Tom Solmajer, Sofia Montalvão, Päivi Tammela, Mihailo Banjanac, Gabrijela Ergović, Marko Anderluh, Lucija Peterlin Mašič, Danijel Kikelj: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahidrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. Journal of Medicinal Chemistry 2015; 58(14): 5501-5521
11. Amy C. Anderson, Michael P. Pollastri, Celia A. Schiffer, Norton P. Peet: The challenge of developing robust drugs to overcome resistance. Drug Discovery Today 2011; 16(17): 755-761
12. Fred C. Tenover, PhD: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine 2006; 119(6A): 3-10

13. Nace Zidar, Helena Macut, Tihomir Tomašić, Matjaž Brvar, Sofia Montalvão, Päivi Tammela, Tom Solmajer, Lucija Peterlin Mašič, Janez Ilaš, Danijel Kikelj: N-Phenyl-4,5-dibromopyrrolamides and N-Phenylindolamides as ATP Competitive DNA Gyrase B Inhibitors: Design, Synthesis, and Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58(15): 6179-6194
14. Ann E. Eakin, Oluyinka Green, Neil Hales, Grant K. Walkup, Shanta Bist, Alok Singh, George Mullen, Joanna Bryant, Kevin Embrey, Ning Gao, Alex Breeze, Dave Timms, Brth Andrews, Maria Uria-Nickelsen, Julie Demerit, James t. Loch III, Ken Hull, Apri Blodgett, Ruth N. Illingworth, Bryan Prince, P. Ann Boriack-Sjodin, Sheila Hauck, Lawrence J. MacPherson, Haihong Ni and Brian Sherer: Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56(3): 1240-1246
15. Tihomir Tomašić, Janez Ilaš, Nace Zidar, Päivi Tammela, Danijel Kikelj: Design, Synthesis and Biological evaluation of 4,5-dibromo-N-(thiazol-2-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide deriatives as novel DNA gyrase inhibitors, poslano v objavo.
16. Borut Štrukelj, Janko Kos: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 68-82
17. http://www.ppdictionary.com/bacteria/gpbac/bacteria_comparison.jpg: dostopano 1.2.2016
18. Marko Anderluh, Janez Mravljak, Andrej Perdih, Matej Sova, Slavko Pečar: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010
19. Aleš Obreza, Maja Kravčič, Aleš Kravčič: Vaje iz Farmacevtkse kemije II, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010
20. <https://www.youtube.com/watch?v=AYvX8tnCM9s>: dostopano 13.2.2016
21. Brian A. Sherer, Kenneth Hull, Oluyinka Green, Gregory Basarab, Sheila Hauck, Pamela Hil, James T. Loch III, George Mullen, Shanta Bist, Joanna Bryant, Ann Boriack-Sjodin, Jon Read, Nancy DeGrace, Maria Uria-Nickelsen, Ruth N. Illingworth, Ann E. Eakin: Pyrrolamide DNA gyrase Inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21: 7416-7420
22. Gregory S. Basarab, Pamela J. Hill, C. Edwin Garner, Ken Hull, Oluyinka Green, Brian A. Sherer, P. Brian Dangel, John I. Manchester, Shanta Bist, Sheila Hauck, Fei Zhou, Maria Uria-Nickelsen, Ruth Illingworth, Richard Alm, Mike Rooney, and Ann E. Eakin: Optimization of Pyrrolamide Topoisomerase II Inhibitors Toward Identification

- of an Antibacterial Clinical Candidate (AZD5099). Journal of medicinal chemistry 2014; 57: 6060-6082
23. <http://www.name-reaction.com/sandmeyer-reaction>: dostopano 4.4.2016
24. Martine Conturier, E. Mustapha Bahassi, Laurena Van Molderen: Bacterial death by DNA gyrase poisoning. Trends in Microbiology 1998; 6(7): 569-175
25. Miha Tišler: Organska kemija, 3. Popravljena izdaja, Ljubljana, 1988: 87-151
26. Tarfah I. Al-Warhi, Hassan M.A. Al-Hazimi, Ayman El-Faham: Recent development in peptide coupling reagents. Journal of Saudi Chemical Society 2012; 16: 97-116
27. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm: dostopano 21.2.2016
28. http://www.cpp.edu/~psbeauchamp/pdf/org_rxns_study_list.pdf: dostopano 23.2.2016
29. www.sigmadralich.com: dostopano 23.2.2016 ob 15.56
30. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HOBt_EDC_Mech.htm: dostopano 24.2.2016
31. Christian A. G. N. Montalbetti, Virginie Falque: Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron 2005; 61: 10827-10852
32. <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/esters/hydrolysis.html>: dostopano 25.2.2016
33. <http://www.slideshare.net/Oatsmith/19-amines-wade-7th>: dostopano 29.2.2016
34. <http://www.shrani.si/f/1F/7H/3kjXnjpy/preparativna-organska-ke.pdf>: dostopano 29.2.2016
35. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl1_Mech.htm: dostopano 11.3.2016