

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Matic Mirt

**Načrtovanje in sinteza novih derivatov  
tiazolov kot zaviralcev DNA-giraze B**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGSTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Matic Mirt

**Načrtovanje in sinteza novih derivatov  
tiazolov kot zaviralcev DNA-giraze B**

**Design and synthesis of novel thiazole  
derivatives as DNA gyrase B inhibitors**

ENOVITI MAGSTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Institutu Jožefa Stefana 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 posredovanjo znanje in izkušnje, trud, predanost mentorskemu delu ter prijaznost in ustrežljivost pri izdelavi magistrske naloge.

Rad bi se zahvalil 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 izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Matic Mirt

Ljubljana, 2017

## Vsebina

1.	Uvod.....	1
1.1.	Poraba protibakterijskih učinkovin in okužbe .....	1
1.2.	Bakterijska odpornost.....	3
1.3.	Topoizomeraze .....	6
1.4.	DNA-giraza .....	10
1.4.1.	Struktura .....	10
1.4.2.	Mehanizem .....	11
1.4.3.	ATPazna domena .....	12
1.5.	Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II .....	14
1.5.1.	Zaviralci GyrA in ParC .....	14
1.5.2.	Zaviralci GyrB in ParE.....	15
2.	Načrt za delo .....	17
2.1.	Delovna hipoteza.....	18
3.	Materiali in metode .....	19
3.1.	Materiali .....	19
3.2.	Kromatografske metode .....	19
3.2.1.	Tankoplastna kromatografija – TLC .....	19
3.2.2.	"Flash" kolonska kromatografska .....	19
3.2.3.	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti .....	19
3.3.	Spektroskopske metode.....	20
3.3.1.	Infrardeča spektroskopija (IR).....	20
3.3.2.	Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	20
3.3.3.	Masna spektrometrija .....	20
3.4.	Nomenklatura in risanje spojin .....	20
3.5.	Določanje temperature tališča .....	20
3.6.	Določanje optične rotacije.....	21
3.7.	Biološka testiranja .....	21
4.	Ekperimentalni del.....	22
4.1.	Reakcijske sheme .....	22
4.2.	Sintezni postopki in analizni podatki .....	26
5.	Rezultati in razprava.....	38
5.1.	Komentar sinteznih postopkov .....	39
5.1.1.	Sinteza vmesnih spojin .....	39
5.1.1.1.	Elektrofilna aromatska substitucija .....	39
5.1.1.2.	Bromiranje .....	40

5.1.1.3.	Kiralna resolucija .....	41
5.1.1.4.	Zaščita aminske skupine na mestu 6 .....	42
5.1.1.5.	Odstranitev Boc zaščitne skupine.....	43
5.1.1.6.	Sinteza amida z aktivirano kislino.....	43
5.1.1.7.	Hidroliza estra .....	44
5.1.2.	Sinteza končnih produktov.....	45
5.1.2.1.	Reakcije s sklopitvenimi reagenti.....	45
5.1.2.2.	Tvorjenje amida s kislinskimi kloridi.....	46
5.1.2.3.	Hidroliza estra .....	47
5.1.3.	Ekstrakcija.....	47
5.2.	Komentar biološkega testiranja.....	48
6.	Sklep.....	53
7.	Literatura .....	55

## Kazalo slik

<b>Slika 1:</b> Struktura DNA-giraze (prirejeno po [16]).....	11
<b>Slika 2:</b> Mehanizem prehoda verige (prirejeno po [16]).....	12
<b>Slika 3:</b> Prikaz interakcij molekule ATP in ATP-vezavnega mesta v GyrB <i>E. coli</i> . Kristalna vodna molekula: rdeča, aminokislinski ostanki, s katerimi voda tvori H-vezi: zelena, aminokislinski ostanki, ki tvorijo hidrofoben žep: modra, H-vezi: črtkana črta.....	13
<b>Slika 4:</b> Struktura oroidina, zaviralca DNA-giraze, in predlagana struktturna tipa potencialnih zaviralcev DNA-giraze ter njuna optimizacija.....	17
<b>Slika 5:</b> Shematska predstavitev vodikovih vezi med zavircem I in vezavnim mestom za ATP v DNA-girazi iz <i>E. coli</i> [prirejeno po 24]. .....	39
<b>Slika 6:</b> Potek elektrofilne aromatske substitucije trikloroacetilne skupine na pirolni obroč (prirejeno po [26]). .....	40
<b>Slika 7:</b> Potek kiralne resolucije (prirejeno po [28]). .....	42
<b>Slika 8:</b> Potek zaščite z Boc <sub>2</sub> O zaščitnim reagentom in možen nastanek stranskega produkta (prirejeno po [27,28]). .....	42
<b>Slika 9:</b> <i>In situ</i> nastanek plinastega vodikovega klorida med acetilkloridom in metanolom (prirejeno po [25]). .....	43
<b>Slika 10:</b> Potek odstranitve zaščitne skupine Boc z acidolizo (prirejeno po [28]). .....	43
<b>Slika 11:</b> Potek sinteze amida med aktivirano kislino in aminom (prirejeno po [30]). .....	44
<b>Slika 12:</b> Potek alkalne hidrolize estrov (prirejeno po [26])......	45

<b>Slika 13:</b> Mehanizem reakcije sinteze amida z EDC/HOBt. Med reakcijo nastane stranski produkt 2 (sečnina), pri neustreznih pogojih (povišana temperatura) pa lahko nastane stranski produkt 1 ( <i>N</i> -acilsečnina) (prirejeno po [27,28]).....	46
<b>Slika 14:</b> Prikaz tvorbe vodikovih vezi spojine 29 (slika A) in spojine 7 (slika B) v vezavnem mestu DNA-giraze iz <i>E. coli</i> (prirejeno po [24])......	49

## Kazalo shem in preglednic

<b>Shema 1:</b> Sinteza <i>N</i> -(4-(2-amino-2-oksietil)tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamidnih analogov, ki vsebujejo fenilni, piridinski in glicinski strukturni element.....	22
<b>Shema 2:</b> Poizkus sinteze metil 3-(2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksamido)benzoata.....	23
<b>Shema 3:</b> Sinteza 3-(2-(2-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)benzoidske kisline....	24
<b>Shema 4:</b> Sinteza ( <i>R</i> )-4,5-dibromo- <i>N</i> -(6-amido-4,5,6,7-tetrahidrobezo[1,2- <i>d</i> ]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamidnih analogov.....	25
<b>Shema 5:</b> Bromiranje pirola. Reagenti in pogoji: b) Br <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> , NaHSO <sub>3</sub> , 0 °C.....	41

<b>Preglednica I:</b> Rezultati zaviralnih aktivnosti končnih sintetiziranih spojin podani kot vrednosti RA [%] in IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]. .....	50
<b>Preglednica II:</b> Protibakterijsko delovanje, testirano na štirih različnih bakterijskih sevih. ....	52

## Povzetek

Eden od problemov današnjega sodobnega zdravstva je odpornost bakterij proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam. Svetovna zdravstvena organizacija jo je razglasila kot eno od treh najpomembnejših groženj za javno zdravje 21. stoletja. Odpornost bakterij proti protibakterijskim učinkovinam je povezana s pretirano uporabo le-teh tako v zdravstvu kot živinoreji. Proti bakterijski odpornosti se borimo na dva načina, in sicer tako, da podaljšujemo učinkovitost obstoječih protibakterijskih učinkovin, ali da odkrivamo in razvijamo nove učinkovine. Odlični tarči za razvoj protimikrobnih učinkovin, ki omogočata selektivno toksičnost, sta DNA-giraza in topoizomeraza IV, ki spadata med topoizomeraze IIA. Ti encimi regulirajo topološko stanje genetskega materiala. DNA-giraza je sestavljena iz dveh katalitičnih podenot GyrA in dveh podenot GyrB, ki hidrolizirata molekulo ATP. Kinoloni in aminokumarini so predstavniki učinkovin, ki delujejo tako, da zavirajo delovanje DNA-giraze in topoizomeraze IV.

S pomočjo strukturno podprtrega rešetanja so na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani odkrili nov strukturni razred zaviralcev DNA-giraze. Eden od zaviralcev je bil tudi oroidin, ki je alkaloid iz spužve rodu *Agelas*. Zaradi svoje relativno nizke molekulske mase in enostavne strukture ponuja več možnosti za kemijsko optimizacijo z uvedbo dodatnih stranskih verig ali funkcionalnih skupinah. Optimizacija spojine in razvoj novih 4,5-dibromopirolamidnih derivatov je privedla do močnih zaviralcev DNA-giraze z vrednostmi IC<sub>50</sub> v nizkem nanomolarnem območju. Pri razvoju novih potencialnih zaviralcev smo izhajali iz analogov oroidina, ki oponašajo vezavo molekule ATP v ATP-vezavnem mestu DNA-giraze preko tvorbe dveh H-vezi z aminokislinskim ostankom Asp73. Dodatne interakcije pa se tvorijo v hidrofobnem žepu ter z aminokislinskima ostankoma Arg76 in Arg136. Sinteze končnih spojin so temeljile na pripenjanju tiazolov z različnimi substituenti, kot so niacin, fenol, sulfanilamid, salicilna, oksalna in malonska kislina na 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino. 4,5-dibromopirolni fragment pa smo zamenjali tudi z indolom. Končnim sintetiziranim spojinam smo določili zaviralo aktivnost na rekombinantni DNA-girazi iz *Escherichia coli* in protibakterijsko aktivnost na štirih različnih bakterijskih sevih. Najboljšo zaviralo aktivnost na encimu je imela spojina **29** z vrednostjo IC<sub>50</sub> 3,58 μM. Zmerno aktivnost sta imeli še spojini **7** in **28**, ostale spojine pa so bile po aktivnosti slabše ali neaktivne. Vse sintetizirane končne spojine so izkazovale le šibko protibakterijsko aktivnost. Rezultate iz te magistrske naloge smo objavili v članku v reviji Bioorganic and Medicinal Chemistry, ki je naveden v poglavju Literatura, pod številko 24.

## Abstract

One of the problems of today's modern healthcare is the bacterial resistance against existing antibacterial agents. It was declared by the World Health Organization as one of the three most important threats to public health in the 21st century. The resistance of bacteria to antibacterial agents is associated with their excessive use in both healthcare and livestock production. Against the resistance we can fight by extending the effectiveness of existing antibiotics or by discovering and developing new antibacterial drugs. Excellent and selective targets for development of antimicrobials are DNA gyrase in topoisomerase IV, which belong to the type IIA topoisomerases. These enzymes regulate the topological state of the genetic material. The DNA gyrase is composed of two catalytic GyrA subunits and two GyrB subunits, which hydrolyse the ATP molecule. Quinolones and aminocumarines are representatives of the drugs that inhibit DNA gyrase and topoisomerase IV.

A novel structural class of inhibitors of DNA gyrase was discovered. Using structure-based screening at the Faculty of Pharmacy of the University of Ljubljana oroidin was discovered, which is an alkaloid from a sponge of the genus *Agleas*. Due to its relatively low molecular weight and simple structure, it offers several options for chemical optimization by introducing different side chains or functional groups. Optimization of the compound and development of new 4,5-dibromopyrrolamide derivatives led to a potent DNA gyrase inhibitors with IC<sub>50</sub> values in the low nanomolar range. The development of new inhibitors was based on the analogues of oroidin, which mimic the binding of ATP molecule in the ATP binding site of DNA-gyrase by forming two H-bonds with Asp73 side chain. Additional interactions are formed in the hydrophobic pocket and with residues Arg76 and Arg136. The syntheses of the final compounds were based on the coupling of thiazoles bearing different substituents, such as niacin, phenol, sulphanilamide, salicylic, oxalic and malonic acid to a 4,5-dibromopyrrol-2-carboxylic acid moiety. The 4,5-dibromopyrrole moiety was also replaced by indole. The final compounds were tested for their inhibitory activity using the recombinant DNA gyrase from *Escherichia coli* and for their antibacterial activity against four different bacterial strains. The best DNA gyrase inhibitor was compound **29** with an IC<sub>50</sub> value of 3,58 µM. Compounds **7** and **28** had moderate activity, while the others exhibited weaker activity or were inactive. Moreover, all synthesized final compounds exhibited only weak antibacterial activity. We have published the results of this master thesis in a full article in the Bioorganic and Medicinal Chemistry journal, which is listed in chapter References, under number 24.

## Seznam okrajšav

- AcCl = acetilklorid
- ADPNP = adenozin-5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]-trifosfat
- AK = aminokislina
- ATP = adenozin trifosfat
- bp = bazni par
- CDC = Center za nadzor bolezni in preventivo (angl. Centers for Disease Control and Prevention)
- CLSI smernice = Smernice inštituta za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
- CTD = C-končna domena
- d = dublet
- dd = dublet dubleta
- DDD = definiran dnevni odmerek (angl. defined daily dose)
- ddd = dublet dublet dubleta
- DKM = diklorometan
- DMF = *N,N*-dimetilformamid
- EDC = *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid
- ESKAPE patogeni = *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter*
- EtOAc = etilacetat
- EU/EEA = Evropska unija in Evropski gospodarski prostor (angl. European Union and European Economic Area)
- G- bakterije = po Gramu negativne bakterije
- G+ bakterije = po Gramu pozitivne bakterije
- GHKL = družina encimov GyrB-Hsp90-histidine/serin protein kinaza-MutL
- GyrA = podenota A DNA-giraze
- GyrB = podenota B DNA-giraze
- HATU = 1-(bis(dimethylamino)methoxy)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin 3-oksid heksafluorofosfat
- HOEt = 1-hidroksibenzotriazol
- H-vez = vodikova vez

- IR = infrardeča spektroskopija
- $K_i$  = koeficient inhibicije, ki je definiran z enačbo  $K_i = [E][I]/[EI]$ , kjer je [E] koncentracija encima, [I] koncentracija inhibitorja in [EI] koncentracija kompleksa encim-inhibitor. Zaviranje je močno, če je  $K_i$  nizek.
- m = multiplet
- MF = mobilna faza
- MRSA = proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*
- NMM = *N*-metilmorfolin
- NMR = jedrska magnetna resonanca
- ParC = podenota C topoizomeraze IV
- ParE = podenota E topoizomeraze IV
- RA = rezidualna aktivnost (100% delovanje encima - % zaviranja encima pri določeni koncentraciji)
- $R_f$  = retencijski faktor
- RT = sobna temperatura
- s = singlet
- SAR = razmerje med strukturo in delovanjem
- t = triplet
- $t_r$  = retenzijski čas
- THF = tetrahidrofuran
- TLC = tankoplastna kromatografija (angl. thin-layer chromatography)
- TMS = tetrametilsilan (angl. tetramethylsilane)
- tolC = membranski protein, ki je sestavni del izlivne črpalke
- WHO = Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World health organization)
- ZDA = Združene države Amerike

## 1. Uvod

Od njihovega odkritja v štiridesetih letih prejšnjega stoletja so bili antibiotiki pomemben del sodobnega zdravstvenega varstva. Njihova vloga se je razširila od zdravljenja resnih okužb do preprečevanja okužb pri kirurških bolnikih, zaščite rakavih bolnikov, zaščite ljudi z ogroženim imunskim sistemom, uporabe kot spodbujevalce rasti in zaščite pred okužbami pri živini ter drugih živalih namenjenih za prehrano [1].

Dandanes pa so postale včasih ozdravljive okužbe težko ozdravljive. S tem naraščajo stroški tako v zdravstvu kot v družbi in tudi umrljivost bolnikov. Zmanjšana učinkovitost protibakterijskih učinkovin je narasla do te mere, da zdaj predstavlja resno grožnjo vsaki državi, ne glede na to kako izpopolnjen zdravstveni sistem ima. Številni patogeni so postali odporni proti več protibakterijskim učinkovinam. Nove učinkovine, ki jih uporabimo v skrajni sili, pa so drage in velikokrat nedostopne osebam, ki jih resnično potrebujejo [1].

### 1.1. Poraba protibakterijskih učinkovin in okužbe

Bakterijska odpornost je neposredno povezana s porabo protibakterijskih učinkovin. Večja kot bo količina protibakterijske učinkovine, ki jo porabimo, večja bo verjetnost, da bodo prevladali odporni mikrobi, kot je to značilno za preživetje najmočnejšega [1]. Čeprav se večina antibiotikov porabi zunaj bolnišnic, je bolnišnična poraba protibakterijskih učinkovin glavno gonilo za širjenje multirezistentnih bakterij, ki so odgovorne za bolnišnične okužbe [2].

Dva trenda sta najbolj pripomogla h globalno povečani porabi protibakterijskih učinkovin. Večji prihodki povečujejo dostop do protibakterijskih učinkovin. To pripomore k reševanju življenj, vendar pa tudi poveča tako ustrezno kot neustrezno porabo, ki spodbuja razvoj rezistence. Povečano povpraševanje po živalskih beljakovinah posledično vpliva na večjo porabo antibiotikov v kmetijstvu, kar prav tako spodbuja razvoj rezistence [1].

Center za nadzor bolezni in preventivo (CDC) iz ZDA ocenjuje, da je bakterijska rezistenca odgovorna za dva milijona okužb in 23.000 smrti vsako leto v Združenih državah Amerike in povzroči za 20 milijard \$ direktnih in 35 milijard \$ indirektnih stroškov zaradi izgub v proizvodnji. V Evropi CDC ocenjuje, da je 25.000 smrti povezanih z okužbami z odpornimi mikroorganizmi, ki vsakoletno povzročijo 1,5 milijard € stroškov. V državah razvoja te okužbe povzročajo neonatalne sepse in ocenjujejo, da vsakoletno samo v Indiji povzročijo smrt 58.000 novorojenčkov [1,3,4].

Potreba po protibakterijskih učinkovinah narašča. Med 2000 in 2010 je globalna poraba protibakterijskih učinkovin narasla za 30 %. V večini držav okoli 20 %

protibakterijskih učinkovin porabijo v bolnišnicah in drugih zdravstvenih ustanovah, 80 % pa jih porabijo zunaj bolnišnic bodisi predpisane na recept ali kupljene brez recepta. Predvideno je, da je od 20 do 50 % celotne porabe protibakterijskih učinkovin neprimerne. Kot neprimerno definiramo, da protibakterijska učinkovina nima nobene koristi za zdravljenje. Na primer, uporaba protibakterijskih učinkovin za zdravljenje prehladov, gripe in akutnih drisk, ki jih povzročajo virusi in ne bakterije. Ali neoptimalna uporaba protibakterijskih učinkovin, kot na primer neprimeren izbor učinkovine s širokim spektrom delovanja, neprimeren odmerek in trajanje zdravljenja ter slaba komplianca pacientov. Vendar pa pomanjkanje in zakasnjen dostop do protibakterijskih učinkovin še vedno povzročita več smrtnih okužb z multirezistentnimi bakterijami. Za doseganje največje koristi za zdravje ljudi bi bili potrebni tako ukrepi za zmanjšanje neustrezne uporabe protibakterijskih učinkovin, kot takšni, s katerimi bi izboljšali dostop do njih, ko so te res potrebne [1].

Povečanje blaginje in populacije povzročata povečano povpraševanje po živalskih beljakovinah. Da bi to potrebo zadostili, mnogi kmetje posežejo po antibiotikih, da bi optimizirali proizvodnjo. Uporablajo jih za zdravljenje okužb pri posameznih živalih, kot preventivo, za preprečevanje okužb v čredi in kot pospeševalce rasti. Ocenjujejo, da je bila svetovna poraba antibiotikov v živinoreji v letu 2010 okoli 63.200 ton, kar je predstavljalo skoraj dve tretjini proizvedenih antibiotikov na leto. Do leta 2030 ocenjujejo, da bi naj ta številka še narasla za dve tretjini. Večina uporabljenih antibiotikov za živinorejske namene je podobnih tem, ki jih uporabljam za zdravljenje pri ljudeh. Najbolj so prodajani makrolidi, penicilini in tetraciklini, ki so kritičnega pomena v humani medicini. Problem, ki se pri tem pojavi je večji vpliv antibiotikov na okolje, saj se lahko kar 90 % odmerka učinkovine izloči skozi urin v okolje in 75 % skozi blato. Druga težava pa je prenos multirezistentnih bakterij direktno od živali na človeka. Prenesejo se lahko tudi s hrano, ki jo človek zaužije, saj bakterije preživijo tudi po zakolu živali ali se razmnožijo kasneje ob neprimerni obdelavi hrane. Na takšen način pridobljeno odpornost bi lahko tudi omilili, in sicer z optimizacijo živinorejstva, kot so to naredile bogatejše države z boljšo prehrano. Potem antibiotiki ne bi več doprinesli veliko k pospeševanju rasti in zato ti ne bi bili več potrebni. Preprečevanje okužb pa bi lahko namesto z antibiotiki dosegli z večjo higieno [1].

Trend splošne porabe protibakterijskih učinkovin za sistemsko zdravljenje v bolnišnicah držav EU/EEA med leti 2011 do 2015, izražen kot definiran dnevni odmerek (DDD) na 1000 prebivalcev na dan, ni pokazal signifikantnega naraščanja. V letu 2015 je v

povprečju znašala 2,1 DDD na 1000 prebivalcev na dan. Vendar so na nacionalni ravni opazili v več državah pomembno povečanje. V nasprotju s predpisovanjem zunaj bolnišnice, penicilini niso bili najpogosteje predpisani antibiotiki v bolnišnicah, ampak so bili to cefalosporini, drugi beta-laktamski (vključno s karbapenemi) antibiotiki in drugi. Zunaj bolnišnic pa so bili najpogosteje uporabljeni penicilini [2].

Pomemben dejavnik za razsoj multirezistentnih bakterij, ki so odgovorne za bolnišnične okužbe, je visoka raven uporabe posebnih protibakterijskih učinkovin v bolnišnicah, ki so namenjene za uporabo v sili kot zadnja linija obrambe. Pri teh bolnikih je večja verjetnost, da jih bodo kolonizirale multirezistentne bakterije in so zato v večji nevarnosti, da se jim razvijejo okužbe s temi bakterijami. Takšne protibakterijske učinkovine so iz skupine karbapenemov in polimiksinov, ki so namenjeni za zdravljenje resnih okužb, ki jih povzročajo multirezistentne po Gramu negativne (G-) bakterije [2].

Tudi v Sloveniji že več let potekajo številne aktivnosti za obvladovanje porabe protibakterijskih učinkovin. Ključne protibakterijske učinkovine so pod nadzorom in imajo določeno omejitev predpisovanja. Slovenija sodi med države, ki dobro obvladuje porabo protibakterijskih učinkovin. V Evropi sodi med države z nizko porabo, ki je v letu 2016 znašala 13,7 DDD. To je najmanjša vrednost, odkar porabo protibakterijskih učinkovin v Sloveniji merimo po tej metodologiji [5].

## 1.2. Bakterijska odpornost

WHO je razglasila odpornost proti protibakterijskim učinkovinam kot eno od treh najpomembnejših groženj za javno zdravje 21. stoletja [4]. Naraščajoča bakterijska odpornost in zmanjšano odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin sta povzročila, da bolniki zdaj umirajo zaradi bakterijskih okužb, ki so bile nekoč ozdravljive. Hiter tempo zlate dobe razvoja antibiotikov, ki se je začela leta 1940, je izgubil svoj zagon, saj je bilo od 1980 do začetka leta 2000 odobritev novih protibakterijskih učinkovin, kot tudi odkritje novih razredov, zmanjšana za kar 90 %. Mnoga podjetja so se zaradi znanstvenih, regulatornih in gospodarskih ovir preusmerila stran od razvoja protibakterijskih učinkovin, saj so bile druge terapevtske skupine glede donosnosti bolj privlačne [6].

Bakterijska rezistenca je starodaven proces in je posledica interakcije organizmov z okolico. Večina protibakterijskih učinkovin je proizvedenih naravno, zato so z namenom preživetja nanje bakterije skozi evolucijo razvile mehanizme za njihovo premagovanje. Bakterije imajo izjemno genetsko prilagodljivost, ki jim omogoča, da se odzovejo na številne grožnje, kot je prisotnost protibakterijske učinkovine, ki bi lahko ogrozile njihov obstoj.

Bakterije, ki si delijo isto ekološko nišo s tistimi, ki proizvajajo protimikrobnna sredstva, so razvile starodavne mehanizme, da prenesejo škodljiv učinek antibiotika in posledično zaradi tega uspevajo ob njihovi prisotnosti [5]. Različni razredi antibiotikov imajo poseben način delovanja, s katerim zavirajo rast ali bakterijo ubijejo. Lahko inhibirajo sintezo bakterijske stene, proteinov, DNA, RNA, folne kisline ali interagirajo z bakterijsko membrano. V vseh primerih je potrebno, da se protibakterijska učinkovina veže na specifično tarčno molekulo, kot so proteini, DNA ali organeli. Se pravi, bakterija postane rezistentna, če razvije mehanizme, ki preprečijo vezavo protibakterijskih učinkovin s svojimi tarčami. To doseže tako, da onesposobi ali razgradi protibakterijsko učinkovino, spremeni tarčno mesto, zmanjša prepustnost celične stene, aktivira izliv antibiotika ali obide zaviralne metabolne poti. Bakterije velikokrat posedujejo več različnih mehanizmov, kar povzroči, da so hkrati odporne proti več protibakterijskim učinkovinam [1,3]. Bakterije uporabljajo dve glavni genetski strategiji za prilagoditev na protibakterijsko učinkovino. To sta mutacije v genih, ki se dogaja naključno in pridobitev tuje DNA preko horizontalnega prenosa genov [4].

Odpornost narašča tako pri po Gram (G+) pozitivnih kot G- patogenih, ki povzročajo okužbe tako v bolnišnicah kot izven njih [7]. Odpornost proti fluorokinolonom, tretji generaciji cefalosporinov in aminoglikozidov se je pri bakterijah *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae* v območju EU/EEA v letih od 2012 do 2015 signifikantno povečala [8]. Na splošno so problematični ESKAPE (glejte seznam okrajšav) patogeni, ki so poglaviten vzrok multirezistenznih okužb. Nekateri so že odporni proti karbapenemom. Naše možnosti zdravljenja teh infekcij so tako omejene, da so zdravniki prisiljeni uporabiti starejše, prej zavrnene učinkovine, kot je kolistin, ki je povezan z znatno toksičnostjo in za katerega še ni določenega optimalnega odmerjanja in trajanja terapije [7]. Vendar se je pri nekaterih bakterijah že tudi proti njemu začela razvijati odpornost, ki jo težko izkoreninimo [8].

Z bakterijsko odpornostjo se lahko borimo na dva načina, in sicer tako, da podaljšamo učinkovitost obstoječih protibakterijskih učinkovin, in da odkrivamo in razvijamo nove protibakterijske učinkovine. Čeprav je bakterijska odpornost globalni problem, uporabo protibakterijskih učinkovin najlažje rešujemo na lokalni ravni. V interesu vsake države je, da poskrbi za zdravje svojih državljanov, s tem da podaljša učinkovitost protibakterijskih učinkovin. To pomeni, da zmanjša njihovo uporabo tam, kjer je to mogoče, in da omogoči dostopnost protibakterijskih učinkovin, ko jih potrebujemo. Spremeniti bo potrebno družbeni pogled na protibakterijske učinkovine. Uporabljati bi jih morali samo takrat, ko so

resnično potrebeni. Za upočasnjevanje odpornosti in ohranjanja učinkovitosti dosedanjih protibakterijskih učinkovin skrbijo naslednje strategije. Izboljšana neoporečnost vode ter olajšan dostop do nje, izboljšana sanitacija in precepljenost zmanjšujejo potrebo po protibakterijskih učinkovinah. Izboljšana je kontrola nad infekcijami v bolnišnicah zaradi boljše higiene med pacienti, predvsem zaradi umivanja rok z milom in alkoholnimi razkužili. Nadzor nad odpornostjo in bolnišničnimi okužbami daje administratorjem informacije za boljše vodenje in sprejemanje odločitev. Spodbujanje uporabe in napačno uporabo protibakterijskih učinkovin, bo potrebno zmanjšati z iniciativami, ki skrbijo za ohranjanje protibakterijskih učinkovin. Zmanjšati in sčasoma odstraniti uporabo protibakterijskih učinkovin v kmetijstvu za namene hitrejše rasti. Izobraziti in seznaniti zdravstvene delavce, oblikovalce politike in javnost o trajnostni uporabi protibakterijskih učinkovin, z namenom ohranjanja aktivnosti protibakterijskih učinkovin [1]. Moramo se pa zavedati, da je razvoj odpornosti neizogiben in ni vprašanje ali, ampak kdaj se bo pojavila. Za borbo proti odpornosti je potrebno odkrivati nove protibakterijske učinkovine z drugačnim, novim mehanizmom delovanja. Čeprav poznamo približno 300 protibakterijskih tarč, trenutno registrirane učinkovine na trgu delujejo le na 20 od teh tarč. To pa predstavlja ogromno priložnosti za odkrivanje in razvoj novih spojin z novim načinom delovanja, pri katerih se ne bo pojavila navzkrižna odpornost [9]. Vendar samo nekaj spojin pride v razvojnem procesu tako daleč, da so opredeljene kot učinkovite in varne. Težave pri odkrivanju in razvoju novih protibakterijskih učinkovin najdemo tako na znanstvenem kot finančnem področju. V primerjavi z zlato dobo razvoja antibiotikov lahko dandanes, kljub odkritju nekaterih novih protibakterijskih učinkovin, zaznamo upad razvoja [1]. Razvoj in registracija zdravila je precejšnja naložba in lahko znaša tudi do 2,5 milijarde \$. Zlasti klinične študije protibakterijskih učinkovin so drage, ker testiranje izvajajo na različnih patogenih ali redkih okužbah z multirezistentnimi bakterijami. Te raziskave tako trajajo dalj časa z nizkim donosom bakterijskih kultur, zato za preučevanje posebnega patogena ali rezistentnega fenotipa potrebujemo večje število bolnikov, kar podaljša čas in strošek razvoja [6]. Največja preizkušnja je odkritje čisto novega razreda učinkovin z ozkim spektrom delovanja. V zadnjih letih so to funkcijo prevzela manjša farmacevtska in biotehnološka podjetja, multinacionalke pa so svoje razvojne zmožnosti novih protibakterijskih učinkovin zmanjšale ali opustile. To je predvsem posledica slabe donosnosti naložb kot pri drugih vrstah zdravil, saj se ta zdravila uporabljajo le za kratek čas zdravljenja, medtem ko ta za kronične bolezni uporabljajo dlje ali tudi celo življenje. Prav

tako se pa vse na novo odkrite protibakterijske učinkovine hrani v rezervi proti odpornim okužbam, kar pa dodatno doprinese k nižjemu dobičku. Prav zaradi te težave so začeli podjetja podpirati z različnimi finančnimi vzpodbudami in s hitrejšimi odobritvami za dovoljenje za promet [1]. Težavi odkrivanja in optimizacije novih protibakterijskih učinkovin sta izbira ustrezne bakterijske tarče, ki ni nagnjena k hitremu razvoju odpornosti in omejena kemijska pestrost. Slednja je zlasti problematična pri G- organizmih, kjer je potrebno premagovanje ovir kot sta prehajanje bakterijske celične stene in aktivno črpanje učinkovine iz celice s pomočjo izlivnih črpalk (angl. Efflux pump). Pri izbiri primerne tarče so potrebni tudi še drugi dejavniki, in sicer pomembnost tarče za preživetje organizma, tako da njena inhibicija vodi v zaviranje bakterijske rasti ali še bolje v smrt bakterij. Pomemben je tudi spekter protibakterijskega delovanja in razlikovanje učinkovine med bakterijskimi in gostiteljskimi tarčami (selektivnost). Protibakterijske učinkovine, ki delujejo na več tarč hkrati, so bolj učinkovite, s tem se pa tudi zmanjša potencial za pojav hitro rastoče odpornosti. Samo dva razreda od pogosto uporabljenih protibakterijskih učinkovin delujeta na več različnih encimov. To so betalaktami, ki ciljajo beljakovine za vezavo penicilinov (PBPs), in fluorokinoloni, ki ciljajo katalitično podenoto DNA-giraze (GyrA) in topoizomeraze IV (ParC) [10].

Moramo pa se zavedati, da je uporaba protimikrobnih zdravil v klinični praksi nedaven pojav v zgodovini glede na pojav bakterijskih organizmov na našem planetu. Zato je treba na razvoj bakterijske odpornosti gledati kot "normalen" prilagoditveni odziv, ki jasno izraža Darwinovo načelo evolucije [4].

### 1.3. Topoizomeraze

DNA je zelo dolga dvojna vijačnica, pri kateri sta obe verigi naviti druga okoli druge [11]. V bakterijah se nahaja v dveh oblikah. Sproščena oblika nastane, če se samo povežeta oba konca linearne molekule, medtem ko dodatno zvita oblika nastane, če se linearna oblika, tik preden se zapre, vsaj še enkrat zasuka okoli svoje osi. Dodatno zvita oblika ni tako stabilna kot sproščena [12]. Spremembe topologije molekule DNA vključujejo odvijanje in navijanje, vozlanje in zapletanje. Odvijanje in navijanje DNA inducirata torzijsko napetost v molekuli. Če se lahko ta napetost prosto razporedi po nukleinski kislini, se je bo nekaj pretvorilo v osno napetost. Ta prerazporeditev povzroči, da se molekula ovije okoli sebe in tvori verižne pletenine. Zato pravimo DNA, ki je pod torzijsko napetostjo, dodatno zvita. Odvitim in navitim molekulam pravimo negativno in pozitivno dodatno zvite. Če je DNA dodatno zvita v isti smeri, kot potekajo zavoji dvojne vijačnice, gre za pozitivno dodatno

zvitje, v primeru negativnega dodatnega zvitja pa se DNA zvije v nasprotni smeri zavojev dvojne vijačnice. Dvojerižna DNA je le skladnična oblika za genetsko informacijo. Da se te informacije izrazijo oz. replicirajo, je potrebno, da se dve vijačnici med seboj ločita. Ta proces močno olajša negativno dodatno zvitje, ki vpliva na to, da se lažje odprejo replikacijska in genska področja in hitrost replikacije in transkripcije je bistveno povečana. Pozitivno dodatno zvitje pa zavira DNK procese, saj otežuje odpiranje dveh verig. Intramolekularni vozli, tvorjeni v isti molekuli DNA, nastanejo med rekombinacijo, medtem ko se medmolekularne pentlje, tvorjene med hčerinskimi molekulami DNA, proizvajajo med replikacijo. Vozli DNK blokirajo bistvene procese DNA, saj ni mogoče ločiti dveh verig dvojne vijačnice. Prepletene molekule DNA pa se ne morejo ločiti med mitozo in mejozo. Zato so lahko vozli in pentlje DNA smrtonosni za celico, če niso rešeni. Da bi regulirali raven torzijske napetosti (odvijanje ali navijanje) v DNA, ali da bi odstranili vozle in pentlje, je potrebno, da se veriga DNA pretrga. Torzijsko napetost lahko odpravimo z rotacijo ali prehodom verige, zato lahko nivo dodatnega zvitja uravnavamo s prelomom ene verige ali obeh. Za razrešitev vozlov in pentelj pa so potrebni dvojerižni prelomi [11].

Encimi, ki regulirajo topološko stanje genetskega materiala, se imenujejo topoizomeraze. Potrebni so za preživetje vseh organizmov in spreminjajo topologijo tako, da ustvarjajo prelome v dvojni vijačnici. Vse topoizomeraze imajo v aktivnem mestu tirozinski ostanek, ki začne cepitev DNA z nukleofilnim napadom na fosfat nukleinske kisline. Preko transesterifikacije se tvori kovalentna vez med fosfatom in tirozinom, ki pripne encim na novo nastali konec verige DNA. Kovalentna povezava encima in DNA ohranja energijo vezi med sladkorjem in fosfatom DNA in prelomljeni verigi ne dovoli, da bi se ločila od encima, s čimer je ohranjena integriteta genetskega materiala. Po spremembji topologije DNA s prehodom verige ali rotacijo je ponovna spojitev verig DNA sprožena z nukleofilnim napadom hidroksilne skupine na verigi s terminalnim koncem na fosfat fosfotirozinske verige. Ta reakcija povrne DNA v prvotno dvojno vijačnico in sprosti tirozin v aktivnem mestu topoizomeraze, pri čemer se spremeni le topološka lastnost DNA. Ravnotežje med cepljenjem in ponovnim spajanjem verig je premaknjeno v smer ponovne vezave dveh verig [11].

DNA-topoizomeraze vplivajo na vse pomembne procese v celici, kot so ločitev vijačnice DNA pri procesu transkripcije in replikacije, brezhibna ločitev dveh kopij celotnega genoma v dve hčerinski celici pri delitvi celice in stiskanje genoma v manjše strukture. Stiskanje DNA je takšno, da se mora celoten genom ene same človeške celice (3

$\times 10^9$  bp, kar ustreza približno 1,8 m) stisniti v jedro s povprečnim premerom 6  $\mu\text{m}$ . Tudi najmanjši krožni genom *Escherichia coli* ( $4,7 \times 10^6$  bp) se mora stisniti v velikost bakterijske celice, ki je kar 3000-krat manjša. Da je ohranjena kompaktnost DNA, so potrebne topoizomeraze, ki zmanjšajo njeno napetost in odstranijo vozle [13,14].

Za transkripcijo in replikacijo je potrebna ločitev vijačnic DNA. Zaradi dvojno vijačne strukture DNA in pomanjkanja prostega vrtenja v celicah ločitev verig povzroča dodatna zvitja DNA na robnem območju, kjer se dve verigi ločujeta zaradi kompleksa polimeraze-helikaze. Kot rezultat se oblikuje pozitivno dodatno zvitje pred replikacijo oz. transkripcijo in negativno za njo. Brez aktivnosti DNA-topoizomeraz, bi pozitivno dodatno zvitje oviralo replikacijo in transkripcijo, negativno dodatno zvitje pa bi favoriziralo nastanek nenormalne DNA, ki bi ovirala normalno presnovo DNA. DNA-topoizomerze pred citokinezo ločijo tudi premreženo DNA, ki nastane med replikacijo [13].

DNA-topoizomeraze lahko razdelimo v dve skupini: tip I, ki ustvarja prehodne prelome v eni verigi DNA in tip II, ki ustvarja prehodne prelome obeh verig DNA. Ti dve skupini lahko glede strukturnih, mehanskih in evolucijskih lastnosti nadalje razdelimo na tipe IA, IB, IC, IIA in IIB [15].

**Topoizomeraze tipa I** so označene z lihim številom (I, III itd.) in cepijo samo eno verigo dvoverižne DNA. Ti encimi so monomerne narave in ne potrebujejo nobenega visokoenergetskega kofaktorja. Topoizomeraze tipa IA delujejo tako, da cepijo samo eno verigo DNA in prenesejo nasprotno necepljeno verigo dvoverižne DNA skozi to novo nastalo odprtino. Tip IB pa enako cepijo samo eno verigo, le da drugo zavrtijo okoli prekinitve. Podobno kot IB delujejo tudi encimi tipa IC. Encimi tipa IA potrebujejo za katalitično aktivnost Mg(II) ione in se kovalentno vežejo na fosfat na 5' koncu DNA. Encimi tipa IB pa ne potrebujejo dvovalentnih kovinskih ionov in se vežejo na fosfat na 3' koncu DNA. Encimi tipa I odstranjujejo po eno dodatno zvitje naenkrat. Zaradi svojega mehanizma, lahko nekatere topoizomeraze tipa IA razrešijo medsebojno povezane enoverižne molekule DNA. Topoizomeraze tipa I lahko spreminjajo samo zasuk DNA, ne morejo pa odstranjevati vozlov ali razrešiti medsebojno prepletene dvoverižne DNA [11,14].

**Bakterije** kodirajo tri različne topoizomeraze tipa I: topoizomerazo I (imenovana tudi protein  $\omega$ ) in topoizomerazo III, ki sta obe tipa IA, ter topoizomerazo IB. Ti encimi odstranjujejo negativna dodatna zvitja, vendar ne pa pozitivnih in z DNA-girazo regulirajo gostoto dodatnih zvitij v kromosomski DNA. Vloga topoizomeraze III ni popolnoma znana, vendar je ta encim pomemben za vzdrževanje stabilnosti genoma. **Evkarionti** kodirajo dve

jedrski topoizomerazi tipa I: topoizomerazo I, ki je tipa IB in je drugačna od proteina  $\omega$ , in topoizomerazo III. Topoizomeraza I sprošča odvite in navite molekule DNA in odstranjuje pozitivna dodatna zvitja, ki se naberejo pred replikacijskim in transkripcijским kompleksom. Raven topoizomeraze I je visoka v vseh celicah, vendar je še višja v hitro delečem se tkivu in v rakavih celicah. Topoizomeraza III je encim tipa IA, ki se pri večini evkariontov deli na tipa III $\alpha$  in III $\beta$ . Miši, ki nimajo topoizomeraze III $\alpha$ , umrejo zgodaj v embriogenezi. Manj je znanega o celični funkciji topoizomeraze III $\beta$ . Miši, ki nimajo te topoizomeraze, preživijo, vendar so neplodne, imajo abnormalno število kromosomov in skrajšano povprečno življenjsko dobo [11].

**Topoizomeraze tipa II** so označene s sodim številom (II, IV itd.). Ti encimi vsebujejo več polipeptidnih verig in za katalitično aktivnost potrebujejo ATP. Prokariontski encimi imajo strukturo A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, evkariontski pa so homodimeri, pri katerih sta se bakterijski A in B podenoti združili. Podenota A vsebuje aktivno mesto s tirozinskim ostankom, ki se veže na fosfat DNA, medtem ko podenota B vsebuje mesto za vezavo in hidrolizo molekule ATP. Topoizomeraze tipa II spreminjajo topologijo DNA z ustvarjanjem prehodnih dvojno vijačnih prekinitev v DNA, s prenašanjem druge dvovijačnice skozi nastalo odprtino in s ponovnim spojem prekiniteve. Vse topoizomeraze tipa II potrebujejo za aktivnost Mg(II) ione. Cepitvena reakcija vključuje kovalentno vezavo vsake podenote dimera na 5' konec DNA preko fosfotirozinske vezi. Topoizomeraze tipa II delujejo na zvitja verig in odstranjujejo lahko vozle in pentlje v genetskem materialu [11,14].

**Bakterije** kodirajo dve različni topoizomerazi tipa II: DNA-girazo in topoizomerazo IV. DNA-giraza je edinstvena, saj je edina znana topoizomeraza, ki lahko ustvarja negativna dodatna zvitja. Deluje v povezavi s proteinom  $\omega$  in skupaj regulirata gostoto dodatnih zvitij v bakterijski DNA. Prav tako igra pomembno vlogo v iniciaciji in elongaciji pri replikaciji DNA. Topoizomeraza IV igra ključno vlogo pri razdruževanju hčerinskih kromosomov po replikaciji DNA in odstranjuje vozle iz genoma. **Evkarionti** kodirajo topoizomerazo II, ki je homologna prokariontskim encimom tipa II. Igra ključno vlogo v replikaciji in rekombinaciji DNA in je potrebna za pravilno organizacijo in segregacijo kromosomov. Nižji evkarionti kodirajo samo eno topoizomerazo tipa II, vretenčarji pa izražajo dva podrazreda topoizomeraze II, in sicer  $\alpha$  in  $\beta$ . Oba imata podobne encimske lastnosti, vendar se razlikujeta v regulaciji in celičnih funkcijah. Topoizomeraza II $\alpha$  je pomembna za preživetje hitro delečih se celic, igra pomembno vlogo v proliferaciji, replikaciji DNA in segregaciji kromosomov. Topoizomeraza II $\beta$  pa naj bi sodelovala pri transkripciji [11].

Topoizomeraze so bistvenega pomena za preživetje celic, lahko pa predstavljajo grožnjo genomske integritete, saj so tarče mnogih protirakovih in protibakterijskih učinkovin. V nasprotju z večino učinkovin, ki ciljajo proteine, te protitopoizomerazne učinkovine ne ubijejo celice z zaviranjem encimske aktivnosti, ampak izkoristijo potencialno smrtonosno naravo topoizomeraz in stabilizirajo kompleks topoizomeraze in DNA. To spremeni topoizomerazo v potencialen fiziološki toksin. Običajno so kompleksi topoizomeraze in DNA kratko živeči in zlahka reverzibilni. Ko pa učinkovine stabilizirajo ta kompleks, lahko pride do trčenja kompleksa z DNA polimerazo ali helikazo. Nastalo trčenje pretvori prehodne prelome DNA v stalne enojne ali dvojne vijačne zlome. Iz nastale škode rekombinacijski ali popravljalni mehanizmi povzročijo mutacije, kromosomalne translokacije in druge spremembe. Ko so te stalne prekinitev DNA prisotne v zadostnem številu, se v bakterijah sproži SOS odgovor, pri evkariontih pa apoptoza [11].

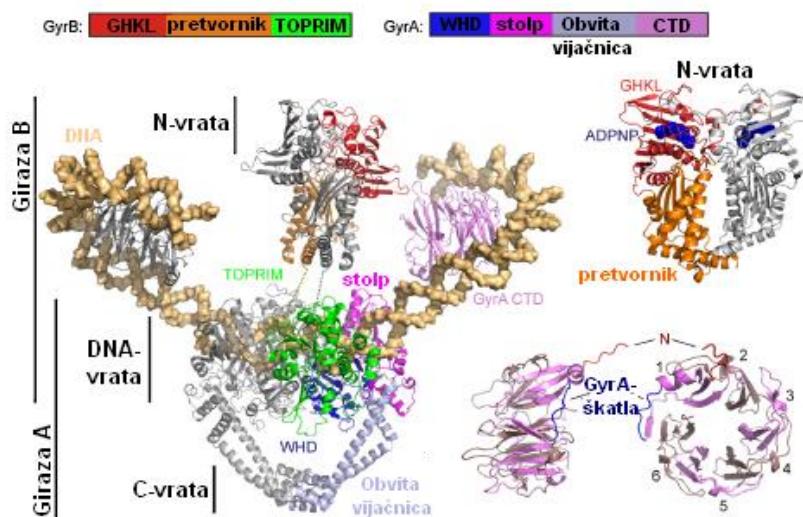
#### 1.4. DNA-giraza

DNA-giraza je topoizomeraza tipa IIA, ki ima sposobnost, da s porabo molekule ATP, uvede negativno dodatno zvitje v kovalentno zaprti dvoverižni DNA. ATP uporablja tudi za sproščanje pozitivnih dodatnih zvitij, čeprav je ta proces energetsko favoriziran in za odstranjevanje vozlov ter za razrešitev premrežene DNA. Vendar pa ima tudi sposobnost, da ustvari vozle ali premreži molekule DNA. Negativna dodatna zvitja pa sprosti brez porabe ATP. DNA-giraza *E. coli* je sestavljena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB, ki so razporejene v A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> heterotetramer. Podobna struktura je pri topoizomerazi IV, ki je sestavljena iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta homologni GyrA in GyrB. DNA-giraza je bila odkrita tudi v rastlinah in nekaterih parazitih, vendar se ne pojavlja pri drugih evkariontih. Zaradi te značilnosti in tega, da je pomembna za preživetje bakterij, sta DNA-giraza in topoizomeraza IV pomembni tarči za številne protibakterijske učinkovine [15].

##### 1.4.1. Struktura

V strukturnem kompleksu GyrB stoji nad GyrA (Slika 1). GyrB *E. coli* je sestavljena iz N-končne domene (NTD), ki je odgovorna za vezavo in hidrolizo molekule ATP in C-končne domene (CTD), ki interagira z GyrA in DNA. N-končna ATPazna domena pripada družini GHKL in je sestavljena iz domene TOPRIM in pretvornika (angl. transducer), ki povezuje ATPazno in TOPRIM domeno. GyrA *E. coli* je sestavljena iz NTD, ki je odgovorna za prelom DNA in CTD, ki objame DNA in je nujna za sposobnost ustvarjanja negativnih dodatnih zvitij. NTD domeno lahko razdelimo na stolp, krilato spiralno vijačnico (WHD) in

domeno v obliki obvite vijačnice, ki je skladna z drugimi topoizomerazami tipa IIA. Strukturno je NTD GyrB *E. coli* dimer, kjer je vsak monomer sestavljen iz N-končnega dela, ki veže ATP, in C-končnega dela, ki tvori 20 Å veliko votlino, ravno prav veliko, da veže dvoverižno DNA. Osrednja votlina, ki jo tvori del C-končne domene, je obložena s pozitivno nabitimi argininskimi ostanki. Tudi CTD GyrB je dimer, ki tvori rakovici podobno strukturo, kjer se nahaja domena TOPRIM. Domena TOPRIM vsebuje tri kisle ostanke, ki so odgovorni za vezavo magnezijevih ionov, potrebnih za katalizno aktivnost encima. Tudi NTD GyrA *E. coli* je dimer in vsebuje 30 Å veliko votlino. Obstajata dva dimerna vmesnika, na vrhu in na dnu strukture, ki vsebujueta DNA-vrata in C-vrata. Vmesnik na vrhu strukture vsebuje aktivno mesto s tirozinom, ki tvori fosfotirozinsko vez s 5' koncem prelomljene verige. Ta regija nasprotno od vmesnika na vrhu strukture zagotavlja pozitivno nabito sedlo, ki spodbuja vezavo DNA. CTD je sestavljena iz  $\beta$ -vetrnice s šestimi kraki. Zunanji dve tretjini površine te strukture sta bazični in nabiti, kar nakazuje, da to področje veže in ukrivilja DNA. Druga pomembna strukturna značilnost CTD, ki jo najdemo med prvim in 6 krakom, je škatla GyrA, ki je sestavljena iz 7 aminokislin in je nujna za ustvarjanje dodatnih zvitij [15,16].

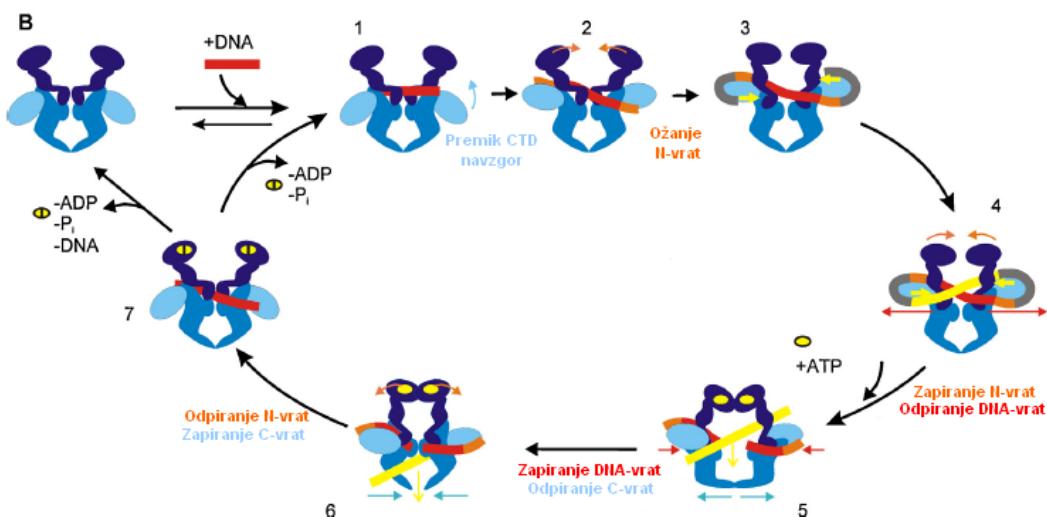


**Slika 1:** Struktura DNA-giraze (prirejeno po [16]).

#### 1.4.2. Mehanizem

Za mehanizem ustvarjanja dodatnih zvitij s strani DNA-giraze je bil predlagan mehanizem prehoda verige, ki poteka z usklajenim odpiranjem in zapiranjem N-, DNA- in C-vrat (Slika 2). Katalitični cikel se začne z ovijanjem DNA okoli DNA-giraze v desni smeri. Tako nastane fiksirano pozitivno dodatno zvitje. Ovijanje nadzira CTD GyrA, ki je bistvena za ustvarjanje negativnega dodatnega zvitja, saj DNA-giraze, ki jim manjka CTD,

ne morejo uvesti negativnega dodatnega zvitja. Lahko pa tako kot topoizomeraza II s porabo ATP sproščajo DNA. Vratni (G)-segment DNA se veže na DNA-vrata DNA-giraze, ki se prelomi z nukleofilnim napadom katalitičnega tirozina na fosfatno skupino DNA. Vezava dveh Mg<sup>2+</sup> ionov s TOPRIM domeno v GyrB je potrebna za prelom verige. Vezava ATP in zaprtje N-vrat vodita do zajetja transportnega (T)-segmenta v zgornjo votline DNA-giraze. Odprtje DNA-vrat mogoči T-segmentu, da se premesti iz zgornje votline v spodnjo. Zaradi tega prehoda imenujemo ta proces mehanizem prehoda verige. DNA-vrata se nato zaprejo in G-segment se ponovno poveže. T-segment zapusti spodnjo votline skozi C-vrata. Hidroliza ATP pa omogoči ponovno odprtje N-vrat in povrne encim na začetno stanje. Na splošno en cikel, ki omogoči dodatno zvitje, ustreza prehodu transportne DNA skozi N-, DNA- in C-vrata, ki se odprejo in zaprejo v zelo usklajenem načinu. DNA-giraza lahko tudi sprosti negativno dodatno zvitje. Mehanizem je podoben kot zgoraj, le da T-segment prehaja skozi nasprotno stran in ni potreben ATP [14,15,16].



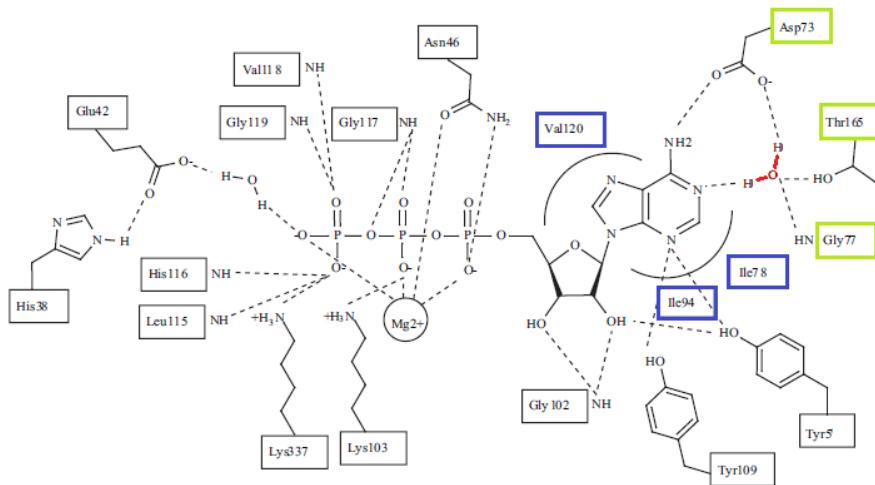
Slika 2: Mehanizem prehoda verige (prirejeno po [16]).

#### 1.4.3. ATPazna domena

ATPazna domena ustreza NTD GyrB. Sestavljena je iz dveh poddomen. N-končna domena GHKL je sestavljena iz 220 AK, ki so razporejene v osem β-vijačnic in pet α-vijačnic in vsebuje nukleotidno vezavno mesto. C-končna pretvorniška (angl. transducer) domena vsebuje 170 AK, ki sestavljajo štiri β-vijačnice in štiri α-vijačnice. ATPazna domena je dimer, ki vsebuje N-končni pas (angl. strap) 14 AK, ki se razteza v sosednji monomer in tako tvori del ATP vezavnega mesta. V zaprti dimerni strukturi se nahaja tudi 20 Å velika odprtina, ki je obložena s pozitivno nabitimi ostanki arginina in predstavlja prehod za prenos

DNA. Spremembra v relativnem položaju GHKL in pretvorniške domene, kot odgovor hidrolize ATP, je pomembna pri usmerjanju T-segmenta DNA skozi prelom [17,18].

Vezavno mesto za ADPNP pri DNA-girazi in topoizomerazi IV leži na NTD na vrhu  $\alpha_6$ -vijačnice in je obrnjeno v smer  $\alpha_4$ -vijačnice. Preko  $Mg^{2+}$  vezan nukleotid je stabiliziran z vodikovimi vezmi, pri nekaterih preko molekul vode, z ostanki Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 (Slika 3). Adenin in riboza tvorita z ostanki Ile78, Ile94 in Val120 ugodne hidrofobne interakcije. Večina ostankov v ATP vezavnem mestu prihaja od domene GHKL. Z glicini bogata zanka oz. ATP pokrov (ang. ATP-lid), ki obdaja ADPNP, je sestavljena iz Gly114, Gly117 in Gly119 razporejenih v GxxGxG vzorec. Njihovi dušikovi atomi pa so usmerjeni proti fosfatom v ADPNP molekuli. Lys103 ima pomembno vlogo pri encimskih konformacijskih spremembah in/ali pri vezavi in hidrolizi ATP. Tudi Lys337, ki pripada C-končni regiji iz pretvorniške domene, interagira z  $\gamma$ -fosfatom. Ta lizin naj bi povezal hidrolizo ATP z relativnim gibanjem med GHKL in pretvorniško domeno. Pomembna struktura je tudi kristalna vodna molekula, ki predstavlja del omrežja vodikovih vezi med adeninski obročem ATP in ostanki Asp73, Gly77 in Thr165. Tyr5 iz N-končnega traka interagira z ADPNP, tako da tvori vodikove vezi z 2'-hidroksi skupino riboze in dušikom na mestu N3 adenina. Na nasprotni strani Asp73 tvori vodikovo vez z dušikom na mestu N6 adenina (Slika 3) [17,18].



**Slika 3:** Prikaz interakcij molekule ATP in ATP-vezavnega mesta v GyrB *E. coli*. Kristalna vodna molekula: rdeča, aminokislinski ostanki, s katerimi voda tvori H-vezi: zelena, aminokislinski ostanki, ki tvorijo hidrofoben žep: modra, H-vezi: črtkana črta (prirejeno po [18]).

Pomembnost His38, Glu42, Asn46, Glu50, Asp73, Arg76, Gly77, Ile78 in Thr165 kažejo tudi študije mutageneze, kjer so te aminokisline mutirali in jih zamenjali z alaninom, Lys103 pa z izolevcinom. Po mutaciji se je ATPazna aktivnost mutiranega encima signifikantno zmanjšala ali pa aktivnosti sploh ni izkazovala. Mutacija Lys337 v glutamat ni izkazovala nobenega večjega vpliva na vezavo nukleotida, vendar pa se je zmanjšala sposobnost hidrolize molekule ATP. Glu42, ki je stabiliziran z ostanki His38, predstavlja katalitsko področje, ki sprejme proton iz sosednje vodne molekule. V naslednjem koraku aktivna vodna molekula napade  $\gamma$ -fosfat molekule ATP. Ta pa razпадa na ADP in anorganski fosfat. Mutirani proteini, pri katerih so Pro79 in Lys103 zamenjali z alaninom, so izkazovali le polovično aktivnost, vendar pa niso imeli sposobnosti tvorjenja dodatnih zvitij DNA. S tem predvidevajo, da sta lahko ta dva ostanka potrebna za sklapljanje hidrolize ATP s sposobnostjo dodatnega zvijanja molekule DNA [17,18].

### 1.5. Zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II

DNA-topoizomeraze so pomembne tarče protimikrobnih učinkovin. DNA-giraza je nujna za preživetje bakterij in je običajno odsotna pri evkariontih, zato predstavlja idealno tarčo. Številne učinkovine, ki so danes na voljo na trgu, ciljajo DNA-girazo in topoizomerazo IV. Poznamo dva razreda učinkovin, ki delujejo na ta dva encima: aminokumarini in fluorokinoloni. Fluorokinoloni so sinteznega izvora, medtem ko so aminokumarini naravne spojine, in sicer produkt bakterijske vrste *Streptomyces* [15].

#### 1.5.1. Zaviralci GyrA in ParC

Fluorokinoloni so sintezne učinkovine, ki temeljijo na 4-okso-1,4-dihidrokinolinskem skeletu, ki ima karboksilno skupino na mestu 3 kinolinskega obroča in več substituentov na obročnem dušiku N1 in na položaju C7. V prvo generacijo kinolonov spadajo nalidiksna kislina, oksolinska kislina in drugi, ki so imeli enostavno sintezno pot. Te učinkovine so delovale le na G- bakterije, zato so jih uporabljali pri okužbah urinarnega trakta. Z uvedbo fluorovega atoma na pozicijo 6 in piperidina na pozicijo 7 so ustvarili fluorokinolone, ki so razširili spekter delovanja tudi na nekatere G+ bakterije. Fluorokinoloni so tudi edini zaviralci DNA-giraze in topoizomeraze IV, ki so trenutno v klinični uporabi. Z optimizacijo strukture so še izboljšali jakost, biološko uporabnost, penetracijo v tkiva, varnost in še dodatno razširili spekter na G+ bakterije. Fluorokinoloni izkazujejo širok spekter delovanja ter izkazujejo bakteriostatično in baktericidno delovanje. Spremenijo bakterijsko topoizomerazo tipa II v močan celični toksin, tako da stabilizirajo kovalentni kompleks med tirozinskim ostankom topoizomeraze in prelomljeno DNA. To

zavre sintezo DNA in s tem rast bakterije, zato imajo bakteriostatično delovanje. Baktericidno delovanje je povzročeno zaradi prelomov DNA, ki se ustvarijo v nadalnjem procesu. Fluorokinoloni selektivno zastrupljajo podenoto GyrA in podenoto ParC, interagirajo pa tudi z GyrB in ParE. V G- bakterijah je primarna tarča predvsem DNA-giraza, pri G+ pa topoizomeraza IV. Vendar pa se je dandanes že razvila odpornost proti fluorokinolonom, in sicer s točkovnimi mutacijami v genih, ki kodirajo tarčno mesto v topoizomerazi IV in DNA-girazi, s čemer se zmanjša afiniteta vezave teh učinkovin. Odpornost povzroča tudi zmanjšano prepustnost bakterijske celične stene za učinkovine, povečano izražanje aktivnih izlivnih črpalk, kemijska deaktivacija učinkovine in zaščita tarčnega mesta s proteinom Qnr [5,13,15,19]. Prav zaradi te odpornosti se je razvoj delno premaknil na odkrivanje novih zaviralcev GyrB in/ali ParE [19].

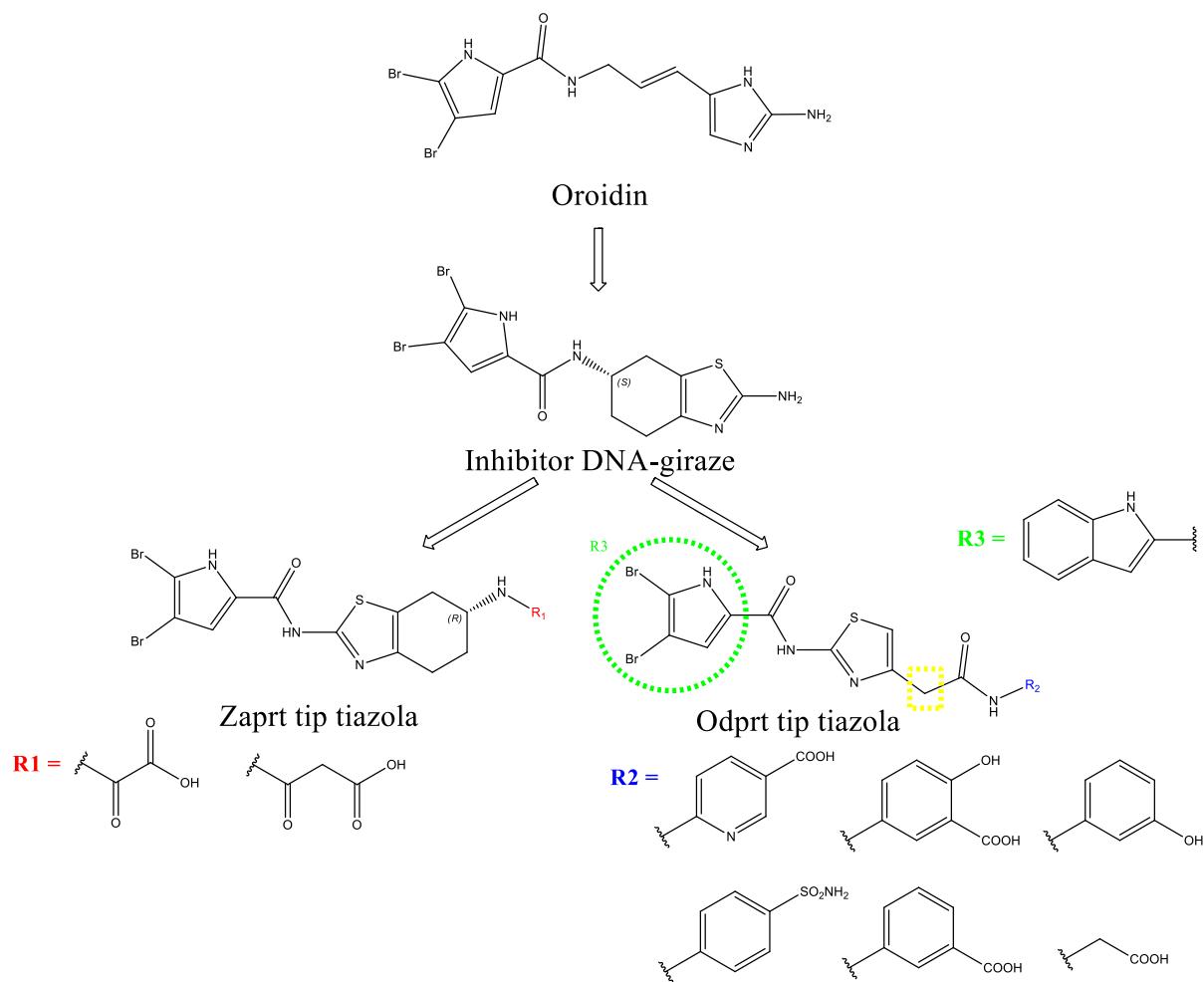
### 1.5.2. Zaviralci GyrB in ParE

ATPazna domena DNA-giraze in topoizomeraze IV je bila kristalizirana z nehidrolizirajočim analogom ATP ADPNP. V kompleksu *E. coli* GyrB-ADPNP adeninski obroč tvori vodikovo vez z Asp73, Gly77 in Thr165 (Slika 3). Zaviralci se pogosto vežejo v vezavno mesto za adenin, kjer tvorijo dve vodikove vezi, in sicer eno neposredno z Asp73 in drugo posredno z Asp73 preko strukturno vezane vode. Posledično morajo zaviralci vsebovati donor vodikove vezi, ki interagira s karboksilno skupino Asp73 in v njegovi bližini akceptor vodikove vezi, ki interagira s strukturno vezano vodo. Vodikove vezi se tvorijo tudi z Arg136, ki je aminokislinski ostanek, ki ni v kontaktu z molekulo ATP. S pomočjo rešetanja na osnovi liganda, fragmentov ali strukturno podprtrega rešetanja in načrtovanja so odkrili številne zaviralce GyrB iz različnih strukturnih razredov, kot so aminokumarini, analogi ciklotrialidinov, arilaminotriazini, arilaminopirimidini, indazoli, pirazolopiridoni, pirolopirimidini, pridiluree, pirolamidi in triciklični pirimidinoindoli [19,20]. Prvi zaviralci bakterijskih encimov, ki zasedejo ATP vezavno mesto, so bili aminokumarini, kot so kumermicin A1, novobiocin in klorobiocin. Aminokumarini so *in vitro* močnejši zaviralci DNA-giraze kot fluorokinoloni, vendar so zaradi slabe topnosti in toksičnosti v evkariontih klinično manj uporabni. Aminokumarini preprečijo dodatno zvitje, kar dokazuje, da je tarča DNA-giraza. So kompetitivni zaviralci hidrolize ATP. Sladkor L-novioza interagira z Asp73, kumarinski obroč pa interagira z Arg136, kar prepreči dimerizacijo NTD GyrB. Novobiocin so v 60ih letih sprostili na trg. Zaradi močnega protibakterijskega delovanja proti G+ bakterijam so novobiocin sprva uporabljali za zdravljenje okužb z MRSA. Zaradi razvoja odpornosti, toksičnosti, slabe topnosti in slabe aktivnosti proti G- bakterijam pa so

ga s trga kmalu umaknili. Kumarinska odpornost, ki izhaja iz spontanih mutacij v aktivnem mestu, se je že pojavila v različnih G- in G+ bakterijah. Najpogosteje je mutiran Arg136 (oštevilčenje po *E. coli*), kjer so našli mutacije glicina, izolevcina, levcina, serina, cisteina in histidina v ATP vezavnem mestu [15,17,18,19].

## 2. Načrt za delo

Tekom eksperimentalnega dela bomo poskusili sintetizirati in optimizirati strukturo novih ATP kompetitivnih inhibitorjev DNA-giraze B in raziskali povezavo med strukturo in delovanjem. Izhajali bomo iz analogov oroidina, alkaloida iz sružve *Agelas sp*, ki so bili razviti na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (Slika 4). Kandidate za sintezo bomo načrtovali s pomočjo struktурno podprtga načrtovanja na osnovi znanih kristalnih struktur encima v kompleksu z zaviralci. Predvideno vezavo načrtovanih spojin bomo preučili s pomočjo sidranja ligandov v ATP vezavno mesto DNA-giraze iz *E. coli*. Sintetiziranim spojinam bomo ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na rekombinantnem encimu in dobljene podatke uporabili v naslednjem ciklu načrtovanja in sinteze.



**Slika 4:** Struktura oroidina, zaviralca DNA-giraze in predlagana struktorna tipa potencialnih zaviralcev DNA-giraze ter njuna optimizacija.

Načrtovali in sintetizirali bomo odprte in zaprte derivate tiazolov. Odprti so derivati 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetne kisline, zaprti pa derivati 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazola.

Na ta način bomo preverili vpliv osrednjega dela molekule na zaviralno aktivnost. Spreminjali bomo tudi desno in levo stran molekule (Slika 4).

Najprej bomo na novem strukturnem tipu potencialnih zaviralcev DNA-giraze spremojali desni del molekule (Slika 4, odprt tip tiazola). Uvedli bomo niacinski, salicilni, fenolni, sulfanilamidni, benzojski in glicinski fragment. Spojino, ki bo izkazovala najboljšo zaviralno aktivnost encima in protibakterijsko delovanje, bomo dalje optimizirali tako, da bomo modifcirali tudi levi in osrednji del molekule.

Na osnovi rezultatov sintetiziranih spojin bomo poskusili optimizirati hidrofobne interakcije v hidrofobnem žepu ATP vezavnega mesta DNA-giraze, tako da bomo 4,5-dibromopirolni obroč zamenjali z indolnim obročem (Slika 4, zelen črtkan krog). Nadalje bomo sintetizirali analog aktivne spojine, ki ima na tiazolnem obroču vmesnik skrajšan za eno CH<sub>2</sub> skupino (Slika 4, rumen črtkan kvadrat). Preverili bomo tudi zamenjavo tiazolnega obroča z R enantiomerom 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazola in tako tvorili zaprt tip tiazola, ki mu bomo pripeli oksalno in malonsko kislino.

Sintetizirane spojine bomo biokemijsko ovrednotili (določili rezidualno aktivnost) in jim določili vrednost IC<sub>50</sub>, kar predstavlja koncentracijo potencialnega zaviralca, ki povzroči 50 % inhibicijo encimske reakcije na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli*. Aktivnim spojinam bomo določili tudi protibakterijsko delovanje pri 50 µM na dveh G+ (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) in dveh G- (*Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakterijskih sevih.

## 2.1. Delovna hipoteza

Menimo, da bodo sintetizirani tiazoli tvorili močne interakcije v ATP-vezavnem mestu in posledično izkazovali močno zaviranje encima ter dobro protibakterijsko aktivnost. To sklepamo iz predhodno sintetiziranih derivatov tiazola, ki so pokazali zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju [21,22,23].

### 3. Materiali in metode

#### 3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics (Geel, Belgium), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) in TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium).

#### 3.2. Kromatografske metode

##### 3.2.1. Tankoplastna kromatografija – TLC

Potek reakcij in ustreznosti mobilne faze za čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo smo spremljali s tankoplastno kromatografijo (TLC - thin layer chromatography). Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila v različnih razmerjih, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali plošče Merck DC Fertigplatten Kisegel 60 F<sub>254</sub> z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali s pomočjo UV lučke z valovno dolžino 254 nm in orositvenimi reagenti.

##### 3.2.2. "Flash" kolonska kromatografija

Za čiščenje spojin smo v nekaterih primerih uporabili tako imenovano "flash" kolonsko kromatografijo, pri kateri pretok mobilne faze pospešujemo z uvajanjem zračnega nadtlaka. Od količine nečistega vzorca je bila odvisna izbira ustrezne steklene kolone, ki so se med seboj razlikovale po velikosti in premeru. Kot mobilno fazo smo uporabljali različna organska topila v ustreznih razmerjih, ki so navedena v sinteznih postopkih posameznih spojin, kot stacionarno fazo pa smo uporabljali silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev med 0,040 – 0,063 mm. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah za TLC smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda = 254$  nm) in orositvene reagente.

##### 3.2.3. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC – high-performance liquid chromatography) uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje vzorcev. 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 uporabljenha kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 × 150 mm). Pri metodi A je MF sestavljal 0,1 % trifluoroacetna kislina v vodi (A) in metanolu (B); gradientna elucija MF: 90% A do 10% A v 20-ih minutah, nato 5 minut 10 % A; uporabljen pretok MF: 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL. Pri metodi B je MF sestavljal 0,1 %

trifluoroocetna kislina v vodi (A) in acetonitrilu (B); gradientna elucija MF: 2 minuti 95 % A, 90 % A do 10 % A v 12-ih minutah, 10 % A do 5 % A v 1 minuti in nato 5 minut 5 % A; uporabljen pretok MF: 1,0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL.

### 3.3. Spektroskopske metode

#### 3.3.1. Infrardeča spektroskopija (IR)

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

#### 3.3.2. Jедrska magnetna resonanca (NMR)

$^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  NMR spektre smo posneli na spektrometu Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranem topilu dimetilsulfoksidu ( $\text{DMSO}-d_6$ ) ali kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ). Kot interni standard pa smo uporabili TMS. S pomočjo računalniškega programa MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mesterlab Research S.L. smo procesirali spektre.

#### 3.3.3. Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je zelo učinkovita tehnika za identifikacijo snovi na osnovi analize ionov, nastalih iz osnovne molekule. Metoda temelji na merjenju razmerja masa/naboj molekul s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Z njo 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. Metoda je zelo občutljiva, saj se z njo lahko zaznajo tudi vsebnosti v območju ng do pg. Spodnja meja detekcije je pogosto odvisna od uporabljenega postopka ionizacije.

Spektri so bili posneti na Institutu Jožefa Stefana v Ljubljani z masnim spektrometrom Avtосpec (VG-Analytical) z ESI tehniko.

### 3.4. Nomenklatura in risanje spojin

Program ChemBioDraw Ultra 13.0 podjetja CambridgeSoft smo uporabili za risanje strukturnih formul spojin, reakcijskih schem in za poimenovanje po IUPAC nomenklaturi. Pri poimenovanju smo si pomagali tudi s skripto Vaje iz Farmacevtske kemije II. Za iskanje sinteznih postopkov po podatkovnih bazah smo uporabljali podatkovno bazo SciFinder Scholar.

### 3.5. Določanje temperature tališča

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

### 3.6. Določanje optične rotacije

Optične rotacije smo merili na polarimetru Perkin-Elmer 241 MC. Poročane vrednosti za določeno rotacijo so povprečne vrednosti 5 zaporednih meritev z uporabo integracijskega časa 5 s.

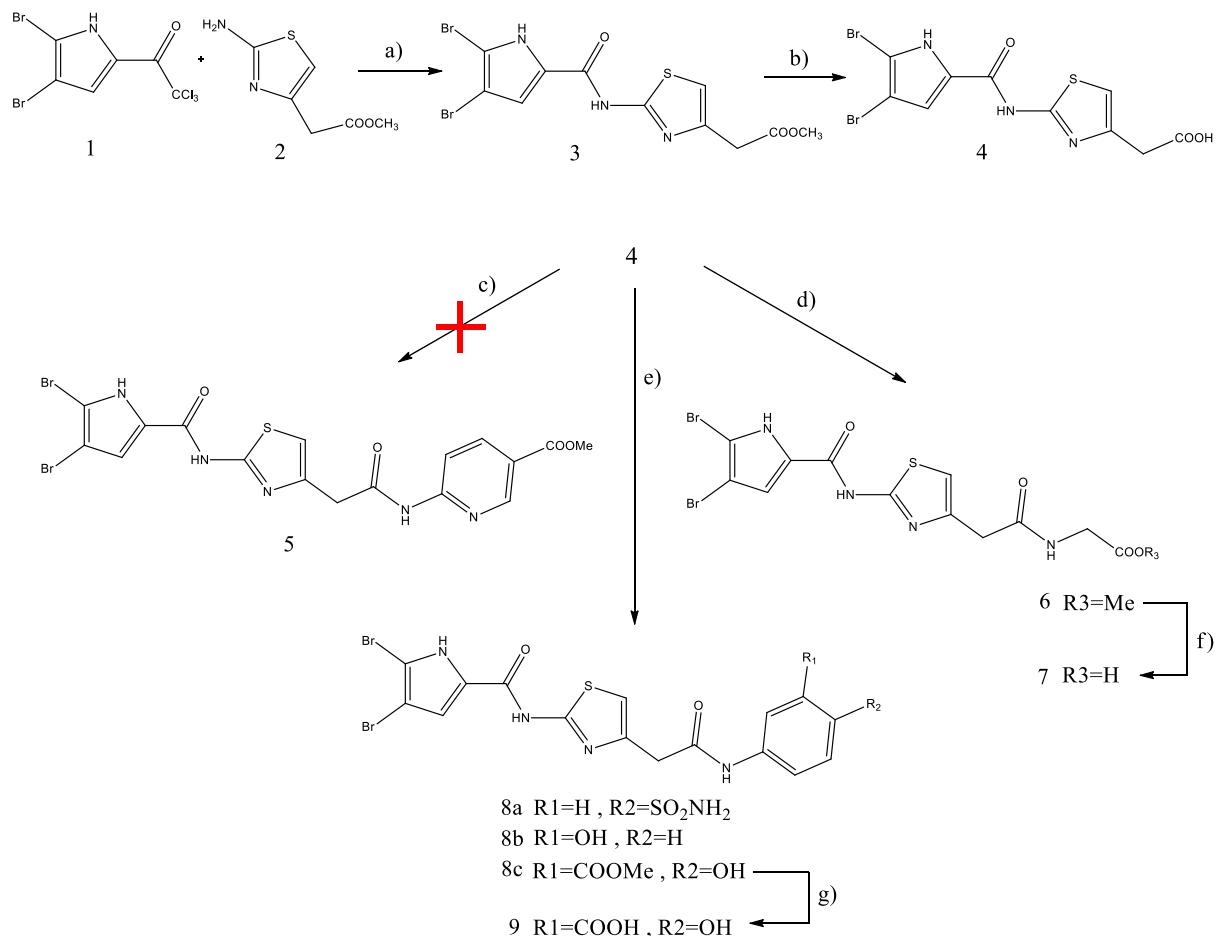
### 3.7. Biološka testiranja

Končnim spojinam smo določili zaviralno aktivnost in protibakterijsko delovanje. Zaviralna aktivnost spojin je bila določena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Izmerila jo je doktorandka Michaela Barančoková na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli*. Testiranje je bilo izvedeno v skladu z opisanim postopkom v poglavju Literatura, pod številko 24. Protibakterijsko delovanje zaviralcev DNA-giraze je bilo določeno na dveh sevih G+ bakterij: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ter dveh G- sevih bakterij: *Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Meritve so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinki na Finskem. Postopek je potekal z metodo razredčitve antibiotika v bujonu v 96-jamični mikrotitrski plošči v skladu s CLSI smernicami in je opisan v poglavju Literatura, pod številko 24.

## 4. Eksperimentalni del

### 4.1. Reakcijske sheme

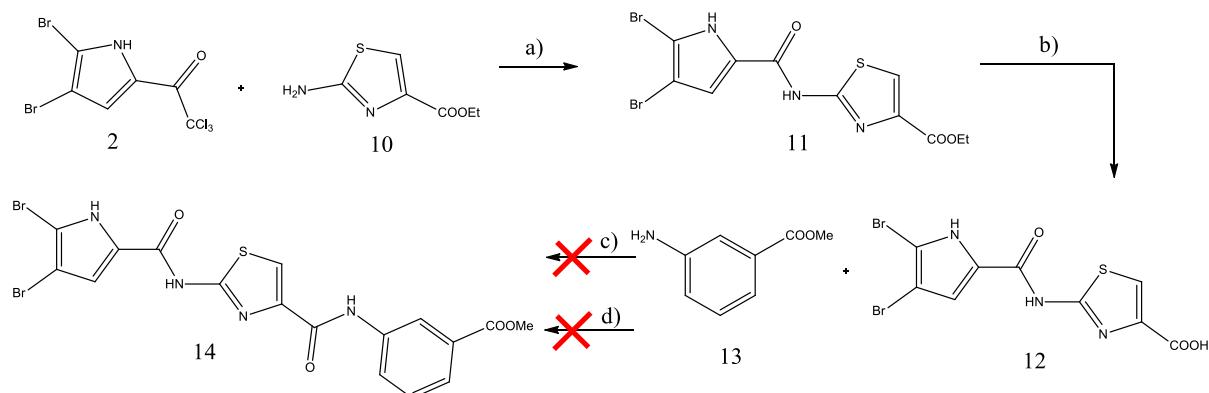
Na shemi 1 je prikazana sinteza *N*-(4-(2-amino-2-oksietil)tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamidnih analogov, ki vsebujejo fenolno (**8b**), sulfanilamidno (**8a**), salicilno (**8c** in **9**), niacinsko (**5**) in glicinsko (**6** in **7**) skupino. V prvi stopnji smo na metil 2-(2-aminotiazol-5-il)acetat (**1**) v prisotnosti natrijevega karbonata pripeli 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (**2**). Estersko vez na nastalem amidu **3** smo hidrolizirali do karboksilne kisline **4** v prisotnosti natrijevega hidroksida. Iz 2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-5-il)etanojske kisline in različnih aminov smo s pomočjo sklopitvenega reagenta EDC v prisotnosti HOBr in *N*-metilmorfolina (NMM) ali *N,N*-diizopropyletilamina tvoriliamide **6**, **8a-c**. V zadnji stopnji smo metilne estre hidrolizirali do karboksilnih kislin **7** in **9** v prisotnosti natrijevega hidroksida.



**Shema 1:** Sinteza *N*-(4-(2-amino-2-oksietil)tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamidnih analogov, ki vsebujejo fenilni, piridinski in glicinski strukturni element. **Reagenti in pogoji:** **a)**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $80^\circ\text{C}$ , 24h; **b)**  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , sobna temperatura, 48h; **c)** metil 6-aminonikotinat, EDC, HOBr, *N,N*-diizopropyletilamin, DMF,  $0^\circ\text{C}$ , nato sobna

temperatura, 24 h; **d)** 2-metoksi-oksoetan-1-amonijev klorid, EDC, HOBr, *N,N*-diizopropiletilamin, DMF, 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h; **e.** za **8a)** 4-aminobenzensulfonamid, EDC, HOBr, NMM, DMF, 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h; za **8b)** 3-aminofenol, EDC, HOBr, NMM, DMF, 0 °C, 24 h; za **8c)** 5-amino-2-hidroksibenzoat, EDC, HOBr, *N,N*-diizopropiletilamin, DMF, 0 °C, 24 h; **f)** NaOH, MeOH, sobna temperatura, 18 h; **g)** NaOH, MeOH, sobna temperatura, 1 tehen.

Poizkus sinteze metil 3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksamido)benzoata **14** je prikazan na shemi 2. Najprej smo iz metil 2-aminotiazol-4-karboksilata **10** in spojine **2** ob prisotnosti natrijevega karbonata tvorili amid **11**. Nato smo estersko vez na nastalem amidu hidrolizirali v prisotnosti natrijevega hidroksida. Nastalo karboksilno kislino **12** smo povezali z metil 3-aminobenzoatom **13** s pomočjo sklopitvenega reagenta EDC ob prisotnosti HOBr in *N,N*-diizopropiletilamina. Pri tem je nastala amidna vez. Zadnjo stopnjo smo ponovili, pri čemer smo kot sklopitveni reagent uporabili HATU. V obeh primerih nismo uspeli izolirati želenega produkta.

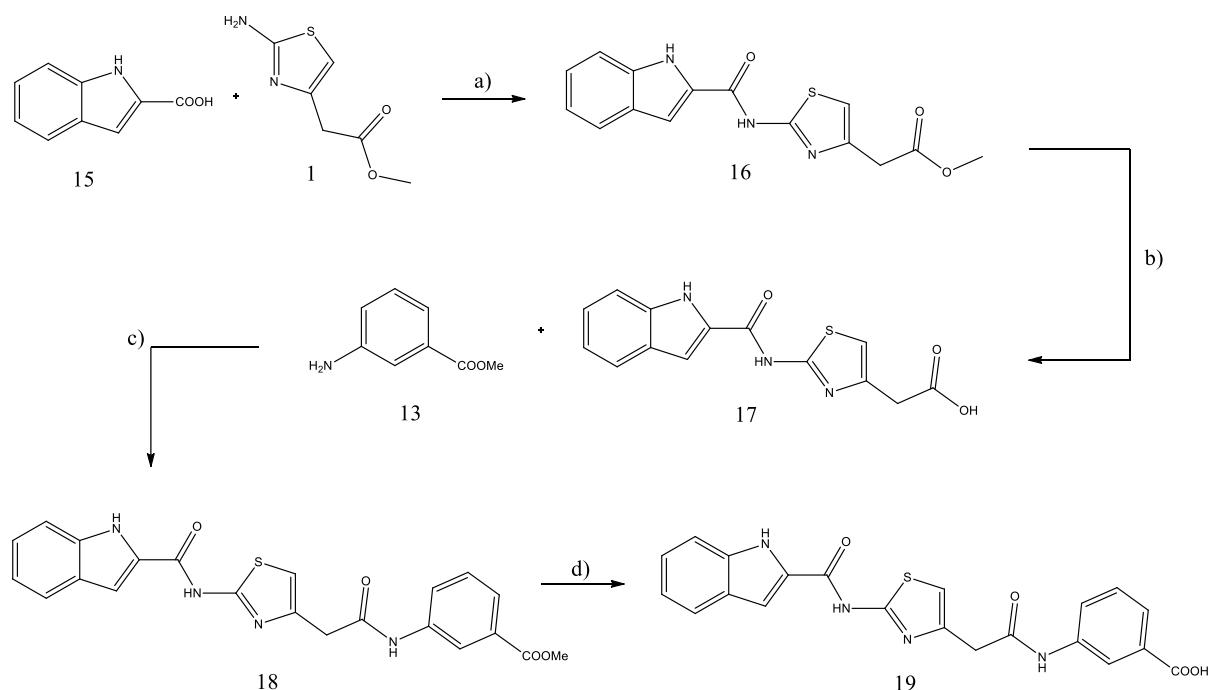


**Shema 2:** Poizkus sinteze metil 3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksamido)benzoata.

Reagenti in pogoji: **a)**  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF, 80 °C, 48 h; **b)** NaOH, MeOH, sobna temperatura, 72 h; **c)** EDC, HOBr, *N,N*-diizopropiletilamin, DMF, 0 °C, nato sobna temperatura, 48 h; **d)** HATU, *N,N*-diizopropiletilamin, DMF, sobna temperatura, 96 h.

Sinteza 3-(2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kislinske **19** je prikazana na shemi 3. Pri tvorbi amida **16** iz 1*H*-indol-2-karboksilne kislinske **15** in metil 2-(2-aminotiazol-5-il)acetata **1** smo ponovno uporabili sklopitveni reagent EDC/HOBr in bazo NMM. Ester **16** na amidu smo hidrolizirali s pomočjo natrijevega hidroksida do karboksilne kislinske **17**, na katero smo s pomočjo sklopitvenega reagenta EDC, HOBr in

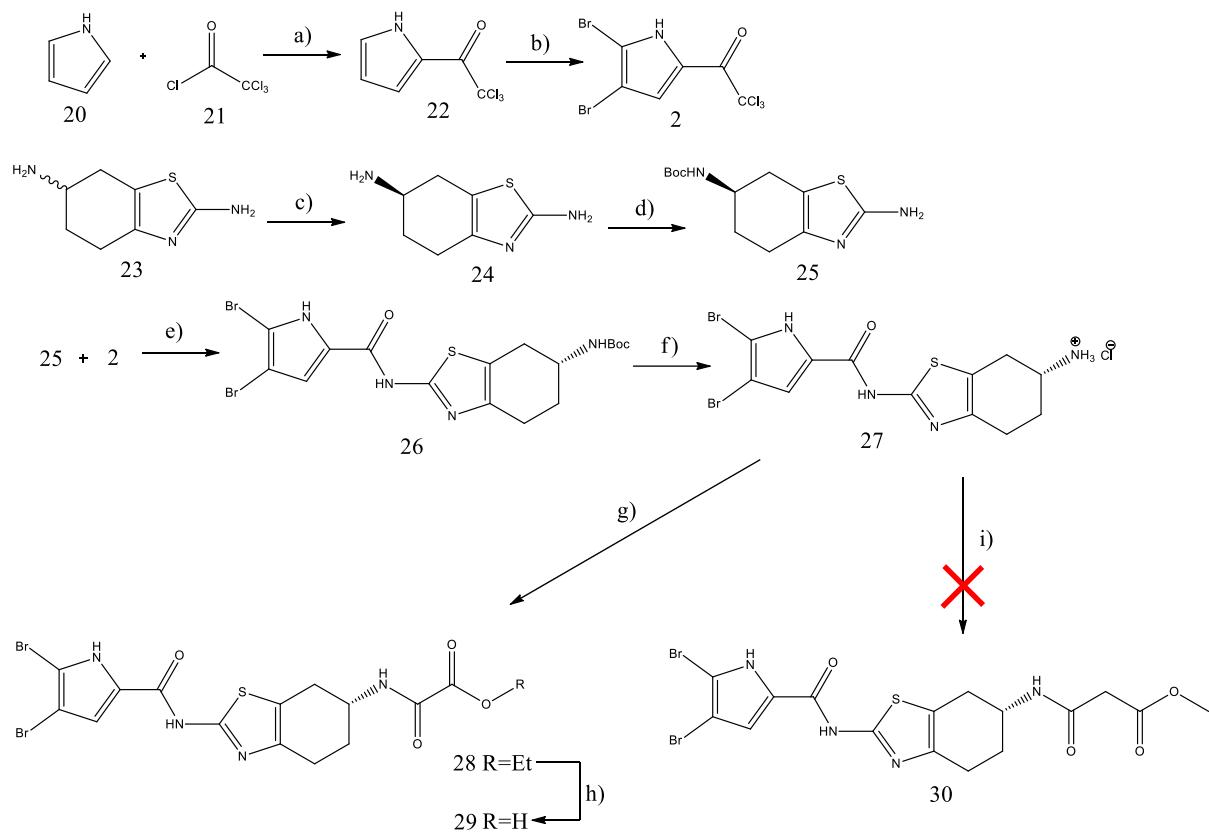
NMM dodali aminsko skupino spojine **13**. Nastala je amidna vez. V zadnji stopnji smo hidrolizirali metilni ester **18** v prisotnosti raztopine natrijevega hidroksida.



**Shema 3:** Sintesa 3-(2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)benzojske kisline.

Reagenti in pogoji: a) EDC, HOBT, NMM, DMF, 0 °C, nato sobna temperatura, 96 h; b) NaOH, MeOH, sobna temperatura, 24 h; c) EDC, HOBT, NMM, DMF, 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h; d) NaOH, MeOH, sobna temperatura, 48 h.

Na shemi 4 je prikazana sinteza (*R*)-4,5-dibromo-*N*-(6-amido-4,5,6,7-tetrahidrobezo[1,2-*d*]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamidnih analogov. V prvi stopnji smo na pirolu **20** izvedli elektrofilno aromatsko substitucijo z 2,2,2-trikloroacetil kloridom **21** ob prisotnosti trietilamina. Nato je sledilo bromiranje pirola **22**. Dobili smo spojino **2**. Nato smo iz racemata 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina **23** s pomočjo D-vinske kisline izolirali čisti *R* stereoizomer **24**. Aminsko skupino na mestu 6 smo zaščitili v obliki *terc*-butilkarbamata (Boc) s pomočjo di-*terc*-butildikarbonata (Boc<sub>2</sub>O). Nato je sledila sklopitev proste aminske skupine na *R* stereoizomeru **25** in spojine **2** ob prisotnosti natrijevega karbonata. Boc zaščitno skupino smo odstranili z acidolizo. Na dobljeno sol amina **27** smo ob prisotnosti piridina v eni reakciji pripeli etil oksalil klorid in v drugi pa metil malonil klorid. Etilni ester na oksalilnem delu **28** smo v zadnji stopnji odstranili z alkalno hidrolizo.



**Shema 4:** Sinteza (R)-4,5-dibromo-N-(6-amido-4,5,6,7-tetrahidrobezo[1,2-d]tiazol-2-il)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamidnih analogov.

Reagenti in pogoji: a) THF,  $\text{NaHCO}_3$ , 0 °C, 1,5 h; b)  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{NaHSO}_3$ , 0 °C, 2,5 h; c) D-vinska kislina,  $\text{EtOH}$ , 90 °C 4,5 h; d)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF, 0 °C, 24 h; e)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , DMF, 80 °C, 24 h; f)  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ ,  $\text{MeOH}$ , 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h; g) etil 2-kloro-2-oksoacetat, piridin, DKM, 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h; h)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , sobna temperatura, 24 h; i) metil 3-kloro-3-oksopropanoat, piridin, DKM, 0 °C, nato sobna temperatura, 24 h.

#### 4.2. Sintezni postopki in analizni podatki

**Metil 2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetat **3**.** Metil 2-(2-aminotiazol-5-il)acetat (**1**) (1,078 g, 2,912 mmol), 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (**2**) (0,608 g, 2,912 mmol) in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,309 g, 2,912 mmol) smo raztopili v DMF (15 mL) in segrevali pri 80 °C preko noči. Potek reakcije smo preverili s tankoplastno kromatografijo. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku, preostanek pa raztopili v EtOAc (50 mL). Organsko fazo smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub>, nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL), sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili topilo pri znižanem tlaku. Preostanek smo kristalizirali iz MeOH. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 57 %; svetlo rjavi kristali (0,704 g); tališče: 200-202 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 1/9): 0,74; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,04 (s, 1H, tiazol-H), 7,45 (d, 1H, J = 2,6 Hz, pirol-H), 12,42 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 36,4, 51,7, 98,8, 107,8, 110,8, 115,4, 125,8, 143,7, 156,6, 157,8, 170,5 ppm; IR (ATR) ν = 3352, 3232, 3129, 2982, 1698, 1650, 1543, 1505, 1442, 1410, 1368, 1274, 1218, 1172, 1116, 1085, 1010, 980, 886, 854, 823, 782, 729, 687 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 419,8653, izmerjena masa: 419,8650; HPLC: method A, t<sub>r</sub> = 13,09 min (95,4% pri 254 nm).

**2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)etanojska kislina **4**.** Spojino **3** (0,481 g, 1,137 mmol) smo raztopili v MeOH (15 mL). Dodali smo 2 M raztopino NaOH (1,137 mL, 2,274 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. Reakcija po 24 h ni potekla do konca, zato smo še dodali NaOH (1,137 mL, 2,274 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. Nato smo odparili topilo in nakisali z 2 M raztopino HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 100 %; rožnato beli kristali (0,496 g); tališče: 240-244 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 9/1): 0,00; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,00 (s, 1H, tiazol-H), 7,44 (d, 1H, J = 2,7 Hz, pirol-H), 12,41 (s, 1H, NH), 13,13 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 97,5, 109,9, 110,0, 115,3, 127,8, 130,5, 139,9, 157,9, 160,3, 164,7 ppm, signal za CH<sub>2</sub> se je prekrival z DMSO-*d*<sub>6</sub>; IR (ATR) ν = 3353, 3230, 3129, 2983, 1699, 1652, 1545, 1505, 1442, 1408, 1367, 1292, 1217, 1174, 1115, 1087, 1010, 989, 898, 856, 823, 782, 740 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 405,8497, izmerjena masa: 405,8488.

**Poizkus sinteze metil 6-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)nikotinata **5**.** Spojino **4** (0,250 g, 0,611 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na 0 °C na ledeni kopeli, dodali EDC (0,141 g, 0,733 mmol), HOBt (0,099 g, 0,733 mmol) in z *N,N*-diizopropiletilaminom (0,202 mL, 1,222 mmol) uravnavali pH do 8. Po 20 min smo dodali metil 6-aminonikotinat in pri sobni temperaturi mešali preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v EtOAc (30 mL). Organsko fazo smo spirali z 10 % citronsko kislino (3 × 10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 15 mL), z nasičeno raztopino NaCl (1 × 15 mL), sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili EtOAc do suhega pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Pri znižanem tlaku smo odparili smo topilo in suh preostanek analizirali z NMR, s katerim nismo potrdili nastanka želenega produkta.

**Metil (2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetil)glicinat **6**.** Spojino **4** (0,200 g, 0,489 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na 0 °C, dodali EDC (0,113 g, 0,587 mmol), HOBt (0,072 g, 0,587 mmol) in *N,N*-diizopropiletilamin (0,161 mL, 0,978 mmol). Po 20 min smo dodali 2-metoksi-oksoetan-1-amonijev klorid (0,061 g, 0,489 mmol) in naprej mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku, preostanek pa raztopili v EtOAc (30 mL). Organsko fazo smo najprej spirali s 10 % raztopino citronske kisline (3 × 10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 15 mL), sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc do suhega. Izkoristek reakcije: 65,4 %; oker kristali (0,159 g); tališče: 231-235 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 9/1): 0,21; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 3,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,87 (d, 2H, J = 5,8 Hz, NHCH<sub>2</sub>CO), 6,97 (s, 1H, tiazol-H), 7,45 (d, 1H, J = 2,5 Hz, pirol-H), 8,40 (t, 1H, J = 5,8 Hz), NHCH<sub>2</sub>CO), 12,40 (s, 1H, NH), 13,11 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 38,0, 40,7, 51,7, 98,8, 107,8, 110,2, 115,3, 125,9, 145,2, 156,5, 157,6, 169,5, 170,4 ppm; IR (ATR) ν = 3354, 3225, 3129, 2980, 1698, 1650, 1543, 1508, 1441, 1409, 1369, 1290, 1216, 1172, 1116, 1086, 1010, 981, 856, 824, 782, 739 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 476.8868, izmerjena masa: 476.8867; HPLC: metoda B, t<sub>r</sub> = 11.98 min (95.0% pri 254 nm).

**(2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetil)glicin **7**.** Spojino **6** (0,122 g, 0,245 mmol) smo raztopili v MeOH (5 mL), dodali 1 M NaOH (0,49 mL, 0,490 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 18 h. Potek reakcije smo preverili s TLC. Nato smo

pri znižanem tlaku odparili MeOH in vodno fazo ( $\text{pH} > 7$ ) ekstrahirali z EtOAc (10 mL). Vodno fazo smo nato nakisali z 2 M HCl do  $\text{pH} = 1$  in izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Matičnico smo ponovno ekstrahirali z EtOAc (10 mL). Izkoristek reakcije: 42,2 %; oker kristali (0,050 g); tališče:  $>300$  °C;  $R_f$  (diklorometan/metanol = 9/1): 0,60;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,56 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3,77 (d, 2H,  $J = 5,6$  Hz,  $\text{NH}\underline{\text{CH}_2}\text{CO}$ ), 6,96 (s, 1H, tiazol-H), 7,43 (s, 1H, pirol-H), 8,28 (t, 1H,  $J = 5,6$  Hz),  $\text{NH}\underline{\text{CH}_2}\text{CO}$ ), 12,41 (s, 1H, NH), 13,11 (s, 1H, NH) ppm, signala za COOH se ne vidi v spektru;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  38,0, 40,7, 98,8, 107,7, 110,1, 115,3, 125,9, 145,2, 156,6, 157,6, 169,3, 171,3 ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3355, 3228, 3128, 2982, 1699, 1651, 1543, 1512, 1441, 1408, 1376, 1294, 1220, 1175, 1090, 1011, 981, 857, 826, 738  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^-$ ) m/z za  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_4\text{SBr}_2$  ([M-H] $^-$ ): izračunana masa: 462,8711, izmerjena masa: 462,8721; HPLC: metoda B,  $t_r$  = 11,24 min (95,2% pri 220 nm).

**4,5-dibromo-N-(4-(2-okso-2-((4-sulamoilfenil)amino)ethyl)tiazol-2-il)-1H-pirol-2-karboksamid 8a.** Spojino **4** (0,207 g, 0,506 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na 0 °C na ledeni kopeli, dodali EDC (0,120 g, 0,607 mmol), HOBT (0,082 g, 0,607 mmol) ter z NMM (0,11 mL, 1,012 mmol) uravnnavali pH do 8. Po 20 min smo odstavili ledeno kopel, dodali 4-aminobenzensulfonamid (0,087 g, 0,506 mmol) in reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi preko noči. DMF smo odparili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v EtOAc (30 mL). Organsko fazo smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $2 \times 30$  mL), nato z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 30$  mL) in nasičeno raztopino NaCl (30 mL). Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in odparili EtOAc do suhega pri znižanem tlaku. Preostanek smo čistili s kristalizacijo iz MeOH. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 15,4 %; svetlo rjavi kristali (0,044 g); tališče:  $>300$  °C;  $R_f$  (diklorometan/metanol = 20/1): 0,08;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,78 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,03 (s, 1H, tiazol-H), 7,07 (t, 1H,  $J = 8,1$  Hz, Ar-H), 7,27 (s, 2H,  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 7,42 (s, 1H, pirol-H), 7,77 (s, 4H, 4 × Ar-H), 10,51 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 12,38 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  98,7, 107,7, 110,5, 115,3, 118,6, 126,7, 138,3, 142,0, 144,8, 149,0, 156,7, 157,8, 168,5 ppm, signal za  $\text{CH}_2$  se je prekrival z DMSO- $d_6$ ; IR (ATR)  $\nu$  = 3244, 3130, 2981, 1698, 1651, 1544, 1513, 1443, 1409, 1368, 1292, 1218, 1172, 1116, 1086, 1010, 982, 886, 855, 823, 782, 738, 660  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^-$ ) m/z za  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Br}_2$  ([M-H] $^-$ ): izračunana masa: 559,8697, izmerjena masa: 559,8687; HPLC: metoda B,  $t_r$  = 12,31 min (95,2% pri 254 nm).

**4,4-dibromo-N-(4-(2-((3hidroksifenil)amino)-2-oksoetil)tiazol-2-il)-1H-pirol-2-karboksamid **8b**.** Spojino **4** (0,200 g, 0,489 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na 0 °C, dodali EDC (0,113 g, 0,587 mmol), HOBr (0,079 g, 0,587 mmol) in z NMM (0,107 mL, 0,978 mmol) uravnnavali pH do 8. Po 20 min smo dodali 3-aminofenol (0,053 g, 0,489 mmol) ter reakcijo pustili, da poteče na ledeni kopeli čez noč. Potek reakcije smo preverili s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku, preostanek raztopili v EtOAc (30 mL) in najprej spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 30 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (30 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili EtOAc do suhega pri znižanem tlaku. Izkoristek reakcije: 45,3 %; rjavkasto beli kristali (0,110 g); tališče: 288-292 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 7/1): 0,58; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,45 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 7,9 Hz, J<sub>2</sub> = 2,3 Hz, J<sub>3</sub> = 0,9 Hz, Ar-H), 6,98 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,1 Hz, J<sub>2</sub> = 1,8 Hz, J<sub>3</sub> = 0,9 Hz, Ar-H), 7,00 (s, 1H, tiazol-H), 7,07 (t, 1H, J = 8,1 Hz, Ar-H), 7,20 (t, 1H, J = 2,1 Hz, Ar-H), 7,44 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H), 9,39 (s, 1H, OH), 10,02 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CONH), 12,38 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 98,8, 106,1, 107,8, 109,8, 110,3, 115,3, 125,8, 129,4, 140,2, 145,3, 156,5, 157,6, 157,7, 167,7 ppm, signal za CH<sub>2</sub> se je prekrival z DMSO-*d*<sub>6</sub>; IR (ATR) ν = 3259, 1655, 1604, 1530, 1489, 1443, 1411, 1377, 1323, 1280, 1225, 1170, 1044, 980, 860, 779, 732, 686 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 496.8919, izmerjena masa: 496.8908; HPLC: metoda B, t<sub>r</sub> = 12.61 min (100% pri 254 nm).

**Metil 5-(2-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)-2-hidroksibenzoat **8c**.** Spojno **4** (0,209 g, 0,511 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na 0 °C, dodali EDC (0,117 g, 0,613 mmol), HOBr (0,083 g, 0,613 mmol) in N,N-diizopropiletilamin. Po 20 min smo dodali metil 5-amino-2-hidroksibenzoat (0,085 g, 0,511 mmol) in mešali pri 0 °C preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. DMF smo pri znižanem tlaku odparili, preostanek pa raztopili v EtOAc (30 mL) in najprej spirali z 10 % raztopino citronske kisline (3 × 10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 15 mL), sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc do suhega. Produkt smo očistili s kristalizacijo iz MeOH. Izkoristek reakcije: 31,6 %; svetlo rjavi kristali (0,090 g); tališče: 257-264 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,27; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,93-7,01 (m, 2H, tiazol-H, Ar-H-3), 7,44 (s, 1H, pirol-H), 7,67 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 9,2 Hz, J<sub>2</sub> = 2,6 Hz, Ar-H-4), 8,17 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H-6), 10,17 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CONH ali OH), 10,28 (s, 1H,

$\text{CH}_2\text{CONH}$  ali  $\text{OH}$ ), 12,37 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  52.2, 98.8, 107.8, 110.5, 115.4, 119.5, 123.5, 123.8, 125.8, 129.3, 130.1, 139.5, 145.0, 156.6, 157.7, 166.0, 168.3 ppm, signal za  $\text{CH}_2$  se je prekrival z DMSO- $d_6$ ; IR (ATR)  $\nu$  = 3235, 3129, 2981, 1697, 1651, 1543, 1505, 1441, 1409, 1367, 1288, 1216, 1172, 1116, 1085, 1009, 981, 899, 856, 824, 782, 737, 692  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^-$ ) m/z za  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{SBr}_2$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ): izračunana masa: 554.8973, izmerjena masa: 554.8979, HPLC: metoda A,  $t_r$  = 21.45 min (100% pri 254 nm).

**5-(2-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)-2-hidroksibenzojska kislina **9**.** Spojino **8c** (0,090 g, 0,161 mmol) smo raztopili v MeOH (5 mL) in dodali 1 M NaOH (0,645 mL, 0,644 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. Reakcija ni potekla do konca, zato smo ponovno dodali 1 M NaOH (0,645 mL, 0,644 mmol). Potek reakcije smo ponovno preverili s TLC. Reakcija še vedno ni potekla do konca, zato smo uporabili 2 M raztopino NaOH (0,645 mL) in mešali čez noč. Reakcija je skupno potekala 7 dni. Nato smo pri znižanem tlaku odparili MeOH in ekstrahirali z EtOAc (10 mL). Vodno fazo smo nakisali z 1 M raztopino HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 37,8 %; rjavi kristali (0,033 g); tališče: >300 °C;  $R_f$  (diklorometan/metanol = 20/1): 0,00;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,72 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,93 (d, 1H,  $J$  = 8,8 Hz, Ar-H-3), 7,02 (s, 1H, tiazol-H), 7,43 (d, 1H,  $J$  = 2,8 Hz, pirol-H), 7,70 (dd, 1H,  $J_1$  = 8,8 Hz,  $J_2$  = 2,6 Hz, Ar-H-4), 8,15 (d, 1H,  $J$  = 2,6 Hz, Ar-H-6), 10,22 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$  ali  $\text{OH}$ ), 11,01 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$  ali  $\text{OH}$ ), 12,39 (s, 1H, NH), 13,13 (s, 1H, NH) ppm, signala za COOH se ne vidi v spektru;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  98.8, 107.8, 110.5, 115.4, 119.8, 123.2, 124.0, 125.9, 129.0, 131.2, 139.4, 145.0, 156.6, 157.7, 167.1, 168.2 ppm, signal za  $\text{CH}_2$  se je prekrival z DMSO- $d_6$ ; IR (ATR)  $\nu$  = 3355, 3224, 3129, 2983, 1698, 1651, 1544, 1505, 1442, 1409, 1367, 1291, 1216, 1171, 1116, 1086, 1009, 988, 898, 854, 823, 781, 738, 696  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^-$ ) m/z za  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_5\text{SBr}_2$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ): izračunana masa: 540.8817, izmerjena masa: 540.8824; HPLC: metoda A,  $t_r$  = 20.10 min (95.2% pri 254 nm).

**Etil 2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksilat **11**.** Etil 2-aminotiazol-4-karboksilat (**10**, 0,515 g, 2,991 mmol), spojino **2** (1,107 g, 2,991 mmol) in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,317 g, 2,991 mmol) smo raztopili v DMF (10 mL) in segrevali na oljni kopeli pri 80 °C preko 2 noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Pri znižanem tlaku smo odparili topilo in preostanek raztopili v EtOAc (30 mL). Organsko fazo smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $2 \times 30$  mL), nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \times 30$  mL) in nasičeno

raztopino NaCl ( $1 \times 30$  mL). Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in pri znižanem tlaku odparili topilo. Produkt smo očistili s kristalizacijo iz MeOH. Izkoristek reakcije: 73,2 %; sivkasto beli kristali (0,926 g); tališče: 294–297 °C;  $R_f$  (diklorometan/metanol = 20/1): 0,64;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1,31 (t, 3H,  $J$  = 7,1 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4,30 (q, 2H,  $J$  = 7,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7,47 (s, 1H, tiazol-H), 8,20 (s, 1H, pirol-H), 12,58–13,54 (m, 2H, pirol-NH in NH), ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3243, 2985, 1700, 1655, 1545, 1507, 1442, 1409, 1368, 1293, 1225, 1175, 1115, 1088, 1011, 990, 898, 856, 822, 783, 747, 691  $\text{cm}^{-1}$ .

**2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksilna kislina 12.**

Spojino **11** (0,876 g, 2,070 mmol) smo raztopili v MeOH (25 mL), dodali 1 M NaOH (8,280 ml, 8,280 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko 3 noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. MeOH smo odparili pri znižanem tlaku in vodno fazo ( $\text{pH} > 7$ ) ekstrahirali z EtOAc (15 mL). Vodno fazo smo nato nakisali s 1 M HCl do  $\text{pH} = 1$ . Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 69,1 %; sivkasto beli kristali (0,565 g); tališče: >300 °C;  $R_f$  (diklorometan/metanol = 20/1): 0,00;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,06 (dd, 1H,  $J_1$  = 1,4 Hz,  $J_2$  = 0,7 Hz, tiazol-H), 7,67 (s, 1H, pirol-H) 10,19–14,21 (m, 2H, pirol-NH in NH) ppm, signala za COOH se ne vidi v spektru; IR (ATR)  $\nu$  = 3359, 3233, 3127, 2977, 1697, 1651, 1549, 1503, 1443, 1367, 1293, 1248, 1175, 1115, 1086, 1010, 983, 885, 856, 816, 736  $\text{cm}^{-1}$ .

**Poizkus sinteze metil 3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksamido)benzoata (14, shema 2, postopek c)).** Spojino **12** (0,259 g, 0,656 mmol) smo raztopili v DMF (10 mL) in ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Nato smo dodali EDC (0,151 g, 0,787 mmol), HOBT (0,106 g, 0,787 mmol) in *N,N*-diizopropiletilamin (0,782 g/mL, 0,108 mL, 0,656 mmol). Po 15 minut mešanja na ledeni kopeli smo dodali metil 3-aminobenzoat (**13**, 1 M, 0,656 mL, 0,656 mmol) in naprej mešali pri sobni temperaturi preko 2 noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. DMF smo pri znižanem tlaku odparili in preostanek raztopili v EtOAc (30 mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $3 \times 10$  mL), nato z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 15$  mL) in nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 15$  mL). Organsko fazo smo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in pri znižanem tlaku in odparili EtOAc. Produkt smo čistili s kristalizacijo iz MeOH.

**Ponovni poizkus sinteze metil 3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)tiazol-4-karboksamido)benzoata (14, shema 2, postopek d)).** Spojino **12** (0,256 g, 0,648 mmol) smo raztopili v DMF (10 mL), dodali *N,N*-diizopropiletilamin (0,782 g/mL, 0,214 mL, 1,296 mmol) in HATU (0,295 g, 0,7776 mmol). Po 20 minutah smo dodali

metil 3-aminobenzoat (**13**, 1 M, 0,648 mL, 0,648 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 4 dni. Potek reakcije smo spremljali s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku in preostanek raztopili v EtOAc ( $2 \times 30$  mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $3 \times 10$  mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $2 \times 15$  mL) in nasičeno raztopino NaCl (1x15 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 40:1).

**Metil 2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetat **16**.** 1*H*-indol-2-karboksilno kislino (**15**, 0,421 g, 2,613 mmol) smo raztopili v DMF (15 mL) in ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Nato smo dodali NMM (0,920 g/mL, 0,575 mL, 5,226 mmol), EDC (0,601 g, 3,136 mmol) in HOBr (0,459 g, 3,397 mmol). Po 30 minutah smo dodali spojino **1** (0,450 g, 2,613 mmol) in najprej mešali pri sobni temperaturi 4 dni. Potek reakcije smo spremljali s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku in suh preostanek raztopili v EtOAc (20 mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $2 \times 10$  mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $2 \times 10$  mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Produkt smo čistili s kristalizacijo iz MeOH. Izkoristek reakcije: 26,6 %; rumenkasto beli kristali (0,219 g); tališče: 218-224 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,50; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,06-7,12 (m, 2H, Ar-H in tiazol-H), 7,26 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,2 Hz, J<sub>2</sub> = 7,0 Hz, J<sub>3</sub> = 1,1 Hz, Ar-H), 7,48 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,3 Hz, J<sub>2</sub> = 0,9 Hz, Ar-H), 7,68 (m, 2H, 2xAr-H), 11,90 (s, 1H, indol-NH ali CONH), 12,75 (s, 1H, indol-NH ali CONH) ppm; IR (ATR) ν = 3231, 2973, 1735, 1698, 1653, 1541, 1442, 1407, 1376, 1314, 1289, 1218, 1179, 1090, 1046, 1016, 992, 975, 931, 860, 743, 698 cm<sup>-1</sup>.

**2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)etanojska kislina **17**.** Spojino **16** (0,186 g, 0,590 mmol) smo raztopili v 1,4-dioksanu (10 mL), dodali 2 M NaOH (1,404 mL, 2,952 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Dioksan smo odparili pri znižanem tlaku in preostanek nakisali z 2 M HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odsesavajem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 98,3 %; rumenkasto beli kristali (0,175 g); tališče: 244-247 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,00; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,04 (s, 1H, tiazol-H), 7,09 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,1 Hz, J<sub>2</sub> = 7,0 Hz, J<sub>3</sub> = 1,0 Hz, Ar-H), 7,26 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,1 Hz, J<sub>2</sub> = 7,0 Hz, J<sub>3</sub> = 1,0 Hz, Ar-H), 7,48 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,3 Hz, J<sub>2</sub> = 0,8 Hz, Ar-H), 7,67 (t, 2H, J<sub>1</sub> = 5,5 Hz, 2xAr-H), 11,92 (s, 1H, indol-NH ali CONH), 12,92-12,51 (m, 1H, indol-NH ali CONH)

ppm, signala za COOH se ne vidi v spektru; IR (ATR)  $\nu$  = 3261, 1718, 1656, 1604, 1535, 1442, 1412, 1377, 1318, 1283, 1225, 1175, 1145, 979, 861, 809, 779, 731, 668 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 3-(2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)benzoat 18.**

Spojino **17** (0,150 g, 0,498 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in dodali NMM (0,920 g/mL, 0,110 mL, 0,997 mmol), EDC (0,115 g, 0,598 mmol) ter HOBr (0,088 g, 0,648 mmol). Po 30 minutah smo dodali spojino **13** (0,075 g, 0,498 mmol) in najprej mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku in suh preostanek raztopili v EtOAc (20 mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 10 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Izkoristek reakcije: 80,6 %; beli kristali (0,174 g); tališče: 279-280 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,22; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,08 (m, 2H, tiazol-H in Ar-H), 7,26 (m, 1H, Ar-H), 7,48 (t, 2H, J = 7,8 Hz, 2xAr-H), 7,72-7,60 (m, 3H, 3xAr-H), 7,85-7,94 (m, 1H, Ar-H), 8,33 (d, 1H, J = 1,6 Hz, Ar-H), 10,49 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CONH), 11,90 (s, 1H, NH), 12,62-12,81 (m, 1H, NH) ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3304, 3214, 3130, 2984, 1700, 1649, 1538, 1442, 1410, 1366, 1293, 1219, 1173, 1114, 1082, 1010, 987, 887, 854, 816, 782, 752, 738, 684 cm<sup>-1</sup>.

**3-(2-(2-(1*H*-indol-2-karboksamido)tiazol-4-il)acetamido)benzojska kislina 19.**

Spojino **18** (0,129 g, 0,297 mmol) smo raztopili v MeOH (10 mL), dodali 2 M NaOH (0,743 mL, 1,486 mmol) in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Reakcija ni potekla do konca, zato smo ponovno dodali 2 M NaOH (0,743 mL, 1,486 mmol) in mešal še dodatne 3 dni. MeOH smo pri znižanem tlaku odparili in preostanek nakisali z 2 M HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 91,2 %; rjavi kristali (0,114 g); tališče: >300 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,00; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,08 (m, 2H, tiazol-H in Ar-H), 7,26 (m, 1H, Ar-H), 7,48 (t, 2H, J = 7,8 Hz, 2xAr-H), 7,72-7,60 (m, 3H, 3xAr-H), 7,85-7,94 (m, 1H, Ar-H), 8,33 (d, 1H, J = 1,6 Hz, Ar-H), 10,49 (s, 1H, CH<sub>2</sub>CONH), 11,90 (s, 1H, NH), 12,62-12,81 (m, 1H, NH) ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3355, 3225, 3128, 2981, 1698, 1651, 1543, 1510, 1441, 1410, 1370, 1293, 1219, 1175, 1115, 1089, 1011, 991, 856, 824, 783, 739 cm<sup>-1</sup>.

**2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-on 22.** 1*H*-pirol (**20**, 0,967 g/mL, 10,0 mL, 0,144 mol) smo raztopili v THF (100 mL) in ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Dodali smo

trietilamin (0,726 g/mL, 24,1 mL, 0,173 mol) in v roku 30 minut počasi po kapljicah dodajali 2,2,2-trikloroacetil klorid (**21**, 1,620 g/mL, 19,8 mL, 0,176 mol). Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 1,5 h po dodatku celotne količine spojine **21** smo reakcijo prekinili z dodatkom natrijevega hidrogenkarbonata. Nato smo topilo odparili pri znižanem tlaku, preostanek pa raztopili v EtOAc (100 mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline ( $1 \times 50$  mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $2 \times 50$  mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 50$  mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Produkt smo očistili s kristalizacijo iz heksana. Izkoristek reakcije: 34,9 %; sivi kristali (10,7 g); tališče: 71-75 °C; R<sub>f</sub> (heksan/etil acetat = 4/1): 0,38; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,37 (dd, J<sub>1</sub> = 4,1 Hz, J<sub>2</sub> = 2,5 Hz, Ar-H), 7,17 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,1 Hz, J<sub>2</sub> = 2,5 Hz, J<sub>3</sub> = 1,3 Hz, Ar-H), 9,7 (s, 1H, pirol-NH) ppm; IR (ATR) ν = 3260, 1652, 1605, 1533, 1490, 1442, 1377, 1318, 1281, 1225, 1171, 1137, 1110, 1062, 1035, 980, 929, 858, 806, 730, 685 cm<sup>-1</sup>.

**2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on **2**.** Spojino 22 (5,076 g, 0,0239 mol) smo raztopili v CHCl<sub>3</sub> (70 mL), ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in počasi po kapljicah dodajali Br<sub>2</sub> (3,119 g/mL, 2,57 mL, 0,05017 mol) predhodno raztopljen v CHCl<sub>3</sub> (30 mL). Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 2,5 urah po dodatku celotne količine Br<sub>2</sub> smo reakcijo ustavili, tako da smo raztopino CHCl<sub>3</sub> ekstrahirali z 10 % NaHSO<sub>3</sub> ( $2 \times 30$  mL). Ekstrakcijo smo nadaljevali še z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> ( $1 \times 50$  mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl ( $1 \times 50$  mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili CHCl<sub>3</sub>. Izkoristek reakcije: 95,4 %; sivi kristali (8,44 g); tališče: 131-139 °C; R<sub>f</sub> (heksan/etil acetat = 4/1): 0,48; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,41 (d, J = 2,5 Hz, 1H, pirol-H), 13,76 (s, 1H, NH) ppm; IR (ATR) ν = 3231, 2973, 1735, 1652, 1538, 1442, 1406, 1376, 1316, 1291, 1215, 1177, 1090, 1046, 1015, 991, 976, 857, 743, 699 cm<sup>-1</sup>.

**(R)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamin **24**.** Racemat 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diamina (**23**, 11,377 g, 0,0673 mol) smo suspendirali v absolutnem etanolu (125 mL), dodali D-vinsko kislino (10,104 g, 0,0673 mol) in refluktirali 4,5 ure pri 90 °C. Reakcijsko zmes smo preko noči ohladili na sobno temperaturo. Naslednji dan smo izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Oborino smo prenesli v bučko in izvedli kristalizacijo iz destilirane vode. Pri ohlajanju je izpadla bela oborina (*R*)-soli spojine **24** z vinsko kislino, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Matičnico (EtOH) smo prelili v bučko in jo uparili pod znižanim tlakom.

Zaostanku smo dodali destilirano vodo (10 mL) in nakisali s toliko 37 % koncentrirane HCl, da se je vse raztopilo. Nato smo naalkalili z 2 M NaOH do pH = 13. Izpadla je oborina (*S*) enantiomera, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem, posušili v sušilniku in prekristalizirali iz destilirane vode. Oborino *R* enantiomera smo prenesli v bučko in jo nakisali s toliko 37 % koncentrirane HCl, da se je vse raztopilo. Nato smo z 2 M NaOH naalkalili do pH = 13. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Izkoristek reakcije: 79,6 %; beli kristali (4,526 g);  $[\alpha]_D +93.4$  (c 1, MeOH); tališče: 241-244 °C; IR (ATR)  $\nu$  = 3257, 1654, 1604, 1532, 1441, 1412, 1376, 1319, 1279, 1226, 1170, 979, 860, 774, 731, 686.

**Terc-butil (*R*)-(2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat 25.**

Spojino 24 (1,000 g, 0,00592 mol) smo raztopili v THF (50 mL), ohladili na ledeni kopeli na 0 °C ter počasi po kapljicah dodajali Boc<sub>2</sub>O (1,291 g, 0,00592 mol) predhodno raztopljen v THF (30 mL). Reakcija je potekala na ledeni kopeli preko noči. Potek smo spremljali s TLC. Izkoristek reakcije: 108,4 %; beli kristali (1,727 g);  $[\alpha]_D +39.7$  (c 0.24, MeOH); tališče: 153-157 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,17; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,54-1,65 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,80-1,86 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,31-2,47 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 2,68 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 14,8 Hz, J<sub>2</sub> = 5,5 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3,57-3,69 (m, 1H, CH<sub>NH</sub>), 6,64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,94 (d, 1H, J = 7,9 Hz, NH) ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3361, 3122, 2976, 2934, 1684, 1514, 1443, 1367, 1307, 1251, 1228, 1171, 1090, 1047, 993, 975, 866, 827, 744 cm<sup>-1</sup>.

**Terc-butil (*R*)-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)karbamat 26.** Spojino 25 (1,00 g, 3,716 mmol), spojino 2 (1,65 g, 4,459 mmol) in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,394 g, 3,716 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (20 ml) in segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 90 °C preko noči. Potek reakcije smo preverili s TLC. DMF smo odparili pri znižanem tlaku, preostanek pa raztopili v EtOAc (30 mL). Najprej smo spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 30 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL). Pri ekstrakciji je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili EtOAc. Izkoristek reakcije: 33,4 %; rjavkasto beli kristali (0,645 g);  $[\alpha]_D +35.2$  (c 0.23, MeOH); tališče: 174-180 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,34; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1,40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,67-1,77 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 1,90-1,99 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2,55-2,76 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 2,91 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15,7 Hz, J<sub>2</sub> = 4,4 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3,69-3,79 (m, 1H, CH<sub>NH</sub>), 7,03 (d, J = 7,9 Hz, CH<sub>NH</sub>), 7,38 (s, 1H, pirol-H), 12,21 (s, 1H, NH), 13,11 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  24,5, 28,2 (3C), 28,4, 28,8, 46,5, 77,7, 98,7,

107.6, 115.1, 119.7, 123.3, 125.97, 126.01, 154.7, 160.2 ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3227, 2973, 1735, 1655, 1541, 1442, 1406, 1377, 1315, 1291, 1215, 1178, 1090, 1046, 1015, 992, 975, 858, 744  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^+$ ) m/z za C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H] $^+$ ): izračunana masa: 516.9545, izmerjena masa: 516.9540.

**(R)-2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-amonijev klorid 27.** V bučko smo nalili 15 mL MeOH, jo ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in počasi po kapljicah dodajali acetil klorid (1,10 g/mL, 0,82 mL, 11,5 mmol). Pri tem se je sprostil plinast HCl. Počakali smo 30 minut, da je reakcija potekla do konca. Nato smo spojino **26** (0,600 g, 1,15 mmol) raztopili v MeOH (10 mL) in jo počasi po kapljicah dodajali k raztopini MeOH, metil acetata (estra, ki nastane pri reakciji) in HCl. Reakcijo smo pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Matičnico smo odparili pri znižanem tlaku. Izkoristek reakcije: 99,8 %; rumenkasto zeleni kristali (0,526 g);  $[\alpha]_D +58.7$  (c 0.21, MeOH); tališče: >300 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,00; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.86-1.96 (m, 1H, H<sub>A</sub>-7), 2.09-2.18 (m, 1H, H<sub>B</sub>-7), 2.71-2.80 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 3.10 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15.7 Hz, J<sub>2</sub> = 5.0 Hz, H<sub>B</sub>-4), 3.51-3.54 (m, 1H, CHNH), 7.41 (s, 1H, pirol-H), 8.23 (s, 3H, NH<sub>3</sub> $^+$ ), 12.29 (s, 1H, NH), 13.13 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  23.5, 26.4, 26.6, 46.4, 98.8, 107.7, 115.4, 117.8, 124.3, 125.9, 143.2, 156.2 ppm; IR (ATR)  $\nu$  = 3355, 3312, 3226, 3127, 2980, 1697, 1651, 1547, 1508, 1436, 1409, 1375, 1292, 1219, 1175, 1115, 1089, 1010, 979, 855, 825, 781, 736, 704  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (ESI $^+$ ) m/z za C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>OSBr<sub>2</sub> ([M-H] $^+$ ): izračunana masa: 416.9020, izmerjena masa: 416.9030.

**Etil (R)-2-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazol-6-il)amino)-2-oksoacetat 28.** Spojino **27** (0,150 g, 0,329 mmol) smo raztopili v piridinu (2 mL) in DKM (6 mL) ter ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Nato smo počasi po kapljicah dodajali etil 2-kloro-2-oksoacetat (0,044 mL, 0,394 mmol) in naprej mešali pri sobni temperaturi preko noči. Reakcijo smo spremljali s TLC. Nato smo dodali še malo DKM in spirali z 10 % raztopino citronske kisline (4 × 30 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 30 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili DKM. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 40:1). Izkoristek reakcije: 12,3 %; rumenkasto rjavi kristali (0,021 g);  $[\alpha]_D +20.1$  (c 0.12, MeOH); tališče: 161-171 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 20/1): 0,67; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-

*d<sub>6</sub>): δ 1.28 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.85-1.99 (m, 2H, H-7), 2.67-2.76 (m, 3H, H<sub>A</sub>-4, H-5), 2.93 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.9 Hz, H<sub>B</sub>-4), 4.04-4.14 (m, 1H, CH<sub>NH</sub>), 4.25 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.41 (s, 1H, pirol-H), 9.04 (d, 1H, J = 8.1 Hz, CONHCH), 12.23 (s, 1H, NH), 13.12 (s, 1H, NH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.8, 24.5, 27.5, 28.0, 45.7, 62.0, 98.8, 107.7, 115.2, 119.5, 130.8, 131.5, 141.0, 155.8, 156.9, 160.9 ppm; IR (ATR) ν = 3356, 3226, 2936, 1735, 1696, 1651, 1538, 1442, 1407, 1376, 1315, 1290, 1214, 1177, 1091, 1014, 992, 976, 858, 826, 742 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 516.9181, izmerjena masa: 516.9186; HPLC: metoda B, t<sub>r</sub> = 12.90 min (95.3% pri 254 nm).*

**(R)-2-((2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-2-oksoetanojske kisline **29**.**

Spojino **28** (0,010 g, 0,019 mmol) smo raztopili v MeOH (0,5 mL) in dodali 2 M NaOH (0,018 mL, 0,036 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi preko noči. Nato smo odparili MeOH, preostalo vodno raztopino pa nakisali z 1 M HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z majhno količino etra in sušili pri 70 °C do konstantne mase. Izkoristek reakcije: 84,2 % (0,008 g); [α]<sub>D</sub> +47.7 (*c* 0.20, MeOH); tališče: 240-242 °C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol = 9/1): 0,56; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,89-1,97 (m, 2H, H-7), 2,44-2,47 (m, 1H, H-4/H-5), 2,70-2,78 (m, 2H, H-4/H-5), 2,92 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 15,4 Hz, J<sub>2</sub> = 5,2 Hz, H<sub>B</sub>-4), 4,03-4,12 (m, 1H, CH<sub>NH</sub>), 7,40 (s, 1H, pirol-H), 8,94 (d, 1H, J = 8,2 Hz, CONHCH), 12,24 (s, 1H, NH), 13,10 (s, 1H, NH) ppm. HRMS (ESI<sup>-</sup>) m/z za C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SBr<sub>2</sub> ([M-H]<sup>-</sup>): izračunana masa: 488.8868, izmerjena masa: 488.8872; HPLC: metoda B, t<sub>r</sub> = 11.744 min (100% pri 254 nm).

**Poizkus sinteze Metil (R)-3-((2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-6-il)amino)-3-oksopropanoata **30**.** Spojino **27** (0,150 g, 0,329 mmol) smo raztopili v piridinu (0,200 mL) in DKM (4 mL) ter ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. Nato smo počasi po kapljicah dodajali metil 3-kloro-3-oksopropanoat (0,042 mL, 0,394 mmol) in naprej mešali pri sobni temperaturi preko noči. Reakcijo smo spremljali s TLC. Nato smo dodali še malo DKM in spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 × 20 mL), nato z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 mL) in na koncu še z nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in pri znižanem tlaku odparili DKM. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 40:1).

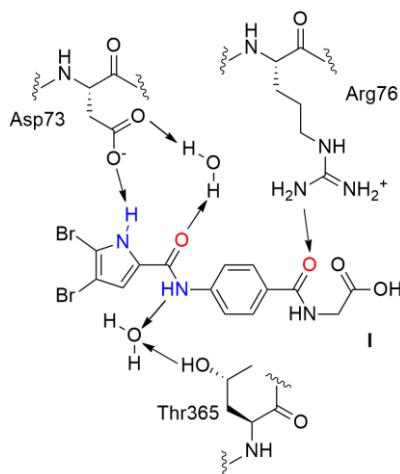
## 5. Rezultati in razprava

Morski ekosistem predstavlja bogat vir kemijsko in funkcijsko različnih molekul, ki jih organizmi uporabljajo za lovjenje plena ali za obrambo pred plenilci, sami pa jih lahko uporabimo za odkrivanje in razvijanje učinkovin. Spužve lahko proizvedejo številne metabolite z visokim potencialom protimikrobnega delovanja. Prav iz morskih organizmov so do sedaj izolirali nekatere najmočnejše bioaktivne snovi. Ker pa so koncentracije teh spojin v morskih organizmih običajno nizke, naravni viri ne zagotavljajo dovolj materiala za izolacijo in podrobno biološko analizo, zato je potrebna sinteza naravnih spojin za raziskovanje načina delovanja in njihove biološke uporabnosti. Problem naravnih spojin predstavlja tudi velika molekulska masa, veliko število kiralnih centrov in kompleksne 3D strukture, ki predstavljajo problem pri razvoju učinkovin [21].

Iz spužve rodu *Agelas* so izolirali alkaloida klatrodin in oroidin, ki spadata med pirol-2-aminoimidazole. Začetne raziskave so pokazale, da klatrodin ni imel skoraj nobene protimikrobnne aktivnosti. Drugače pa je bilo pri njegovem dibromo analogu oroidinu, ki je izkazoval zaviralno aktivnost rasti G+ bakterij kot sta *S. aureus* in *E. faecalis*, ni pa izkazoval aktivnosti na G- bakterije. V primerjavi z mnogimi drugimi pirol-2-aminoimidazoli so strukture oroidinskega razreda alkaloidov relativno enostavne in so zato primerni kandidati za optimizacijo. Zaradi svoje relativno nizke molekulske mase in enostavne strukture oroidin ponuja več možnosti za kemijsko optimizacijo z uvedbo dodatnih stranskih verig ali funkcionalnih skupinah. Razvili so številne analoge z izboljšanim spektrom delovanja in boljšo vrednostjo MIC<sub>90</sub>, ki je pri nekaterih spojinah znašala 12,5 µM pri G+ bakterijah in 50 µM pri G-. Čeprav se je pojavila tudi citotoksičnost v sesalskih celicah, ta raziskava ponuja številne informacije za nadaljnjo optimizacijo do bolj selektivnih spojin [21].

Pred kratkim so zasnovali več struktturnih razredov analogov morskih alkaloidov, ki temeljijo na klatrodinu, himenidinu in oroidinu, ki so jih izolirali iz spužev rodu *Agelas*. Določili so njihov vpliv na napetostno odvisne natrijeve kanale, inhibicijo tvorbe bakterijskih biofilmov, protimikroben delovanje in proapoptozno delovanje v HepG2 in THP-1 celicah. Zaradi podobnosti oroidina in njegovih analogov z znanimi pirolamidnimi zaviralci DNA-giraze so preverili njihovo aktivnost na DNA-girazi iz *E. coli*. Optimizacija spojin in razvoj novih 4,5-dibromopirolamidnih derivatov je privedla do močnih zaviralcev DNA-giraze z vrednostmi IC<sub>50</sub> v nizkem nanomolarnem območju. Slabost teh spojin pa je še vedno predstavljalo šibko protibakterijsko delovanje. S pomočjo rentgenske strukture so

ugotovili, da pirolni del zasede enako ATP vezavno mesto v *E. coli* GyrB kot velja za druge pirolamidne zaviralce, kot so naravnii antibiotik klorobiocin in drugi sintezni zaviralci [24].



**Slika 5:** Shematska predstavitev vodikovih vezi med zaviralcem I in vezavnim mestom za ATP v DNA-girazi iz *E. coli* [prirejeno po 24].

Rentgenska kristalna struktura 4,5-dibromopirolamidnega zaviralca I v ATP vezavnem mestu *E. coli* GyrB prikazuje tri vodikove vezi, ki nastanejo med encimom in pirolamidno skupino zaviralca (Slika 5). Ena vodikova vez nastane med pirolno NH skupino in Asp73. Druga nastane med sosednjo karbonilno skupino in strukturno vezano molekulo vode, ki je v kontaktu z Asp73. S takšnim načinom vezave zaviralci GyrB posnemajo vezavo adeninskega obroča molekule ATP. NH skupina amida tvori vodikovo vez z vodo, ki je povezana s stransko verigo Thr365. Prisotne so tudi hidrofobne interakcije med dibromopirolno strukturo in encimom, ki so pomembne za močno zaviranje DNA-giraze iz *E. coli*. Z nadaljnji raziskovanjem povezave med strukturo in delovanjem 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol-2,6-diaminskega derivata so sintetizirali spojine, pri katerih je 4,5-dibromopirolkarbonilni del vezan na amino skupino na mestu 2 namesto na mestu 6. Nato so uvedli dodatne substituente na 6-amino skupini z namenom ciljanja stranske verige Arg76/Arg136 [24].

## 5.1. Komentar sinteznih postopkov

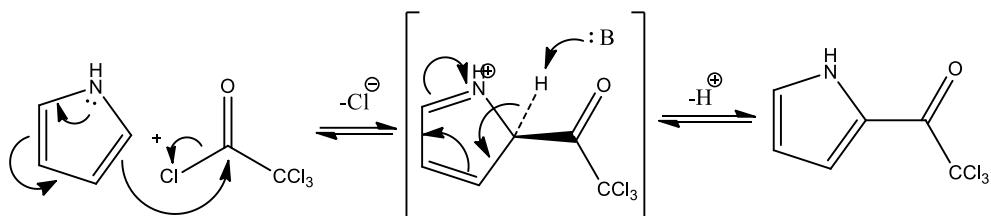
### 5.1.1. Sintesa vmesnih spojin

V prvih stopnjah smo morali pripraviti iz osnovnih spojin vmesne spojine **4**, **12** in **27**, na katere smo pripenjali različne fragmente, zato smo jih pripravili v večjih količinah.

#### 5.1.1.1. Elektrofilna aromatska substitucija

Pri prvi stopnji je potekla elektrofilna aromatska substitucija, kjer smo na pirolni obroč na mestu 2 pripeli trikloroacetilno skupino (Slika 6). Elektrofilna aromatska

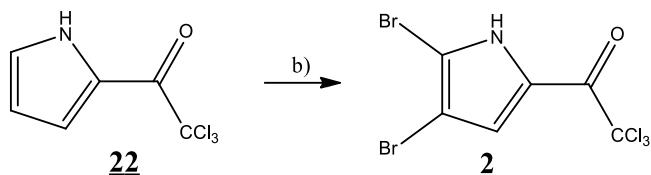
substitucija je organska reakcija, pri kateri se atom, ki je vezan na aromatski sistem (običajno vodik), zamenja z elektrofilom. Mehanizem poteka po dveh stopnjah. V prvi stopnji elektronosko bogat aromatski obroč napade elektrofil, ki je v našem primeru trikloroacetilklorid raztopljen v tetrahidrofuranu. To vodi do adicije elektrofila na obroč in nastanka pozitivno nabitega intermediata, imenovanega  $\sigma$ -kompleks, ki je resonančno stabiliziran. V naslednji stopnji baza, v našem primeru trietilamin, donira elektrone vodikovemu atomu v točki elektrofilnega napada in tako eliminira vodikov atom iz obroča, kar sistemu povrne aromatičnost. Amin hkrati služi nevtralizaciji nastajajoče HCl. Reakcijo smo zaustavili z dodatkom NaHCO<sub>3</sub>, ki je hidroliziral nezreagiran del trikloroacetilklorida, hkrati pa je nevtraliziral nastajajočo HCl. Pri teh reakcijah zaradi največje stabilnosti protoniranega intermediata pirol na splošno reagira z elektrofilom na mestu  $\alpha$  (C2 ali C5). Reakcija je eksotermna, zato jo izvajamo na ledeni kopeli [25,26,27].



**Slika 6:** Potek elektrofilne aromatske substitucije trikloroacetilne skupine na pirolni obroč (prirejeno po [26]).

#### 5.1.1.2. Bromiranje

Sledilo je bromiranje spojine **22**, ki tudi poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije (Shema 5). Pirol reagira s halogenidi tako zlahka, da če ne uporabimo kontroliranih pogojev, bi nastal tetrahalogeniran pirol. Čeprav je reakcija zaradi reaktivnosti Br<sub>2</sub> manj eksotermna kot reakcija s Cl<sub>2</sub>, smo jo še vedno izvajali na ledeni kopeli. Na ta način smo reakcijo vodili predvsem v nastanek dibromiranega produkta. Bromiranje z dvema ekvivalentoma Br<sub>2</sub> je poteklo na mestih 4 in 5, saj je trikloroacetilna skupina na mestu 2 deaktivirala mesto 3. Spojino **22** smo raztopili v CHCl<sub>3</sub>, raztopino v bučki postavili na ledeno kopel in po kapljicah dodajali Br<sub>2</sub> raztopljen v CHCl<sub>3</sub>. Po porabi celotne količine Br<sub>2</sub> smo reakcijo ustavili tako, da smo reakcijsko zmes sprali z NaHSO<sub>3</sub>. Natrijev bisulfit deluje kot reducent, ki zreagira s prebitno količino Br<sub>2</sub>, ki je oksidant. Poteče redoks reakcija, pri čemer nastaneta Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in NaBr. Spojino smo še očistili z ekstrakcijo z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in nasičeno raztopino NaCl, organsko fazo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter pri znižanem tlaku odparili CHCl<sub>3</sub> [25,26].

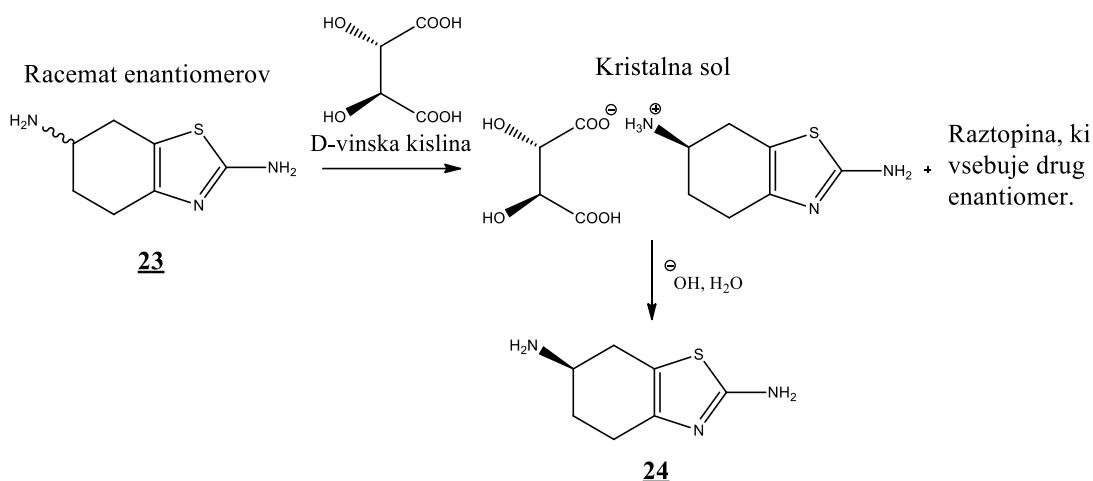


**Shema 5:** Bromiranje pirola. Reagenti in pogoji: b) Br<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, NaHSO<sub>3</sub>, 0 °C.

#### **5.1.1.3. Kiralna resolucija**

Spojina **23** je racemat, zato smo jo morali pred naslednjimi stopnjami sinteze ločiti na enantiomera. Uporabili smo kiralno resolucijo, ki je postopek ločevanja racemnih spojin na njihove enantiomere. Spojini, ki sta enantiomera, imata enako vrednišče, lomni količnik, reaktivnost, tališče in topnost, zato ju je težko ločiti med seboj. Eden od načinov je, da enantiomera kemijsko pretvorimo v diastereomera, ki imata drugačne lastnosti, zato ju lahko ločimo s konvencionalnimi ločitvenimi tehnikami, kot sta kromatografija in kristalizacija [28,29].

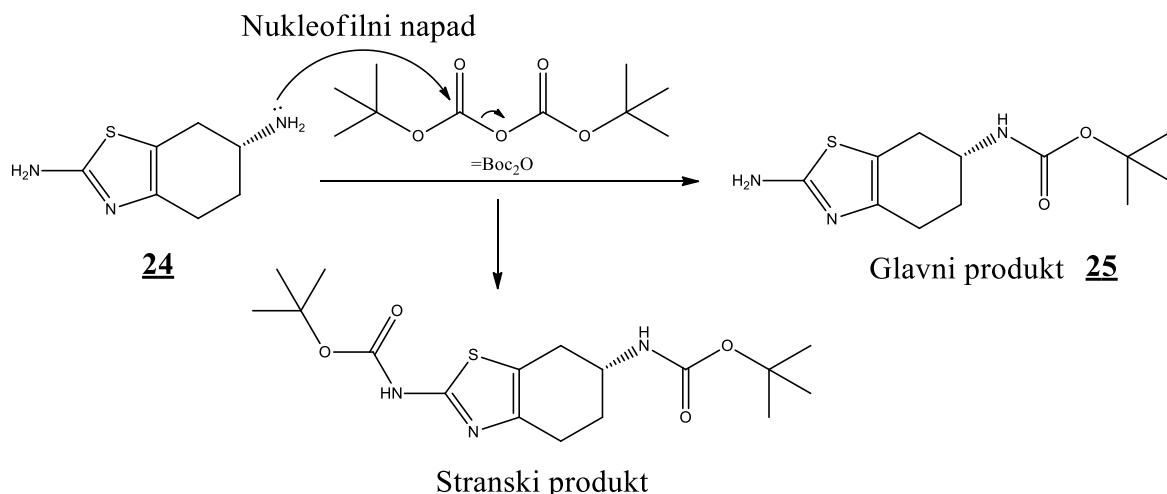
V našem primeru smo *R* in *S* enantiomer amina **23** z D-vinsko kislino pretvorili v diastereomerno sol (Slika 7). Racemno zmes smo raztopili v etanolu, dodali D-vinsko kislino in 4,5 h refluktirali, nato pa zmes ohljali preko noči. Nastala diastereomera sta se razlikovala v topnosti v etanolu, zato je eden od diastereomerov kristaliziral, drug pa je ostal topen v matičnici. Spojini smo ločili s filtracijo z odsesavanjem in ju posušili v sušilniku. Oborino smo očistili s kristalizacijo iz destilirane vode, iz katere je izkristalizirala *R* sol amina **23**. Sol smo raztopili v 37% HCl in raztopino nato naalkalili do pH = 13 z NaOH. Pri tem je izpadla čista spojina *R* izomera (neprotoniran amin), ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku. Matičnico (EtOH) smo pri znižanem tlaku odparili, zaostanek smo raztopili v 37% raztopini HCl in naalkalili do pH = 13 z NaOH. Pri tem je kristaliziral čisti *S* enantiomer, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku.



Slika 7: Potek kiralne resolucije (prirejeno po [28]).

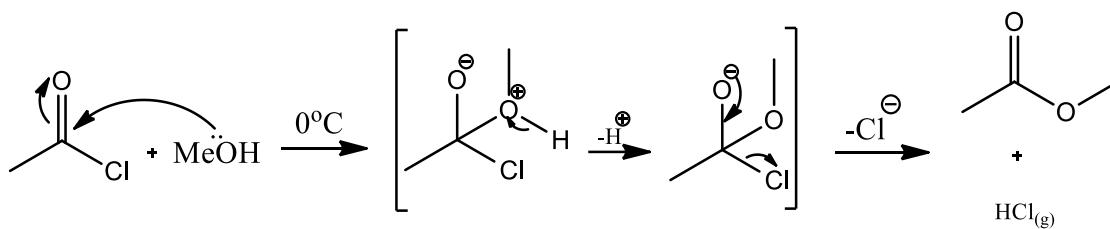
## 5.1.1.4. Zaščita aminske skupine na mestu 6

Za pripravo vmesnega produkta **26** je bilo potrebno uvesti zaščitno skupino na mestu 6 spojine **24** (Slika 8). Zaradi poteka nadaljnjih sinteznih stopenj smo se odločili uporabiti zaščito v obliki *terc*-butilkarbamata (Boc). Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Prednost te zaščitne skupine je, da se odstranjuje pri milejših pogojih z acidolizo in da se zaščitna skupina ne bo odstranila ob prisotnosti baze, ki smo jo uporabili v nadaljnjih sinteznih postopkih. Selektivnost reakcije smo dosegli s počasnim dokapavanjem  $\text{Boc}_2\text{O}$  (*di-terc*-butil dikarbonat) v raztopino diamina in z nizko temperaturo ( $0^\circ\text{C}$ ). Pri selektivnosti pa nam pomaga tudi struktura molekule, saj je aromatska amino skupina na mestu 2 zaradi elektron privlačnega aromatskega obroča slabši nukleofil kot pa alifatska amino skupina na mestu 6, zato bo zaščita selektivno potekla na mestu 6 [27,28].

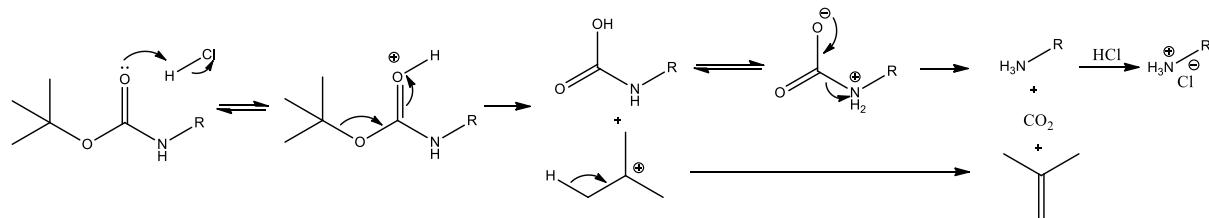
Slika 8: Potek zaščite z  $\text{Boc}_2\text{O}$  zaščitnim reagentom in možen nastanek stranskega produkta (prirejeno po [27,28]).

### 5.1.1.5. Odstranitev Boc zaščitne skupine

Zaščitno skupino Boc smo odstranili z amina z acidolizo z uporabo HCl, ki smo jo generirali *in situ* pri reakciji med acetilkloridom in metanolom (Slika 9). Potekala je reakcija po mehanizmu nukleofilne substitucije, ki poteče preko nestabilnega tetraedričnega intermediata (Slika 10). Kloridni anion kot dobra izstopajoča skupina ima pomembno vlogo, saj poveča reaktivnost kislinskega derivata. Pri tem nastaneta plinasti HCl in metilacetat. Bučko z metanolom smo postavili na ledeno kopel in počasi po kapljicah dodajali acetil klorid. Pri tem se je razvil plinast HCl, ki je po dodatku metanolne raztopine spojine **26** povzročil acidolizo zaščitne skupine. Pri reakciji je nastala sol, saj je HCl reagiral z aminom, ki je nastal pri odstranitvi zaščitne skupine [27,28].



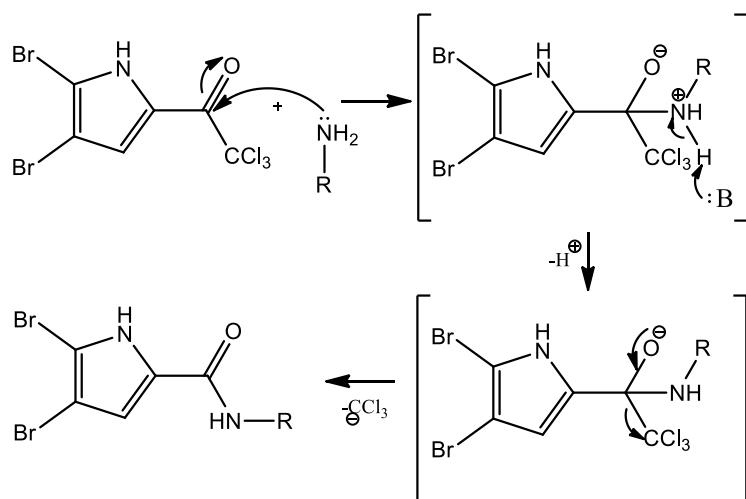
**Slika 9:** *In situ* nastanek plinastega vodikovega klorida med acetilkloridom in metanolom (prirejeno po [25]).



**Slika 10:** Potek odstranitve zaščitne skupine Boc z acidolizo (prirejeno po [28]).

### 5.1.1.6. Sintesa amida z aktivirano kislino

Tvorba naše vmesne spojine **3** iz spojin **1** in **2** je potekla s standardnim sinteznim postopkom nukleofilne substitucije, ki poteče preko nestabilnega tetraedričnega intermediata (Slika 11). V DMF smo raztopili spojini **1** in **2**, dodali Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in segrevali pri 80 °C. Tvorba amidne vezi običajno poteka med karboksilno kislino in aminom, vendar je pri sobnih pogojih to nemogoče, saj pri mešanju amina in kisline nastajajo soli. Direktna kondenzacija med aminom in karboksilno kislino lahko poteče, vendar eliminacija vode poteka le pri visokih temperaturah (>200 °C). Temu se izognemo z aktiviranjem kisline tako, da OH skupino karboksilne skupine zamenjamo z dobro izstopajočo skupino, kot je triklorometilna skupina, ki je primerna za reakcije s primarnimi amini. Takšen način sinteze amida smo uporabili samo pri vmesnih spojinah **3**, **11** in **26**, saj so aktivirane kisline zelo reaktivne in niso primerne pri reakcijah, pri katerih nastopa več nukleofilov hkrati [30].



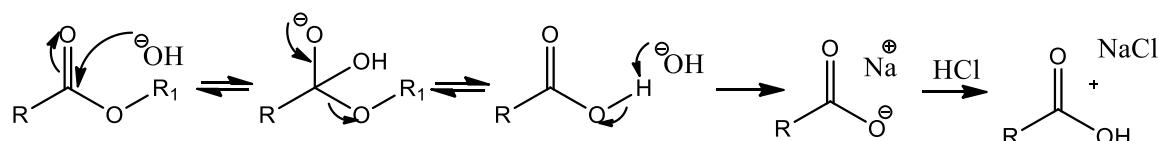
**Slika 11:** Potek sinteze amida med aktivirano kislino in aminom (prirejeno po [30]).

#### 5.1.1.7. Hidroliza estra

Hidroliza estra je kemijska reakcija, pri kateri se pod vplivom vode esterska vez razcepi do karboksilne kisline in alkohola. Kislinsko katalizirano estrenje in hidroliza estrov sta reakciji, ki potekata na enak način, vendar v nasprotni smeri, zato sta reverzibilni. Reakcija hidrolize lahko poteka tudi po drugih mehanizmih. Poleg hidrolize v kislem lahko le-ta poteče tudi v alkalnem mediju. Prav zaradi reverzibilnosti hidrolize, ki jo katalizirajo kisline, se raje poslužujemo alkalne hidrolize estrov, ki je ireverzibilna, saj nastane sol karboksilne kisline [25,28,31].

V bazičnih pogojih iz karboksilne kisline in alkohola ne moremo pridobiti estra, saj baza disociira karboksilno kislino, ki postane nukleofilna in ne elektrofilna kot je potrebno za reakcijo. Lahko pa hidroliziramo ester v bazičnih pogojih, kjer namesto vode vlogo nukleofila opravlja hidroksilni anion ( $\text{OH}^-$ ) (Slika 12). Tetraedrični intermediat lahko preide nazaj v ester ali pa razpade na alkohol in kislino. Šele odcep protona kisline s strani baze premakne ravnotežje v smer hidrolize estra, saj soli karboksilnih kislin po navadi ne morejo reagirati z nukleofili, tudi s takšnimi, ki so močnejši nukleofili od alkoholov [28].

Hidrolizo smo morali izvesti pri pripravi vmesnih produktov **4** in **12** ter pri nekaterih končnih produktih. Postopek je potekal tako, da smo ester raztopili v metanolu, dodali smo vodno raztopino NaOH ter pustili mešati nekaj časa. Po končani hidrolizi smo dobili alkohol in sol karboksilne kisline. Alkohol smo uparili pod znižanim tlakom in nato zaostalo alkalno vodno fazo ekstrahirali z etilacetatom ter se tako znebili nečistot. Vodno fazo smo nato nakisali z 2 M HCl do  $\text{pH} = 1$ . Pri tem je izpadla oborina, ki je bila naš produkt. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in posušili v sušilniku.



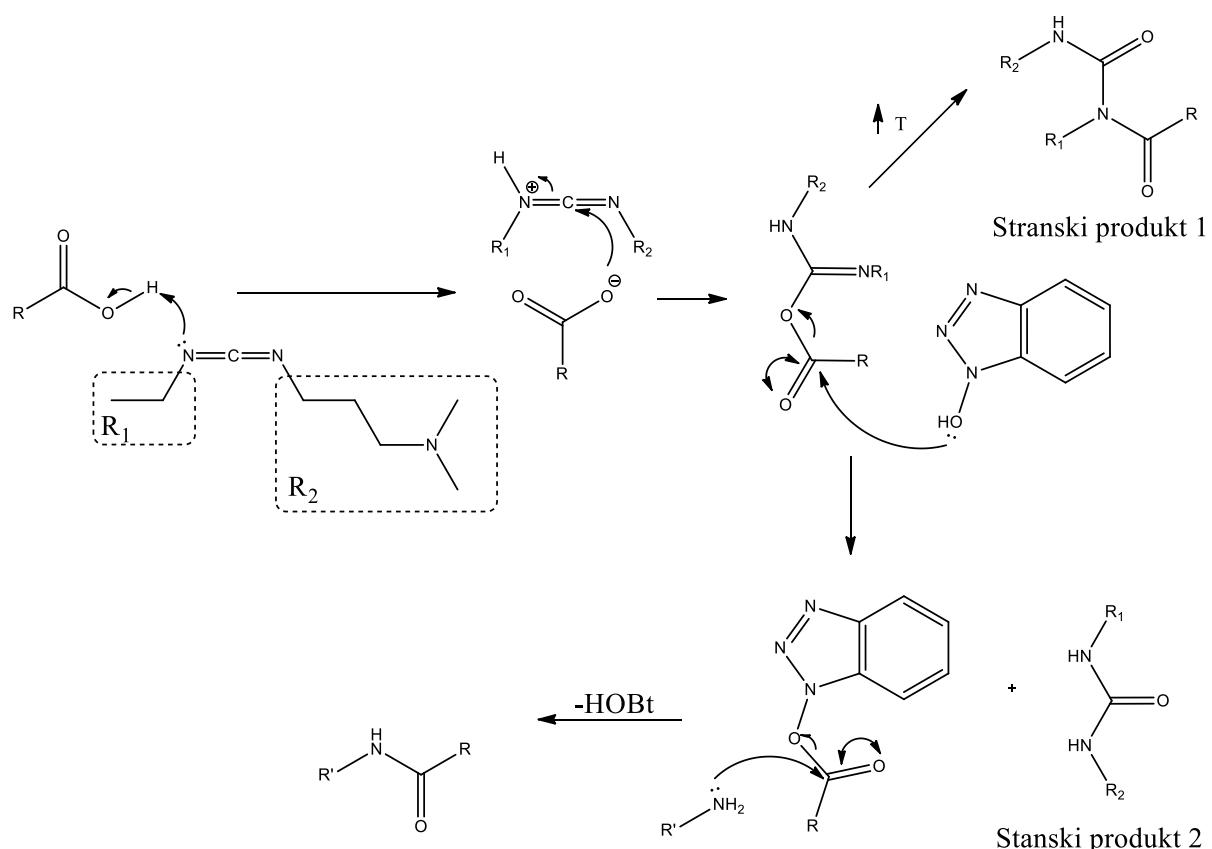
Slika 12: Potek alkalne hidrolize estrov (prirejeno po [26]).

### 5.1.2. Sinteza končnih produktov

#### 5.1.2.1. Reakcije s sklopitvenimi reagenti

Že prej omenjena reakcija sinteze amida med karboksilno kislino in aminom pri normalnih pogojih težko poteče, zato aktiviramo enega od reaktantov, običajno karboksilno kislino. To lahko storimo tudi s sklopitvenimi reagenti (angl. coupling reagents). Reakcija poteka v dveh korakih, in sicer v prvi stopnji poteče aktivacija karboksilne kisline tako, da nastane aktivirani ester. V drugi stopnji nato nastopi nukleofilni napad  $\text{NH}_2$  skupine na aktivirano karboksilno kislino, pri čemer izstopi stabilna sečnina. Najpogosteje uporabljeni sklopitveni reagenti so karbodiimidi (DCC, EDC) in novejše fosforjeve in amonijeve soli (HATU). Karbodiimidi tvorijo amidno vez v prisotnosti baze, ki v prvem koraku deprotonira karboksilno kislino, s čemer ji poveča njeno elektrofilnost tako, da ta lahko reagira s karbodiimidom. Najpogosteje uporabljamo  $N,N$ -diizopropiletilamin (**6** in **8c**) ali  $N$ -metilmorfolin (NMM) (**8a**, **8b**, **18**). Na ta način smo aktivirali karboksilno kislino v aktiviran ester. Preko nukleofilnega napada amina na aktiviran ester se je tvorila amidna vez (Slika 13). Prednost karbodiimidnega reagenta EDC pred ostalimi je ta, da je nastala sečnina topna v vodi, zato se stranski produkti in nezreagirani EDC enostavno odstranijo z vodno ekstrakcijo. Najpogostejša stranska reakcija, ki lahko poteče, je racemizacija. Zato običajno dodamo pomožne nukleofile, kot je 1-hidroksibenzotriazol (HOBT), ki prestreže aktivirani ester in tvori nov intermedijat, ki ne racemizira, saj je reakcija zaradi HOBT močno pospešena. Poleg zmanjšane racemizacije se izboljša tudi izkoristek. Slaba stran benzotriazolov pa je njihova eksplozivnost. Problemu racemizacije se lahko izognemo tudi z uporabo fosforjevih in amonijevih soli, kot je HATU, ki je zelo učinkovit sklopitveni reagent z zelo malo racemizacije, vendar ga ni priporočljivo dodajati v presežku, saj lahko reagira z nezaščitenim aminom. Tudi le-ta reagira tako, da nastane aktivirani ester. Druga stranska reakcija, ki lahko poteče pri uporabi karbodiimidov, je  $O,N$ -premestitev v  $N$ -acilsečnino, preko katere amid ne bo nastal (Slika 13). Ta premestitev se zgodi pri višjih temperaturah, zato izvajamo aktivacijo kisline s sklopitvenimi reagenti pri znižani temperaturi. Premestitev pa preprečimo tudi z dodatkom HOBT [28,30,32,33].

Spojine **6**, **8a**, **8b**, **8c** in **18** smo pripravili z uporabo reagentov EDC in HOBr. Karboksilno kislino smo raztopili v DMF in ohladili na ledeni kopeli na 0 °C. S pomočjo reagentov EDC in HOBr smo poizkusili sintetizirati spojini **5** in **14**, vendar reakciji nista potekli. Spojino **14** smo poizkusili nato pripraviti s pomočjo skloplitvenega reagenta HATU, vendar tudi z uporabo tega novejšega reagenta reakcija ni potekla. Med razlogi bi lahko bil nastanek neželenih produktov, ki so preprečili nastanek amida.



**Slika 13:** Mehanizem reakcije sinteze amida z EDC/HOBr. Med reakcijo nastane stranski produkt 2 (sečnina), pri neustreznih pogojih (povišana temperatura) pa lahko nastane stranski produkt 1 (*N*-acilsečnina) (prirejeno po [27,28]).

#### 5.1.2.2. Tvorjenje amida s kislinskimi kloridi

Spojino **28** smo sintetizirali s pomočjo kislinskega klorida. Kislinski klorid je aktivirana oblika karboksilne kisline, saj postane s tem bolj polarizirana, s čimer je olajšan nukleofilni napad amina. Reakcija poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije preko tetraedričnega intermediata, pri čemer je izstopajoča skupina  $\text{Cl}^-$ , ki skupaj s protonom iz amina tvori  $\text{HCl}$ . Pri reakciji zato za nevtralizacijo nastalega  $\text{HCl}$  potrebujemo bazo, ki je v našem primeru piridin. Prednost tvorbe amida preko kislinskega klorida in amina je hitrost in ireverzibilnost reakcije. Problem pa predstavlja dejstvo, da so kislinski kloridi običajno

tekočine z dražečim učinkom na sluznice, zato je potrebno previdno ravnanje z njimi. Reakcije izvajamo v digestoriju in pri tem potrebujemo zaščitne rokavice in očala [27,28].

Produkt smo očistili z ekstrakcijo, pri kateri smo organsko fazo spirali z 10 % raztopino citronske kisline, nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  in nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$ . Nato smo organsko fazo sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in pri znižanemu tlaku odparili topilo. Z 10 % raztopino citronske kisline smo se znebili piridina in morebitnega nezreagiranega amina, saj je kislina protonirala bazo, pri čemer je nastala sol, ki je prešla v vodno fazo. Z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  smo se znebili nezreagiranega kislinskega klorida, ki smo ga dali v prebitku, oz. kisline, ki je nastala pri hidrolizi prebitnega kislinskega klorida. Nasičena raztopina  $\text{NaCl}$  pa je iz organske faze odtegnila preostanek vode. Ker je TLC kromatogram kljub ekstrakciji pokazal dodatne lise, smo izvedli še kolonsko kromatografijo.

Tudi spojino **30** smo želeli pridobiti na takšen način, vendar reakcija ni potekla po želeni poti.

#### 5.1.2.3. *Hidroliza estra*

Zadnja stopnja priprave končnih spojin **7**, **9**, **19** in **29** je bila alkana hidroliza estra. Estre smo uporabili za zaščito karboksilne skupine, ki ni smela reagirati pri sintezi amida. Alkalna hidroliza je potekala po istem postopku kot pri pripravi vmesnih produktov. Hidrolize so se razlikovale le v topilu, ki pa je bil odvisen od tega, kakšen alkohol je izstopil pri hidrolizi. Uporabljali smo  $\text{MeOH}$  ali  $\text{EtOH}$ .

#### 5.1.3. *Ekstrakcija*

Spojine **3**, **6**, **8a**, **8b**, **8c**, **11**, **16**, **18**, **22**, **26**, **28** in **33** smo očistili in izolirali z metodo ekstrakcije. Spojine **7**, **9**, **12** in **32** smo z metodo ekstrakcije samo očistili. Ta metoda temelji na topnosti snovi v posamezni fazi in na porazdelitvi spojine med organsko in vodno fazo, ki jo določa porazdelitveni koeficient. Pri metodi smo uporabili naslednja topila in raztopine:

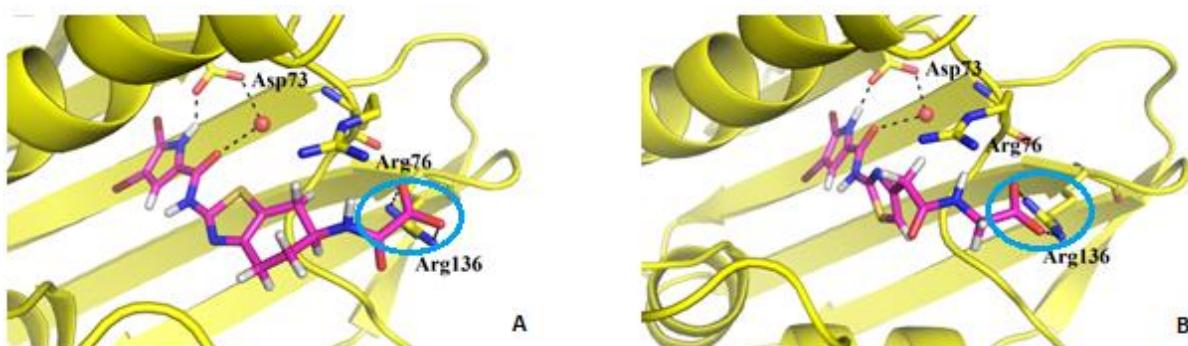
- Etilacetat ( $\text{EtOAc}$ ) je služil za razapljanje spojine ali pa za odstranjevanje nepolarnih nečistot.
- Z 10% raztopino citronske kisline smo odstranili bazične nečistote in nečistote topne v vodi.
- Z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  smo odstranili kisle nečistote in nečistote topne v vodi.
- Z nasičeno raztopino  $\text{NaCl}$  smo iz organske faze odtegnili preostanek vode. Odstranili smo pa tudi polarne oziroma ionske primesi.

- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  je brezvodna anorganska snov, ki se uporablja kot sušilno sredstvo, s katerim smo še dodatno odstranili vodo iz organske faze pred uparevanjem topila. [27,34]

## 5.2. Komentar biološkega testiranja

Končnim spojinam **6**, **7**, **8a**, **8b**, **8c**, **9**, **18**, **19**, **28** in **29** smo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani določili zaviralno aktivnost na rekombinantni DNA-girazi iz bakterije *E. coli*. Rezultati so podani kot rezidualne aktivnosti (RA) spojin pri različnih koncentracijah, vendar sta za primerjavo med spojinami pomembni koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$  (Preglednica I). Aktivnejšim spojinam smo določili tudi vrednosti  $\text{IC}_{50}$  ( $\text{RA} < 50\%$  pri 100  $\mu\text{M}$ ). Vrednost RA [%] nam pove, kakšno delovanje je ohranil encim po vezavi zaviralca. 100 % vrednost RA nam pove, da spojina pri tej koncentraciji nima zaviralne aktivnosti na encimu. Se pravi, nižja kot je vrednost RA, boljše je zaviralno delovanje spojine na encimu. Pri višjih koncentracijah predvidevamo boljšo zaviralno aktivnost spojin in s tem nižjo RA vrednost. Vrednost  $\text{IC}_{50}$  nam pove koncentracijo zaviralca, ki zavre delovanje encima za 50%. Aktivne spojine smo tudi testirali za njihovo protibakterijsko delovanje pri 50  $\mu\text{M}$  na dveh G+ (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) in dveh G- (*Escherichia coli* ATCC 25922 in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakterijskih sevih (Preglednica II).

Zasnovali in sintetizirali smo različne derivate tiazolov odprtrega in zaprtega tipa. Tiazoli zaprtega tipa so derivati 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazola, ki so bolj rigidni in ne ponujajo vpeljave večjih substituentov. Tiazoli odprtrega tipa pa so derivati 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetne kisline, ki zaradi manjšega osrednjega skeleta ponujajo možnost uvedbe večjih substituentov za potencialno interakcijo z Arg76/Arg136. Načrtovanje vseh teh spojin je bilo podprto z molekulskim sidranjem v ATP-vezavno mesto DNA-giraze iz *E. coli*. 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 DNA-girazo B in interpretirali njihov odnos med strukturo in delovanjem (SAR). Vsi analizirani zaviralci tvorijo predvidoma dve H-vezi med pirolamidno strukturo in vezavnim mestom za ATP. Ena se tvori direktno z aminokislinkim ostankom Asp73, druga pa preko mostu z vodo (Slika 14). Razlike v vezavi opazimo v Arg76/Arg136 delu vezavnega mesta encima, kar lahko razloži razlike v jakosti vezave sintetiziranih spojin.



**Slika 14:** Prikaz tvorbe vodikovih vezi spojine 29 (slika A) in spojine 7 (slika B) v vezavnem mestu DNA-giraze iz *E. coli* (prirejeno po [24]).

Prva spojina, ki smo jo pripravili je bila derivat 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetne kisline. Tako ester **6** kot prosta karboksilna skupina **7** sta imeli precej dobro zaviralno aktivnost na DNA-girazi iz *E. coli*. Karboksilna kislina **7** je imela vrednost  $IC_{50}$  15,9  $\mu\text{M}$  (Preglednica I). Slaba protibakterijska aktivnost glicinskega fragmenta nakazuje na uvedbo bolj lipofilnih in rigidnih aromatskih substituentov s kislimi fragmenti, ki delujejo kot akceptorji vodikove vezi pri interakciji z Arg76 in/ali Arg136. Zato smo na 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetno kislino v nadaljevanju pripeli sulfanilamidno (**8a**), fenolno (**8b**), salicilno (**9**) skupino in njen ester (**8c**).

Sulfanilamid **8a** in ester salicilne kisline **8c** nista izkazovala zaviralne aktivnosti na encimu (Preglednica I). Estri so na splošno delovali slabše, kot njihove pripadajoče karboksilne kisline. Fenol **8b** je izkazoval šibkejšo zaviranje DNA-giraze iz *E. coli* z vrednostjo  $IC_{50} = 143 \mu\text{M}$  (Preglednica I). Bolje se je odrezal derivat s salicilno kislino **9**, ki je izkazoval zmerno zaviralno aktivnost DNA-giraze iz *E. coli* z vrednostjo  $IC_{50} = 39,6 \mu\text{M}$  (Preglednica I). Čeprav so bile spojine bolj lipofilne, kisle (razen estra) in so vsebovale akceptor vodikove vezi, njihova protibakterijska aktivnost ni bila izboljšana, saj je bila njihova zaviralna aktivnost verjetno še vedno prešibka, da bi dosegli protibakterijsko delovanje. Šibkejša zaviralna aktivnost sulfanilamida **8a**, fenola **8b** in estra **8c** je najbrž posledica manjše kislosti funkcionalnih skupin ( $pK_a(\text{fenol}) = 9,95$  [35],  $pK_a(\text{sulfanilamid}) = 10,6$  [36] in  $pK_a(\text{salicilna kislina}) = 2,97$  [37]) in s tem povezana šibkejša interakcija z aminokislinskima ostankoma Arg76 in Arg136. Spojine lahko z Arg136 predvidoma tvorijo dve H-vezi. Ena vodikova vez se tvori preko karbonilne skupine amida, druga pa s karboksilno skupino zaviralca (Slika 14).

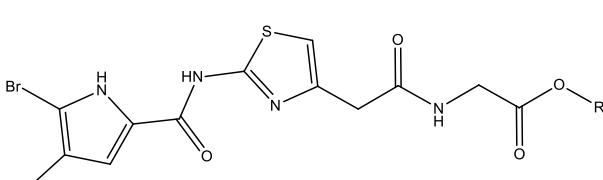
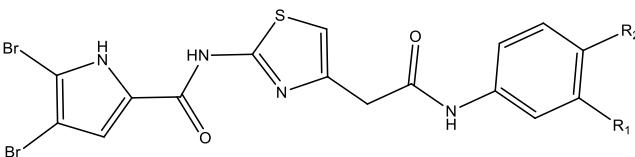
Spojini **28** in **29** sta derivata 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazola, ki po dolžini posnemata strukturo derivatov 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetne kisline **6** in **7**. Če pa primerjamo vrednosti  $IC_{50}$ , sta spojini **28** in **29** močnejša zaviralca, čeprav modeli vezave kažejo podoben

način vezave teh spojin (Slika 14). Spojina **29** (karboksilna kislina) ima 4-krat močnejšo zaviralno aktivnost na encimu kot spojina **7** in spojina **28** (ester) ima kar 16-krat močnejšo zaviralno aktivnost kot spojina **6**. Spojina **29** je izmed sintetiziranih spojin imela najmočnejšo zaviralno aktivnost DNA-giraze iz *E. coli* z vrednostjo  $IC_{50} = 3,58 \mu\text{M}$ , kar nakazuje močnejše delovanje bolj rigidnih spojin (Preglednica I).

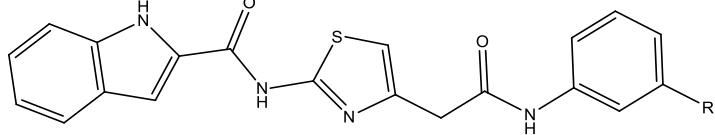
4,5-dibromopirolni fragment je bolj optimalen kot indolni fragment, saj spojini z indolnim fragmentom **18** in **19** nista izkazovali zaviralne aktivnosti na encimu (pri  $100 \mu\text{M}$  RA > 50 %, spojina **18** RA = 100%) (Preglednica I). To je posledica boljšega prilaganja pirolnega substituenta v vezavno mesto in tvorba močnejših interakcij. Ključno vlogo igrata 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. Indolni fragment pa je lahko tudi prevelik in se ne more vezati v vezavno mesto, kamor se veže pirol. Spojini z indolnim fragmentom zaradi neaktivnosti v encimskem testu nismo testirali za protibakterijsko delovanje.

Rezultati zaviralnih aktivnosti končnih spojin na rekombinantni DNA-girazi iz *E. coli* so podani v preglednici I.

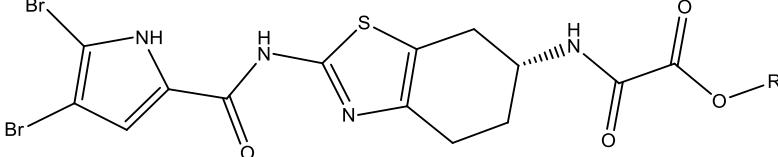
**Preglednica I:** Rezultati zaviralnih aktivnosti končnih sintetiziranih spojin podani kot vrednosti RA [%] in  $IC_{50} [\mu\text{M}]$ .

Spojina	R	RA[%]						$IC_{50} [\mu\text{M}]$	
		100% - ni zaviranja	0% - popolno zaviranje	500 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$		
	<b>6</b>	Me	/	/	46 %	83 %	/	/	169 $\mu\text{M}$
	<b>7</b>	H	/	/	10 %	84 %	/	/	15,9 $\mu\text{M}$

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>500 µM</b>	<b>250 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	
<b><u>8a</u></b>	H	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	/	/	82 %	86 %	/	/	NA
<b><u>8b</u></b>	OH	H	19 %	49 %	54 %	100 %	/	/	143 µM
<b><u>8c</u></b>	COOMe	OH	/	/	100 %	100 %	/	/	NA
<b><u>9</u></b>	COOH	OH	/	/	2 %	100 %	/	/	39,6 µM

	<b>R</b>	<b>500 µM</b>	<b>250 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	
<b><u>18</u></b>	COOMe	/	/	100 %	100 %	/	/	NA
<b><u>19</u></b>	COOH	/	/	65 %	100 %	/	/	NA

	<b>R</b>	<b>500 µM</b>	<b>250 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	
<b><u>28</u></b>	Et	/	/	5 %	9 %	77 %	100 %	10,4 µM
<b><u>29</u></b>	H	/	/	0 %	2 %	63 %	100 %	3,58 µM

NA - NEAKTIVNA

Testirane spojine so bile pri koncentraciji 50 µM le šibko aktivne proti testiranim G+ in G- bakterijam, saj je bilo zaviranje rasti pri vseh spojinah manjše kot 50 % (Preglednica II). Obstaja več možnih razlogov za ugotovljeno pomanjkanje korelacije med *in vitro* zaviranjem encima in protibakterijsko aktivnostjo proti tem bakterijskim sevom. Encimska aktivnost bi lahko bila prenizka (IC<sub>50</sub> vrednosti med 3,58 µM in 169 µM), da bi povzročila inhibicijo bakterijske rasti G- *E. coli*. Glede na literaturne podatke so verjetno potrebne subnanomolarne K<sub>i</sub> vrednosti proti citoplazemskim tarčam, da bi dosegli zadostno protibakterijsko delovanje na G- bakterije [38]. Te spojine so lahko tudi substrati za tolC izlivno črpalko, ki jo najdemo v celični steni *E. coli*, zaradi česar spojine ne dosežejo tarčnega mesta v zadostni koncentraciji in posledično se zmanjša njihovo protibakterijsko delovanje. 4,5-dibromopirolni del bi lahko bil tudi prevelik, da bi zasedel v primerjavi z *E. coli* volumsko manjši hidrofobni žep DNA-giraze iz *S. aureus*. To bi lahko povzročilo

šibkejšo inhibicijo spojin s 4,5-dibromopirolnim fragmentom na DNA-girazi iz *S. aureus* in posledično bi bilo tudi protibakterijsko delovanje slabše. Rezultati protibakterijskega delovanja so prikazani v preglednici II.

**Preglednica II:** Protibakterijsko delovanje, testirano na štirih različnih bakterijskih sevih.

<b>Spojina</b>	<b>% inhibicije rasti pri 50 µM koncentraciji spojine</b>			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<b><u>6</u></b>	13	10	7	0
<b><u>7</u></b>	15	14	7	0
<b><u>8a</u></b>	0	0	6	0
<b><u>8b</u></b>	0	0	3	0
<b><u>8c</u></b>	12	4	7	0
<b><u>9</u></b>	0	0	3	0
<b><u>28</u></b>	19	5	10	4
<b><u>29</u></b>	0	3	8	6

## 6. Sklep

Zaradi razvoja odpornosti bakterij proti številnim protibakterijskim učinkovinam in s tem povezanimi težko ozdravljivimi okužbami z multirezistentnimi bakterijami je nastala potreba po novih protibakterijskih učinkovinah z drugačnim mehanizmom delovanja. Odlično priložnost so nam ponudili morski organizmi, spužve iz rodu *Agelas*, ki proizvajajo spojine s protibakterijskim delovanjem, kot je npr. oroidin. Ta spojina deluje na podenoto B DNA-giraze tako, da se veže v njeno vezavno mesto za ATP. Optimizacija strukture oroidina in razvoj novih 4,5-dibromopirolamidnih derivatov je privedla do močnih zaviralcev DNA-giraze z vrednostmi IC<sub>50</sub> v nizkem nanomolarnem območju.

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali nove zaviralce DNA-giraze B, preučili povezavo med strukturo in delovanjem in optimizirali že sintetizirane pirolamidne analoge. Izhajali smo iz analogov oroidina. Vse spojine so imele, tako kot oroidin, skupen pirolamidni strukturni fragment, ki se v ATP vezavnem mestu veže z dvema vodikovima vezema. Ena se tvori direktno med dušikom pirola in Asp73, druga pa posredno preko vode med sosednjo karbonilno skupino in Asp73. Dibromo fragment na pirolu v vezavnem mestu interagira s hidrofobnim območjem. Spojine smo sintetizirali tako, da smo na ta pirolamidni strukturni fragment pripeli dva različna tiazola, in sicer 2-(2-aminotiazol-4-il)ocetno kislino in 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[1,2-*d*]tiazol. Na oba tiazola pa smo pripenjali različne fragmente s ciljem doseči interakciji z aminokislinskima ostankoma Arg76 in Arg136 in na podlagi rezultatov biološkega testiranja in molekulskega modeliranja preučili povezavo med strukturo in delovanjem.

Najboljšo zaviralno aktivnost DNA-giraze iz *E. coli* je izkazoval oksalat **29**, ki je derivat 4,5,6,7-tetrahidrobenzo [1,2-*d*]tiazola. Vrednost IC<sub>50</sub> te spojine je znašala 3,58 μM in je po zaviralni aktivnosti presegala vse druge sintetizirane spojine. Sulfanilamidni (**8a**) analog, ester salicilne kisline (**8c**) in spojini z indolnim fragmentom (**18**, **19**) niso izkazovali zaviralne aktivnosti na encimu. Razlog bi lahko predstavljal manjšo kislost in posledično šibkejšo interakcijo z aminokislinskimi ostanki Arg76/Arg136 (**8a** in **8c**) v vezavnem mestu in prevelik strukturni fragment (**18**, **19**), ki se slabše prilagaja v hidrofobni žep ATP vezavnega mesta (Ala47, Val43, Val71 in Val167). Zmerno zaviralno aktivnost sta imeli spojina **7** z glicinskim substituentom in spojina **28**, ki je ester spojine **29**. Njuni vrednosti IC<sub>50</sub> sta znašali 15,9 μM za spojino **7** in 10,4 μM za spojino **28**. Čeprav je bil ester **28** po zaviralni aktivnosti na encimu druga najboljša spojina, so bili estri **6**, **8c** in **18** na splošno slabše aktivni kot njihove analogne kisline **7**, **9** in **19**.

Predvidevali smo, da bodo spojine z različnimi substituenti na osnovnem ogrodju interagirale z aminokislinskima ostankoma Arg76 in/ali Arg136 in dosegale močno zaviralno aktivnost v nanomolarnem območju. Z optimizacijo spojin tekom načrtovanja in sinteze smo želeli izboljšati tudi fizikalno-kemijske lastnosti in doseči močnejše protibakterijsko delovanje tako na G+ kot tudi na G- bakterije. Vse končne sintetizirane spojine so izkazovale le šibko protibakterijsko delovanje, ki je bilo verjetno posledica delovanja izlivnih črpalk ali prenizke zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin na bakterijskem encimu. Kljub temu opisani rezultati teh novih struktur zaviralcev DNA-giraze zagotavljajo dragocene informacije za odkrivanje izboljšanih zaviralcev DNA-giraze B, ki so nujno potrebni za boj proti vse pogostejši odpornosti bakterij proti obstoječim protibakterijskim učinkovinam.

## 7. Literatura

- [1] [https://cddep.org/sites/default/files/swa\\_2015\\_final.pdf](https://cddep.org/sites/default/files/swa_2015_final.pdf) (dostopano 1.5.2016).
- [2] [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-ESAC-Net%20Summary%202016\\_0.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-ESAC-Net%20Summary%202016_0.pdf) (dostopano 3.5.2016).
- [3] [https://socialwelfare.bl.uk/subject-areas/services-activity/health-services/departmentofhealth/178656AMR\\_EBO\\_2016.pdf](https://socialwelfare.bl.uk/subject-areas/services-activity/health-services/departmentofhealth/178656AMR_EBO_2016.pdf) (dostopano 10.5.2016).
- [4] Munita JM in Arias CA: Mechanisms of Antibiotic Resistance, Microbiology Spectrum, 2016; 4(2): 1-37.
- [5] Fürst J: Poraba antibiotikov in antimikotikov. Farmacevtski vestnik 2017; 68(1): 3-5.
- [6] Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr III JF: Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. Pharmacotherapy 2017; 37(1): 71-84.
- [7] <https://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/antibiotics-EARS-Net-summary-2016.pdf> (dostopano 10.5.2016).
- [8] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert Jr D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J: Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 2009; 48: 1-12.
- [9] Singh SB: Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2014; 24: 3683–3689.
- [10] Silver LL: Challenges of Antibacterial Discovery. Clinical Microbiology Reviews 2011; 24(1): 71-109.
- [11] Dewees JE, Osheroff MA, Osheroff N: DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a “Knotty” Subject. Biochemistry and Molecular Biology Education 2009; 37(1): 2-10.
- [12] Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 257-281.
- [13] Pommier Y, Leo E, HongLiang Zhang, Marchand C: DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. Chemistry & Biology 2010; 17: 421-430.
- [14] Champoux JJ: DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. Annual Review of Biochemistry 2001; 70: 369-413.
- [15] Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A: DNA Topoisomerases. EcoSal Plus, 2015: 1-26.
- [16] Gubaev A, Klostermeier D: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strandpassage. DNA Repair 2014; 24: 23-34.

- [17] Mayer C, Janin YL: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism, *Chemical Reviews* 2014; 114: 2313–2342.
- [18] Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 2033-2047.
- [19] Tomašič T, Mašič LP: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current Topics in Medical Chemistry* 2014; 14: 130-151.
- [20] Jakopin Ž, Ilaš J, Barančokova M, Brvar M, Tammela P, Sollner Dolenc M, Tomašič T, Kikelj D: Discovery of substituted oxadiazoles as a novel scaffold for DNA gyrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 130: 171-184.
- [21] Zidar N, Montalvão S, Hodnik Ž, Nawrot DA, Žula A, Ilaš J, Kikelj D, Tammela P, Peterlin Mašič L: Antimicrobial Activity of the Marine Alkaloids, Clathrodin and Oroidin, and Their Synthetic Analogues. *Marine drugs* 2014; 12: 940-963.
- [22] Tomašič T, Katsamakas S, Hodnik Ž, J. Ilaš, Brvar M, Solmajer T, Montalvão S, Tammela P, Banjanac M, Ergović G, Anderluh M, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58: 5501–5521.
- [23] Gjorgjieva M, Tomašič T, Barančokova M, Katsamakas S, Ilaš J, Tammela P, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of Benzothiazole Scaffold-Based DNA Gyrase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 59: 8941-8954.
- [24] Tomašič T, Mirt M, Barančoková M, Ilaš J, Zidar N, Tammela P, Kikelj D: Design, synthesis and biological evaluation of 4,5-dibromo-N-(thiazol-2-yl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide derivatives as novel DNA gyrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2017; 25(1): 338-349.
- [25] Tišler M: Organska kemija, 3. Popravljeni izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1988: 87-151.
- [26] Joule JA, Mills K: Heterocyclic chemistry, 5. izdaja, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2010: 295-319
- [27] Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
- [28] Clayden J, Greeves N, Warren S: Organic chemistry, 2. izdaja, Oxford University Press, New York, 2012: 125-757.
- [29] <http://www.chemhelper.com/enantiomersep.html> (dostopano 21.6.2017)

- [30] Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827-10852.
- [31] Humar M, Šmid-Korbar J, Obreza A in drugi, Farmacevtski terminološki slovar, Založba Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti, Ljubljana, 2011: 97.
- [32] [http://documents.bachem.com/coupling\\_reagents.pdf](http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf) (dostopano 19.6.2017)
- [33] <http://www.aapptec.com/coupling-reagents-i-414.html> (dostopano 20.6.2017)
- [34] <http://www.shrani.si/f/1F/7H/3kjXnjpy/preparativna-organska-ke.pdf> (dostopano 22.6.2017)
- [35] <https://en.wikipedia.org/wiki/Phenol> (dostopano 26.6.2017)
- [36] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00259> (dostopano 26.6.2017)
- [37] [https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Salicylic_acid) (dostopano 26.6.2017)
- [38] Tari LW, Li X, Trzoss M, Bensen DC, Chen Z, Lam T, Zhang J, Lee SJ, Hough G, Phillipson D, Akers-Rodriguez S, Cunningham ML, Kwan BP, Nelson KJ, Castellano A, Locke JB, Brown-Driver V, Murphy TM, Ong VS, Pillar CM, Shinabarger DL, Nix J, Lightstone FC, Wong SE, Nguyen TB, Shaw KJ, Finn J: Tricyclic GyrB/ParE (TriBE) inhibitors: a new class of broad-spectrum dual-targeting antibacterial agents. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-13.