

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MANCA GLAVAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA GLAVAN

MAGISTRSKA NALOGA

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA AMINOKISLINSKIH DERIVATOV PIROL-2-
KARBOKSAMIDA S POTENCIALNIM ZAVIRALNIM DELOVANJEM NA
GIRAZO B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF AMINOACID PYRROLE-2-CARBOXAMIDE
DERIVATIVES AS POTENTIAL GYRASE B INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Roka Frlana, mag. farm. Meritve masne spektrometrije so opravili na Inštitutu Jožef Stefan.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Roku Frlanu za vso strokovno pomoč, potrpežljivost, hitro odzivnost, nasvete pri pisanju magistrske naloge ter predano znanje.

Zahvaljujem se tudi staršem, mami Mileni in očetu Matjažu, za vso izraženo podporo in spodbudo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. Roka Frlana, mag.farm.

Manca Glavan

Predsednik komisije: izr. prof. Robert Roškar, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Nejc Horvat

Vsebina

1. UVOD	1
1.1 Bakterijska odpornost	1
1.2 Razvoj protibakterijskih učinkovin.....	5
1.3 Giraza	8
1.3.1 ATP vezavno mesto.....	12
1.4 Razvoj giraznih inhibitorjev v pirolamidne derivate	14
2. NAMEN IN NAČRT DELA.....	18
3. MATERIALI IN METODE	21
3.1 Materiali.....	21
3.2 Metode	21
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1 Shema sintezne poti 1	23
4.2 Shema sintezne poti 2	24
4.3 Sintezna pot 1.....	25
4.3.1 Sinteza 4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline.....	25
4.3.2 Sinteza 4,5-dibromo-N-(1-metil-5-((1-(metilperoksi)-3-fenilpropan-2-il)karbamoi)-1 <i>H</i> -pirol-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida	25
4.3.3 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanojske kisline.....	26
4.3.4 Sinteza metil 2-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanoata	27
4.3.5 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanojske kisline	28
4.3.6 Sinteza metil 1-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)cikloheksankarboksilata	28
4.3.7 Sinteza 1-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)cikloheksankarboksilne kisline	29
4.3.8 Sinteza dimetil 2-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)sukcinata.....	30
4.3.9 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)sukcinatne kisline	31

4.3.10	Poskus sinteze metil 1-(4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)-4-hidroksiprolidin-2-karboksilata	32
4.4	Sintezna pot 2.....	32
4.4.1	Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona.....	32
4.4.2	Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata	33
4.4.3	Sinteza metil prolidin-2-karboksilata	33
4.4.4	Poskus sinteze cikloheksilnega derivata.....	34
4.4.5	Poskus sinteze prolinskega derivata	35
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
5.1	Razprava sinteznih reakcij	37
5.1.1	Nitriranje.....	37
5.1.2	Katalitsko hidrogeniranje	38
5.1.3	Estrenje s tionil kloridom	39
5.1.4	Alkoholiza trikloroacetilpirollov	40
5.1.5	Hidroliza metilnih estrov	40
5.1.6	Tvorba amidnih vezi s sklopitvenimi reagenti	42
5.1.7	Primerjava sintezne poti 1 in 2	47
5.2	Rezultati in razprava bioloških testiranj	48
6.	SKLEP.....	51
7.	Literatura	53

Kazalo slik

<i>Slika 1:</i> Tarče protibakterijskih učinkovin v bakterijski celici, njihova spremembe in posledičen razvoj odpornosti na protibakterijske učinkovine.	3
<i>Slika 2:</i> Rezultati raziskave EMA in ECDC o uspešnosti razvoja novih protibakterijskih učinkovin.	5
<i>Slika 3:</i> Časovnica razvoja protibakterijskih učinkovin in razvoja bakterijskih odpornosti .	7
<i>Slika 4:</i> Shema mehanizma delovanja giraze.	10
<i>Slika 5:</i> Prikaz GyrA, lokacije DNK in C vrat.	11
<i>Slika 6:</i> Prikaz GyrB, ATP vezavnega mesta in N-vrat.	12
<i>Slika 7:</i> Prikaz ATP molekule in njenih interakcij v ATP vezavnem mestu GyrB.	13
<i>Slika 8:</i> Ia-novobiocin, Ib-ciklotialidin C, Ic-klorobiocin.	14
<i>Slika 9:</i> Predstavniki pirolamidni zaviralcev GyrB iz AstraZenece.	15
<i>Slika 10:</i> 2D shema interakcij spojine IIa v ATP vezavnem mestu GyrB.	16
<i>Slika 11:</i> Spojina IIb in njene spremembe z načrtovanimi aminokislinami.	18
<i>Slika 12:</i> 2D shema interakcij spojine IIb z ATP vezavnim mestom GyrB.	19
<i>Slika 13:</i> 3D slika molekularnega sidranja spojine IIb v ATP vezavno mesto GyrB.	19
<i>Slika 14:</i> Primerjava aktivnosti karboksilne kisline in metilnega estra.	20
<i>Slika 15:</i> Usmeritve elektrofilne substitucije glede na elektrondonorske oziroma elektronakceptorske substituentne na pirolnem obročul.	37
<i>Slika 16:</i> Mehanizem dimerizacije pirola v kislem mediju.	38
<i>Slika 17:</i> Mehanizem katalitskega hidrogeniranja.	39
<i>Slika 18:</i> Mehanizem racemizacije pri sklopitvenih reakcija po poti A in B.	42
<i>Slika 19:</i> Mehanizem sklopitvene reakcije z EDC.	43
<i>Slika 20:</i> Mehanizem sklopitvene reakcije z HoBt.	44
<i>Slika 21:</i> Možni stranski produkti pri sklopitvenih reakcijah.	45
<i>Slika 22:</i> Del NMR spektra, kjer je viden intermediatni del spojine 2 s HoBtom.	45
<i>Slika 23:</i> Primerjava 2D shem interakcij cikloheksilnega (11) in glicinskega derivata (IIb) z ATP vezavnim mestom.	49
<i>Slika 24:</i> 3D predstavitev molekulskega sidranja spojine 11 v ATP vezavno mesto GyrB.	50
<i>Slika 25:</i> 3D predstavitev molekulskega sidranja spojine IIb v ATP vezavno mesto GyrB.	50

Kazalo preglednic

Preglednica I: Kvalifikacija bakterij odporne na protibakterijske učinkovine po velikosti tveganja po WHO.	2
Preglednica II: Čas hidrolize in njeni izkoristki v odvisnosti od dodane koncentracije LiOH.	41
Preglednica III: Prikaz uporabe topil in sklopitvenih reagentov za sinteze določenih spojin	46
Preglednica IV: Rezultati biološkega testiranja.	48

Povzetek

V zadnjih dveh desetletjih se je zaradi vedno pogostejšega pojavljanja odpornih bakterij, ki so odporne na že obstoječe učinkovine, pojavila velika potreba po razvoju novih protibakterijskih učinkovin. Tako stanje je posledica napačne rabe protibakterijskih učinkovin in zmanjšanega razvoja novih učinkovin od 80. let. Dobra tarča za razvoj novih učinkovin je giraza B, saj inhibitorji te tarče delujejo ne samo bakteriostatično, ampak tudi baktericidno, z zaviranjem giraze pa dosežemo širokospektralno delovanje.

V magistrski nalogi smo se osredotočili na razvoj novih pirolamidnih zaviralcev ATP vezavnega mesta giraze B. Izhajali smo iz pirolamidnega ogrodja, ki je bil sintetiziran na Fakulteti za farmacijo Ljubljana. Namen magistrske naloge je bil, da s pripenjanjem različnih aminokislin na pirolamidno ogrodje ugotovimo ali katere od aminokislin tvorijo dodatne interakcije z vezavnim mestom in ali lahko na ta način izboljšamo biološko aktivnost potencialnih pirolamidnih zaviralcev. Sintetizirali smo štiri nove končne spojine, trem smo določili zaviralno aktivnost na bakterijsko girazo. Dodatne interakcije sta najverjetneje tvorila derivata asparaginske kisline in fenilalanina, vendar pa se zaviralna aktivnost zaradi voluminoznosti aminokislin v primerjavi z glicinskim derivatom ni izboljšala. Kljub temu, da modifikacije niso bile uspešne pri izboljšavi zaviralne aktivnosti, pa smo pridobili kar nekaj informacij o sami sintezi in stabilnosti pirolamidnih spojin. Sintezo smo izvajali po dveh sinteznih poteh, pri čemer se je prva sintezna pot izkazala za bolj uspešno. Rezultati predstavljajo dobro izhodišče za optimizacijo sinteznih postopkov pirolamidnih spojin.

Ključne besede: protibakterijsko delovanje, giraza B, aminokisline, 4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido

Abstract

A great necessity for development of new antibacterial drugs appeared within the last two decades, because of increasingly larger occurrence of bacteria, that are resistant to already existing antibacterials. This situation came to light due to inadequate use of antibacterials and a decrease of development of new antibacterials since the 80's. A great target for development of new active ingredients is gyrase B, as inhibitors of this target are not only bacteriostatic, but also bactericidal and have a broad spectrum activity.

The master's thesis is centered around the development of new pyrrole amide inhibitors of the ATP binding site of GyrB. We originated from a pyrroleamide scaffold, which was prior synthesized on the Faculty of Pharmacy Ljubljana. The purpose of the master's thesis was, that with attaching different amino acids to the pyrrole amide scaffold, we will find out whether additional interactions are made between amino acids and the binding-site and whether this will increase the biological activity of the molecules. We synthesized four new final compounds, to three of which we determined inhibitory action. Derivatives of aspartic acid and phenylalanine most probably resulted in additional interaction with the binding-site, however the inhibitory action was not increased, because of the voluminosity of the amino acids in comparison to the glycine derivative. Although our modifications weren't successful with the improvement of inhibitory activity, we gained some valuable information about the synthesis and stability of pyrrole amide compounds. The synthesis was carried out with two synthesis paths, first of which proved to be more successful. Results introduce a good basis for optimization of the synthetic procedures of pyrrole amide compounds.

Keywords: antibacterial activity, gyrase B, amino acids, 4,5-dibromo-1H-pyrrolo-2-carboxamido

Seznam okrajšav

Ac ₂ O	anhidrid očetne kisline
ADMET	absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija, toksičnost
ADPNP	5'-adenilil-β,λ-imidotrifosfat
Ar	aril
ATP	adenozin trifosfat
ATR	oslabljena popolna odbojnost
bs	široki singlet
Bz	benzil
d	dublet
DCC	N,N'-dicikloheksilkarbodiimid
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleionska kislina
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni
EDC	1-etil-3-(3-metilaminopropil)karbodiimid
ekv.	ekvivalent
EMA	Evropska agencija za zdravila
ESI	masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem
FBLG	načrtovanje zdravilnih učinkovin na osnovi fragmentov
FT-IR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
Gyr B	girazna podenota B
GyrA	girazna podenota A
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat)
hept	heptet
HoBt	hidroksibenzotriazol
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti

HTS	rešetanje visoke zmogljivosti
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
m	multiplet
MeOH	metanol
Mg	magnezij
MS	masna spektroskopija
NaOMe	natrijev metoksid
NMM	N-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
ParC	podenota C topoizomerase IV
ParE	podenota E topoizomerase IV
PBP	»penicillin binding protein« - penicilin vezajoči protein
Pd/C	paladij na inertnem nosilcu ogljika
Ph	fenil
Q-TOF	masni analizator časa preleta ionov s kvadрупolnim predanalizatorjem
RA	rezidualna aktivnost
RNK	ribonukleinska kislina
rt	sobna temperatura
s	singlet
t	triplet
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetramethyluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1. UVOD

1.1 Bakterijska odpornost

Od odkritja penicilina v drugi polovici 20. stoletja predstavlja odkritje vseh novih protibakterijskih učinkovin velik korak naprej v razvoju medicine. Te učinkovine ne samo, da zdravijo obbolele ljudi z okužbami, ampak tudi pomagajo k uspešnosti številnih bolnišničnih dejavnosti, kot so operacije, transplantacije, kemoterapija, ki so dejavniki tveganja za razvoj sekundarnih okužb. Žal pa, zaradi razvoja sevov bakterij, ki so odporne proti več vrst protibakterijskih učinkovin naenkrat, učinkovitost protibakterijskih učinkovin upada. Po podatkih ECDC (Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni) zaradi okužb z odpornimi bakterijami vsako leto umre približno 25000 Evropejcev. Zaradi dodatne oskrbe bolnikov v bolnišnicah se za zdravljenje takih okužb porabi 1,5 milijard evrov na leto. (1) ECDC in EMA (Evropska agencija za zdravila) je izluščila najbolj pogoste bakterije, ki so odporne proti več vrst protibakterijskih učinkovin in sicer:

- *S. aureus*, odporna na metilicilin (MRSA)
- *S. aureus*, srednje odporna na vankomicin in odporna na vankomicin (VISA/VRSA)
- *Enterococcus spp.*, odporna na vankomicin (VRE)
- *S. pneumnoae*, odporna na penicilin (PRSP)
- *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *Klebsiella pneumnoae*), odporna na tretjo generacijo cefalosporinov
- *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*), odporna na karbapeneme in
- Ne-fermentacijske Gram negativne bakterije (*P. aeruginosa*), odporne na karbapeneme.

WHO (Svetovna zdravstvena organizacija) je leta 2013 objavil malo drugačen seznam odpornih bakterij in je razvrstil bakterije glede na nujno razvoja novih učinkovin proti tem bakterijam, in sicer je razvrstitev predstavljena v *preglednici I.*

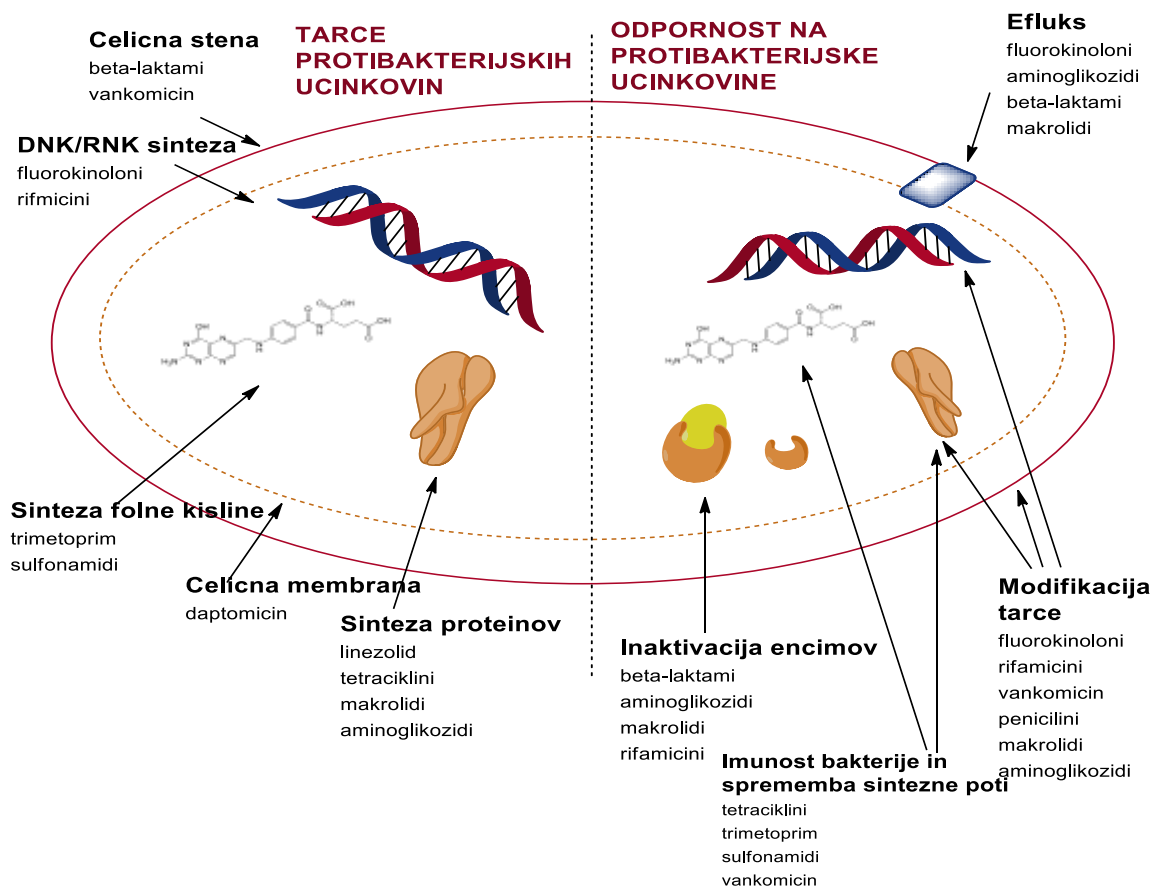
Preglednica I: Kvalifikacija bakterij odporne na protibakterijske učinkovine po velikosti tveganja po WHO. Prirejeno po (3).

Stopnja tveganja za okužbo odporno na antibiotično terapijo	Bakterije	Učinkovine na katere so bakterije odporne
Izjemno visoko tveganje	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>spp.</i>	karbapenemi karbapenemi karbapenemi in 3. generacija cefalosporinov
Visoko tveganje	<i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> <i>H. pylori</i> <i>Campylobacter</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	vankomicin meticilin in vankomicin klaritromicin fluorokinoloni fluorokinoloni fluorokinoloni in 3. generacija cefalosporinov
Srednje tveganje	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>Shigella spp.</i>	penicilin ampicilin fluorokinoloni

V prvo skupino spadajo Gram negativne bakterije, odporne na karbapeneme, ki so zadnja možnost terapije proti tem bakterijam. (2) Izluščimo lahko tako imenovane ESKAPE patogene (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*), ki jim lahko še dodamo *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* in *Neisseria gonorrhoea*. V tabeli so te bakterije označene z rdečo barvo. (16)

Geni odgovorni za odpornost so obstajali že pred razvojem protibakterijskih učinkovin. (16) Razvoj bakterijske odpornosti je evolucijska potreba bakterij, vendar pa smo k njegovemu hitremu razvoju veliko prispevali ljudje. (2) Ljudje izvajamo selektivni pritisk na bakterije, da vgradijo odpornostne gene v obliki plazmidov iz drugih mikrobov, ki obstajajo že tisočletja. To velja ne samo za antibiotike naravnega izvora, ampak tudi za sintezne kemoterapevtike. Primer tega je odpornost na fluorokinolone, npr. ciprofloksacin, kjer so *Enterobacteriaceae* vgradile t. i. *qnr* gene, odgovorne za odpornost. Geni izvirajo iz bakterij roda *Shewanella*. (16) Razlogi tičijo v napačni uporabi protibakterijskih učinkovin, na primer bolniki ne dokončajo terapije, ki je predpisana in predhodno

prenehajo s terapijo; napačnem predpisovanju antibiotikov, predpisujejo se širokospektralni antibiotiki pred ozkospektralnimi, antibiotiki se predpisujejo za virusna obolenja ... K zmanjšanju hitrosti razvoja bakterijske odpornosti lahko prispevamo na dva načina, in sicer z ozaveščanjem ljudi o pravilnem ravnanju z protibakterijskimi učinkovinami in z razvojem novih protibakterijskih učinkovin. (2)



Slika 1: Tarče protibakterijskih učinkovin v bakterijski celici, njihova spremembe in posledičen razvoj odpornosti na protibakterijske učinkovine. Pripisane so učinkovine, ki delujejo na določeno tarčo oziroma so bakterije na učinkovino postale odporne. Prirejeno po (13).

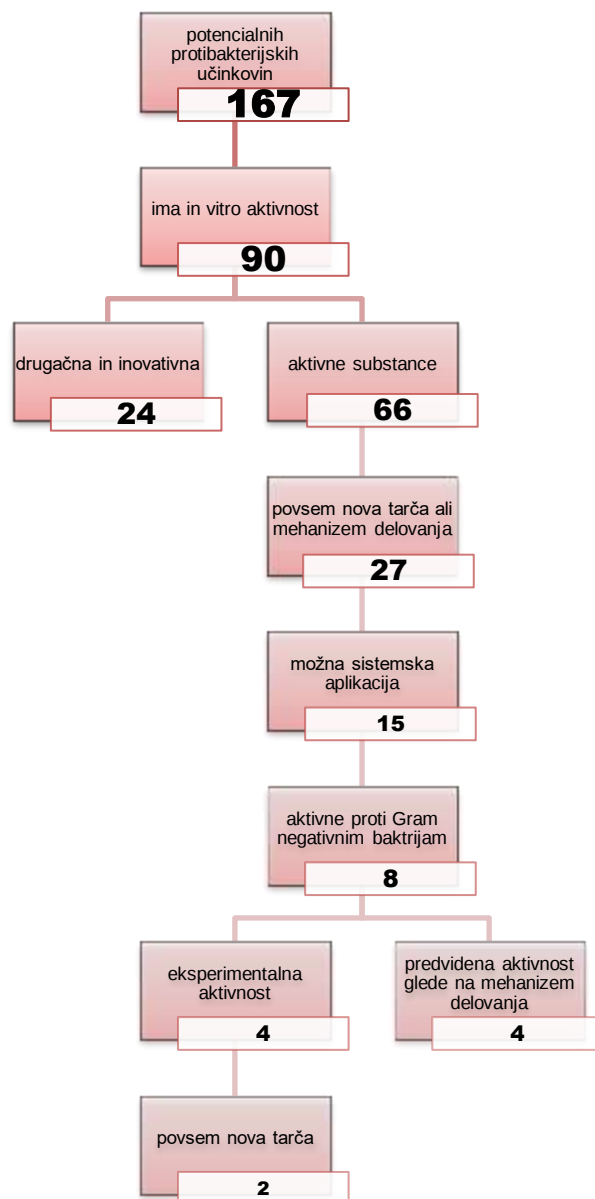
Pomembno pri odpornosti bakterij na antibiotike je tudi to, da večina že znanih antibiotikov deluje na podobne tarče oziroma s podobnimi mehanizmi. (1) Doslej znane tarče so sinteza proteinov, transkripcija z RNK polimerazo, kromosomska segregacija in metabolizem folne kisline (*slika 1*). Skozi mutacije določenih genov lahko bakterije spremenijo svoje celične strukture tako, da antibiotik ni več učinkovit. MRSA npr. doseže visoko odpornost na meticilin in ostale beta-laktamske antibiotike preko pridobitve in ekspresije *mecA* gena, ki kodira PBP2a protein. Ta vrsta PBP (penicilin vezajoči protein)

ne veže metililina in ostalih beta laktamski antibiotikov kot ostali PBP (acilijacija proteina ne poteče) – kar ima za posledico neučinkovitost antibiotika. (13)

Delno rešitev odpornosti antibiotikov predstavljajo tudi tako imenovani antibiotični adjuvansi. To so molekule, ki bi se lahko uporabljale v kombinaciji z že znanimi antibiotiki, ki so na trgu in bi povečale njihovo učinkovitost. Antibiotični adjuvansi bi delovali na genetske tarče, ki so odgovorne za odpornost bakterij ali pa bi povečali učinek samega antibiotika. (1, 16)

1.2 Razvoj protibakterijskih učinkovin

Razvoj novih protibakterijskih učinkovin je več kot očitno potreben. Da pa bi ECDC in EMA ugotovila, kako dobro trenutno razvijamo nove antibiotike, je pregledala dve komercialno dostopni bazi podatkov - Adis Insight R&D in Pharmaprojects, ki zbirata najnovejše podatke o razvoju novih učinkovin za različne terapevtske skupine. EMA je učinkovine razvrstila glede na to, ali delujejo na enako tarčo kot že obstoječi antibiotiki, ali je mehanizem delovanja na novo tarčo znan in ali imajo nov mehanizem delovanja.



Slika 2: Rezultati raziskave EMA in ECDC o uspešnosti razvoja novih protibakterijskih učinkovin. Prirejeno po (2).

Rezultati raziskave so predstavljeni na *sliki 2*. Od začetnih 167 učinkovin je le 5 učinkovin napredovalo do faze 3 kliničnih preizkušanj. S to raziskavo vidimo, da je pomanjkanje novih protitibakterijskih učinkovin zelo veliko. Največja težava bakterijske odpornosti pa pri tem predstavljajo Gram negativne bakterije. (2)

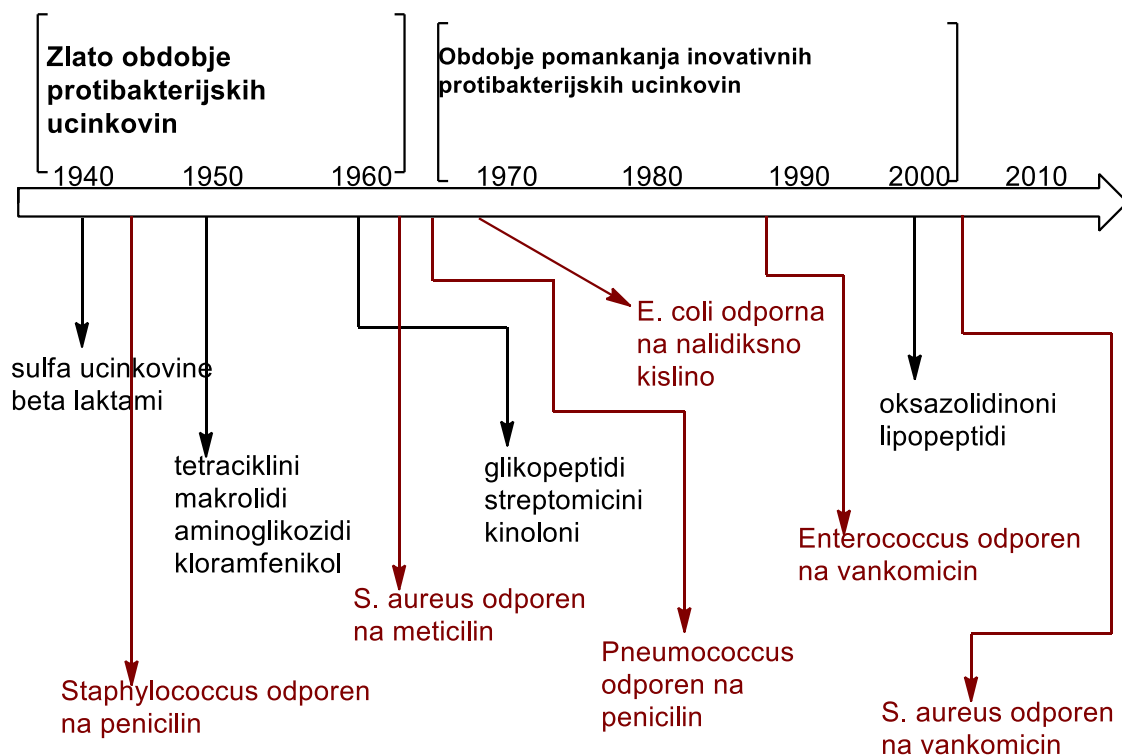
Razvoj novih protibakterijskih učinkovin je zastal predvsem zaradi razlogov farmacevtske industrije, kot so prevelik strošek, ki ga razvoj novih učinkovin prinese, nizek zaslužek za učinkovine, ki niso namenjene kroničnim boleznim in splošno prepričanje, da so že dostopni antibiotiki dovolj učinkoviti. (4) Čeprav je svetovni trg z protibakterijskimi učinkovinami velik, za leto 2009 je bil zaslužek namreč vreden 42 milijard dolarjev, pa se farmacevtska industrija boji prevelikega investiranja v razvoj novih protibakterijskih učinkovin in nizke povrnitve stroškov tega razvoja. (16) Nizek zaslužek farmacevtske industrije z protibakterijskimi učinkovinami je posledica predvsem dveh razlogov:

- obdobje uporabe je precej krajše v primerjavi z učinkovinami za kronična obolenja in
- cena antibiotikov je precej nižja, zaradi konkurenčnosti generikov in zaradi konkurenčnosti že obstoječih antibiotikov, npr. vankomicina, ki se uporablja za zdravljenje MRSA-e.

Tudi, če so nove protibakterijske učinkovine dražje kot starejše, ki proti nekaterim bakterijam niso več učinkoviti, to še vedno ne pokrije stroška razvoja zaradi kratkega obdobja jemanja protibakterijskih učinkovin. Linezolid, ki spada med novejšje protibakterijske učinkovine, stane približno 600 evrov na bolnika, če predvidimo najdaljšo možno terapijo. (45) Če torej linezolid primerjamo z novim inovativnim zdravilom proti hepatitisu C, ki stane nekaj čez 60000 evrov na bolnika za celotno zdravljenje, hitro opazimo razliko. Kot posledica tega je razvoj novih protibakterijskih učinkovin skoraj zamrl v nasprotju z razvojem učinkovin za zdravljenje kroničnih bolezni, kjer je trenutno v razvoju 500 novih učinkovin. (4, 16)

Ker farmacevtska industrija ni zainteresirana za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, so pri tej nalogi pomembne javno-zasebne povezave. Tak primer je projekt CARB-X, ki je vložil 455 milijonov dolarjev za protibakterijske predklinične raziskave v obdobju petih let, pri tem pa se skoncentriral na protibakterijske učinkovine proti najbolj tveganim Gram negativnim bakterijam. (5) Ameriško društvo za okužbe (IDSA) je zagnalo iniciativo, katere cilj je odkriti 10 novih inovativnih antibiotikov do leta 2020 imenovan 10x20

projekt. Na ta način želijo spodbuditi farmacevtsko industrijo k razvoju novih protibakterijskih učinkovin. (16, 18)



Slika 3: Časovnica razvoja protibakterijskih učinkovin in razvoja bakterijskih odpornosti. Prirejeno po (40) in (41)

Najstarejša kemoterapevtska protibakterijska učinkovina je bila odkrita v 20. stoletju z rešetanjem spojin barvne industrije, kar je privedlo do odkritja salvarsana in sulfonamidnih učinkovin. Vendar pa je prava revolucija nastopila z odkritjem penicilina. Na *sliki 3* lahko vidimo kako hitro z razvojem antibiotika se je tudi razvila odpornost nanj.

Antibiotiki izolirani iz mikroorganizmov, npr. beta-laktami, aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, glikopeptidi ... in sintezni kinoloni so bili osnova za razvoj novih učinkovin. (7) Dve tretjini protibakterijskih učinkovin v klinični uporabi je namreč polysinteznih. (11) Boljše razumevanje kemije, identifikacija tarč in razvoj sidranja ligandov v kristalne strukture ter boljše razumevanje mehanizma odpornosti bakterij je vodila v odkritje in razvoj šestih generacij antibiotikov. Preoblikovanje že odkritih učinkovin je omogočilo izboljšanje učinkovitosti in farmakokinetičnih lastnosti antibiotikov, vendar pa so možnosti preoblikovanja starih učinkovin že bile izčrpane. Od približno 80. let pa do leta 2000 novih protibakterijskih učinkovin ni bilo na spregled. (7) V zadnjem desetletju je

nekaj novih protibakterijskih učinkovin prišlo na tržišče, vendar v večini predstavljajo le molekule, ki uporabljajo že znana ogrožja uveljavljenih skupin antibiotikov oziroma kemoterapevtikov – sem predvsem spadajo beta-laktami in fluorokinoloni. Samo štirje antibiotiki v zadnjem desetletju imajo popolnoma novo strukturo, in to so linezolid, ki je povsem sintezen ter naravni produkti daptomicin (lipopeptid), fidaksomicin (makrolidni poliketid) in retapamulin (diterpenski pleuromurilin). Vendar pa noben od teh štirih antibiotikov ne predstavlja povsem novega strukturnega razreda, saj so bili odkriti že več desetletij nazaj in bili predelani za človeško uporabo ali pa obujeni iz starih raziskovalnih projektov. Slaba stran teh štirih je tudi, da so vsi usmerjeni samo proti Gram pozitivnim bakterijam. (16) Obstaja približno 265-350 genetsko validiranih protibakterijskih tarč. Od tega je 60 % širokospektralnih tarč in samo 20 od teh tarč zasedajo že obstoječe učinkovine. Kar pomeni, da je še veliko prostora za odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin z novimi in drugačnimi tarčami. (7)

Najdba dobre spojine vodnice protibakterijske učinkovine predstavlja velik izziv. To so pokazale raziskave GlaxoSmithKline, kjer so med leti 1995 in 2001 izvedli 70 HTS (reševanje visoke zmogljivosti) kampanj in več kot milijon molekul je bilo reševanih na različnih bakterijskih tarčah. Odkrili so samo 16 zadetkov, od tega 5 spojin vodnic. Tudi, če se le ena od teh izkaže za učinkovito protibakterijsko učinkovino pa lahko naletimo na velik ADMET (absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija in toksičnost) problem. Skoraj 40 % potencialnih učinkovin ne prestande kliničnih študij zaradi neugodnega farmakokinetkega profila. (15) FBLG (načrtovanje zdravilnih učinkovin na osnovi fragmentov) ponuja nove rešitve za iskanje novih spojin vodnic, pri čemer se izognemo težavam, ki jih ponuja HTS korporativnih knjižnic spojin. Iščejo se namreč le fragmenti nizke molekulske mase, ki bi se lahko vezali na specificirano tarčo, fizikalno-kemijske lastnosti spojine pa so lahko nato oblikovane okoli glavnih elementov, potrebnih za aktivnost učinkovine. Na ta način so odkrili nov razred inhibitorjev DNK giraze, ki vsebujejo pirolamidne fragmente in so učinkoviti proti širokemu spektru Gram pozitivnih bakterij - tudi proti tistim, ki so odporne na vse že obstoječe učinkovine. (10)

1.3 Giraza

Giraze so encimi, ki so esencialni za celično preživetje, saj pomagajo pri uspešni replikaciji, transkripciji in rekombinaciji DNK. Ti encimi prekinajo obe verigi DNK in ju

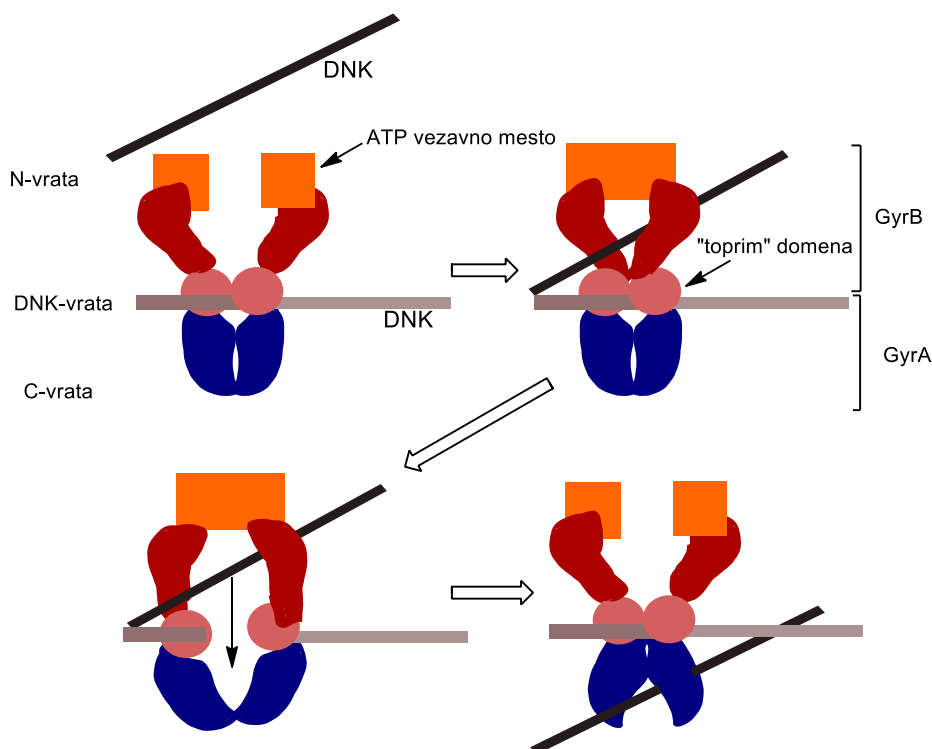
nato po sprostitvi napetosti obeh verig DNK pri podvojevanju spet sestavijo skupaj. (11) DNK giraza ustvarja negativne supernavoje DNK in odstrani pozitivne supernavoje. (17) Giraza spada med večjo skupino encimov imenovane topoizomeraze. Topoizomeraze razvrstimo na tip I in tip II. Tip I prekine le eno, tip II pa obe DNK verigi naenkrat. Vse topoizomeraze prekinajo fosfodiesterko vez v DNK preko nukleofilnega napada tirozinskega ostanka. Bakterijske topoizomeraze lahko razdelimo na tip IA in tip IIA pri čemer pod tip IA spadata topoizomerazi I in III. (14, 17) DNK giraza in topoizomeraza IV spadata med bakterijske topoizomeraze tip IIA. (11) Topoizomeraza IV je bolj pomembna pri kromosomski segregaciji, medtem kot je giraza odgovorna za neprekinjen potek DNK sinteze. (11) Bakterijske topoizomeraze tipa II so dobre tarče, ker so esencialne za razmnoževanje v vseh bakterijah, akumulacija delčkov DNK pa ima baktericidni in ne samo bakteriostatični efekt. (14, 17)

Giraza in topoizomeraza IV sta encimska kompleksa, sestavljena iz štirih podenot: Giraza je sestavljena iz GyrA in GyrB podenote, medtem, ko je topoizomeraza sestavljena iz ParC in ParE podenote. GyrA podenota je odgovorna za prekinitev DNK in njeno ponovno združitev, GyrB pa je odgovorna za hidrolizo ATP, ki poskrbi za energijo, potrebno za encimsko aktivnost. (9) GyrA podenoto enačimo s ParC podenoto, ter GyrB enačimo z ParE. Vsak par podenot si je namreč precej podoben, zato posledično obstaja možnost inhibicije obeh podenot z eno samo učinkovino. Topoizomeraze so namreč encimi, ki imajo več različnih tarčnih mest in podobnost med tarčnimi mesti omogoča, da ena učinkovina inhibira več tarč naenkrat. (17) Pri razvoju inhibitorjev bakterijske giraze moramo biti pozorni tudi na selektivnost – kar pomeni, da moramo najti tarče, ki imajo zelo malo oziroma skoraj nič podobnosti z človeškimi proteini. Tarča mora biti prisotna v veliki koncentraciji v odpornih bakterijah in odsotna, drugačna ali neesencialna pri človeku. ATP vezavno mesto je lahko težavno, saj je med človeškim in bakterijskim kar nekaj podobnosti. Zato moramo poznati razlike kot so različne konformacije encima in sosednji hidrofobni žepi, ki vplivajo na oblikovanje učinkovine. (6) Tako so na primer aminokumarini toksični tudi za evkariontske celice, zaradi njihove aktivnosti proti človeški topoizomerazi II. (14)

Odkrili so, da lahko s ciljanjem na bakterijsko girazo dosežemo manjšo možnost mutacij bakterij, saj prvič, lahko načrtujemo molekulo, ki deluje na več različnih tarčah in drugič, na bakterijski girazi se lahko ohranijo le mutacije, ki ne vplivajo na aktivnost samega

encima in hkrati preprečijo vezavo učinkovine. Manjša možnost mutacije bakterijske giraze pa pomeni tudi manjšo možnost odpornosti bakterije na protibakterijske učinkovine. (11, 17) Kinoloni se vežejo na podenoto GyrA/ParC, kumarini pa se vežejo na katalitično ATP vezavno mesto GyrB/ParE. (7) Vezavno mesto za nukleotide DNK se nahaja v GyrB domeni, imenovana tudi N-terminalna GHKL (Giraza, Hsp90, histidin Kinaza, MutL) domena (11), ki je sestavljena iz osmih β struktur in petih α vijačnic. GyrB domena je sestavljena iz treh poddomen in sicer:

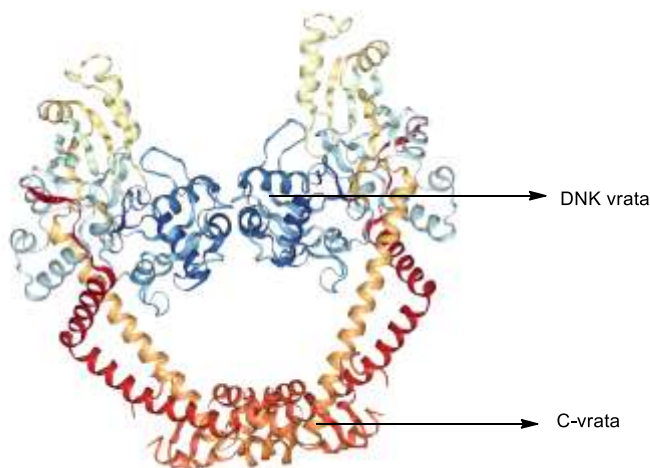
- 1) ATP-vezavne domene,
- 2) domene za vezavo nukleotidov in
- 3) domene, ki je vključena v topoizomernostno aktivnost in se imenuje tudi »toprim« domena. (42)



Slika 4: Shema mehanizma delovanja giraze.

Terciarno strukturo domene GyrA sestavljajo 4 β strukture in 4 α vijačnice, imenovana pa je tudi C-terminalna pretvorniška domena (11). Sprememba konformacij pretvorniške in GHKL domene je pomembna pri potovanju DNK skozi katalitični cikel giraze. (11). Definirane so bile tri vrste tako imenovanih vrat: N-vrata, DNK-vrata in C-vrata. N-vrata sestavljata dve GyrB poenoti, ki vežeta ATP. (19) DNK vrata povzročijo prelom DNK

preko kovalentne vezave in takrat so DNK vrata odprta. Ko se DNK verigi prekrížata tako, da nastane negativni supernavoj, se DNK vrata spet zaprejo in DNK verigi se združita. DNK nato potuje skozi C-vrata in se sprostí iz encima. Katalitični cikel encima je predstavljen na *sliki 4*. Na sredini zaprte dimerne strukture se nahaja prostor v velikosti 20 Å. Ta luknja je obdana s pozitivno nabitimi arginini in predstavlja pot za transport negativno nabiti DNK. (15) Vidna je na *sliki 5*.

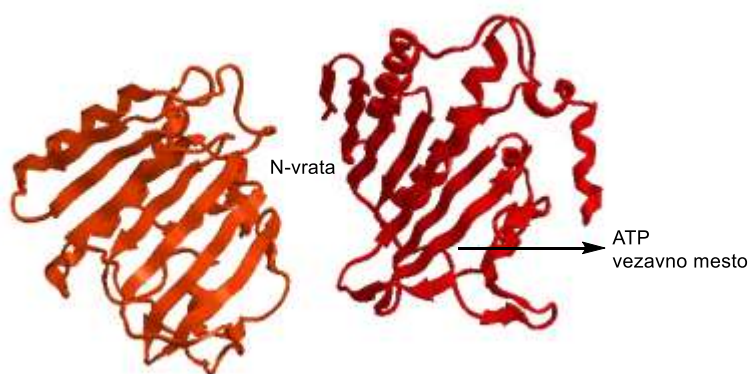


Slika 5: Prikaz GyrA, lokacije DNK in C vrat. Slika je vzeta iz PDB baze, oznaka: 1AB4

Fluorokinoloni inhibirajo DNK girazo in topoizomerozo IV. Ta vrsta kemoterapevtikov interagira s kompleksi, ki se tvorijo med DNK in DNK girazo oziroma topoizomerozo – s tem pa stabilizirajo prelome DNK, ki jih giraza/topoizomeroza tvori. (13, 17) Nakopičijo se oksidativne poškodbe in sproži se apoptoza. (17) Odpornost na fluorokinolone je posledica kromosomski mutacij pri DNK girazi oziroma topoizomerazi IV. Spremembe v GyrA ali GyrB se pojavijo predvsem v na kinolone odpornih Gram negativnih bakterijah. GryA mutacije so veliko pogostejše kot GyrB mutacije. V podenotah topoizomeroze IV (ParC in ParE) se mutacije prav tako lahko pojavijo v Gram negativnih bakterijah, vendar pa znanstveniki ugotavljajo, da so manj pomembne pri odpornosti, saj se odpornost na fluorokinolone pojavi le kadar je mutacija prisotna tudi v DNK girazi. V Gram pozitivnih bakterijah pa je situacija obrnjena in sicer so za odpornost bolj pomembne mutacije v topoizomerazi IV. (13)

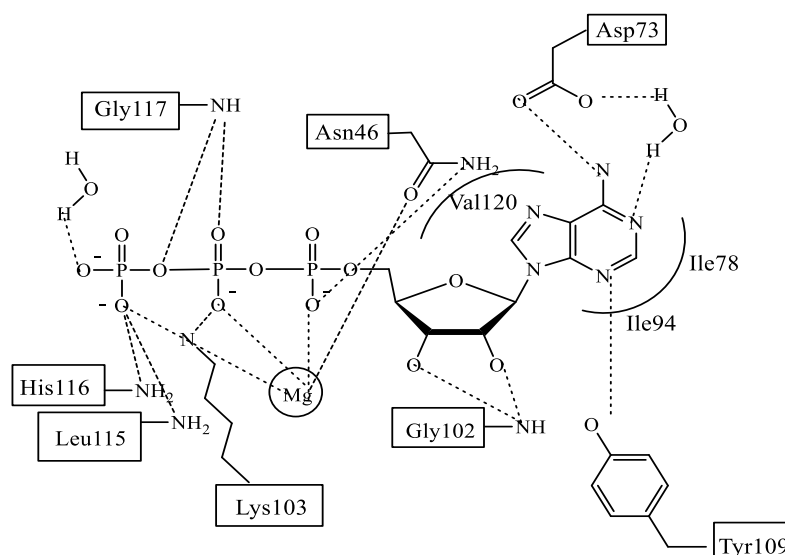
1.3.1 ATP vezavno mesto

Do danes še ni bila objavljena nobena visokoresolucijska celotna struktura giraznih tetramerov. So pa znanstveniki uspeli kristalizirati GyrB in ParE fragmente in jih definirati. Prva ugotovljena kristalna struktura je bila 43 kDa velik N-terminalni fragment *E. coli*, imenovan tudi GyrB43 v kompleksu z ADPNP (5'-adenilil- β , λ -imidotrifosfat) (slika 6).



Slika 6: Prikaz GyrB, ATP vezavnega mesta in N-vrat. Slika vzeta iz PDB baze, oznaka: 4DUH

V kristalni strukturi GyrB43 tvori dimer v prisotnosti ATP ali ADPNP. Konformacija GyrB43-ADPNP je stabilizirana z vodikovimi vezmi preko aminokislinskih ostankov Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His 116 in Gly117 (slika 7). Ile78, Ile94 in Val120 tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo. Pomemben je tudi Lys 337, ki se nahaja v C-terminalni pretvorniški domeni in tvori vodikovo vez s fosfatno skupino ATP.



Slika 7: Prikaz ATP molekule in njenih interakcij v ATP vezavnem mestu GyrB. Prirejeno po (11).

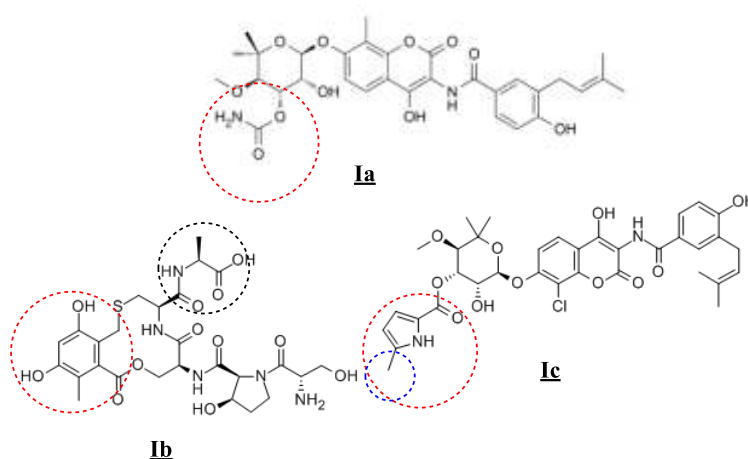
Še ena pomembna molekula je kristalna molekula vode, ki je del vodikove vezi med adeninskim obročem ATP in aminokislinskimi ostanki Asp73, Gly77 in Thre65. Molekula vode je pomembna, saj napade fosfat ATP-ja, ki razpade na ADP in fosfat. (15) Glu42 naj bi bil odgovoren za odtegnitev protona vodi, ki nato napade fosfat. (11) Tyr5' tvori dve H-vezi z 2'-hidroksilno skupino riboze in dušikovim atomom adeninskega obroča, Ile10' pa stabilizira dimer preko hidrofobnih interakcij. Da bi izluščili najbolj pomembne aminokislinske ostanke odgovorne za vezavo ATP in njegovo hidrolizo, so ugotavljali kateri ostanki skozi mutacijo povzročijo znižane oziroma ničlo ATP-azno aktivnost. Pri tem so izluščili His38, Glu42, Asn46, Glu50, Asp73, Arg76, Gly77, Ile78, Thr165 in Lys103. (15) Poleg molekule vode v vezavnem mestu pa je za katalične lastnosti vseh topoizomeraz tipa IIA pomembna tudi prisotnost magnezijevih kationov kot kofaktorjev. Predvidevajo, da sta potrebni dve molekuli Mg^{2+} za vsako domeno GyrB. Zaradi teh ugotovitev lahko sklepamo, da bi sprememba celične koncentracije magnezija ali zamenjava s katerim drugim divalentnim kovinskim ionom, povzročila nepravilno delovanje teh encimov in posledično vplivala na razmnoževanje bakterij. (11)

Dolgo časa so raziskovalci menili, da ima razvoj učinkovin s tarčo na bakterijski girazi svoje izzive in sicer mora biti učinkovina kompetitivna z ATP v celici. ATP v bakterijah se nahaja v koncentracijah od 0,6 do 18 mM, ki so podobne koncentracijam v človeških celicah (1-10 mM) – zaradi česar so se raziskovalci bali, da ni možno razviti učinkovin z dovolj veliko učinkovitostjo, ki bi lahko tekmovala s tako veliko koncentracijo ATP v

bakterijskih celicah. Vendar pa je razvoj kompetitivnih antagonistov protein-kinaznih inhibitorjev v človeških celicah dokazal nasprotno. (6)

1.4 Razvoj giraznih inhibitorjev v pirolamidne derivate

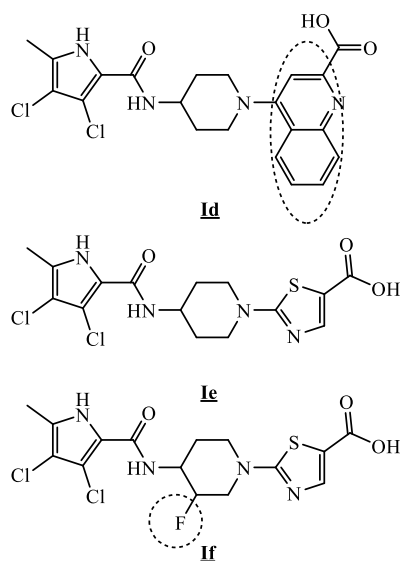
Eni prvih encimskih inhibitorjev ATP vezavnega mesta so naravni kumarini novobiocin (**Ia**), klorobiocin (**Ic**) in kumermicin A, ki ga proizvajajo bakterije rodu *Streptomyces* in inhibirajo bakterijsko DNK sintezo tako, da zavirajo delovanje DNK giraze. Novobiocin inhibira podenoto GyrB, povzročil pa naj bi tudi prekinitev RNK sinteze. (6,11) Novobiocin je bil leta 2011 umaknjen iz trga zaradi poročanih resnih neželenih učinkov. Kumermicin je kazal aktivnost *in vitro*, vendar pa se je domnevno zaradi premočne vezave na serumske proteine izkazal za neaktivnega *in vivo*. Ciklotialidin (**Ib**) je še ena naravna učinkovina iz *Streptomyces*, ki je bila potencialna nova protibakterijska učinkovina in je strukturno zelo podobna novobiocinu. Edini dve spremembi se kažeta v nadomestilu karbamatne skupine s pirolom in zamenjavi metilne skupine s klorovim atomom. Raziskovalci so začeli ugotavljati, da so karbamat novobiocina, 2-karboksipirol klorobiocina in fenol ciklotialidina C bioizosteri, ki lahko interagirajo z Asp73 v ATP tarčnem mestu. (slika 8) Ker ima pirol klorobiocina tudi metilno skupino na pirolu, so predvidevali da le-ta zaseda lipofilni žepek, ki ga novobiocin ne. Z rentgensko kristalografijo so ugotovili, da poleg 2-karboksipirolnega fragmenta, ki interagira z Asp73, lahko dosežemo interakcije še z ostalimi deli vezavnega mesta, npr. interakcija Arg136 s karbonilnim kisikom na kumarinskem obroču. (11)



Slika 8: Ia-novobiocin, Ib-ciklotialidin C, Ic-klorobiocin. Obkroženi so fragmenti pomembni za nadaljnji razvoj protigiraznih učinkovin.

Pri ciklotialidinu Asp73 in molekula vode interagirata z resorcinolnim obročem, Arg136 pa s peptidnim delom (alaninom). Vendar pa ima učinkovina nizko protibakterijsko aktivnost, verjetno zaradi nizke penetracije skozi celično steno. (19) Sprememba metilne skupine na fenolu v brom je izboljšala protibakterijsko funkcijo. Fenolna skupina se je izkazala za bioizosterni ekvivalenten 2-karboksipirolu klorobiocina in karbamatu novobiocina, vendar pa je hidroksilna skupina na fenolnem obroču dobra tarča za glukuronidacijo, kar prispeva k hitri inaktivaciji učinkovine. (11, 19)

Farmacevtski kemiki AstraZenece so nadaljevali razvoj iz klorobiocina in uporabili pirolni fragment ter ga pretvorili v amidno molekulo (*slika 9*). Pirolamidne derivate so identificirali preko rešetanja z jedrsko magnetno resonanco na osnovi fragmentov. (19) Substituenti na pirolnem obroču so se izkazali za pomembne. Najprej so uporabili brom in metil, brom pa so nato nadomestili s klorom – kar pa se je izkazalo, da poveča jakost delovanja za 150-krat. Klorova atoma zasedeta lipofilni žep v vezavnem mestu in hkrati povečata kislost pirolnega vodika, kar poveča interakcijo z Asp73. (11) Karboksamid na kinolinu (**Id**) interagira z Arg136. Tiazolni obroč (**Ie**) pa tvori interakcijo kation- π z Arg76. (19) Kasneje so na piperidinski obroč pripeli fluorov atom (**If**), ki je aktivnost prav tako izboljšal zaradi hidrofobne interakcije s hidrofobno regijo vezavnega mesta Ile78 in Ile94. (11, 7)

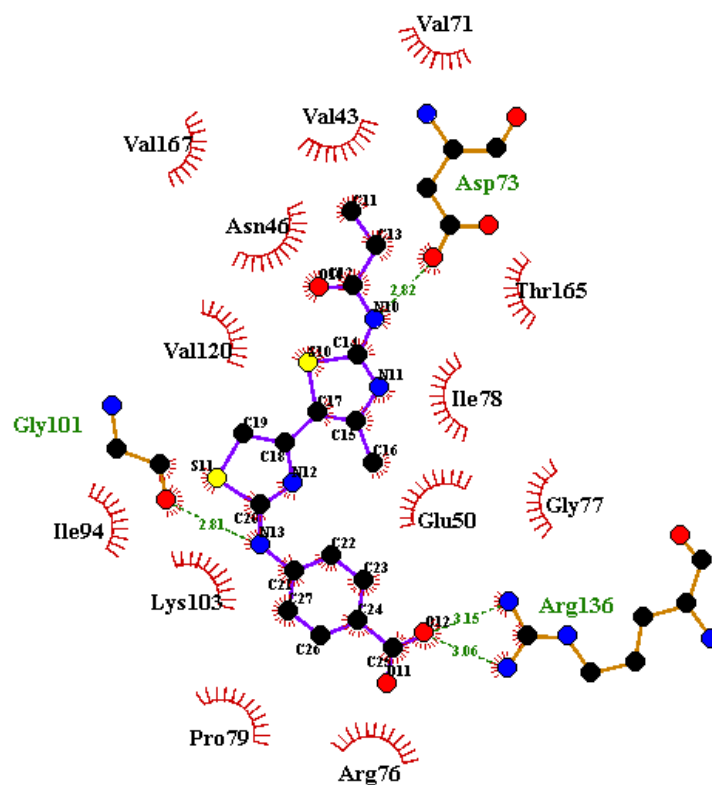


Slika 9: Predstavniki pirolamidni zaviralcev GyrB iz AstraZenece.

Rezultati testiranj na Gram negativnih in Gram pozitivnih bakterijah so pokazali, da se s fleksibilnostjo molekule bolj približamo širokospektralni funkciji učinkovine. (19) Proučevanje različnih potencialnih protigiraznih učinkovin je pokazalo, da bolj polarne, vodotopne učinkovine z manjšo lipofilnostjo, povečano skupno polarno površino in molekulsko maso blizu vendar ne več kot 600 Da, bolje inhibirajo Gram negativne bakterije. (19) Manjša možnost efluksa se je pokazala pri učinkovinah, ki so manjše – velika okoli 400 Da. (19)

Nobena od razvitih učinkovin proti GyrB še ni v klinični uporabi, razen novobiocina, ki je bil umaknjen iz trga, zaradi nizke biološke uporabnosti in topnosti ter zaradi neželenih učinkov (8, 14)

Brvar M. in sodelavci so odkrili spojino zadetek 4-((4'-metil-2'-propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il)amino)benzojsko kislino (**IIa**), ki so ji z biološkim testiranjem določili $IC_{50}=1,1\pm0,2\ \mu M$. Kristalna struktura te molekule encimu DNK giraze *E. coli* je prosto dostopna v PDB bazi z oznako 4DUH (slika 10). (21)

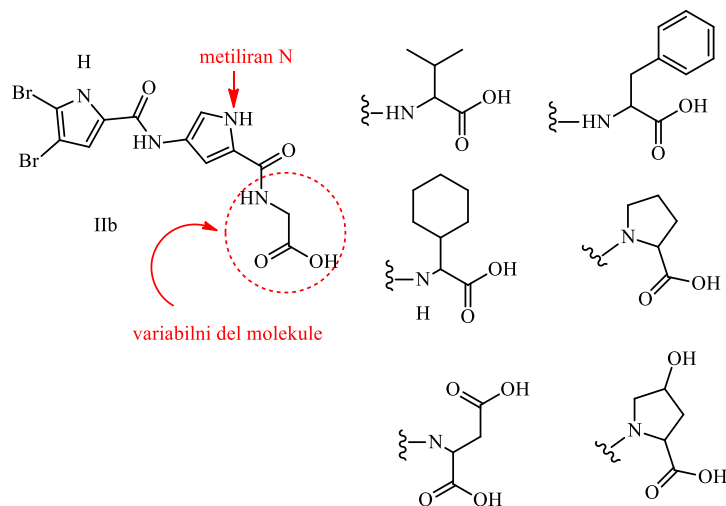


Slika 10: 2D shema interakcij spojine **IIa** v ATP vezavnem mestu GyrB

Na *sliki 9* so prikazane pomembne interakcije, ki jih omogočata Arg136 in Asp73. Interakcije v tem primeru tvori tudi Gly101. Pri hidrofobnih interakcijah naj bi pomembno vlogo igrali Val43, Val 71 in Val120, ki predstavljajo hidrofobni žep encima. Na sliki žal ni prikazana molekula vode (oznaka W1001), ki tudi igra pomembno vlogo pri umeščanju giraznih zaviralcev v aktivno mesto encima. (20)

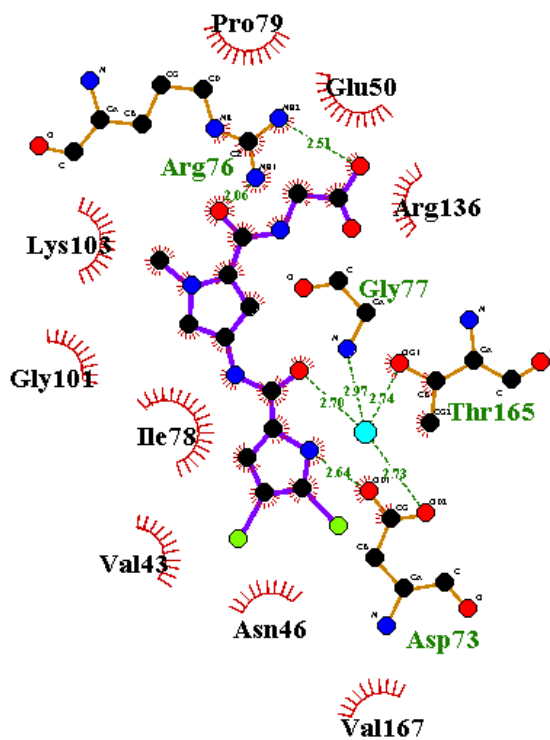
2. NAMEN IN NAČRT DELA

Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani so sintetizirali novo spojino **I**II**b**, ki spada v kategorijo pirolamidnih zaviralcev (slika 11) in so ji določili $IC_{50}=61,3 \mu M$ na giraznem encimu *E. coli*.

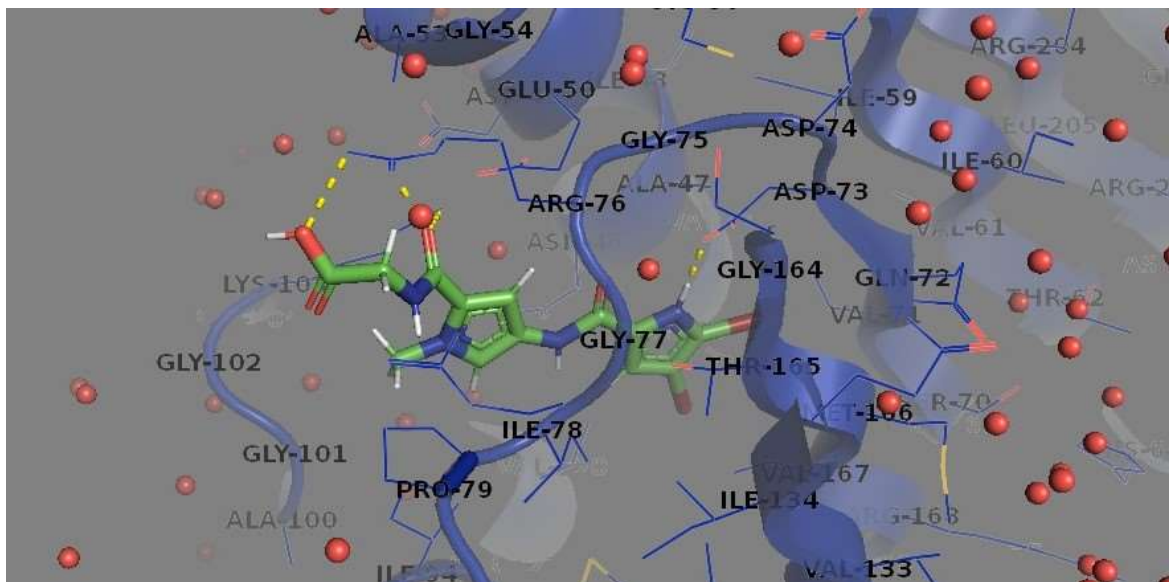


Slika 11: Spojina **I**II**b** in njene spremembe z načrtovanimi aminokislinami.

Ker smo želeli zaviralno aktivnost spojine **I**II**b** še povečati, smo se odločili, da bomo to poskusili s spremembo glicinskega dela molekule. Obdržali bomo dibromopirrolni fragment, ki se je s stališča hidrofobnih interakcij izkazal za ugodnega, saj atomi broma interagirajo s hidrofobnim žepom (Val43, Ile78). Pirolni dušik preko vodikovih vezi interagira z Asp73, medtem ko karboksilna skupina amidne vezi interagira z molekulo vode, ki je tudi vidna na sliki 11. Dodali bomo še metilno skupino na dušiku drugega pirolnega obroča, ki najverjetneje tvori hidrofobne interakcije z Lys 103. Kot je vidno na glicinskem derivatu tvorita karboksamidni in karboksilni funkcionalni skupini pomembne interakcije z Arg76.



Slika 12: 2D shema interakcij spojine **IIb** z ATP vezavnim mestom GyrB.

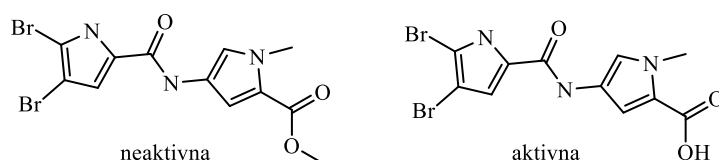


Slika 13: 3D slika molekularnega sidranja spojine **IIb** v ATP vezavno mesto GyrB.

Naša hipoteza je, da lahko s spreminjanjem glicinskega dela molekule in zamenjavo z drugimi aminokislinskimi predstavniki izboljšamo biološko aktivnost. Pri tem bomo

poskusili vgraditi polarne in nepolarne aminokisline in tako poskusili izboljšati hidrofozne interakcije, interakcije preko vodikovih vezi in tudi kation- π interakcije.

Eva Shannon Shiffrer je v svoji magistrski nalogi sintetizirala in biološko ovrednotila 4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino in njen metilni ester (slika 14). Pri tem je ugotovila, da metilni ester nima zaviralne aktivnosti, zato bomo tudi mi biološko testirali spojine s prostimi karboksilnimi kislinami. Aktivna spojina ima zaviralno aktivnost z $IC_{50} \sim 150 \mu M$. (22)



Slika 14: Primerjava aktivnosti karboksilne kisline in metilnega estra.

Literaturni podatki nakazujejo, da fleksibilnost molekule poveča možnosti za širokospektralnost, zato molekul ne bomo rigidizirali (npr. s ciklizacijo). Spojine bomo poskušali sintetizirati po dveh različnih sinteznih poteh, da ugotovimo ali je katera od poti s stališča čistosti in večjega izkoristka končnih spojin boljša. Pri prvi sintezni poti bomo izhajali iz že prej sintetiziranega metil 4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksilata, ki ga bomo najprej pretvorili v karboksilno kislino, nato pa bomo s sklopitvenimi reakcijami pripenjali različne aminokisline. Opazovali bomo ali različni sklopitveni reagenti vplivajo na uspešnost poteka reakcije. Na koncu bomo metilni ester hidrolizirali do karboksilnih kislin, ki jih bomo nato ovrednotili na izoliranem encimu GyrB (glej shemo sintezne poti 1, stran 22). Pri drugi sintezni poti bomo izhajali iz *N*-metilpirola, ki mu bomo najprej pripenjali različne aminokisline in šele v zadnji stopnji dodali bromopirolni fragment (glej shemo sintezne poti 2, stran 23). Primerjali bomo izkoristke reakcij in čistost končni spojin po prvi in drugi sintezni poti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Uporabljali smo reagente in topila proizvajalcev Merck, Fluka, Sigma-Aldrich in Acros Organics. Brezvodni diklorometan in tetrahidrofuran smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi. Brezvodni DMF je bila predhodno pripravljen in hranjen z molekularnimi siti.

3.2 Metode

TLC: za razvijanje TLC ploščic za spremljanje poteka reakcij smo uporabili TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminijaste plošče (0,25 mm) proizvajalca Merck. Za detekcijo smo uporabili UV svetlobo ($\lambda=254$ nm). Nekatere razvite TLC plošče smo orosili z reagenti ninhidrin in bromkrezol zeleno.

Kolonska kromatografija: Skoraj vse spojine smo dodatno čistili s kolonsko kromatografijo pri čemer smo za stacionarno fazo uporabili silikagel s premerom delcev 0,040 – 0,063 nm proizvajalca Merck. Reverznofazno kolonsko kromatografijo smo izvajali z instrumentom Biotage Isolera Prime z UV detektorjem ($\lambda=254$ nm).

Sušenje: Spojine smo dodatno sušili s pomočjo membranske vakuumske črpalke Cacuubrand MZ2C ter peči Büchi Glass Oven B-580 s segrevanjem pri 37°C.

Jedrsko magnetna resonanca (NMR): NMR ^1H in ^{13}C spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo na spektrometru Bruker Advance III 400 MHz. Vzorci so bili raztopljeni v devteriranih topilih DMSO, metanol in diklorometan. Za interni standard smo uporabili TMS. Spektre smo obdelali s programom NMRNotebook 2.70 in programom MestReNova.

Infrardeča spektroskopija (IR): IR spektre smo posneli na Nexus FT-IR z ATR tehniko na Fakulteti za farmacijo Ljubljana.

Masna spektroskopija (MS): Masne spektre HRMS so posneli na Inštitutu Jožefa Stefana v centru za masno spektrometrijo na masnem spektrometru Watters Micromass Q-TOF Premier. Masne spektre ESI smo posneli na Fakulteti za farmacijo Ljubljana na masnem spektrometru Advion expression CMSL.

Temperatura tališča: Tališča smo določali na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Ljubljana.

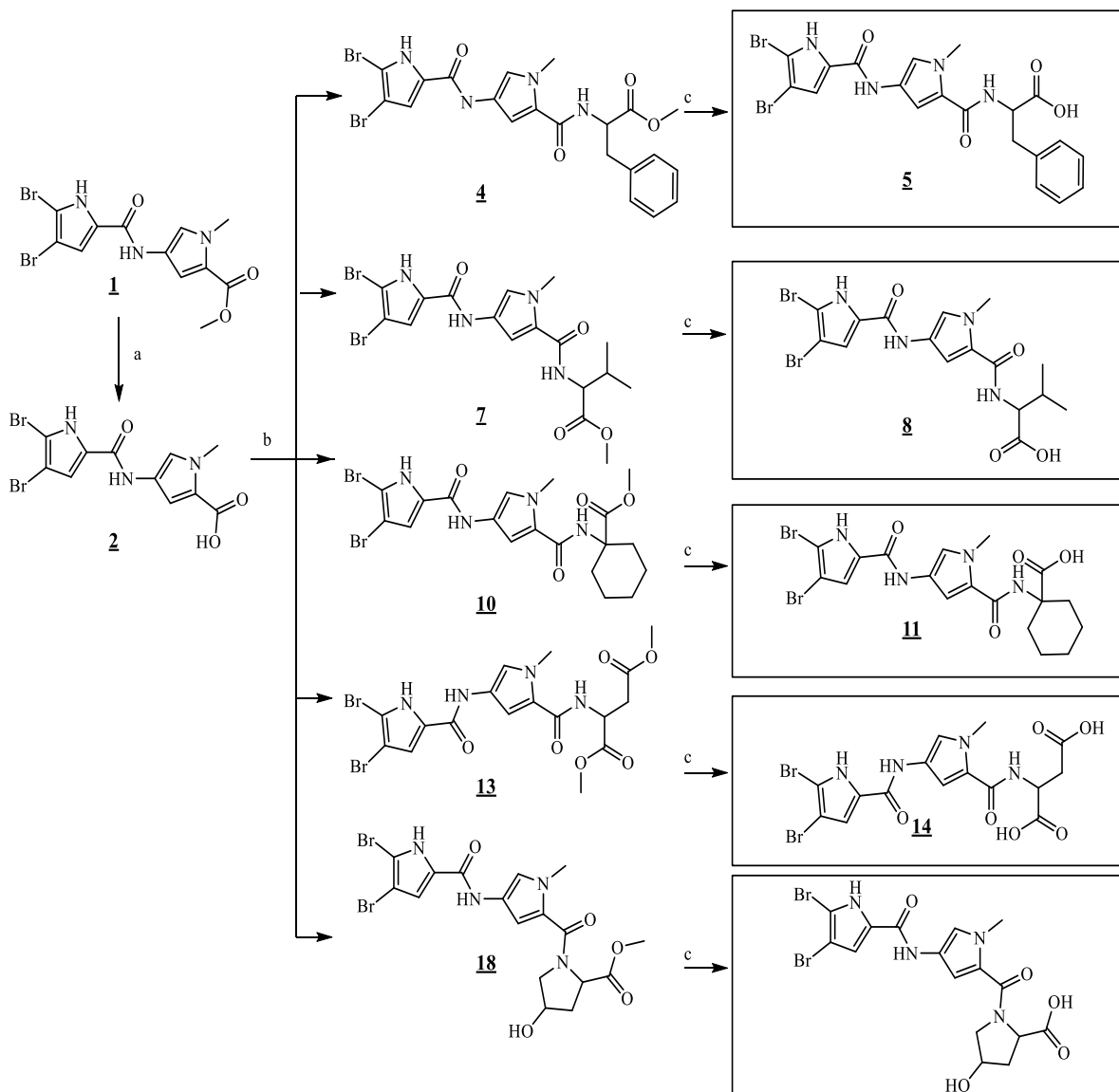
Optična sučnost: Optična sučnost je bila izmerjena s polarimetrom Perkin-Elmer 241 MC na fakulteti za farmacijo Ljubljana z natrijevo žarnico pri 580 nm in živosrebrovo žarnico pri 436, temperaturi 20°C in dolžini kivet 1 dm.

Biološko testiranje: Testiranje in določevanje zaviralne aktivnosti končni spojini na E.coli je bilo izvedeno na Fakulteti za farmacijo Ljubljana z Microplate Assay Kit podjetja Inspiralis.

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 15.1 proizvajalca CambridgeSoft. Za sidranje spojin v vezavno mesto encima giraze B E.coli (oznaka 4DUH) smo uporabili programski paket OpenEye.. Za prikaz 2D shem spojin in interakcij z vezavnim mestom smo uporabili program LigPlus, ki ga je razvil Evropski Bioinformacijski Inštitut, za prikaz 3D interakcij z vezavnim mestom pa program PyMOL proizvajalca Schrodinger.

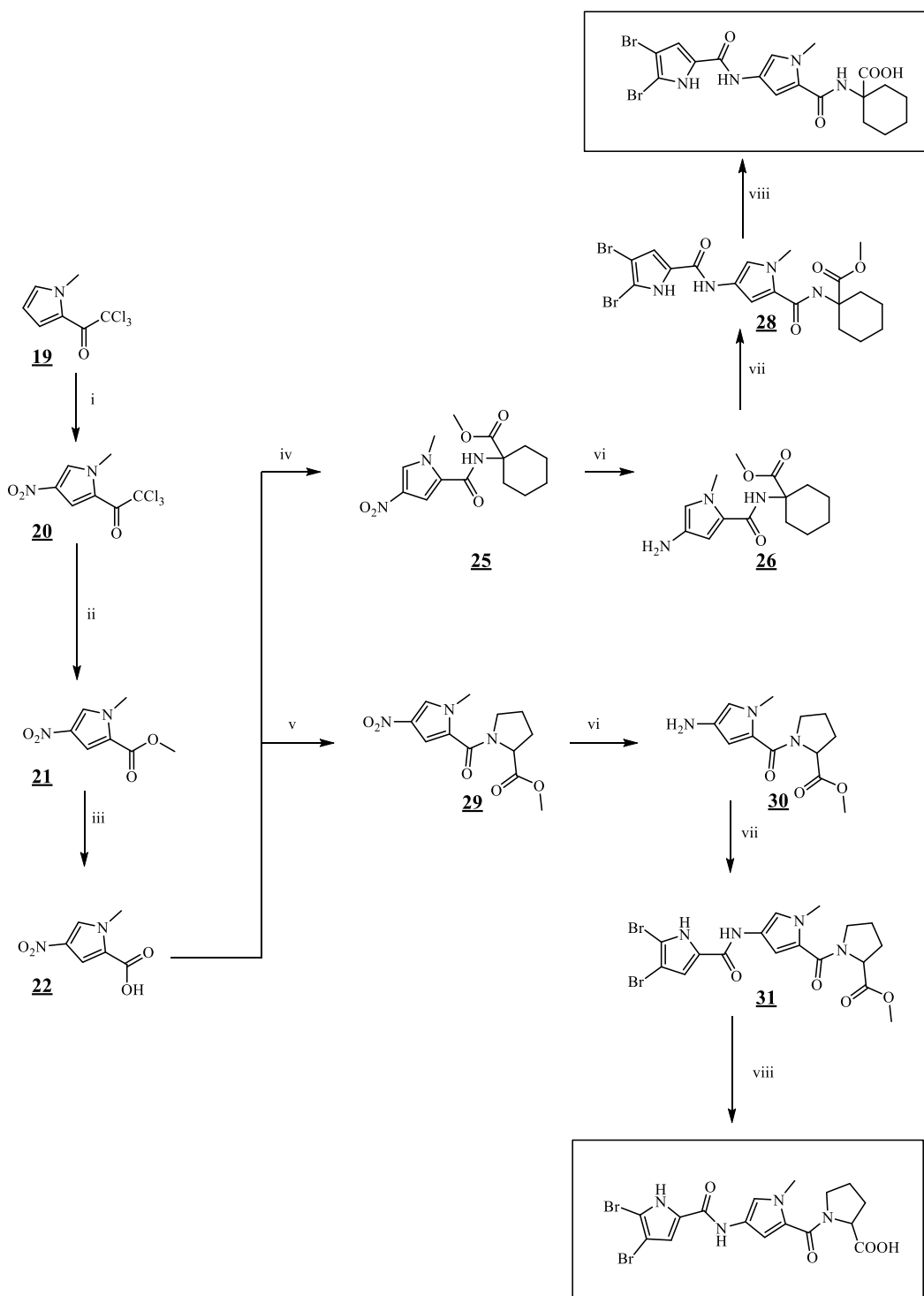
4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Shema sintezne poti 1



Reagenti in reakcijski pogoji: (a) 1M NaOH/dioksan, 25 °C, (b) EDC, HoBt/DMF, CH₂Cl₂, trietilamin ali TBTU/DMF, trietilamin, od 0 °C do 25 °C (c) LiOH/THF, 25 °C.

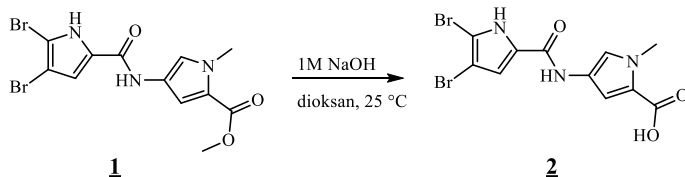
4.2 Shema sintezne poti 2



Reagenti in reakcijski pogoji: (i) HNO_3 konc./ Ac_2O , $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (ii) NaOMe/MeOH , $0\text{ }^\circ\text{C}$ (iii) HCl konc. (iv) metil 1-aminocikloheksankarboksilat, EDC, HoBT/DMF, CH_2Cl_2 , od $0\text{ }^\circ\text{C}$ do $25\text{ }^\circ\text{C}$ (v) metil pirolidin-2-karboksilat, EDC, HoBT/DMF, CH_2Cl_2 , od $0\text{ }^\circ\text{C}$ do $25\text{ }^\circ\text{C}$ (vi) H_2 , Pd/C, $25\text{ }^\circ\text{C}$ (vii) 4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilna kislina, EDC, HoBT/DMF, CH_2Cl_2 , od $0\text{ }^\circ\text{C}$ do $25\text{ }^\circ\text{C}$ (viii) LiOH/THF , $25\text{ }^\circ\text{C}$

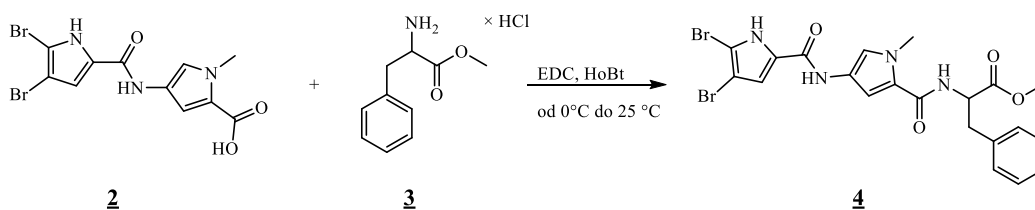
4.3 Sintezna pot 1

4.3.1 Sinteza 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksilne kisline



673 mg (1,66 mmol) spojine **1** raztopimo v mešanici 1M NaOH/dioksan=1:1 in mešamo 24 ur pri sobni temperaturi. Po 24 urah odparimo dioksan in nakisamo raztopino s koncentrirano HCl do pH=2. Izpade 500 mg rjavih kristalov, ki jih odfiltriramo in posušimo v prisotnosti fosforjevega pentoksida (**2**) (77 %) **Tališče:** 170-185 °C

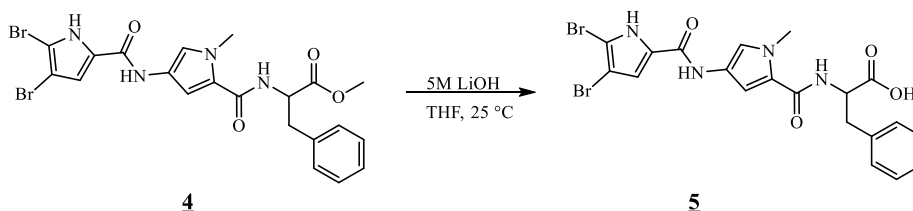
4.3.2 Sinteza 4,5-dibromo-N-(1-metil-5-((1-(metilperoksi)-3-fenilpropan-2-il)karbamoyl)-1H-pirol-3-il)-1H-pirol-2-karboksamida



204 mg (0,52 mmol) spojine **2**, 135 mg (0,63 mmol, 1,2 ekv.) L-fenilalanina in 70 mg (0,52 mmol, 1 ekv.) HoBt raztopimo v 5 mL DMF. Raztopino ohladimo na ledeni kopeli in po pol ure dodamo še 217 μL (1,56 mmol, 3 ekv.) trietilamina in 121 mg EDC (0,63 mmol, 1,2 ekv.). Mešamo pri sobni temperaturi 24 ur. Iz reakcijske zmesi nato uparimo DMF. Trdno reakcijsko mešanico raztopimo v 20 mL etilacetata in ekstrahiramo z 2x10 mL citronske kisline, 1x10 mL NaHCO_3 in 1x10 mL NaCl. Uparimo etilacetat in dobimo 145 mg svetlo rjavih kristalov spojine **4**. (53 %) **Tališče:** 109-112°C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.78 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-NH), 9.96 (s, 1H, CO-NH), 8.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CO-NH), 7.32 – 7.21 (m, 5H, Ph-H), 7.21 – 7.16 (m, 1H, pirol-H-5), 7.11 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-H-3'), 6.87 (d, $J = 1.9$ Hz, pirol-H-3), 3.73 (s, 3H, COO-CH₃), 3.66 (s, 3H, N-CH₃), 4.57 (ddd, $J = 10.2, 7.9, 5.1$ Hz, 1H, Bz-CH₂-NH), 3.14 – 3.04 (m, 2H, Ph-CH₂-CH) ppm. **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 161.07, 155.94, 138.34, 129.05, 128.11, 128.04, 126.26, 122.42, 121.38, 118.33, 112.86, 104.99, 104.51, 97.95, 53.54,

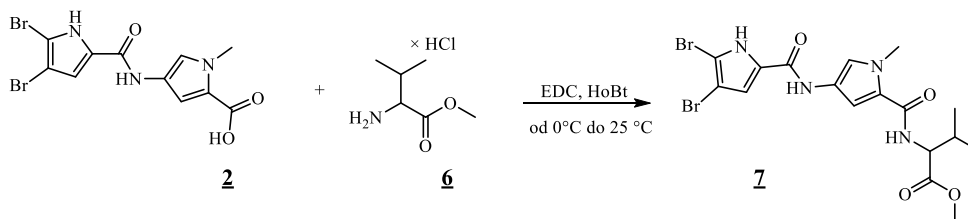
36.07 ppm. **IR(ATR):** ν 3125.63, 2951.16, 1730.37, 1633.73, 1576.96, 1508.94, 1406.27, 1313.15, 1212.17, 1149.99, 1010.96, 987.58, 972.46, 914.53, 814.71, 743.12, 698.94, 662.56 cm^{-1} . **MS (ESI):** m/z = 549,1 ($[\text{M-H}]^-$, 50), 551,2 ($[(\text{M-H})+2]^-$, 100), 553,14 ($[(\text{M-H})+4]^-$, 50). **HRMS** izračunano za $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M-H}]^-$ (m/z): 548,9773; izmerjena vrednost: 548,9771. $[\alpha]_{\text{D}} = -59,6^\circ$ (c 0,25, MeOH)

4.3.3 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanojske kisline



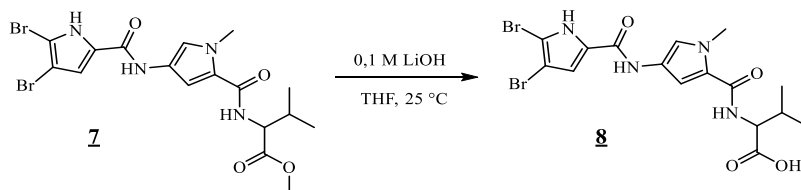
95 mg (0,17 mmol) spojine **4** raztopimo v 3 mL THF in ob mešanju na sobni temperaturi dodamo še 16 mg LiOH raztopljenega v 3 mL destilirane vode, da dobimo 5M LiOH. Po 2 urah reakcija še ni potekla do konca, zato pustimo reakcijo potekati 24 ur. Iz reakcijske mešanice odparimo THF in nato nakisamo s koncentrirano HCl do pH=2. Izpade 31 mg svetlo rjavih kristalov spojine **5**, ki jih odfiltriramo. Opazimo, da je še nekaj spojine ostalo v matičnici, zato matičnico ekstrahiramo z etilacetatom in zopet nakisamo s koncentrirano HCl. Izpade še dodatnih 63 mg svetlo rjavih kristalov spojine **5**. (102 %) **Tališče:** 144-145 °C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.78 (s, 1H, COOH), 9.96 (s, 1H, pirol-NH), 8.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CO-NH), 7.35 – 7.23 (m, 4H, Ph-H), 7.11 (d, J = 2.5 Hz, 1H, Ph-H), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-5) 7.11 (d, J = 2.5 Hz, 1H, pirol-H-3'), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-3), 4.57 – 4.46 (m, 1H, Bz-CH-NH), 3.73 (s, 3H, N-CH₃), 3.16 – 2.99 (m, 2H, Ph-CH₂-CH) ppm. **^{13}C NMR** (100 MHz, metanol- d_4) δ 175.07, 163.71, 158.80, 138.73, 130.36, 130.25, 128.96, 127.80, 124.35, 122.91, 120.73, 114.26, 106.37, 106.30, 100.09, 54.92, 38.35, 36.67 ppm. **IR(ATR):** ν 3333.61, 3125.25, 2953.00, 1710.97, 1632.72, 1593.32, 1531.06, 1497.66, 1417.87, 1358.50, 1319.90, 1319.90, 1291.85, 1190.51, 1147.51, 1013.47, 987.89, 973.94, 853.19, 818.48, 782.38, 738.31, 696.37, 657.40, 630.69 cm^{-1} . **HRMS** izračunano za $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M-H}]^-$ (m/z): 534.9617; izmerjena vrednost: 534.9611 $[\alpha]_{\text{D}} = +74,2^\circ$ (c 0,22, MeOH)

4.3.4 Sinteza metil 2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanoata



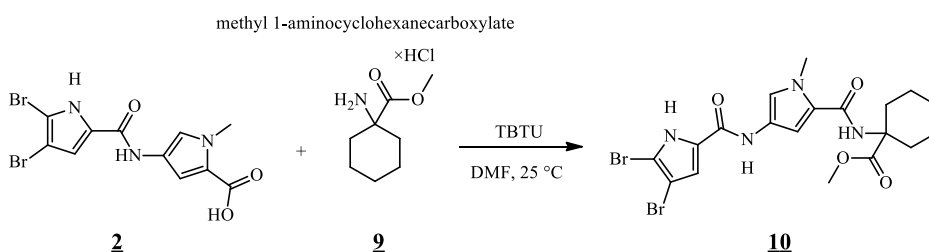
204 mg (0,52 mmol) spojine **2**, 105 mg (0,63 mmol) spojine **6** in 70 mg (0,52 mmol, 1 ekv.) HoBt raztopimo v 2,5 mL DMF 2,5 mL CH₂Cl₂. Reakcijsko zmes ohladimo v ledeni kopeli in po pol ure dodamo še 121 mg (0,63 mmol, 1,2 ekv.) EDC in 217 µL (3 ekv.) trietilamina. Po 24 urah odparimo DMF in reakcijsko zmes raztopimo v 20 mL etilacetata. Raztopino ekstrahiramo z 2x10 mL citronske kisline, 1x10 mL NaHCO₃ in 1x10 mL etilacetata. Etilacetat sušimo z natrijevim sulfatom, odfiltriramo natrijev sulfat in odparimo etilacetat. Končno spojino (**7**) še dodatno čistimo s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo etilacetat:heksan=1:1. Dobimo 96 mg oranžnih kristalov. (37 %) **Tališče**: 100-103°C. **¹H NMR** (400 MHz, metanol-d₄) δ 7.22 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-5), 6.95 (s, 1H, pirol-H-3'), 6.92 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-3), 4.43 (dd, J = 8.4, 6.8 Hz, 1H, NH-CH-COOH), 3.85 (s, 3H, pirol-CH₃), 3.76 (s, 3H, COO-CH₃), 2.22 (hept, J = 6.8 Hz, 1H, CH₃-CH-CH₃), 1.02 (t, J = 6.6 Hz, 6H, CH₃-CH-CH₃) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, metanol-d₄) δ 174.08, 164.08, 158.84, 128.96, 124.22, 122.95, 120.85, 114.26, 106.72, 106.40, 100.10, 59.31, 52.52, 36.74, 32.78, 19.66 ppm. **IR(ATR)**: ν 3125.28, 2959.74, 1727.50, 1633.19, 1577.67, 1510.12, 1463.66, 1434.95, 1406.57, 1311.76, 1205.60, 1152.92, 1010.12, 972.47, 819.37, 776.01, 748.48, 666.29, 615.57 cm⁻¹. **MS (ESI)**: m/z = 501,2 ([M-H]⁻, 50), 503,2 ([M-H+2]⁻, 100), 505,1 ([M-H+4]⁻, 50). **HRMS** izračunano za C₁₆H₁₇Br₂N₄O₄ [M-H]⁻ (m/z): 486,9617; izmerjena vrednost: 486,9604. **[α]_D** = +15,3° (c 0,29, MeOH)

4.3.5 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanojske kisline



60 mg (0,12 mmol) spojine **7** dodamo 3,5 mL 0,1M LiOH in 3,5 mL THF. Po 24 urah ugotovimo, da hidroliza še ni potekla do konca, zato dodamo še 1,5 mL 0,1M LiOH. Po skupno 48 urah odparimo THF, dodamo koncentrirano HCl do nevtralizacije in sušimo do suhega. Dodamo 2 mL ohlajene destilirane vode in postavimo reakcijsko zmes za 1 uro v hladilnik. Izpadlo oborino odfiltriramo in sušimo. Dobimo 40 mg oranžno-rjavih kristalov (**8**). (69 %) **Tališče**: 140-141 °C. **¹H NMR** (400 MHz, metanol-*d*₄) δ 7.12 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-3), 6.86 (s, 1H, pirol-H-3'), 6.85 – 6.76 (m, 1H, pirol-H-5), 3.74 (s, 3H, pirol-N-CH₃), 3.67 – 3.59 (m, 1H NH-CH-COOH), 2.22 – 2.09 (m, 1H, CH₃-CH-CH₃), 0.93 (dd, *J* = 6.8, 1.0 Hz, 6H, CH₃-CH-CH₃) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, metanol-*d*₄) δ 175.19, 164.02, 158.83, 128.97, 124.39, 122.95, 120.74, 114.24, 106.49, 106.38, 100.08, 58.96, 36.71, 26.51, 19.73, 18.75. **IR(ATR)**: ν 3125.93, 2960.57, 1707.61, 1637.33, 1577.88, 1508.74, 1465.52, 1311.38, 1201.31, 1149.83, 1010.40, 987.19, 972.19, 867.60, 810.41, 776.17, 745.61, 702.54, 681.11, 615.14 cm⁻¹. **HRMS** izračunano za C₁₇H₁₉Br₂N₄O₄ [M-H]⁻ (*m/z*): 500,9765; izmerjena vrednost: 500,9773. [α]_D = +18,0 ° (c 0,31, MeOH)

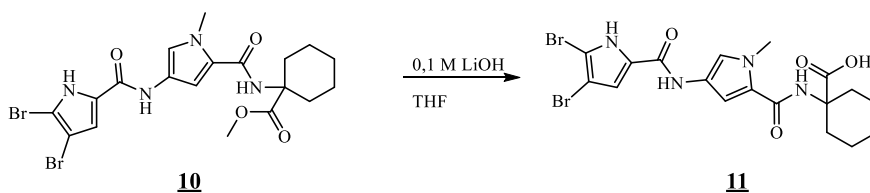
4.3.6 Sinteza metil 1-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)cikloheksankarboksilata



200 mg (0,51 mmol) spojine **2** raztopimo v 5 ml DMF, ohladimo na ledeni kopeli in prepihavamo z argonom. Po 10 minutah dodamo TBTU (1,2 ekv., 197 mg), počakamo na aktivacijo kisline ter nato dodamo še 213 µL baze (3 ekv.) 119 mg (1,2 ekv., 0,61 mmol) spojine **9**. Reakcijo pustimo potekati na sobni temperaturi 24 ur. TLC razvijemo v mobilni

fazi etilacetat:heksan=1:1. Uparimo DMF in trdno oborino raztopimo v približno 5 mL diklorometana in naredimo suhi nanos spojine na silikagelu. Tako reakcijsko zmes brez predhodne ekstrakcije čistimo s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo heksan:etilacetat=1:1. Po uparevanju topila dobimo 35 mg čistejše spojine in 25 mg manj čiste končne spojine – skupno torej 60 mg svetlo rjavih kristalov (**10**). (22 %) **Tališče**: 119-120 °C. **¹H NMR** (400 MHz, metanol-d₄) δ 7.19 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-3), 6.95 (s, 1H, pirol-H-3'), 6.88 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-5), 3.81 (s, 3H, pirol-N-CH₃), 3.71 (s, 3H, COO-CH₃), 2.12 (d, J = 13.4 Hz, 2H, cikloheksil-CH), 1.92 (ddd, J = 13.9, 10.2, 4.0 Hz, 2H, cikloheksil-CH), 1.68 – 1.57 (m, 5H, cikloheksil-CH), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 1H, cikloheksil-CH) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, metanol-d₄) δ 176.86, 163.87, 158.84, 128.98, 124.73, 122.83, 120.48, 114.23, 106.82, 106.39, 100.09, 60.17, 52.64, 36.56, 33.60, 26.53, 22.78 ppm. **IR(ATR)**: ν 3119.36, 2948.00, 1655.02, 1586.13, 1517.64, 1433.29, 1410.70, 1319.15, 1187.74, 1142.22, 1101.75, 1045.65, 1010.86, 971.50, 812.44, 746.80, 726.23, 698.59, 611.46 cm⁻¹. **HRMS** izračunano za C₁₉H₂₁Br₂N₄O₄ [M-H]⁻ (m/z): 526.9930; izmerjena vrednost: 526.9944. [α]_D = +2,5 ° (c 0,28, MeOH)

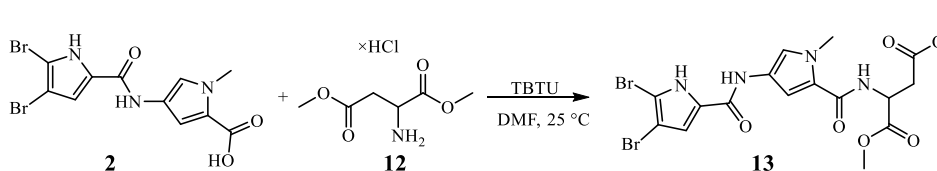
4.3.7 Sinteza 1-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)cikloheksankarboksilne kisline



50 mg (0,09 mmol) spojine **10** raztopimo v 5 mL THF in nato dodamo 5 mL 0,1M LiOH ter mešamo 24 ur pri sobni temperaturi. Ker po 24 urah hidroliza ne poteče do konca, dodamo še 3,5 mL LiOH. Po 48 urah odparimo THF, nakisamo raztopino s koncentrirano klorovodikovo kislino do nevtralnosti in odfiltriramo oborino. Dobimo približno 20 mg nečistih svetlo rjavih kristalov (41 %). Ker je bila spojina 11 še vedno preveč nečista za biološka testiranja smo se odločili, da ponovno naredimo kolono. Tokrat smo spojino adsorbirali na silikagel s pomočjo metanola nato pa kolono spirali z etilacetatom in heksanom v razmerju 1:1 z dodatkom 3% očetne kisline. Vendar smo žal s kolono izgubili skoraj ves produkt (**11**). **Tališče**: 203-206 °C. **¹H NMR** (400 MHz, metanol-d₄) δ 7.19 (d, J = 1.8 Hz, 1H, pirol-H-3), 6.96 (d, J = 2.9 Hz, 1H, pirol-H-3'), 6.88 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-H-5), 3.83 (s, 3H, pirol-N-CH₃), 2.19 (d, J = 13.8 Hz, 2H, cikloheksil-CH), 1.92 (ddd,

$J = 13.9, 10.2, 4.0$ Hz, 2H, cikloheksil-CH), 1.68 – 1.57 (m, 5H, cikloheksil-CH), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, cikloheksil-CH) ppm. **IR(ATR):** ν 3125.68, 2936.64, 2858.09, 1708.59, 1636.27, 1587.23, 1516.20, 1414.63, 1318.70, 1269.03, 1231.91, 1160.48, 1140.23, 1061.16, 1011.43, 987.64, 972.711, 915.19, 826.56, 780.44, 744.95, 676.30, 613.09 cm^{-1} . **HRMS** izračunano za $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z): 512,9777; izmerjena vrednost: 512,9773.

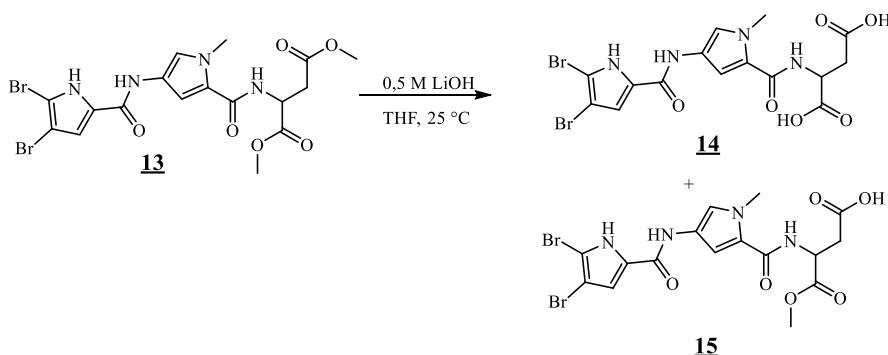
4.3.8 Sinteza dimetil 2-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)sukcinata



200 mg (0,51 mmol) spojine **2** raztopimo v 5 mL DMF, raztopino ohladimo na ledeni kopeli in prepihujemo z argonom. Po 10 minutah dodamo TBTU (197 mg, 0,61 mmol, 1,2 ekv.), počakamo na aktivacijo karboksilne kisline in na koncu dodamo še 213 μL (3 ekv.) baze ter 156 mg (1,2 ekv., 0,61 mmol) mg spojine **12**. Reakcijo pustimo potekati 24 ur pri sobni temperaturi. Po 24 urah izdelamo TLC z mobilno fazo heksan:etilacetat=1:1. Uparimo DMF in oborino raztopimo v 10 mL etilacetata. Raztopino ekstrahiramo z 2x10 mL citronske kisline, 2x10 mL NaHCO_3 in 2x10 mL NaCl. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 . Odparimo etilacetat in dobimo 170 mg nečistega končnega produkta. Zaradi nečistosti spojine naredimo še kolono. Pri tem uporabimo gradientno eluiranje pri čemer se mobilna faza spreminja iz heksan:etilacetat=1:1 v prid etilacetata. Dobimo 90 mg svetlo rjavih kristalov spojine **13**. (33 %) **Tališče:** 82-86 °C. **^1H NMR** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.78 (s, 1H, pirol-NH), 9.95 (s, 1H, CO-NH), 8.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, CO-NH), 7.24 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, pirol-H-3), 7.09 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-H-3'), 6.88 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, pirol-H-5), 4.76 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, Asp-CH), 3.80 (s, 3H, Asp-CH₃), 3.65 (s, 3H, pirol-N-CH₃), 3.62 (s, 3H, Asp-CH₃), 2.93 (dd, $J = 16.3, 6.2$ Hz, 1H, Asp-CH₂), 2.85 – 2.74 (m, 1H, Asp-CH₂) ppm. **^{13}C NMR** (100 MHz, metanol- d_4) δ 173.04, 172.79, 163.62, 158.80, 128.96, 123.92, 123.05, 121.04, 114.29, 106.58, 106.41, 100.11, 53.13, 52.53, 50.26, 36.88 ppm. **IR(ATR):** ν 3179.73, 2952.72, 2855.44, 1732.86, 1641.61, 1517.61, 1435.96, 1409.06, 1287.85, 1078.71, 1005.43, 971.65, 804.25, 780.46, 749.62, 687.22, 625.50 cm^{-1} .

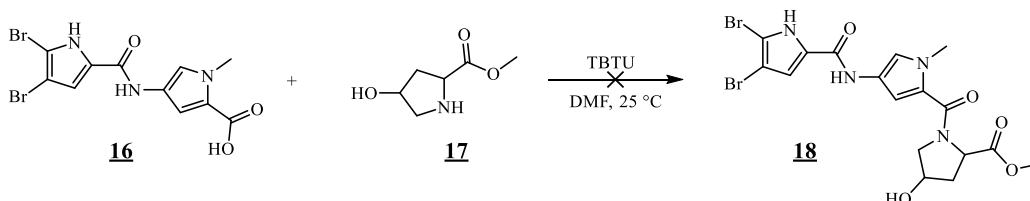
HRMS izračunano za $C_{17}H_{17}Br_2N_4O_6$ $[M-H]^-$ (m/z): 530,9502; izmerjena vrednost: 530,9515. $[\alpha]_D^{20} = +7,62^\circ$ ($c = 0,302$ g/100ml, MeOH)

4.3.9 Sinteza 2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)sukcinatne kisline



60 mg (0,12 mmol) spojine **13** raztopimo v 1 mL THF in dodamo približno 1,1 mL 0,5M LiOH. Po 24 urah nam TLC pokaže, da je hidroliza potekla do konca (MF: diklorometan:metanol=7:1+1% CH_3COOH). Predhodno smo spojino **26** hidrolizirali v manjši količini. Reakcijsko zmes manjše količine smo ekstrahirali z 1M HCl in 4x10 mL etilacetata. Po sušenju organske faze smo dobili 10 mg še vedno nečiste spojine. Zato smo reakcijsko zmes večje količine nakisali s koncentrirano HCl in odparili topilu. Po odparevanju topila je spojina postala zelo težko topna v vodi, zato smo jo raztopili v metanolu. Raztopino smo nato čistili z reverznofazno kolonsko kromatografijo v mobilni fazi acetonitril:voda z gradientnim eluiranjem. Kasneje smo ob spremljanju izolere ugotovili, da bi bila najprimernejša mobilna faza za čiščenje spojine 27 in 28 acetonitril:voda=3:2. Izolirali smo 6 mg čistih kristalov spojine **14** in **15**. (10 %) **Tališče**: 208-211 °C. 1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ 7.25 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, pirol-H-5), 6.96 (s, 1H, pirol-H-3'), 6.91 – 6.80 (m, 1H, pirol-H-3), 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, asparaginska kislina-CH), 3.89 (s, 3H, pirol-N-CH₃), 3.09 – 2.75 (m, 2H, asparaginska kislina-CH₂) ppm [pri 3,68 ppm vrh z integracijo 1 bi lahko predstavljal derivat asparaginske kisline, kjer je metilirana ena od karboksilnih kislin – razmerje karboksilna kislina:ester=3:1]. ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ 163.63, 158.80, 128.99, 124.19, 123.02, 120.89, 114.25, 106.35, 106.31, 100.08, 36.83 ppm. **IR(ATR)**: ν 3325.93, 2928.30, 1638.35, 1530.64, 1398.12, 1190.26, 1074.05, 815.48, 770.33, 627.17 cm^{-1} . $[\alpha]_{436}^{20} = +245,2^\circ$ (c 0,26, MeOH)

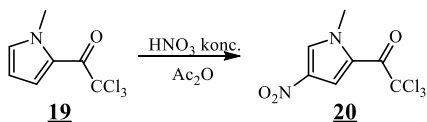
4.3.10 Poskus sinteze metil 1-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karbonil)-4-hidroksipirolidin-2-karboksilata



210 mg (0,54 mmol) spojine **16** raztopimo v 5 ml DMF, ohladimo na ledeni kopeli in preprihavamo z argonom. Po 10 minutah dodamo TBTU (1,2 ekv., 208 mg, 0,65), počakamo na aktivacijo kisline ter nato dodamo še 226 μ L baze (3 ekv.) 94 mg (1,2 ekv., 0,65 mmol) spojine **17**. Reakcijo pustimo potekati na sobni temperaturi 24 ur. TLC razvijemo v mobilni fazi etilacetat:heksan=1:1. Uparimo DMF in trdni oborini dodamo etilacetat, vendar se reakcijska zmes ni raztopila, zato etilacetat odparimo. Trdni zmes nato dodamo diklorometan, v kateri je reakcijska zmes delno topna – izpade oborina. Nastalo oborino odfiltriramo in čistimo s prekristalizacijo tako, da metanolno raztopino kapljamo v etilacetat ob mešanju. Nastalo oborino ohladimo ter oborino prefiltriramo, vendar pa NMR analiza ne pokaže želene spojine, zato predvidevamo, da reakcija ni potekla.

4.4 Sintezna pot 2

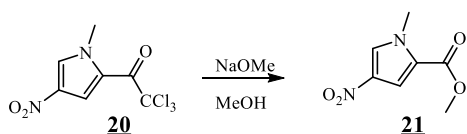
4.4.1 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(1-metil-4-nitro-1*H*-pirol-2-il)etanona



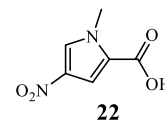
Spojino **19** (8,1 g, 35,76 mmol) raztopimo v približno 34 mL acetanhidrida. Reakcijsko zmes ohladimo na -20 °C ter v brezvodni atmosferi (s pomočjo klorkalcijeve cevke) počasi dodajamo 6 mL 65% HNO₃. Mešamo dve uri in nato še eno uro pri sobni temperaturi. Nato ohladimo 40 mL izopropanola na -20 °C in ga dodamo k reakcijski zmesi. Izpade približno 1 g oborine, veliko spojine pa je ostalo še v matičnici. Matičnici dodamo 200 mL vode in ekstrahiramo z 2-krat po 100 mL diklorometana. Mešanico diklorometana in izopropanola skoncentriramo in adsorbiramo na silikagel. S pomočjo kolonske kromatografije (mobilna

faza je heksan:etilacetat=4:1, ki jo gradientno spreminjamo proti heksan:etilacetat=1:1) izoliramo še 3,6 g spojine **17** (47 %) **Tališče:** 130-135 °C, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.58 (dt, $J = 1.8, 0.6$ Hz, 1H, pirol-H-5), 7.81 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, pirol-H-3), 4.01 (d, $J = 0.6$ Hz, 3H, pirol-N-CH₃) ppm.

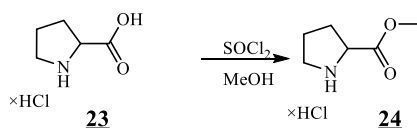
4.4.2 Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata



4,5 g (16,58 mmol) spojine **20** raztopimo v 50 mL metanola. Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli in prepihujemo z argonom. Dodamo 1,95 g trdnega natrija (82,90 mmol, 5 ekv.) in pustimo mešati 24 ur. Po 24 urah opazimo, da imamo v reakcijski zmesi še vedno izhodno spojino, zato dodamo še 2 g natrija in ponovno mešamo 24 ur. Reakcijsko zmes nato nevtraliziramo s počasnim dokapavanjem 37% HCl. Po nevtralizaciji spiramo s 6x20mL etilacetata, združene organske organske frakcije sušimo z brezvodnim natrijevim sulfatom, ki ga filtriramo in odparimo etilacetat. Ob tem dobimo 750 mg rjavih kristalov. (25 %) MS in NMR analiza nakazuje, da smo pravzaprav dobili hidrolizirano obliko (spojina **22**). **Tališče:** 190-200 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.19 (dd, $J = 2.1, 0.6$ Hz, 2H, pirol-H-5), 7.20 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, pirol-H-3), 3.92 (d, $J = 0.6$ Hz, 3H, pirol-N-CH₃) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 161.21, 133.87, 128.72, 110.79, 37.43 ppm. **IR(ATR):** ν 3138.25, 2808.39, 1696.93, 1542.80, 1499.11 1397.51, 1349.51, 1349.44, 1309.49, 1260.85, 1192.60, 1119.10, 1082.83, 846.07, 818.11, 747.64, 698.96, 602.29 cm^{-1} . **MS (ESI):** $m/z = 169,0$ ($[\text{M-H}]^-$, 100).



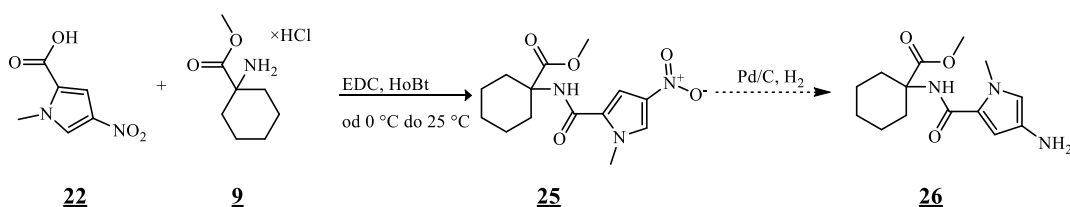
4.4.3 Sinteza metil pirolidin-2-karboksilata



1 g (6,60 mmol) prolina (**23**) raztopimo v 15 mL metanola. Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli in počasi dokapavamo 0,72 mL (5 ekv., 9,90 mmol) SOCl₂ ter mešamo še 12 ur pri sobni temperaturi. Odparimo metanol in dobimo smolnato oranžno spojino. Dodamo

50 mL dietiletra in postavimo bučko za 1 uro v ultrazvočno kopel. Mešanico nato še segrevamo z gorilno pištolo in nameščenim zračnim hladilnikom. Med samim segrevanjem in ohlajanjem na sobno temperaturo ne pride do spremembe – še vedno imamo suspendirano smolnato oranžno spojino. (546 mg, izkoristek: 64 %) (**24**) Dietileter odlijemo in odparimo ter nato nadaljujemo z naslednjo stopnjo reakcije. **Tališče:** sobna T (tekoč vzorec)

4.4.4 Poskus sinteze cikloheksilnega derivata



4.4.4.1 Sinteza metil 1-(1-metil-4-nitro-1H-pirol-2-karboksamido)cikloheksan-1-karboksilata

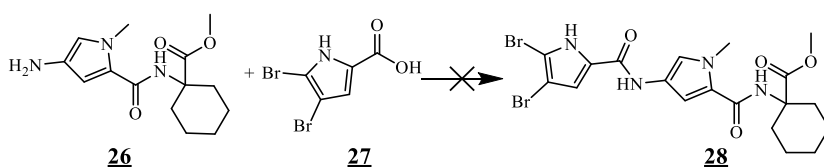
400 mg (2,35 mmol) spojine **22** poskusimo raztopiti v 6 mL diklorometana, vendar je bila spojina slabo topna, zato dodamo še 6 mL DMF. Nato dodamo 546 mg (2,82 mmol, 1,2 ek.) aminokisliline (**9**) in 318 mg (2,35 mmol, 1 ekv.) HoBt. Reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli, nato pa dodamo še 438 mg EDC (2,82 mmol, 1,2 ekv.) in 0,983 mL (3 ekv., 7,05 mmol) trietilamina. Pustimo mešati 48 ur. Iz reakcijske mešanice odparimo DMF in diklorometan in jo nato raztopljeno v etilacetat in metanolu adsorbiramo na silikagel. Reakcijsko mešanico čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza je heksan:etilacetat=1:1). Dobimo 150 mg rumenih kristalov. (21 %) (**25**) ^1H NMR (400 MHz, kloroform- d) δ 7.58 (dd, $J = 1.9, 0.6$ Hz, 1H, pirol-H-5), 7.14 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, pirol-H-3), 6.03 (s, 1H, CO-NH), 3.97 (d, $J = 0.5$ Hz, 3H, pirol-N-CH₃), 3.77 (s, 3H, COO-CH₃), 2.17 – 2.05 (m, 3H, cikloheksil-CH), 2.02 – 1.90 (m, 2H, cikloheksil-CH), 1.80 – 1.66 (m, 3H, cikloheksil-CH), 1.50 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H, cikloheksil-CH), 1.38 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, cikloheksil-CH) ppm.

4.4.4.2 Sinteza metil 1-(1-metil-4-amino-1H-pirol-2-karboksamido)cikloheksan-1-karboksilata

100 mg (0,34 mmol) spojine **25** raztopimo v 50 mL metanola. Ob mešanju raztopino 1 uro prepihavamo z argonom, nato dodamo 20 mg paladija in raztopino prepihamo še z vodikom. Po 2 urah s pomočjo TLC (mobilna faza je heksan:etilacetat=1:1) preverimo, ali

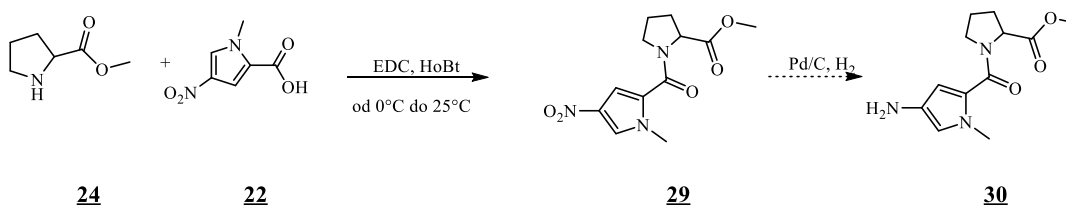
je reakcija potekla do konca. Opazili smo, da je v reakcijski zmesi še vedno veliko izhodne spojine **6**, zato smo pustili reakcijo potekati še 24 ur. Po 24 urah nismo videli izboljšanja, zato smo dodali še 50 mL THF in za konico spatule katalizatorja. Ker po 24 urah na TLC-ju vidimo še vedno prisotno izhodno spojino, dodamo še 40 mL THF in 100 mg paladija. Po nadaljnjih 24 urah odnučamo paladij in uparimo topilo. Dobimo 100 mg črno-rjave trdne spojine **26**. (111 %)

4.4.4.3 Poskus sinteze metil 1-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)cikloheksan-1-karboksilata



84 mg (0,31 mmol) spojine **27** raztopimo v 2,5 mL diklorometana in 2,5 mL DMF. Reakcijsko mešanico ohladimo na ledeni kopeli in dodamo 73 mg (0,38 mmol, 1,2 ekv.) EDC in 130 μ L (3 ekv., 0,93 mmol) trietilamina. Mešamo eno uro in nato dodamo 100 mg (0,38 mmol, 1,2 ekv.) spojine **26** in 42 mg (0,31 mmol, 1 ekv.) HoBt. Reakcijo pustimo potekati pri sobni temperaturi 24 ur. Po 24 urah vidimo na TLC (mobilna faza je heksan:etilacetat=1:2), da je reakcija potekla s slabim izkoristkom, zato dodamo še 20 mg EDC in pustimo reagirati še nadaljnjih 24 ur. Reakcijsko mešanico nato adsorbiramo na silikagel in čistim s kolonsko kromatografijo, kjer mobilno fazo etilacetat:heksan=2:1 gradientno spreminjamo v korist etilacetata. Zbiramo tri različne frakcije, vendar NMR pokaže, da nobena od frakcij ni želena spojina.

4.4.5 Poskus sinteze prolinskega derivata



4.4.5.1 Sinteza metil (1-metil-1-nitro-1H-pirol-karbonil)prolinata

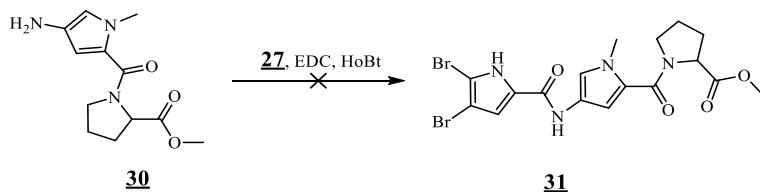
100 mg (0,77 mmol) spojine **22** raztopimo v 5 mL DMF ter dodamo 177 mg (0,92 mmol, 1,2 ekv.) EDC. Po pol ure mešanja na ledeni kopeli dodamo še 104 mg HoBt (0,77 mmol,

1 ekv.), 158 mg (1,2 ekv., 0,93 mmol) spojine **24** in 322 μ L (3 ekv., 2,31 mmol) trietilamina. Po 24 urah naredimo TLC z mobilno fazo diklorometan:metanol=50:1 z dodatkom 20 μ L ledocetne kisline, ki pokaže, da imamo v reakcijski zmesi še vedno prisotno izhodno spojino, zato dodamo 0,5 ekvivalenta aminokisline, 0,5 ekvivalenta EDC in 1 ekvivalent baze. Izpadla je oborina, ki jo prefiltriramo ter z NMR ugotovimo, da je le v trdni obliki najverjetneje izpadel trietilamin. Želena spojina je bila prisotna še v matičnici, zato matičnico uparimo. Reakcijsko zmes čistimo s kolonsko kromatografijo – mobilna faza je etilacetat. Dobili smo 85 mg oranžne trdne spojine. (**29**) (39 %) ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ 7.98 – 7.91 (m, 1H, pirol-H-5), 7.18 (s, 1H, pirol-H-3), 4.59 (dd, J = 8.6, 4.5 Hz, 1H, pirolidin-CH), 3.84 (d, J = 7.1 Hz, 3H, COO-CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 2H, pirolidin-CH₂), 2.39 (dd, J = 14.5, 7.6 Hz, 2H, pirolidin-CH₂), 2.16 – 2.00 (m, 2H, pirolidin CH₂).

4.4.5.2 Sinteza metil (4-amino-1-metil-1H-pirol-2-karbonil) prolinata

Spojino **29** (85 mg, 0,30 mmol) raztopimo v 50 mL metanola in preprihavamo 1 uro z argonom. Nato dodamo 15 mg paladija in reakcijsko zmes preprihamo še z vodikom. Reakcijo pustimo potekati 24 ur. Po 24 urah odfiltriramo paladij in uparimo metanol ter takoj nadaljujemo s sklopitveno reakcijo.

4.4.5.3 Poskus sinteze metil 1-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karbonil)pirolidin-2-karboksilata



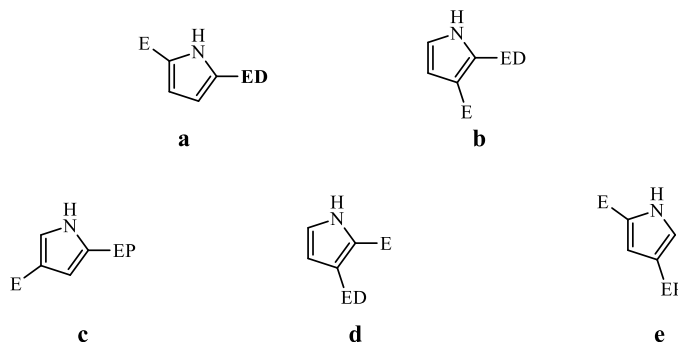
Spojino **27** (90 mg 0,33 mmol) aktiviramo v diklorometanu (2,5 mL) z EDC (75 mg, 0,40 mmol) in trietilaminom (138 μ L, 0,99 mmol, 3 ekv.). Po eni uri dodamo še 2,5 mL DMF, 100 mg (0,40 mmol) spojine **30** in 45 mg (0,33 mmol) HoBt reagenta. Reakcijo pustimo potekati 24 ur, nato odparimo diklorometan in DMF in ekstrahiramo s 50 mL etilacetata in 50 mL 0,1% raztopine očetne kisline. Organsko fazo sušimo z brezvodnim natrijevim sulfatom in uparili z rotavaporjem. Nato smo spojino še dodatno čistili s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi diklorometan:metanol=20:1 + 3% očetne kisline. Po poskusu izolacije nismo dobili željene spojine (**31**), reakcija najverjetneje ni potekla.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Razprava sinteznih reakcij

5.1.1 Nitriranje

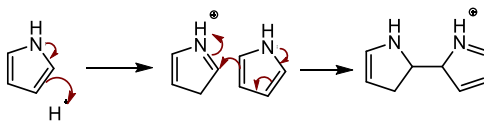
Nitriranje spojine **19** je potekalo z mehanizmom elektrofilne aromatske substitucije. Petčlenski heterocikli so bolj podvrženi elektrofilnim substitucijam kot pa adicijam. To lahko pripišemo podobnosti benzenu, kjer lahko enačimo prosti elektronski par v heterociklu z dvojno vezjo v benzenu. Ker so elektroni pri heterociklih skoncentrirani le na štirih ogljikovih atomih, imajo tako na atomih večjo elektronsko gostoto in so posledično tudi bolj reaktivni kot benzen. Med vsemi heterocikli so najbolj reaktivni piroli – to lastnost pripisujejo zmožnosti trivalentnega dušika, da lahko sprost elektron in je stabiliziran kot tetravalentni dušik. Na nesubstituiranem pirolu potekajo elektrofilne substitucije lažje na C2 in C5 atomih kot pa C3 in C4, saj imajo C2 in C5 substituirani piroli tri možne resonančne strukture, C3 in C4 pa le dve. Pri substituiranih pirolih je mesto in hitrost elektrofilne aromatske substitucije odvisna od vrste in mesta substituenta na posameznih C atomih (*slika 15*).



Slika 15: Usmeritve elektrofilne substitucije glede na elektrondonorske oziroma elektronakceptorske substituentne na pirolnem obroču. **ED**=močan elektrondonor, **ED**=šibek elektrondonor, **EP**=elektroprivlačna skupina, **E**=elektrofil.

Elektrondonorski substituenti na mestu C2 usmerjajo substitucijo na atoma C5 in C3. Če so elektrondonorski substituenti šibki (npr. metil ali klor), potem reakcija lažje poteče na C3 poziciji (**b**), kadar pa so substituenti močni elektrondonorji (npr. amin ali hidroksilna skupina) pa elektrofilna substitucija lažje poteče na C5 atomu (**a**). Po drugi strani pa elektronprivlačne skupine na poziciji C2 usmerjajo substituentne na pozicijo C4 (**c**).

Elektrondonorski substituenti na poziciji C3 pa usmerjajo elektrofilno substitucijo na pozicijo C2 (**d**), medtem ko elektronprivlačne skupine na tej poziciji usmerjajo reakcijo na pozicijo C5 (**e**). (23)



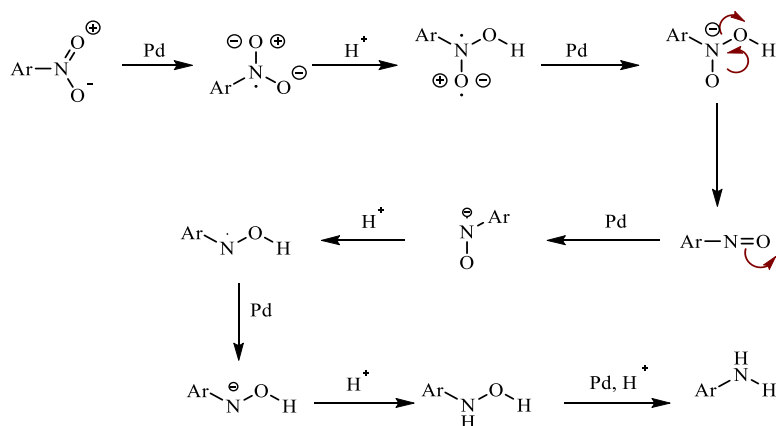
Slika 16: Mehanizem dimerizacije pirola v kislem mediju. Prirejeno po (24).

Ker so pirola občutljivi na oksidacijo, kislinsko katalizirano dimerizacijo (*slika 16*) in polimerizacijo, pirola nismo nitrirali pod zelo kislimi pogoji. Kombinacija $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ za nitriranje je primerna za benzene, za pirole pa je bolj primerno nitriranje z $\text{HNO}_3/\text{Ac}_2\text{O}$ pri nizki temperaturi. V našem primeru smo imeli na C2 poziciji substituirano elektronprivlačno skupino (trikloroacetil), ki je nitro skupino usmerjala na C4 in C5. Ker smo imeli dušik substituiran z metilno skupino in smo reakcijo izvajali pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ je v večji meri nastala spojina z NO_2 na C4 mestu. (24, 25)

5.1.2 Katalitsko hidrogeniranje

Reakcijsko zmes smo najprej pripravili za katalitsko hidrogeniranje tako, da smo v THF raztopljeno izhodno spojino prepihovali z argonom, da smo se znebili kisika v reakcijski zmesi. Paladij je namreč zelo občutljiv na kisik in bi lahko v prisotnosti kisika prišlo do vžiga. Po prepihovanju z argonom dodamo 10% katalizatorja (paladija, ki je vezan na inerten ogljik) glede na maso izhodnega reagenta in začnemo reakcijsko zmes prepihovati z vodikom. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ostalih analiz po končani reakciji nismo izvedli, saj so aminopirola po literarnih podatkih zelo nestabilni. (28)

Mehanizmi pretvorbe nitro skupine v aminske skupine še niso bili dobro preučeni. Intermediati, ki pri tem nastajajo so hidroksilaminski in nitrozo derivati. Mehanizem reakcije je prikazan na *sliki 17*. (30)



Slika 17: Mehanizem katalitskega hidrogeniranja. Prirejeno po (30).

Stranska reakcija, ki bi v našem primeru lahko potekla je redukcija pirola do pirolidina. Literatura namreč navaja, da ta reakcija lahko poteče tudi pri sobni pogojih. (26,27)

Spojine, ki vsebujejo bazični dušik imajo inhibitorni učinek na katalizatorje, ki se uporabljajo pri hidrogenaciji. Ta učinek se imenuje zastrupitev katalizatorja. Pojav lahko preprečimo z dodatkom kisline, ki nevtralizira bazični dušik – vendar v našem primeru pri pirolih to ni možno, saj so pirolji občutljivi kislo okolje in bi lahko prišlo do dodatnih stranskih reakcij in polimerizacije. Težave, ki smo jih imeli s hidrogeniranjem so zato lahko posledica naraščajoče tvorbe 4-aminopirolnega fragmenta, ki je zastrupil katalizator ali pa naraščajoče tvorbe stranskega produkta pirolidina. Tudi v literaturi so poročali, da dodatek svežega katalizatorja in ponovitev reakcije, ni pospešila hidrogeniranja in reakcija se je povsem ustavila. Rešitev bi lahko bila zamenjava paladija, ki je na zastrupitev z amini najbolj občutljiv, npr. z rodijem, ki je najmanj občutljiv. (29)

5.1.3 Estrenje s tionil kloridom

Za estrenje aminokislin so včasih uporabljali brezvodni HCl, vendar pa se je estrenje s tionil kloridom uveljavila kot bolj učinkovita sintezna reakcija. Kislini kloridi omogočajo enostavno in ekonomično pot za aktivacijo karboksilne kisline za nadaljnje aciliranje. Na ta način postane karbonilna skupina zelo elektrofilna in reaktivna za alkoholne nukleofile. (32) Reaktiven intermediat, ki nastane pri reakciji esterifikacije s tionil kloridom naj bi bil metilni ester klorsulfonske kisline. Pri reakciji nastajata tudi HCl in SO_2 , ki se med reakcijo zlahka odstranjujeta. Prisotnost vode bi esterifikacijo motila zato smo uporabili klorkalcijevo cevko. Pri esterifikaciji aminokisline sicer reakcijske

zmesi po dodanem tionil kloridu nismo segrevali pod refluxom, kot je to navedeno v številnih literaturnih virih (32, 33), vendar smo kljub temu dobili dovolj dober izkoristek reakcije. Veliko boljše izkoristke esterificirane aminokisline bi lahko dobili pri esterifikaciji s pomočjo TMSCl (trimetilsililklorid), kjer reakcija sicer poteka pri sobni temperaturi. (31) Segrevanje ni priporočeno za temperaturno občutljive spojine – pri teh je dovolj nižja temperatura in daljši čas poteka reakcije. S pripenjanjem metilnih oziroma etilnih skupin zaščitimo karboksilno funkcionalno skupino pred napadom baze in nukleofila. Tako pripravljene aminokisline so hranjene kot HCl soli, zato smo pri nadaljnji sklopitveni reakciji dodatne ekvivalente baze uporabili za nevtralizacijo aminokisline. Vendar pa moramo biti pozorni, da presežek baze ne povzroči neželene stranske reakcije pri sklopitvenih reakcijah kot sta O-aciliranje in racemizacija aminokislinskih verig. Hitrost teh reakcij je odvisna od bazičnosti dodane baze. (33) Mi smo dodali trietilamin, ki je veliko bolj bazičen ($pK_a=10,65$) kot N-metilmorfolin ($pK_a=7,61$), ki se navadno uporablja pri sklopitvenih reakcijah. (34)

5.1.4 Alkoholiza trikloroacetilpirolov

Trikloroacetil smo želeli pretvoriti v metilni ester karboksilne kisline z metoksidom. Metoksid smo tvorili *in situ* z dodatkom natrija v metanol, kjer je bila že raztopljena spojina **21**. Na hitrost pretvorbe trikloroacetila v ester zelo vplivajo sterične ovire alkohola in baze, saj metanol reagira zelo hitro, medtem ko je reakcija z ostalimi alkoholi počasnejša. (36) Dodano bazo smo nevtralizirali s 36% HCl, vendar smo najverjetneje klorovodikovo kislino dodajali prehitro in v preveliki količini, saj nam je NMR in MS analiza pokazali, da smo pravzaprav izolirali spojino **23**. Enak učinek bi dosegli, če bi trikloroacetilpirolu dodali NaOH in segrevali pod refluxom.

5.1.5 Hidroliza metilnih estrov

Metilni estri so stabilni proti acidolizi (npr. HBr v očetni kislini), katalitskem hidrogeniranju in proti nukleofilom kot so tioli in amini. Pretvorba metilnega estra v karboksilno kislino tako največkrat poteka v metanolni ali etanolni raztopini s KOH, NaOH ali LiOH v širokem spektru topil kot so DMF, DMSO, piridin in vodne raztopine alkoholov, acetona, etil acetata in dioksana. Metilni estri kratkih peptidov so hitro hidrolizirani (v približno 1 uri), težje pa hidroliza poteče pri daljših peptidnih verigah. Daljše peptidne verige zahtevajo večji presežek baze, daljše čase poteka reakcije in včasih

tudi povišano temperaturo (35). Za hidrolizo metilnega estra spojine **1** smo uporabili NaOH v dioksanu, ker je bila reakcija že prej preizkušena in se pri tem nismo bali hidrolize amidne vezi. Sicer pa smo za hidrolize v predzadnjih korakih sinteze uporabljali različne koncentracije LiOH v THF, ki tudi ni tako močno bazičen kot NaOH.

Preglednica II: Čas hidrolize in njeni izkoristki v odvisnosti od dodane koncentracije LiOH.

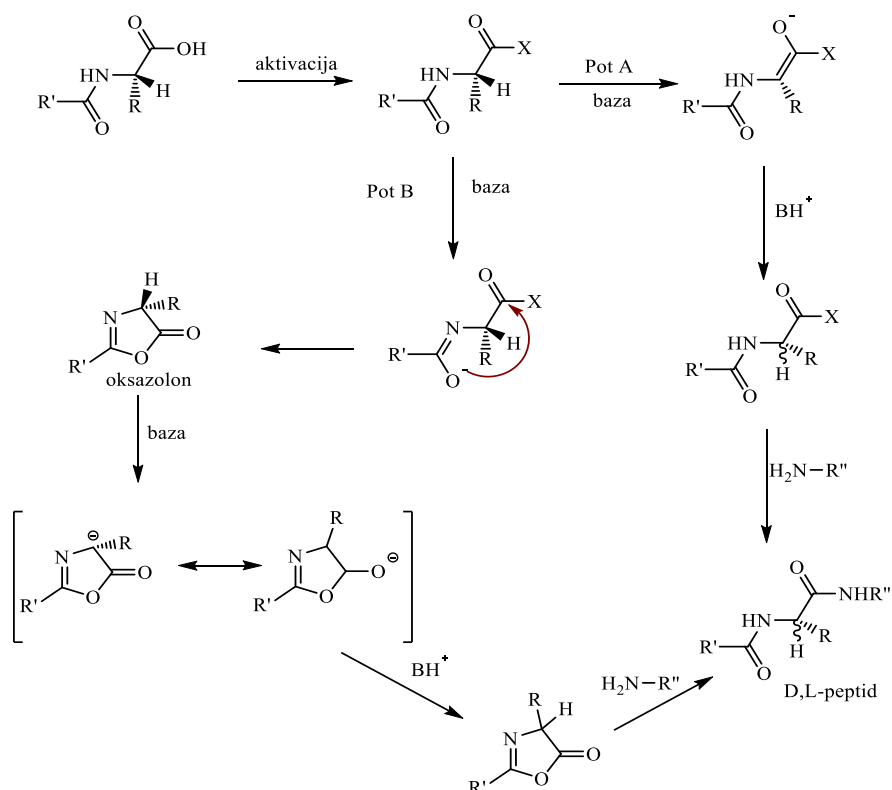
*izkoristek je bil izračunan po dodatnem čiščenju z izolero

<i>Označba spojine</i>	<i>Koncentracija LiOH</i>	<i>Čas poteka hidrolize</i>	<i>Izkoristek hidrolize</i>
5	5 M	24 h	102 %
8	0,1 M	48 h	69 %
11	0,1 M	48 h	42 %
13	0,5 M	24 h	10 %*

V *preglednici II* vidimo primerjave različnih koncentracij LiOH pri različnih spojinah ter čase in izkoristke njihovih hidroliz. Višje koncentracije LiOH pomenijo krajši čas hidrolize, zato smo dobili največji izkoristek pri največji koncentraciji dodane baze. Vendar pa se moramo zavedati, da večji izkoristek ne korelira nujno samo s koncentracijo baze, ampak tudi z elektronskimi vplivi različnih okoliških funkcionalnih skupin. Zaradi majhne količine metilnih estrov spojin **8**, **11** in **13**, smo bili bolj previdni in hidrolize izvajali v manjših koncentracijah in daljši čas, če je bilo to potrebno.

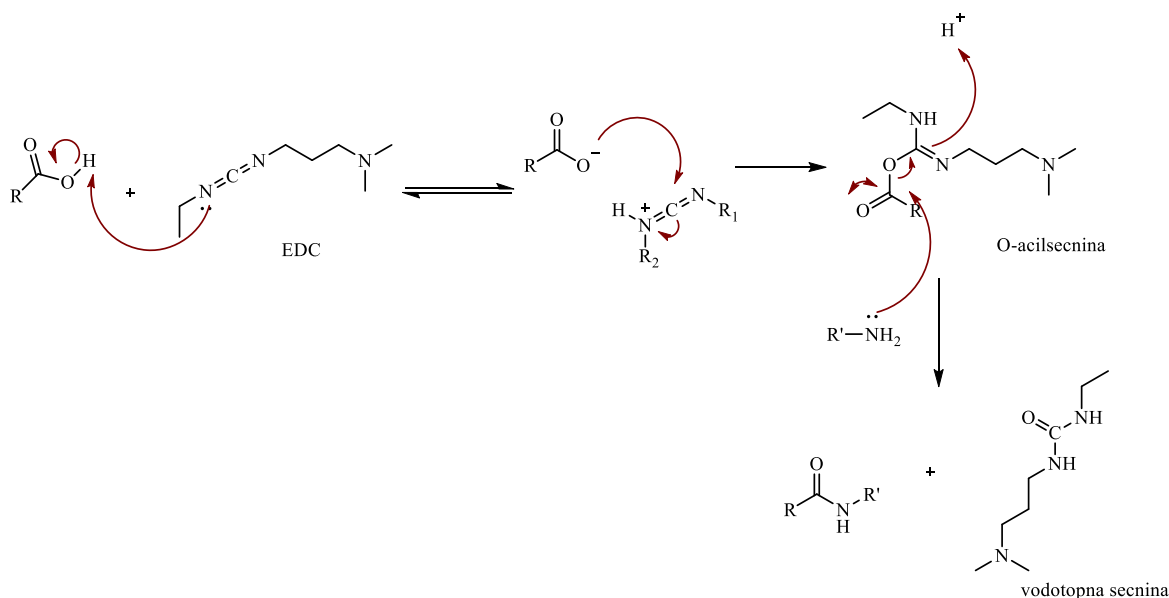
5.1.6 Tvorba amidnih vezi s sklopitvenimi reagenti

Tvorba amidne vezi s pomočjo sklopitvenih reagentov poteče v dveh korakih. Prvi korak je aktivacija karboksilne kisline. Če je aktivacija prepočasna, lahko reagenti za tvorbo amidne vezi degradirajo in reakcija ne bo potekla. Drugi korak je nukleofilni napad amino skupine na aktivirano karboksilno kislino. Pri tem lahko pride do racemizacije aminokislinskih delov peptida. Do racemizacije lahko pride po dveh različnih mehanizmih (slika 18).



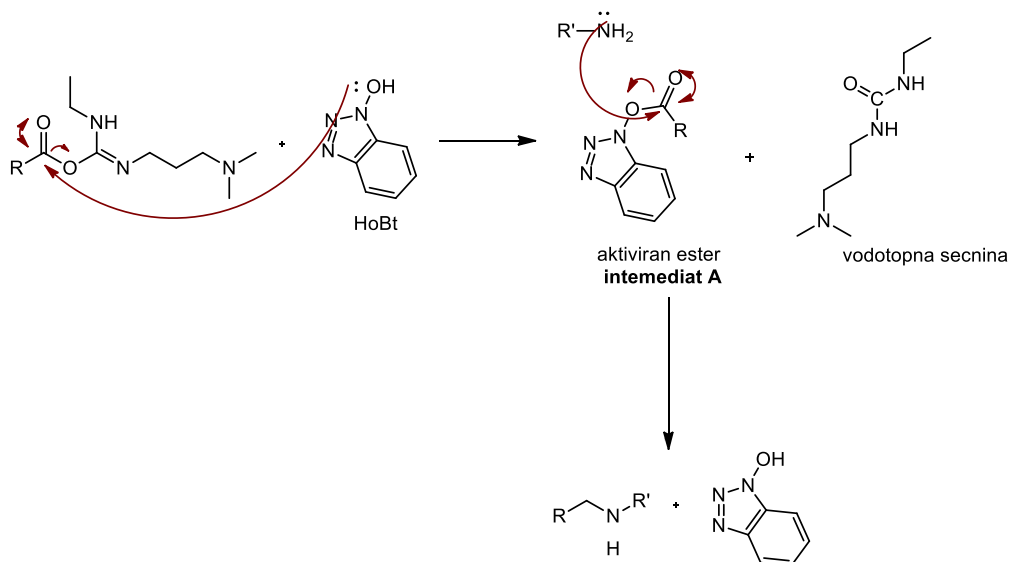
Slika 18: Mehanizem racemizacije pri sklopitvenih reakcija po poti A in B. Prirejeno po (36)

Pri tvorbi amidnih vezi se ponavadi z dobrim izkoristkom reakcije poveča tudi odstotek racemizacije. Pri naših spojinah racemizacija ni predstavljala težave, saj v molekuli nimamo alfa CH skupine, v nasprotju z aminokislinami.



Slika 19: Mehanizem sklopitvene reakcije z EDC. Prirejeno po (43).

Najbolj uporabljeni sklopitveni reagenti so karbodiimidi in fosfonijeve ter amonijeve soli. Izmed karbodiimidnih predstavnikov smo izbrali EDC. Čeprav po so po literaturnih podatkih sinteze z DCC bolj učinkovite pa je stranski sečninski produkt DCC netopen v vodi. (40) EDC-sečninski produkt je v vodi topen in ga zato tudi lahko zlahka odstranimo z ekstrakcijo. Pri karbodiimidih nastane aktivirana O-acilsečnina, ki nato reagira z aminom (slika 19). Če uporabimo dva ekvivalenta karboksilne kisline, potem O-acilsečnina reagira z drugim ekvivalentom karboksilne kisline do simetričnega anhidrida. Ta nato reagira z aminom do amida. Kadar imamo prisoten še HoBt, amid nastane po principu aktiviranega estera. HoBt je elektronprivlačna spojina, ki zmanjša elektronsko gostoto na karbonilnem ogljikovem atomu in tako pospeši napad aminskega nukleofila (slika 20). Glavna prednost dodatka spojin, kot je HoBt, je zmanjšanje možnosti racemizacije. Kadar sintetiziramo večje količine peptida (cca. 10 mmol) moramo aktivacijo obvezno izvajati pri nižji temperaturi (okoli 4 °C), saj eksotermna reakcija poveča možnost racemizacije in stranskih reakcij, sicer pa lahko reakcije potekajo tudi pri sobni temperaturi. (37, 40)

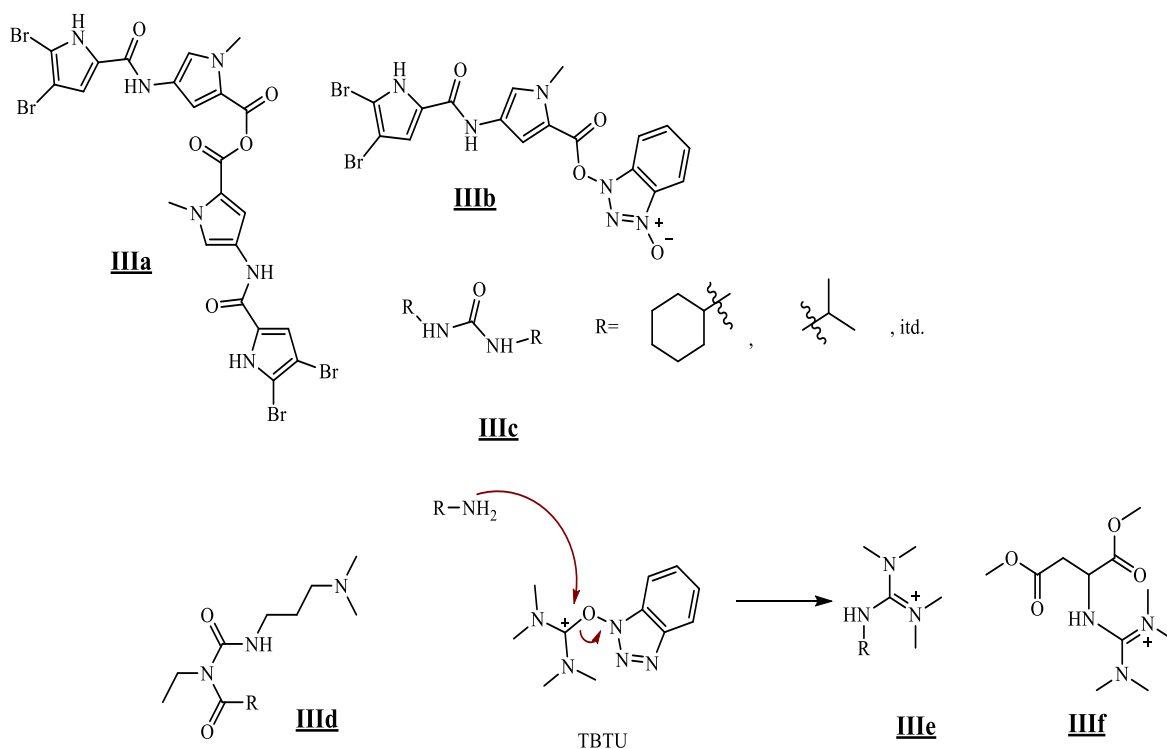


Slika 20: Mehanizem sklopitvene reakcije z HoBt. Prirejeno po (43).

Druga vrsta sklopitvenega reagenta, ki smo ga uporabili je uronijeva sol imenovana TBTU. Ti reagenti reagirajo po podobnem principu kot karbodiimidi, in sicer tvorijo aktivirane estre preko HoBt-a. Stranski produkt, ki je tukaj velikokrat prisoten je gvanidinski stranski produkt – v našem primeru bi stranski produkt asparaginske kisline bil N-(((1,4-dimetoksi-1,4-dioksobutan-2-il)amino)dimetilamino)metilen)-N-metilmetanaminium. (**IIIe**, **III f**, slika 21). (40)

Goodreid in sodelavci (37) so primerjali dva načina priprave reakcije, in sicer, v prvem načinu so dodali vse reagente naenkrat, kar se je pričakovano odražalo v zelo slabih izkoristkih želenega amida. Poleg slabega izkoristka so opazili tudi velik odstotek nezreagiranega amina, nastanek anhidrida in sečnine kot stranskih produktov. Nastanek anhidrida naj bi nastal z reagiranjem dveh molekul karboksilne kisline preko aktiviranega estra. Pri drugem načinu so najprej aktivirali kislino tako da so kislini v topilu najprej dodali sklopitveni reagent in počakali eno uro na aktivacijo, nato pa dodali še amin in bazo. Pri drugem načinu so opazili višje izkoristke željene spojine in manjše izkoristke stranskih produktov. S poskusi so preizkušali amonijske, uronijske in fosfonijske soli ter karbodiimide. Opazili so, da aminokislinska sečnina kot stranski produkt ni nastajala pri reakciji z EDC, pojavljala pa se je pri reakciji z HBTU. Ugotovili so torej, da je postopno dodajanje reagentov – najprej aktivacija karboksilne kisline in nato dodatek baze in amina – ključno za uspešen potek reakcije.

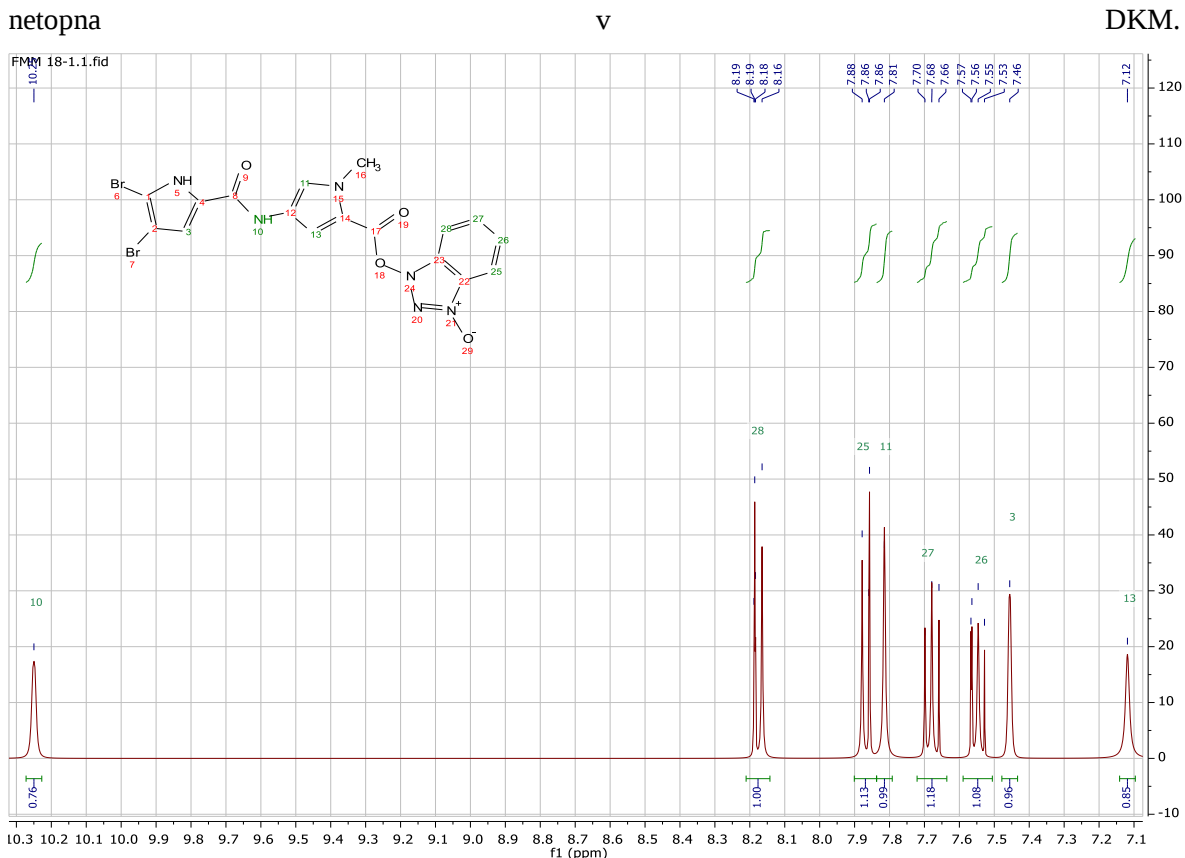
Reakcijsko zmes smo prepihovali z argonom, da smo preprečili potencialno hidrolizo O-acilsečnine z zračno vlago. Dodali smo tri ekvivalente baze: en ekvivalent zaradi nevtralizacije aminokisline, en ekvivalent zaradi nevtralizacije EDC in en ekvivalent za povečanje pH reakcijske zmesi ter deprotoniranje karboksilne kisline in povečanje njene elektrofilnosti. Sklopitvene reakcije namreč najboljše potekajo v pH okoli 9. Kot že prej omenjeno, je velikokrat pri sklopitvenih reakcijah aminokislin kot baza uporabljen NMM. V našem primeru, ko tvorimo amidne vezi med pirolnimi fragmenti in aminokislinami, izbira NMM, namesto trietilamina nima vpliva na tvorbo stranskih produktov. Zaradi boljše nevtralizacije aminokislin in EDC, je trietilamin v našem primeru celo bil najverjetneje boljša izbira.



Slika 21: Možni stranski produkti pri sklopitvenih reakcijah. IIIa-anhidrid, IIIb-N-oksadni intermediat s HoBt, IIIc-sečnina z aminokislinskimi ostanki, IIId-N-acilsečnina, IIIe-nastanek gvanidinskega stranskega produkta pri TBTU, IIIf – gvanidinski stranski produkt asparaginske kisline. Prirejeno po (39), (40) in (43).

Mahmoud in sodelavci so opazili, da pri aktivaciji karboksilne kisline s HoBt nastane tudi izomer N-oksid (**IIIb**, slika 21). Ta naj bi nastajal že pod blagimi pogoji in v večjem odstotku v bolj polarnih topilih. Izomer je v veliki meri kriv za manjše izkoristke, saj v nasprotju z intermediatom

A (slika 20) ni reaktiven. (39) NMR analize so pokazale, da smo intermediate s HoBt pogosto tudi sami izolirali – na sliki 22 je primer izolirane frakcije s kolonsko kromatografijo pri sintezi spojine **13**. Žal se polarnemu topilu DMF nismo mogli izogniti, saj je bila karboksilna kislina bila povsem netopna



Slika 22: Del NMR spektra, kjer je viden intermediatni del spojine **2s** HoBtom.

Preglednica III: Prikaz uporabe topil in sklopitvenih reagentov za sinteze določenih spojin. Prikazani so tudi izkoristki in ali je bila spojina pred kolonsko kromatografijo dodatno čiščena z ekstrakcijo.

Označba spojine	Topilo	Sklopitveni reagent	Ekstrakcija	Izkoristek
4	DMF	EDC, HoBt	DA	53%
7	DMF:DKM=1:1	EDC, HoBt	DA	37%
10	DMF	TBTU	NE	22%
13	DMF	TBTU	DA	33%
25	DMF:DKM=1:1	EDC, HoBt	NE	21%
29	DMF	EDC, HoBt	NE	39%

Sintezo različnih spojin z različnimi pogoji med seboj težko primerjamo (*preglednica III*), saj se elektronski in sterični vplivi aminokislin zelo razlikujejo. V grobem pa lahko predvidevamo, da zamenjava EDC/HoBt reagenta s TBTU ni značilno vplivala na izkoristek reakcije. Prav tako uporaba mešanice topila DMF in DKM v primerjavi s čistim DMF ni imela značilnega vpliva na izkoristke oziroma tvorbo stranskih produktov pri reakcijah. Opazili smo, da je bila sklopitev težavnejša, ko so izhodni reagenti bili starejši – predvidevamo lahko torej, da drži trditev iz literaturnih virov, da so bromopiroli v obliki HCl soli in prostih kislin nestabilni skozi daljša obdobja. Stabilnost bi lahko povečali s pretvorbo spojin v litijeve karboksilate. (38) Kadar smo spojino pred kolonsko kromatografijo čistili še z ekstrakcijo, se zdi, da so bili izkoristki po kolonski kromatografiji celo boljši, kot pa brez ekstrakcije. Ekstrakcija je bila dobrodošla, saj smo tako končne spojine dobili veliko čistejše, predvsem pri sintezi z EDC smo se takoj znebili sečninskega stranskega produkta in HoBt-a. Sklopitvena reakcija spojine **18** je lahko bila problematična zaradi kompetitivnega nukleofila na aminokislini – hidroksilne skupine. Za neuspešnost reakcije za sklopitev spojine **30** in **33** z bromopirolnim fragmentom so najverjetneje bili odgovorni najmanj trije možni razlogi:

- 1) Predhodno katalitsko hidrogeniranje ni bilo v celoti uspešno zaradi zastrupitve katalizatorja, zato smo šli v nadaljnjo reakcijo z zelo majhno maso amina.
- 2) Nastali amini so bili zelo nestabilni in je reagent razpadel že med samo izolacijo.
- 3) Pri sintezi smo mogoče uporabili že razpadli reagent karboksilne kisline bromopirola

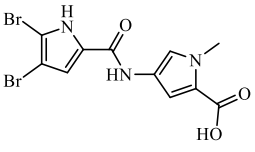
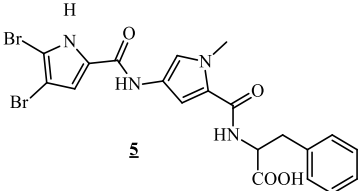
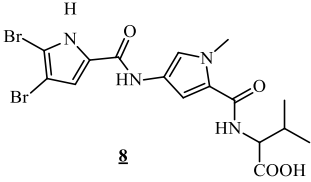
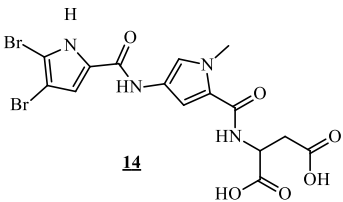
5.1.7 Primerjava sintezne poti 1 in 2

Pri sintezni poti 2 lahko hitro opazimo, da končnih produktov nismo dobili. Aminokislina, ki je bila skupna sintezni poti 1 in sintezni poti 2 je bila metan 1-aminocikloheksankarboksilat. Pri sintezni poti 2 ni potekla zadnja stopnja reakcije, torej sklapljanje med bromopirolnim fragmentom in ostalim delom molekule. Bromopirolni fragment je bil predhodno sintetiziran in o njegovi stabilnosti ne moremo biti prepričani. Dvomimo tudi, da sta spojini **26** in **30** bili ustrezno čisti in ali je katalitsko hidrogeniranje nitro funkcionalne skupine do amino funkcionalne skupine res poteklo. Sintezna pot 1 se je tako izkazala za boljšo sintezno pot kot sintezna pot 2, tako zaradi izkoristkov reakcije kot tudi zaradi večje čistosti končnih spojin.

5.2 Rezultati in razprava bioloških testiranj

Rezultati zaviralnih aktivnost giraze B *E. coli* s spojinami **5**, **8** in **14** so prikazane v preglednici IV. Rezidualna aktivnost predstavlja razmerje med aktivnostjo DNK giraze v prisotnosti spojine pri 100 μM koncentraciji oziroma 10 μM koncentraciji in aktivnosti DNK giraze v odsotnosti spojine. 100 % predstavlja odsotnost inhibicije, 0 % pa popolno inhibicijo encima. (44) IC_{50} je srednja zaviralna aktivnost in jo lahko ocenimo kot koncentracijo učinkovine pri kateri je delovanje encima zmanjšano za 50%.

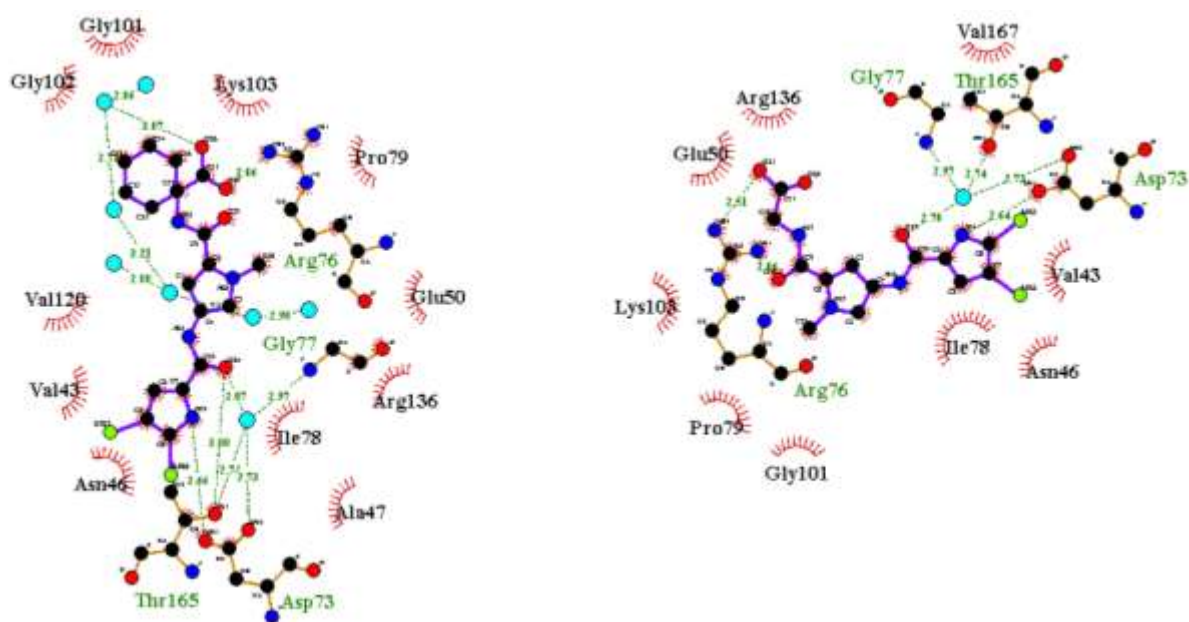
Preglednica IV: Rezultati biološkega testiranja.

Struktura in oznaka strukture	RA[%]	IC_{50}
	/	$\text{IC}_{50} \sim 150 \mu\text{M}$
 5	RA (100 μM) = 53 % RA (10 μM) = 112 %	$\text{IC}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$
 8	RA (100 μM) = 102 % RA (10 μM) = 111 %	NEAKTIVNA
 14	RA (100 μM) = 44 % RA (10 μM) = 91 %	$\text{IC}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$

Rezultati v preglednici IV nakazujejo, da smo s spojinama **5** in **14** izboljšali inhibicijo giraze B *E. Coli* v primerjavi s spojino brez aminokislinskega dodatka, vendar pa nismo izboljšali aktivnosti v primerjavi z glicinskim derivatom. Spojine, ki smo jih sintetizirali so precej

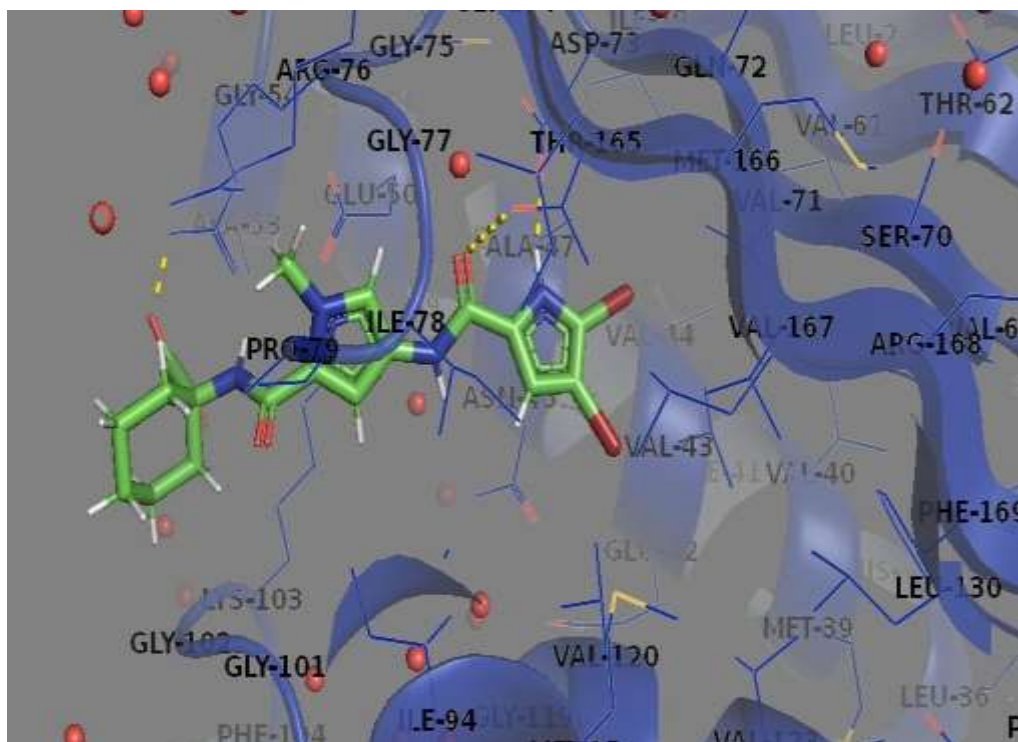
bolj voluminozne kot pa glicinski derivat, kar bi lahko nakazovalo, da prevelike in preprosto gibljive molekule pri načrtovanju giraznih inhibitorjev niso zaželeni. Pri spojini **5** dodatne interakcije najverjetneje dosežemo s kation- π interakcijo med fenilnim obročem in Arg76, kar izboljša aktivnost. Pri spojini **14** dodatne interakcije dosežemo z dodatnimi vodikovimi vezmi med karboksilnimi funkcionalnimi skupinami in Arg 76.

Spojina **8** nima zaviralne aktivnosti, čeprav je na prvi pogled molekula zelo podobna glicinskemu derivatu. Čeprav nismo uspeli biološko ovrednotiti spojine **11** (cikloheksilni derivat) pa bi lahko predvidevali enako neaktivnost kot pri spojini **8**. Na *sliki 23* vidimo primerjavo interakcij v 2D prikazu med glicinskim in cikloheksilnim derivatom.



Slika 23: Primerjava 2D shem interakcij cikloheksilnega (**11**) in glicinskega derivata (**11b**) z ATP vezavnim mestom.

Na *sliki 23* je vidno, da voluminozen cikloheksil obrne molekulo v tak položaj, da z Arg76 tvori interakcijo le karboksilna funkcionalna skupina cikloheksilne aminokisline, ne pa tudi karboksilna funkcionalna skupina amidne vezi. Enako je vidno tudi na 3D slikah (*slika 24* in *slika 25*). Valinska izopropilna skupina prav tako predstavlja sicer manjši vendar vseeno voluminozen fragment. Na 3D slikah lahko tudi vidimo, da je metilna skupina na dušiku pirolnega obroča obrnjena pri cikloheksilnem derivatu stran od Ile78 in Pro79, kar bi lahko pomenilo tudi manj hidrofobnih interakcij.



Slika 24: 3D predstavitev molekulskega sidranja spojine **11** v ATP vezavno mesto GyrB.



Slika 25: 3D predstavitev molekulskega sidranja spojine **11b** v ATP vezavno mesto GyrB.

6. SKLEP

Sintetizirali smo 4 potencialne protibakterijske učinkovine in sicer **5**, **8**, **11** in **14**. Skozi proces eksperimentalnega dela, ki se je osredotočal na sintezo pirolamidnih spojin in njihovo biološko testiranje smo ugotovili slednje:

- Sinteza končnih spojin je bila bolj uspešna z uporabo sintezne poti 1. Sintezna pot 2 je bila bolj problematična predvsem zaradi katalitskega hidrogeniranja, kjer smo imeli kar nekaj težav. Možnih vzrokov za to je več, najverjetneje pa je prišlo do zastrupitve paladija zaradi nastanka pirolaminskih fragmentov. Predlagamo, da se v prihodnje katalitsko hidrogeniranje optimizira, pri čemer bi spreminjali vrsto katalizatorja, topila in velikost pirolnega fragmenta. Druga možna vzroka za neuspeh sinteze preko sintezne poti 2 sta lahko tudi hiter razpad 4-aminopirola in neustreznost reagenta 4,5-dibromopirola-2-karboksilne kisline, ki je tudi nestabilna skozi daljši čas.
- Hidroliza metilnih estrov pirolamidnih spojin dobro poteče tudi pri 5M koncentraciji litijevega hidroksida. Pri uporabi litijevega hidroksida ni nevarnosti za hidrolizo amidnih vezi. Poleg tega karboksilne kisline lahko pretvorimo v litijeve soli, ki naj bi bile bolj stabilne kot proste karboksilne kisline.
- Pri sklopitvenih reakcijah je pomembno zaporedje dodatka reagentov.
- Sklopitvene reakcije so enako dobro potekale tako pri EDC/HoBt kot pri TBTU sklopitvenem reagentu. Uporaba samo DMF kot topila ima vpliv na nastanek N-oksidnega izomera HoBta, ki zavira sklopitveno reakcijo. Intermediat s HoBt-om smo pri spojini **13** tudi uspeli izolirati. Stranske reakcije so potekale pri vseh možnih kombinacijah sklopitvenega reagenta in topila, vendar pa ne vemo v kakšnih odstotkih. Opazili pa smo, da so bili izkoristki manjši pri bolj voluminoznih aminokislinah.
- Ekstrakcija pred čiščenjem s kolonsko kromatografijo je dobrodošla, saj smo glede na NMR analize ugotovili, da so bile končne spojine čistejše ob izvajanju ekstrakcije.
- Sklopitvena reakcija s 4-hidroksipirolidinom ni potekla. Razlog za to je verjetno kompetitivni nukleofilni napad hidroksilne skupine, saj je sklopitvena reakcija z nesubstituiranim pirolidinom potekla.

- Biološka testiranja so pokazala, da smo spojini **5** in **14** izboljšali biološko aktivnost glede na spojino **2**, vendar pa biološka aktivnost ni bila boljša od glicinskega derivata. Sklepamo lahko, da smo pri spojini **5** dosegli dodatno kation- π interakcijo z Arg76 pri spojini **14** pa dodatne vodikove vezi z Arg76. Iz rezultatov biološkega testiranja in molekulskega sidranja lahko tudi sklepamo, da uporaba večjih aminokislin ni dobrodošla, saj lahko velik substituent vpliva na zvitje molekule v za vezavo neugodno konformacijo. Čeprav spojine **11** nismo uspeli biološko testirati, lahko sklepamo, da bi bila ta neaktivna, saj je aminokislinski ostanek hidrofoben in voluminozen, tako kot pri spojini **8**. Na sliki molekulskega sidranja lahko tudi vidimo, da prevelik aminokislinski dodatek povzroči, da molekula gleda ven iz tarčnega mesta, kar za njeno aktivnost ni ugodno.

Zaključimo lahko, da je sinteza pirolamidnih molekul težavna, saj smo imeli težave s slabimi izkoristki želenih spojin in tvorbo stranskih produktov. Opazili smo, da vključevanje večjih aminokislin v ta del molekule ni ugodno za interakcije z encimom, zato bi morali ta del molekul optimizirati z manjšimi fragmenti. Rezultati magistrske naloge predstavljajo pomembne ugotovitve za nadaljno optimizacijo pirolamidne sinteze in optimizacijo aktivnosti potencialnih pirolamidni učinkovin.

7. Literatura

- (1) Gonzalez-Bello C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; 27: 4221-4228.
- (2) ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. EMEA doc. ref. EMEA/576176/2009.
- (3) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1; Dostopano: 21.01.2018
- (4) Payne DJ, Federeci Miller L, Findlay S, Anderson J, Marks L. Time for change: adressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. *Phil Trans R Soc B* 2015; 370: 20140086
- (5) Carb-X. <http://www.carb-x.org/about>; Dostopano: 21.01.2018
- (6) Škedelj V, Tomašič T, Peterlin Mašič L, Zega A. ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibiotic Drug Design. *J Med Chem* 2011; 54: 915-929
- (7) Singh S B. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2014. 24: 3683-3689
- (8) Jakopin Ž, Ilaš J, Barančkova M, Brvar M, Tammela P, Sollner Dolenc M, Tomašič T, Kikelj D. Discovery of substituted oxadiazoles as a novel scaffold for DNA gyrase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2017; 130: 171-184
- (9) Uria-Nickelsen M, Blodgett A, Kamp H, Eakin A, Sherer B, Green O. Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characteriation of pyrrolamides. *Int J Antibimicrob Ag* 2013; 41(1): 28-35
- (10) Eakin E A, Green O, Hales N, Walkupp G K et al. Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening to Identify Antibacterial Agents. *Antimicrob. Ag Chemother* 2012; 56 (3): 1240-1246
- (11) Mayer C, Janin Y L. Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chem Rev* 2014; 114: 2313-2342
- (12) Yule I A, Czaplewski L G, Pommier S, Davies D T, Narramore S K, Fishwick C W G. Pyridine-3-carboxamide-6-yl-ureas as novel inhibitors of bacterial DNA gyrase: Structure based design, synthesis SAR and antimicrobial activity. *Eur J Med Chem* 2014; 86: 31-38

- (13) Lambert P A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1471-1485
- (14) Pommier Y, Leo A, Zhang H, Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem Biol* 2010; 17: 421-433
- (15) Oblak M, Kotnik M, Solmajer T. Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Curr Med Chem* 2007; 14(19): 2033-47
- (16) Wright G D. Antibiotics: A New Hope. *Chemistry & Biology* 2012; 19: 3-10
- (17) Bradbury B J, Pucci M J. Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 572-581
- (18) The 10x20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clin Infect Dis* 2010; 50 (8): 1081-1083
- (19) Tomašič T, Peterlin Mašič L. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem* 2014; 14: 130-151
- (20) Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T. Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *J Med Chem* 2012; 55(14): 6413-6426
- (21) Protein Data Bank, oznaka proteina: 4DUH. <https://www.rcsb.org/structure/4DUH>; Dostopano: 02.02.2018
- (22) Shannon Shiffrer E. Načrtovanje in sinteza derivatov pirolo[1,2-a]pirazin-1-(2H)-ona s potencialnim zaviralnim delovanjem na girazo B (Magistrska naloga). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2016.
- (23) Gupta R R, Kumar M, Gupta V. *Heterocyclic Chemistry: Volume II: Five-Membered Heterocycles*. Springer 2013
- (24) Katritzky A, Ramsden C A, Joule J, Zhdankin V. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, 3rd edition. Elsevier 2010.
- (25) Loudon M. *Organic Chemistry*, 5th Edition. Roberts and Company Publishers 2009.
- (26) Hegedus L, Mathe T, Tungler A. Hydrogenation of pyrrole derivatives. II. Hydrogenations over supported noble metal catalysts. *Appl Catal A Gen* 1996. 147(2): 407-414
- (27) Kaiser H P, Muchowski J M. Catalytic Hydrogenation of Pyrroles at Atmospheric Pressure. *J Am Chem Soc* 1984. 49(22): 4204-4205

- (28) Fu I, Gribble G W. Reductive acylation of 2- and 3-nitropyrroles-efficient synthesis of pyrrolylamides and pyrrolylimides. *Tetrahedron Lett* 2007. 48(52): 9155-9158
- (29) Hegedus L, Mathe T, Hydrogenation of pyrrole derivatives: Part V. Poisoning effect of nitrogen on precious metal on carbon catalysts. *Appl Catal A Gen* 2002. 226(1-2): 319-322
- (30) Smith M B, March J. *March's Advances Organic Chemistry*, Sixth Edition. Wiley Interscience 2007.
- (31) Li J, Sha Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* 2008. 13: 1111-1119
- (32) Prabhu G, Bavaprabhu N N, Vishwanatha T M, Sureshbabu V V. Amino acid chlorides: a journey from instability and racemization toward broader utility in organic synthesis including peptides and their mimetics. *Tetrahedron* 2015. 71: 2785-2832
- (33) Houben-Weyl. *Methods of Organic Chemistry Vol. E 22a*, 4th Edition Supplement: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. Georg Thieme Verlag 2004.
- (34) Sannigrahi M, Kerekes A D. N-Methylmorpholine. *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* 2005.
- (35) Harbuck J W, Repoport H. Facile introduction of Ester Groups into the Pyrrole Nucleus via Trichloroacetylation and Alcoholysis. *J Org Chem*. 1972. 37(23): 3618-3622
- (36) Al-Warhi T I, Al-Hazimi H M A, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc* 2012. 16(2): 97-116
- (37) Goodreid J D, Duspara P A, Bosch C, Batey R A. Amidation Reactions from the Direct Coupling of Metal Carboxylate Salts with Amines. *J Org Chem* 2014. 79:943-954
- (38) Mahmoud K A, Long Y T, Schatte G, Kraatz H B. Rearrangement of the Active Ester Intermediate During HoBt/EDC Amide Coupling. *Eur J Inorg Chem* 2005. 173-180
- (39) Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev* 2009. 38: 606-631
- (40) Tang S S, Apisarnthanarak A, Hsu L Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev* 2014. 78(30): 3-13

- (41) Tiwaey B K, Pradhan K, Nanda A K, Chakraborty R. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *J Chem Biol Ther* 2015. 1(1):104
- (42) Serre M C, Duguet M. Enzymes That Cleave and Religate DNA at High Temperature: The Same Story with Different Actors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2003.
- (43) Clayden J, Greeves N, Warren S: *Organic Chemistry*. New York, Oxford University Press, 2012.
- (44) Jerič E. Načrtovanje in sinteza derivatov 3-amino2-tioksitiazoldin-4-ona in 1H-pirol-3-amina kot potencialnih zaviralcev giraze B (Magistrska naloga). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2014.
- (45) Mediatelly.
<https://mediately.co/si/drugs/3dqCJoI30RwJcQEpvqvYMP2B7Qv/linezolid-accord-600-mg-filmsko-oblozene-tablete>. Dostopano: 10.04.2018

Manca Glavan

2018