

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



EVA SHANNON SCHIFFRER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



EVA SHANNON SCHIFFRER

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV PIROLO[1,2-*a*]PIRAZIN-1(2*H*)-ONA S
POTENCIALNIM ZAVIRALNIM DELOVANJEM NA GIRAZO B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF PYRROLO[1,2-*a*]PYRAZIN-1(2*H*)-ONE
DERIVATIVES WITH POTENTIAL INHIBITION OF GYRASE B**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko/magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Meritve masne spektrometrije so opravili na Inštitutu Jožef Stefan.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. in somentorju asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm. za strokovno pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela ter pisanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Eva Shannon Schiffrer

Predsednik komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Matjaž Ravnika, mag. farm.

Vsebina

Vsebina	II
Povzetek	V
Abstract.....	VI
Seznam okrajšav	VII
1. Uvod	1
1.1. Protibakterijske učinkovine	1
1.1.1. Odkrivanje, načrtovanje ter razvoj protibakterijskih učinkovin.....	1
1.2. Bakterijska rezistenca	2
1.3. Topoizomeraze	4
1.4. DNK giraza.....	6
1.5. ATP vezavno mesto GyrB	8
1.6. Znani zaviralci GyrB	9
2. Načrt dela.....	13
3. Materiali in metode.....	15
3.1. Materiali	15
3.2. Metode	15
4. Eksperimentalni del	17
4.1. Sinteza derivatov pirola	17
4.1.1. Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1H-pirol-2-il)etan-1-ona (2)	17
4.1.2. Tipični postopek za sintezo metilnih estrov	18
4.1.3. Sinteza metil 1-(2-etoksi-2-oksoetil)-4-nitro-1H-pirol-2-karboksilata (4).....	18
4.1.4. Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1H-pirol-2-karboksilata (5)	19
4.1.5. Sinteza 4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilne kisline (6).....	19
4.2. Sinteza derivatov metilpirola.....	20
4.2.1. Sinteza metil 4-amino-1-metil-1H-pirol-2-karboksilata (7)	20
4.2.2. Sinteza metil 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksilata (8).....	20
4.2.3. Sinteza 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksilne kisline (9)	21

4.3.	Sinteza 1-(karboksimetil)-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1H-pirol-2-karboksilne kisline (12)	21
4.3.1.	Sinteza metil 4-amino-1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1H-pirol-2-karboksilata (10) .	21
4.3.2.	Sinteza metil 4- (4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1H-pirol-2-karboksilata (11)	21
4.3.3.	Sinteza 1-(karboksimetil)-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1H-pirol-2-karboksilne kisline (12)	22
4.4.	Sinteza obročnega sistema: 8-nitro-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirol[1,2-a][1,4]diazepin-1-on (14).....	23
4.4.1.	Prva sintezna pot.....	23
4.4.2.	Druga sintezna pot.....	24
4.5.	Sinteza derivatov 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (21)	25
4.5.1.	Sinteza obročnega sistema: 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (21)	25
4.5.2.	Sinteza gradnikov končnih spojin	27
4.5.3.	Tipični postopek katalitskega hidrogeniranja.....	28
4.5.4.	Tipični postopek tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta.....	29
4.5.4.	Sinteza 2-(7-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-oksopirol[1,2-a]pirazin-2(1H)-il)ocetne kisline (29)	30
4.6.	Poskus sinteze skrajšanih derivatov spojine (9)	31
4.6.1.	Poskus sinteze metil 3-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksamido)benzoata (30).....	31
4.6.2.	Poskus sinteze metil 3-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-il)-3-oksopropanoata (31)	32
4.7.	Poskus ciklizacije preko uvedbe metilnega estra serina.....	34
4.7.1.	Sinteza derivatov metilnega estra serina	34
4.7.2.	Poskus uvedbe metilnega estra serina na pirolni dušik	36
4.8.	Poskus sinteze metil 1-(3-azidopropil)-4-nitro-1H-pirol-2-karboksilata	38
4.9.	Poskus sinteze derivatov 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1,3(2H,4H)-diona (44).....	38
4.9.1.	Poskus sinteze 7-nitropirol[1, 2-a]pirazin-1, 3(2H, 4H)-diona (44).....	38
4.9.2.	Poskus sinteze 7-nitro-2-fenilpirol[1, 2-a]-pirazin-1, 3(2H, 4H)-diona (45) 40	

4.10.	Poskus sinteze derivatov 4-hidroksi-7-nitro-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (20).....	40
4.10.1.	Sinteza 7-amino-4-hidroksi-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (46).	41
4.10.2.	Poskus sinteze 4,5-dibromo-N-(4-hidroksi-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-7-il)-1H-pirol-2-karboksamida (47)	41
4.11.	Poskus sinteze nadaljnjih derivatov 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (21)	41
4.11.1.	Poskus sinteze metansulfonilnega derivata	41
4.11.2.	Poskus sinteze derivata brez substituenta na amidnem dušiku.....	42
4.11.3.	Poskus sinteze acetalnega derivata	42
4.12.	Poskus sinteze derivatov 6-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona	43
4.12.1.	Sinteza obročnega sistema: 6-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (55).....	43
4.12.2.	Sinteza gradnikov končnih spojin	45
4.12.3.	Katalitsko hidrogeniranje gradnikov končnih spojin.....	45
4.12.4.	Poskus tvorbe amida s spojino 6 z uporabo sklopitvenih reagentov	46
5.	Rezultati in razprava.....	47
5.1.	Rezultati bioloških testiranj	47
5.2.	Razprava sinteznih postopkov	48
5.2.1.	Sinteza pirol[1,2-a][1,4]diazepin-1-ona	48
5.2.2.	Sinteza 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona	49
5.2.3.	Sinteza gradnikov končnih spojin	51
5.2.4.	Katalitsko hidrogeniranje	52
5.2.5.	Tvorba amida.....	53
5.2.6.	Poskus sinteze derivatov 6-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona	55
5.2.7.	Hidroliza estra.....	55
5.2.8.	Poskus sinteze spojine 31	56
5.2.9.	Poskus ciklizacije preko uvedbe metilnega estra serina.....	57
5.2.10.	Poskus sinteze derivatov 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1,3(2H,4H)-diona (44).	59
5.3.	Razprava rezultatov bioloških testiranj	59
6.	Sklep.....	60
7.	Literatura	61

Povzetek

Bakterijska rezistenca postaja vedno večji zdravstveni problem. Želja po sintezi novih učinkovitih protibakterijskih učinkovin na katere razvoj rezistence še ni bil opažen je zato velika. Bakterijska DNK giraza je uveljavljena protibakterijska tarča na katero delujejo spojine kot so fluorokinoloni ter aminokumarini. Tekom izdelave magistrske naloge smo načrtovali zaviralce podenote B bakterijske DNK giraze z novimi kemijskimi strukturami, ki se vežejo v njeno ATP vezavno mesto. Podenota B je odgovorna za vezavo energijsko bogate molekule ATP, katere cepitev omogoči katalitsko aktivnost encima. Trenutno je kot tarča protibakterijskih učinkovin slabo izkoriščena, zato zadnja leta poteka veliko poskusov sinteze novih spojin z zaviralnim delovanjem nanjo. Namen naloge je bil z modifikacijami pirolamidne izhodiščne spojine, ki so jo pripravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, izboljšati zaviralno aktivnost predhodno pripravljenih spojin. V strukturo spojine vodnice smo poskusili vpeljati rigidizacijo preko ciklizacije do različnih bicikličnih obročev ter modificirati obstoječe substituenta za doseg močnejše vezave v ATP vezavno mesto. Odločili smo se za sintezo spojin, ki so izkazale dobro vezavo po računalniškem sidranju v ATP vezavno mesto giraze B. Sintetizirali smo sedem novih spojin in jih ovrednotili z merjenjem zaviralne aktivnosti na girazo B. Tri izmed sintetiziranih spojin vključujejo pirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-onski fragment. Kljub temu, da uspešno vpeljane modifikacije izhodiščne strukture niso bile ugodne za višjo zaviralno aktivnost na girazi B, predstavljajo rezultati magistrske naloge dobro izhodišče za nadaljnje poskuse optimizacije spojin s potencialnim zaviralnim delovanjem na girazo B.

Ključne besede: protibakterijsko, DNK giraza B, pirolamid, rigidizacija, pirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-on

Abstract

Antibacterial drug resistance is a healthcare problem rising in its' scope. The need for novel effective antibacterial drugs that are not subject to currently known resistance mechanisms is great. Bacterial DNA gyrase is a validated target of antibacterial agents, such as fluoroquinolones and aminocoumarines. The Master's thesis focused on the design and synthesis of novel bacterial DNA gyrase B inhibitors targeting its' ATP binding site. Gyrase B is the bacterial DNA gyrase subunit that binds ATP, the energy source for the enzyme's catalytic activity. As a target of antibacterial agents it is still poorly exploited and numerous attempts to synthesise novel inhibitors have recently been underway. The aim of the Master's thesis was to modify the pyrroleamide lead compound that had been previously prepared at Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana. Modifications aimed to increase the inhibitory activity of previously known compounds by improving their binding affinity to the ATP binding site. Modifications approached included rigidisation by cyclisation and modifications of the substituent groups of known compounds. The compounds to be synthesised were selected after a molecular docking study of the interaction between designed chemical structures and the gyrase B ATP binding site. Seven novel compounds, three of which were pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1(2*H*)-one analogues, were synthesised and biologically tested. Successfully prepared compounds including the desired modifications in their structures did not express higher inhibitory activities on gyrase B. The Master's thesis outcomes represent promising starting points for further structural optimisation to improve the inhibitory activity of the pyrroleamide class.

Key words: antibacterial, DNA gyrase B, pyrroleamide, rigidisation, pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1(2*H*)-one

Seznam okrajšav

Ac₂O	acetanhidrid	IC₅₀	srednja zaviralna koncentracija
ADPNP	5'-adenilil-β, λ-imidotrifosfat	IR	infrardeča spektroskopija
ATPaza	adenozin trifosfataza	J	sklopitvena konstanta
ATP	adenozin-5'-trifosfat	KOtBu	kalijev <i>terc</i> -butoksid
ATR	oslabljena popolna odbojnost (attenuated total reflectance)	LiOtBu	litijev <i>terc</i> -butoksid
Boc	<i>terc</i> -butiloksikarbonil	m	multiplet
Boc₂O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat	MsCl	mezil klorid
bs	širok singlet	MutL	mutatorski protein L
Bu₄NBr	tetra- <i>n</i> -butilamonijev bromid	NaOAc	natrijev acetat
CDCl₃	devteriran kloroform	n-Bu₃P	tri- <i>n</i> -butilfosfin
CDI	karbonildiimidazol	NH₄OAc	amonijev acetat
oAcAc	acetilacetonat	NMR	jedrska magnetna resonanca
d	dublet	Pd/C	paladij na ogljiku
dd	dublet dubleta	PDB	Protein Data Bank
ddd	dublet dubleta dubleta	PPh₃	trifenilfosfin
DIAD	diizopropil azadikarboksilat	PPh₃=O	trifenilfosfin oksid
DMAP	4-dimetilaminopiridin	pTsOH	<i>para</i> -toluensulfonska kislina
DMF	dimetilformamid	q	kvartet
DMSO	dimetilsulfoksid	quin	kvintet
DMSO- d₆	devteriran DMSO	RNA	ribonukleinska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina	RT	sobna temperatura (room temperature)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid	s	singlet
ekv.	ekvivalent	t	triplet

FT-IR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo	TBAI	tetrabutilamonijev jodid
GHKL	naddružina proteinov, ki jo sestavljajo giraza, Hsp90, histidin kinaza in MutL	TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
GyrA	giraza A	TFA	trifluorocetna kislina
GyrB	giraza B	THF	tetrahidrofuran
HOAc	očetna kislina	TLC	tenkoplastna kromatografija
HOBt	1-hidroksibenzotriazol	TMAD	tetrametilazodikarboksamid
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija	tozil	4-toluensulfonil
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti	TsCl	tozil klorid
Hsp90	protein toplotnega šoka 90		

1. Uvod

1.1. Protibakterijske učinkovine

Boj proti okužbam povzročenih z bakterijami poteka že od nekdaj. Začetek obdobja protibakterijskih učinkovin predstavlja Flemingovo odkritje penicilina leta 1928, po katerem je sledilo nadaljnje raziskovanje spojin naravnega in sinteznega izvora (1). Razvoj protibakterijskih učinkovin je bil sprva zelo uspešen in med leti 1930 ter 1962 je bilo odkritih več kot 20 različnih razredov, po letu 1962 pa se je razvoj močno upočasnil. Kljub temu na tržišče ves čas prihajajo analogi znanih razredov, pojavile pa so se tudi bakterije, odporne na znane učinkovine (2).

Tarče protibakterijskih učinkovin so strukture in mehanizmi, ki so nujno potrebni za rast in preživetje bakterijskih celic. Za doseg selektivnega delovanja na bakterijske celice tarča ne sme biti prisotna v sesalskih celicah oziroma se mora signifikantno razlikovati od sesalske različice. Ker so mehanizmi ter strukture v katerih so udeležene tarče esencialni za bakterije, se jih le-te v odgovoru na uporabo učinkovin ne morejo popolnoma znebiti, možen pa je razvoj rezistence preko mutacij tarč (3).

Različne protibakterijske učinkovine delujejo na različne tarče, ki se nahajajo znotraj ali na zunanji strani bakterijskih celic. Najpomembnejše izmed njih so celična stena ter celična membrana, metabolizem bakterijske celice, bakterijski encimi, nukleinske kisline ter ribosomi. Učinkovine baktericidno ali bakteriostatično delovanje dosežejo po različnih mehanizmih, kot so inhibicija sinteze celične stene, inhibicija sinteze proteinov ali nukleinskih kislin, motnje delovanja celične membrane ter delovanje kot antimetaboliti (4).

1.1.1. Odkrivanje, načrtovanje ter razvoj protibakterijskih učinkovin

V preteklosti najbolj učinkovit pristop je bila izolacija spojin iz naravnih virov, nekateri razredi učinkovin pa so bili pridobljeni s totalno kemijsko sintezo (2). Izolaciji oziroma sintezi je sledilo ovrednotenje spojin s testi inhibicije rasti bakterij na standardnih gojiščih. Dejanske tarče so bile tako identificirane šele kasneje (5).

Napredek molekularne biologije, biokemije in genetike je omogočil rutinsko *in vitro* reševanje velikega števila spojin na znanih tarčah. Pristop je uspešen v generiranju večjega števila zadetkov za različne tarče, temu pa sledi optimizacija spojin in s tem razvoj potencialnih učinkovin (1). Boljše razumevanje sosledja dogodkov, ki sledijo interakciji učinkovine s tarčo bi lahko pospešilo razvoj novih ter izboljšanje obstoječih učinkovin. Tovrstno spremljanje dogajanja v celici je možno z visokozmogljivim reševanjem knjižnic

bakterijskih genomov po stiku s protibakterijsko učinkovino ter z opazovanjem vzorcev ekspresije bakterijskih genomov, ki so posledica odziva na protibakterijsko učinkovino in nam pomaga razumeti tudi učinke spojin, ki niso posledica neposrednega delovanja na njihove tarče (6).

Protibakterijske učinkovine zajemajo unikaten kemijski prostor s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki ne sledijo pravilom Lipinskega (7). Celična stena ter v primeru po Gramu negativnih bakterij tudi dodatna zunanja celična membrana ščitita bakterijske celice. Večina tarč protibakterijskih učinkovin se nahaja v notranjosti celic, kar pomeni, da morajo za doseg tarč preiti močne pregrade. Le majhno število učinkovin se za prenos v celico poslužuje bakterijskih prenašalcev, saj njihova struktura ter funkcija nista dobro poznani, možen pa je tudi hiter razvoj rezistence z izgubo prenašalcev (1). Protibakterijske učinkovine imajo zato večjo polarnost, vodotopnost, polarno površino molekule ter molekulske mase, ki ne presegajo 600 Da. Razvoj uspešnih širokospektralnih učinkovin tako zahteva razumevanje vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti ter različnih strukturnih motivov na permeabilnost v bakterijsko celico (7). Za izvedbo uspešnih pristopov reševanja bi morali ustvariti raznolike knjižnice spojin z lastnostmi, ki so primerne za protibakterijske učinkovine (1).

Nove metode odkrivanja učinkovin vključujejo iskanje spojin z delovanjem proti prej neizkoriščenim tarčam ali metabolnim potem. Predhodno validirane tarče pa se uporabljajo za odkrivanje spojin z novim mehanizmom delovanja (8). Možna tarča so tudi mehanizmi rezistence bakterij (9). Izboljšana kemijska sinteza, odkrivanje tarč, dostopnost kristalnih struktur ligandov v kompleksih s tarčami ter boljše razumevanje mehanizmov rezistence so vodili v odkritje in razvoj analogov znanih učinkovin z boljšo jakostjo, farmakokinetičnimi lastnostmi in profili rezistence (1). Spojine, fragmenti in skeleti, katerih sinteza je bila v preteklosti prezahtevna ali predraga, se danes lahko izolirajo s pomočjo heterolognih gostiteljev, ustvarjenih z biotehnoško manipulacijo biosinteznih poti mikroorganizmov (5). Omembe vreden pristop je tudi razvoj hibridnih učinkovin, ki so sestavljene iz dveh ali več znanih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja (9).

1.2. Bakterijska rezistenca

Protimikrobne učinkovine so bile v naravi prisotne že dolgo pred odkritjem prvih učinkovin v laboratoriju, kar je pripomoglo tudi k razvoju rezistence (9). Bakterijska rezistenca je posebnost protibakterijskih učinkovin, ki je ne opazimo pri drugih skupinah zdravih učinkovin. Povzroči, da učinkovine sčasoma izgubijo svojo učinkovitost (2). Zaradi

rezistence se bolezni proti katerim smo se v preteklosti uspešno borili ponovno pojavljajo in terjajo življenja (4). Ni pa omejena samo na bakterije, prisotna je tudi pri glivah, parazitih in virusih (10). Večina prisotne rezistence izvira iz narave in jo vodijo evolucijski pritiski (5) (11). Vsi organizmi se z namenom preživetja prilagajajo svojemu okolju, kar vključuje tudi obrambo pred škodljivimi vplivi, kot so protibakterijske učinkovine (12). Razširjena neutemeljena uporaba učinkovin ustvarja selekcijski pritisk, ki favorizira bakterije s pridobljenimi mehanizmi rezistence (4). Večji kot je spekter delovanja učinkovine, večja je verjetnost za razvoj rezistence (12). Bakterije, ki so že odporne na eno učinkovino od sevov prisotnih v okolju še hitreje pridobijo druge tipe rezistence. Rezistenco so najprej opazili v bolnišnicah kjer se uporablja večina učinkovin in kjer različni bakterijski sevi pridejo v stik med sabo (4) (13). Rezistenca na več učinkovin pa je bila prvič opažena v petdesetih letih (4). Razumevanje mehanizmov in njihovega vpliva na protibakterijske učinkovine ter uspešno predvidevanje razvoja novih mehanizmov so nujni za uspešen razvoj učinkovin (11).

Rezistenco delimo na aktivno, ki je rezultat specifičnega evolucijskega pritiska, ter pasivno, ki je posledica splošnih procesov prilagajanja (13). Ločimo jo tudi na naravno in pridobljeno. Intrinzična ali naravna je posledica pomanjkanja tarč ali transportnih mehanizmov, pridobljena pa se pojavi po spremembi obstoječega genetskega materiala ali pridobitvi genetskega materiala od drugega vira (4).

Različne bakterije razvijejo odpornost različno hitro, nekatere pa jo lahko pridobijo od drugih bakterij (2). Razlog za kontinuiran razvoj rezistence so sekvenčne mutacije na kromosomih (10). Ko se geni za rezistenco razvijejo, se ti prenesejo vertikalno preko replikacije DNK, ali horizontalno z bakteriofagi, plazmidi, golo DNK ali transpozoni v celotno bakterijsko populacijo (4) (10). Plazmidi, krožni fragmenti DNK, se prenašajo v procesu konjugacije, gola DNK, ki najpogosteje izvira iz odmrlih in razpadlih bakterijskih celic, pa med transformacijo. Bakteriofagi informacijo prenesejo preko okužbe bakterijske celice v procesu transdukcije (12). Nekateri transpozoni vsebujejo integrone, mesta DNK kjer se integrirajo različni geni in tako omogočajo prenos multiple rezistence (10) (12). Posamezen gen običajno nosi rezistenco za določeno učinkovino, možna pa je akumulacija več genov v eni bakterijski celici (10).

Poznanih je veliko različnih bioloških mehanizmov rezistence, ki jih lahko povzamemo z razgradnjo ali spremembo učinkovine z bakterijskimi encimi, aktivnim črpanjem učinkovine iz bakterijske celice ter spremembo tarče oziroma receptorja (12). Nekateri znani mehanizmi

rezistence so mnogo kompleksnejši, zelo verjetno pa je, da se bodo v prihodnosti razvili še mnogi drugi (9) (12). Enak tip mehanizma lahko posredujejo različni geni, na posamezno učinkovino pa bakterije lahko delujejo z več različnimi mehanizmi (10). Nekatere učinkovine, kot so fluorokinoloni, s svojim delovanjem spodbudijo obrambni odziv celice, kar poveča število napak v replikaciji DNK in s tem dodatno pospešijo razvoj rezistence (2). Izguba rezistence je tudi v odsotnosti učinkovine zelo počasna. Plazmidi vsebujejo gene za različne mehanizme in so prisotni dokler katerikoli od mehanizmov predstavlja prednost za preživetje gostiteljske celice. Umiku učinkovine običajno sledi zmanjšanje obsega zaznane rezistence, vendar pa ta vedno ostane prisotna in se razširi ob ponovni vpeljavi učinkovine (10).

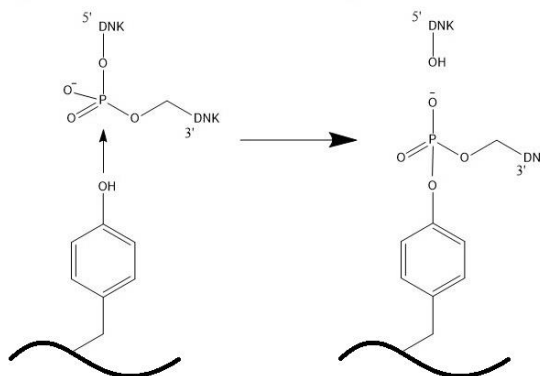
Tekmovanje med razvojem novih učinkovin ter odzivom bakterij z razvojem novih mehanizmov rezistence poteka ves čas (9). Najnovejše učinkovine se zato uporabljajo kot zadnja izbira, pomemben pa je tudi časovni zamik med odkritjem učinkovine ter njenim prihodom na trg, ki je ugoden za razvoj rezistence (14). Za uspešen boj proti rezistenci bodo zato potrebni še številni drugi pristopi kot so boljši nadzor nad širjenjem infekcij, boljša diagnostika ter bolj racionalna uporaba učinkovin (12).

1.3. Topoizomeraze

Tridimenzionalna struktura DNK nadzoruje replikacijo, ekspresijo in rekombinacijo genetskega materiala, ki je zapisan v dvojni vijačnici DNK. Ta je stisnjena v majhnem celičnem prostoru, zato je večina pomembnih tridimenzionalnih interakcij topološke narave. Reševanje topoloških problemov zahteva tudi krožna narava prokariontske DNK (15). Večina celičnih procesov, ki za svoj potek potrebujejo dostop do genetskih informacij, zahteva začasno ali trajno ločitev verig DNK (16). Zaradi dvojnoverižne strukture in odsotnosti proste rotacije v celicah, ločitev verig povzroči supernavijanje. Pozitivni supernavoji nastanejo pred mesti replikacije in transkripcije ter oba procesa hitro zaustavijo. Negativni supernavoji pa nastanejo za temi mesti in sprožijo nastanek nenormalnih DNK struktur, kot so D in R zavoji (17). Tudi vezava na histone in druge proteine povzroči podobne supernavoje. Transkripcija nekaterih promotorjev v bakterijski DNK supernavoje zahteva, jih pa ne sme biti preveč. Topologija DNK mora tako biti skrbno vzdrževana za optimizacijo njene funkcije (16).

DNK topoizomeraze so encimi, ki nadzorujejo topologijo DNK v celici in so nujne za preživetje vseh organizmov (15) (16). Cepitev DNK s topoizomerazami poteka preko prehodne kovalentne fosfodiesterne vezi med tirozinom v aktivnem mestu encima ter

koncem cepljene vijačnice, ki nastane po sočasni cepitvi fosfodiesterne vezi DNK (16) (18) (slika 1). Nastala vez ohrani energijo vezi med sladkorjem in fosfatom v verigi DNK ter integriteto genetskega materiala s fiksiranjem verige med cepitvijo (15). V času obstoja kovalentnega intermedata se uredi topologija (18). Encim se sprost po ponovni povezavi DNK z drugo reakcijo transesterifikacije (16) (18). Pri tej hidrokislinski reakciji nastane na nasprotni strani cepljene verige DNK pri predhodni reakciji, napade fosfor prehodne kovalentne vezi ter jo tako cepi (18). Hkrati se regenerira aktivno mesto topoisomeraze. Kemijska struktura DNK ostane nespremenjena, topoisomeraze pa vplivajo le na njeno topologijo (15). Topoisomeraze so tako naravna rešitev za topološke težave DNK v celici, a hkrati s svojim delovanjem v verigo vnašajo prehodne šibke točke (18).



Slika 1. Cepitev vezi DNK s topoisomerazami preko tvorbe prehodne fosfodiesterne vezi med tirozinom encima in 3' koncem cepljene vijačnice.

Topoisomeraze imenujemo skupino encimov z enakimi osnovnimi mehanizmi katalize (15). Ločimo jih na dva tipa, encimi tipa I cepijo verige DNK posamično, encimi tipa II pa cepijo obe verigi hkrati. Oba tipa nadalje ločimo na štiri podskupine, IA, IB, IIA ter IIB (18). Topoisomeraze tipa II ločimo na osnovi strukturnih podobnosti (16). Vse vsebujejo več polipeptidnih verig in so ATPaze (15). Katalitske lastnosti podskupine IIA so nujno odvisne od prisotnosti magnezijevih ionov kot kofaktorjev (19). Vsi do sedaj znani prokariotski encimi tipa II so sestavljeni iz dveh različnih podenot in imajo heterotetramerno strukturo A_2B_2 . Evkariontski encimi so homodimerni, ker sta se bakterijski podenoti A in B združili (15) (16). Lokacijo domen so osnovali na strukturi giraze, klasičnega bakterijskega encima tipa II (15). Vse topoisomeraze tipa II uporabljajo energijo pridobljeno iz hidrolize ATP za relaksacijo supernavojev v strukturi DNK, giraza pa je edina sposobna to energijo uporabiti tudi za uvajanje negativnih supernavojev (16). V bakterijah poleg giraze najdemo še topoisomerozo IV, ki prav tako sodi v družino topoisomeraz tipa II. Giraza je pomembna za podaljševanje verige DNK med replikacijo in njen začetek, topoisomeroza IV pa je nujna za dekatencijo hčerinskih kromosomov pred celično delitvijo in odstranjevanje vozlov iz genoma. Tudi v evkariontskih celicah se nahaja topoisomeroza II, ki je homologna prokariotskim encimom tipa II (15).

V obeh encimih je bilo identificiranih več tarč, ki so ugodne za razvoj protibakterijskih učinkovin, saj so nujne za preživetje bakterij (7) (20). Te učinkovine izkoriščajo potencialno smrtonosno naravo topoizomeraz in zvišajo koncentracijo kompleksov encim-DNK, kar generira večje število cepitev verige DNK. To sproži obrambni odgovor v celicah ter mehanizme celične smrti (15). Učinkovine imajo tako baktericidni, ne bakteriostatični učinek in izkazujejo vsaj trikrat večjo selektivnost za bakterijske encime v primerjavi s sesalskimi. Hipotezo, da učinkovine delujejo preko vezave na komplekse encim-DNK so postavili po poskusih sekvenciranja. Ti poskusi so pokazali tudi, da kemijsko različne učinkovine ustavijo proces cepitve na različnih stopnjah. Po odstranitvi učinkovin so nastali kompleksi hitro reverzibilni (17).

Humane topoizomeraze pa so potencialna tarča za protitumorne učinkovine (7). Znanе so učinkovine razvite iz naravno prisotnega kamptotecina, ki zavirajo humano topoizomerazo I (15). Odkritih je bilo tudi nekaj zaviralcev bakterijske topoizomeraze IA, ki imajo podobno planarno poliaromatsko strukturo, a niso klinično uporabni zaradi pomanjkanja selektivnosti za bakterijske celice (20).

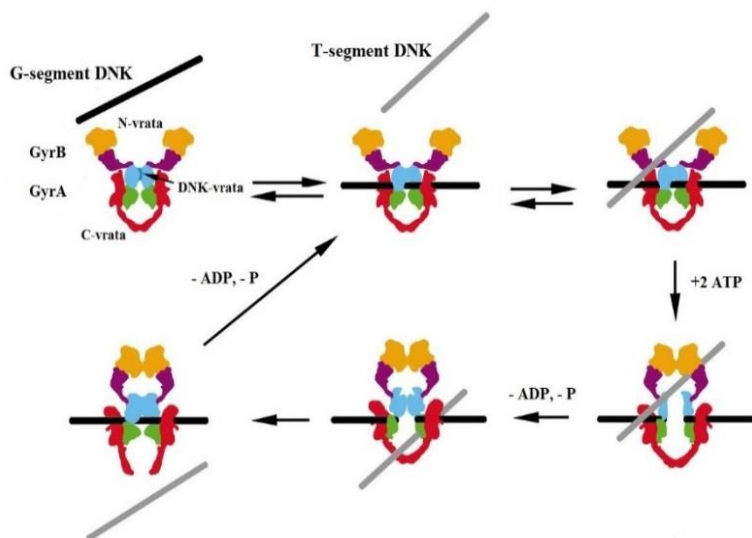
1.4. DNK giraza

DNK giraze so prisotne v vseh bakterijah. So edina skupina DNK topoizomeraz, ki je sposobna vpeljevati negativne supernavoje v strukturo DNK. To delovanje omogoča unikatna tridimenzionalna struktura C-domene, ki jo sestavlja zaporedje sedmih aminokislin in je prisotna v vseh girazah. Začetek DNK replikacije ter ustrezna ekspresija številnih proteinov v bakterijah zahtevata negativno supernavijanje, zato so DNK giraze esencialne za njihovo preživetje (21).

DNK giraza je sestavljena iz dveh podenot, GyrA ter GyrB (17). Najbolj raziskana je giraza *E. coli*, ki ima podenoti z molekulskima masama 97 kDa ter 90 kDa (22). Podenota GyrA vsebuje aktivno mesto s tirozinom ter tako omogoča vezavo na verigo DNK, podenota GyrB pa vsebuje ATPazno domeno (20) (21). Topoizomeraza IV ima strukturo analogno DNK girazi (20). Študije primerjave aminokislinskih zaporedij so pokazale, da sta podenoti GyrB ter ParE homologni N-terminalni regiji, podenoti GyrA ter ParC pa C-terminalni regiji evkariontskih topoizomeraz (7).

Kristalna struktura celotne DNK giraze še ni znana, so pa znane kristalne strukture nekaterih domen iz različnih bakterijskih sevov. Na voljo je tudi kristalna struktura fuzije GyrA ter GyrB domene, brez in z vezano DNK. Pojasnjene pa so tudi strukture proteinov GyrA ter GyrB in intaktne giraze nizke resolucije, pridobljene z rentgensko difrakcijo (22). Te strukture so identificirale tri strukturne motive, ki z zaporednim odpiranjem in zapiranjem omogočajo prehod dvojne vijačnice DNK tekom cikla katalize (7). To so N-terminalna domena GyrB, imenovana N-vrata, stik GyrA, GyrB ter DNK, ki so ga poimenovali DNK-vrata in C-vrata, ki jih tvori C-terminalna regija zvitja verig (22). Izbris C-terminalne regije, ki veže DNK, povzroči izgubo girazine sposobnosti supernavijanja DNK, ohrani pa se od ATP odvisna sposobnost relaksacije DNK (19). Uvajanje negativnega supernavitja poteka preko asociacije G-segmenta DNK z encimom, ki ji sledi navijanje DNK na C-terminalno domeno giraze. To omogoči T-segmentu iste molekule DNK, da doseže N-vrata. Vezava ATP zapre N-vrata ter

ujame T-segment DNK. Giraza nato cepi obe verigi na G-segmentu in T-segment potuje skozi odprta DNK-vrata ter cepljeni G-segment, na koncu pa še skozi C-vrata. Energija pridobljena s hidrolizo ATP omogoči



tudi regeneracijo encima za naslednji cikel katalize. V odsotnosti ATP lahko giraza relaksira DNK po obratnem mehanizmu (22) (slika 2).

Slika 2. Model cikla katalize giraze, povzet po (16). Barvna shema: ATPazni domeni GyrB, oranžna; domeni GyrB, ki ujameta T-segment DNK, vijolična; C-terminalni domeni GyrB, modra; domeni GyrA, ki vežeta G-segment DNK, zelena; C-terminalni domeni GyrA, rdeča.

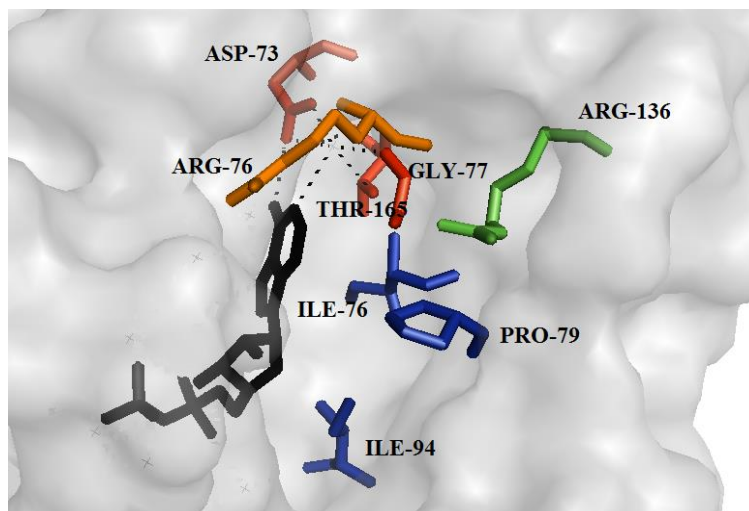
Podenoto GyrB so uspešno kristalizirali v kompleksu z ADPNP, analogom ATP, odpornim na hidrolizo, ter s strukturno različnimi inhibitorji. Znane so tudi kristalne strukture GyrA v kompleksih z inhibitorji in DNK. Omenjene dostopne strukturne informacije so podlaga za na strukturi osnovano načrtovanje zaviralcev obeh domen. Raziskave kristalnih struktur so dokazale, da je podenota GyrB evolucijsko dobro ohranjena, kar omogoča razvoj širokospektralnih učinkovin. Dokazale so tudi, da je GyrB homologna podenoti ParE kar

omogoča razvoj selektivnih ter dualnih inhibitorjev. Razvoj inhibitorjev z delovanjem na dve tarči je ugoden, saj upočasni razvoj odpornosti (7).

1.5. ATP vezavno mesto GyrB

Topoizomeraze delujejo kot ATPaze, v človeškem organizmu pa obstaja še mnogo drugih encimov, ki za svoje delovanje potrebujejo ATP. Vsi ti encimi imajo potencialno podobna vezavna mesta za inhibitorje, zato je pomembno doseganje selektivnosti glede na človeške homologe topoizomeraz ter druge ATPaze, kot so protein kinaze (7).

ATPazni domeni DNK giraze in topoizomeraze IV sta bili kristalizirani v kompleksu z ADPNP. Te strukture so pokazale, da adeninski obroč ADPNP tvori vodikove vezi z Asp73, Gly77 ter Thr165 encimov (slika 3).



Zaviralci se pogosto vežejo v adeninski žep, kjer tvorijo dve vodikovi

Slika 3. Shema vezave molekule ADP v ATP vezavno mesto GyrB. Na sliki so označeni tudi aminokislinski ostanki, ki niso udeleženi v vezavi ADP, a se izkoriščajo za vezavo večine znanih zaviralcev GyrB.

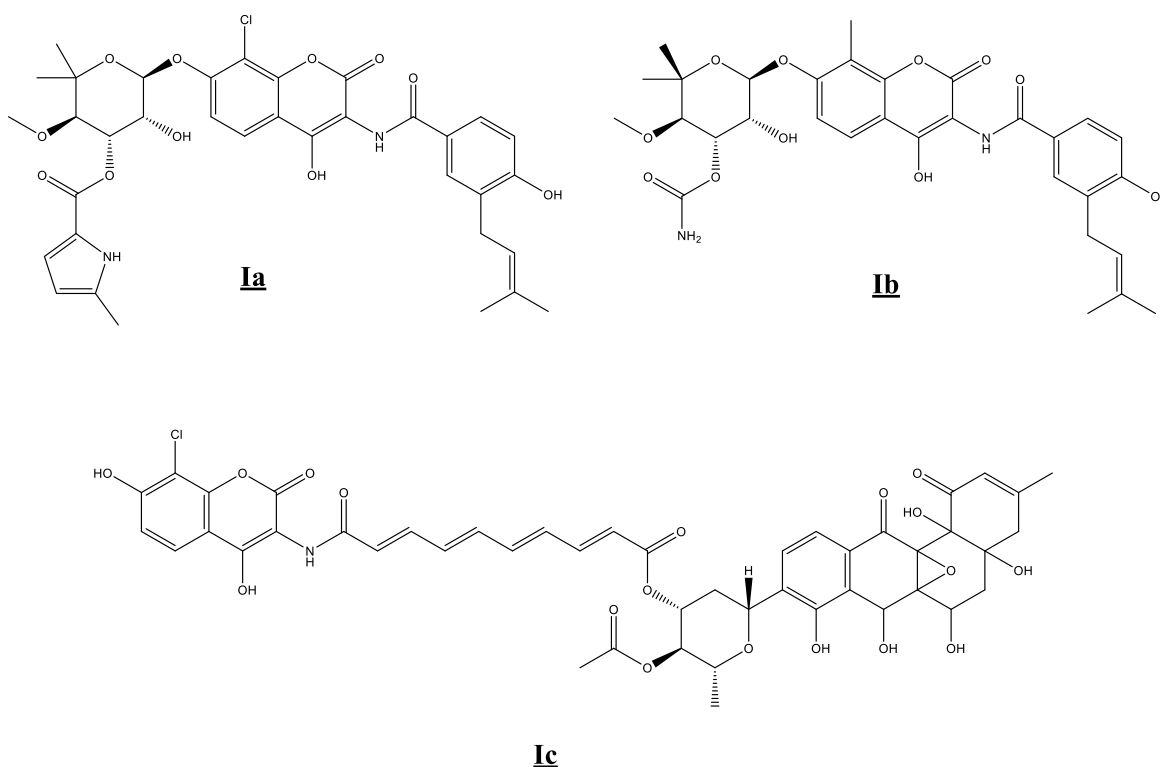
vezi z Asp73. Vsebovati morajo donor vodikove vezi, ki reagira s karboksilno skupino Asp73 ter v neposredni bližini akceptor vodikove vezi, ki tvori interakcije z molekulo vode, ki je stalno prisotna v vezavnem mestu (7). Do danes še niso znane mutacije s spremembo na Asp73 (23). Večinoma se hkrati tvorijo še vodikove vezi z Arg136, ki niso pomembne pri vezavi ATP. Dobro definirani, delno hidrofobni žepi v ATP vezavnem mestu so odlična osnova za optimiziranje spojin vodnic na osnovi strukture (7). Pomemben hidrofobni žep sestavljajo Pro79, Ile78 in Ile94, izkoristimo pa lahko tudi možnost tvorbe π -kation interakcij z Arg76 (23) (slika 3). Opisani model vezave večine zaviralcev GyrB/ParE je osnova za selektivnost napram drugim encimom, ki vežejo ATP (7).

GyrB spada v GHKL (DNK giraza, Hsp90, histidin kinaza ter MutL) družino ATPaz. Za to skupino je značilen strukturni element Bergeratov zgib, ki je odgovoren za vezavo ATP (7). Podobnost v ATP vezavnih mestih je najbolj opazna med MutL in GyrB. Med omenjenimi encimi je le malo homologije v primarnem zaporedju, se pa strukture encimov vseeno prilegajo glede na Bergeratov zgib. Struktura samega zгиба je znana, znane pa so tudi razlike

v ATP vezavnem mestu med posameznimi člani družine (24). ATPazna domena GyrB je signifikantno podobna tudi humani piruvat dehidrogenazi ter humani topoizomerazi II (7). Upoštevanje razlik med omenjenimi encimi je tako nujno za doseganje selektivnosti zaviralcev (24).

1.6. Znani zaviralci GyrB

Kompleksnost interakcij, ki jih tvorita DNK giraza in topoizomeraza IV nudi številne možnosti za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin (7). Protibakterijsko aktivnost lahko dosežemo na dva načina, z inhibicijo encimske aktivnosti in s stabilizacijo kovalentnega kompleksa giraza-DNK. Aminokumarini delujejo na GyrB oziroma ParE domeno in zavirajo ATPazno aktivnost. Kinoloni, ki se vežejo v GyrA oziroma ParC podenoto, pa stabilizirajo komplekse DNK-encim (7) (22). Oba tipa učinkovin običajno delujeta na oba encima zaradi strukturne podobnosti vezavnih mest. Rezistenca na oba tipa učinkovin, povezana z mutacijami v ustreznih regijah encima, je bila opažena (7).

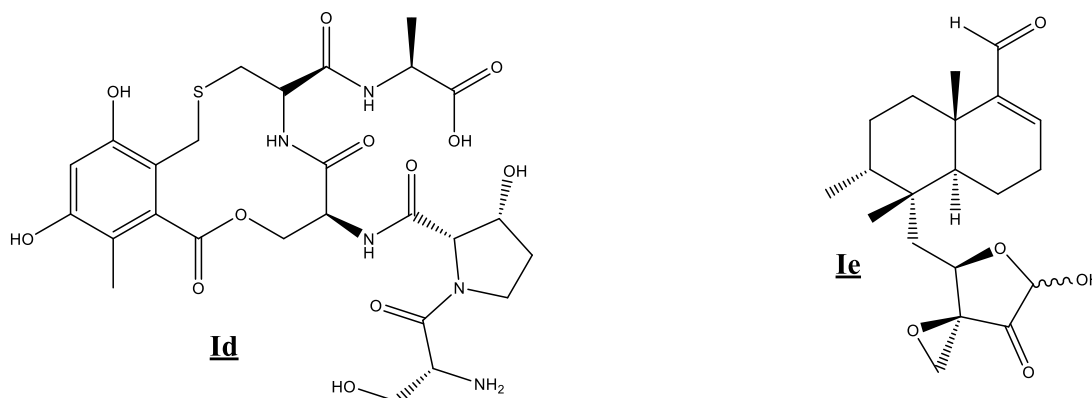


Slika 4. Znani zaviralci GyrB: **Ia**, klorobiocin; **Ib**, novobiocin; **Ic**, simociklinon D8.

Pri načrtovanju novih zaviralcev giraze ter v manjši meri topoizomeraze IV lahko ciljamo na ATP vezavno mesto (17). V to vezavno mesto se vežejo aminokumarini, kot so kumericin A1, klorobiocin (**Ia**, slika 4) ter novobiocin (**Ib**, slika 4), učinkovine, izolirane iz sevov streptomycet v 50. letih (17) (22). Klasični aminokumarini vsebujejo substituiran kumarinski obroč, sladkor L-noviozo ter aromatsko komponento (22). Kristalne strukture

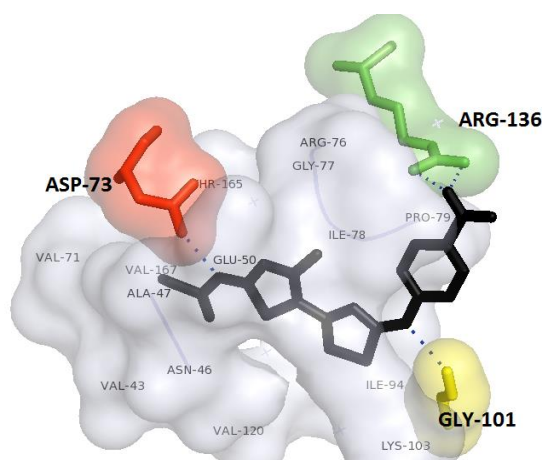
aminokumarinov v kompleksu z GyrB ter ParE so pokazale, da po vezavi delno prekrijejo ATP vezavno mesto in tako onemogočijo vezavo ATP (7). Analiza vezave klorobiocina je odkrila dodaten hidrofoben žep, sestavljen iz Val71, Val43, Val167 ter Ala47. Dodatna interakcija, ki jo omogoča vezava v omenjeni žep zviša jakost delovanja napram encimu (23). Novobiocin, ki deluje tudi na sintezo RNA, so kljub močnemu zaviranju DNK giraze umaknili s tržišča zaradi nizke biološke uporabnosti in topnosti, stranskih učinkov ter rezistence (7) (17) (19). Ugotovili so, da aminokumarini delujejo toksično tudi na evkariontske celice, kar povezujejo z njihovim delovanjem na druge ATPazne encime (17). Simociklinoni (**Ic**, slika 4), hibridni antibiotiki, ki vsebujejo aminokumarinske ter poliketidne elemente, delujejo protibakterijsko preko vezave na GyrA domeno (22).

Primeri razredov spojin, ki se vežejo v GyrB domeno so še ciklotialidini (**Id**, slika 5), kinodin, klerocidin (**Ie**, slika 5) ter kibdelomicin in sorodne spojine (7) (25). Ciklotialidini so ATP kompetitivni zaviralci DNK giraze, izolirani iz streptomiket, ki pa imajo zaradi slabega prehajanja v bakterijske celice le šibko protibakterijsko aktivnost (7) (22). Tudi ta razred spojin deluje ATP kompetitivno preko prekritja ATP vezavnega mesta, vendar se vežejo na drugačen način kot aminokumarini (22) (23). So prvi primer nekumarinskih zaviralcev ATPazne aktivnosti GyrB in s tem prvi dokaz, da na ATP vezavno mesto giraze lahko delujemo s kemijsko zelo različnimi strukturami (23).



Slika 5. Znani zaviralci GyrB: **Id**, predstavnik ciklotialidinov; **Ie**, klerocidin.

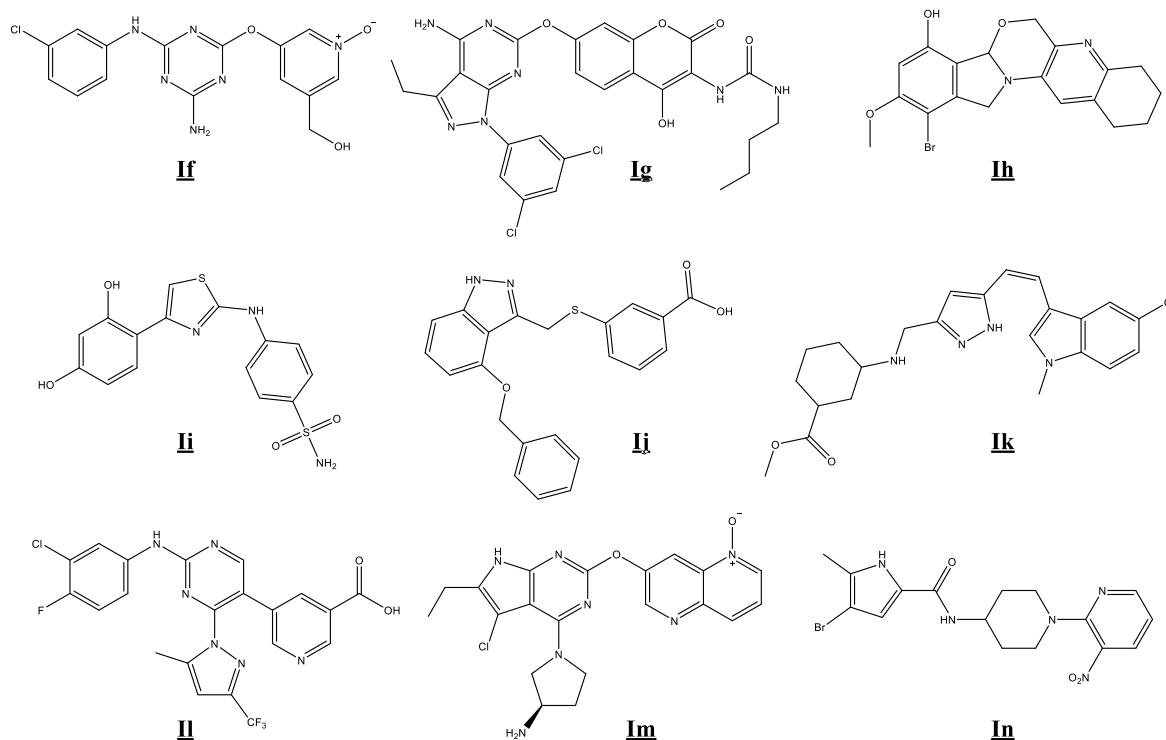
Za identifikacijo spojin s potencialnim ATP kompetitivnim zaviralnim delovanjem na DNK girazo se pogosto uporabljata rešetanje visoke zmogljivosti ter rešetanje na osnovi strukture (7). V podjetju Zeneca so študije vezave aminokumarinov vodile do aminotriazinov (**Ii**, slika 7), ki vsebujejo heterocikel z aminom na mestu 2, ki je odgovoren za tvorbo vodikovih vezi z Asp73 in molekulo vode. Ogrodje te skupine je omogočalo uvedbo dodatnih funkcionalnih skupin, ki so ciljale na druga področja v vezavnem mestu. Sledila je objava skupine hibridnih spojin (**Ig**, slika 7), ki vsebujejo strukturne motive ATP, novobiocina ter omenjenih triazinov s strani podjetja Roche. Tekom razvoja te skupine spojin so odkrili, da uvedba etilne skupine omogoča izkoriščanje dodatnih hidrofobnih



Slika 6. Vezava zaviralca GyrB, ki so ga sintetizirali Brvar in sodelavci, v ATP vezavno mesto GyrB.

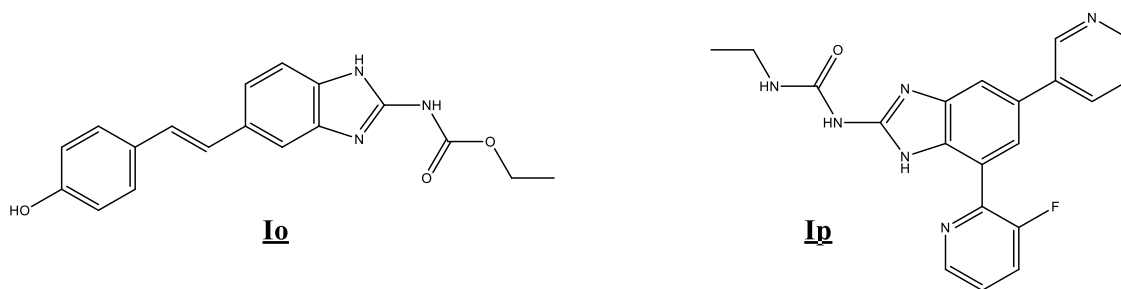
interakcij z vezavnim mestom, ki ga zaseda klorobiocin. Nadaljnje rešetanje molekul je vodilo v raziskave skupine spojin s fenolno osnovo (**Ih**, slika 7)(23). Brvar in sodelavci so se v svojih poskusih rešetanja osredotočili na resorcinolni obroč, opažen v ciklotialidinih, ki tvori za afiniteto nujne vodikove vezi z Asp73 (**Ii**, slika 7). V nadaljnjem poskusu pa so ohranili fenolni del strukture, ki se je izkazal kot zadosten za tvorbo vodikovih vezi z Asp73 in iskali zamenjavo za tiazolni obroč (7) (slika 6). V podjetju Roche so odkrili tudi indazolni razred spojin (**Ij**, slika 7), kjer indazolni obroč tvori interakcije z Asp73 in vodo. Substituent benzojske kisline reagira z Arg136, fenil pa s hidrofobnim žepom. Pri Dainippon so raziskovali pirazole kot potencialne zaviralce giraze ter nadalje optimizirali prej znane indazole. Kljub dosegu boljše penetracije v bakterijske celice, ti indazoli še vedno niso primerni kandidati za učinkovine zaradi visokega obsega vezave na plazemske proteine. Pirazole (**Ik**, slika 7) so optimizirali z enakimi pristopi, a so ti izkazali le šibko protibakterijsko delovanje. Druga podjetja so izvajala nadaljnje poskuse optimizacije pirazolnega ali indazolnega skeleta. Poskusi rešetanja v podjetju AstraZeneca so odkrili arilaminopiridinski skelet (**Ii**, slika 7). V podjetju Trius so se osredotočili na pirolpirimidine in s strukturnimi modifikacijami poskušali doseči vezavo v dodatne žepe vezavnega mesta (**Im**, slika 7). Po opustitvi dela na triazinskem skeletu, je rešetanje v AstraZeneci odkrilo pirolamidno spojino vodnico (**In**, slika 7). Metilpirolni fragment te

serije spojnin je odgovoren za interakcije z Asp73 in vodo. Daiichi Sankyo je kasneje razkril serijo imidazolnih analogov pirolamidne serije (23).



Slika 7. Znani zaviralci GyrB: **I**f, predstavnik aminotriazinov; **I**g, predstavnik serije hibridnih spojnin; **I**h, predstavnik spojnin s fenolno osnovo; **I**i, zaviralec GyrB, ki so ga sintetizirali Brvar in sodelavci; **I**j, predstavnik indazolov; **I**k, predstavnik pirazolov; **I**l, predstavnik arilaminopiridinov; **I**m, predstavnik pirolpirimidinov; **I**n, pirolamidna spojina vodnica.

V podjetju Vertex so optimizirali strukturno novo spojino vodnico, ki je bila derivat etil karbamata (**I**o, slika 8). Glavne modifikacije strukture so bile zamenjava karbamata z etilsečnino, ki omogoča dodatno vodikovo vez z Asp73, izboljšanje interakcij z Arg138, ter uvedba dodatne arilne skupine, običajno 2-piridila, ki omogoča vezavo v hidrofobni žep (**I**p, slika 8). Med imidazolom ter 2-piridilom se tvori ugodna intramolekularna vodikova vez, zaradi katere imidazolni dušik reagira kot akceptor vodikove vezi z molekulo vode, vez pa zagotovi tudi koplanarnost molekule (23). Na osnovi uspeha razreda benzimidazol sečnin kot dualnih inhibitorjev GyrB ter ParE se raziskujejo nekateri strukturno podobni razredi (7).

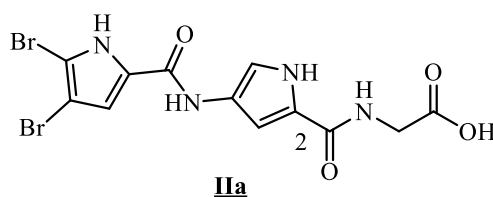


Slika 8. Znani zaviralci GyrB: **Io**, derivat etil karbamata, **Ip**, predstavnik etilsečnin.

Sintetizirani so bili številni nizkomolekularni zaviralci GyrB ter ParE, nobena od spojin pa ni dosegla klinične uporabe (25). Glavni cilj racionalnega načrtovanja zaviralcev GyrB je doseči širokospektralno delovanje. To so dosegli z vnosom določene stopnje fleksibilnosti v molekule, saj se strukture vezavnih mest nekoliko razlikujejo med sevi. Spojine odkrite s poskusi rešetanja in sledečo optimizacijo pa je potrebno optimizirati tudi s stališča fizikalno-kemijskih lastnosti in tako omogočiti prehod v bakterijske celice (7).

2. Načrt dela

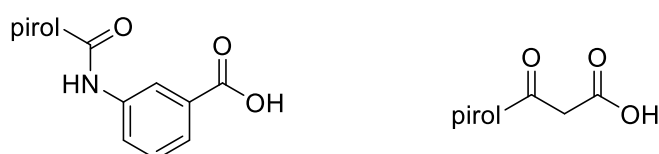
Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so predhodno pripravili pirolamidni zaviralec DNK giraze (spojina **IIa**), ki je izkazal zaviralno aktivnost pri biološkem testiranju na girazi *E. coli* ($IC_{50} = 61,3 \mu M$). Z namenom dosega boljše vezavne energije v vezavno mesto giraze B bomo poskusili sintetizirati rigidizirane derivate ter optimizirati substituentne spojine **IIa** (slika 9). Ustrezno rigidizacijo bomo poskusili doseči z uvedbo ciklizacije in s tem tvorbo bicikličnega obroča.



Slika 9. Spojina **IIa** ter mesto 2 na katerem bomo poskusili modificirati obstoječi substituent.

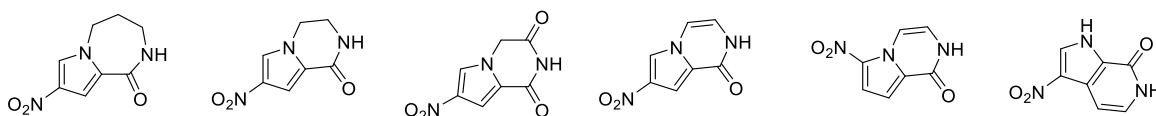
Znana je kristalna struktura 24 kDa *N*-končne domene *E. coli* DNK giraze B v kompleksu z nizkomolekularnim inhibitorjem, 4-((4'-metil-2'-propionamido-[4,5'-bitiazol]-2-il)amino)benzojsko kislino, ki nam bo v pomoč pri računalniško podprtem načrtovanju novih potencialnih zaviralcev DNA giraze B (26) (slika 6). Kristalna struktura omenjenega kompleksa je dostopna tudi v PDB podatkovni bazi (27). V molekuli bomo obdržali 4,5-dibromopirolni fragment, ki se je v podobnih spojinah, pripravljenih na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani izkazal za pomembnega za dosego protibakterijskega učinka.

Za ta del molekule predvidevamo, da se po analogiji znane kristalne strukture inhibitorja s podobnim fragmentom veže v adeninski žep vezavnega mesta giraze B (28). Modificirali bomo drugi del molekule, kjer bomo obdržali pirolni fragment spojine **IIa**. Za doseg ugodnejše ocenjene energije vezave bomo najprej poskusili modificirati substituent na mestu 2 (slika 10). Ohranili bomo karboksilno kislino za katero predvidevamo, da tvori interakcije z Arg136, doseči pa bomo poskusili π -kation interakcije z Arg76 ter hidrofobne interakcije s hidrofobnim žepom, ki ga sestavljajo Pro79, Ile78 ter Ile94. Hkrati bomo metilirali dušik pirola v tem delu molekule, saj je primerjava s spojinami z metilnim substituentom, pripravljenih na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pokazala, da omenjena substitucija ne vpliva signifikantno na protibakterijsko delovanje. Za uvedbo metiliranja smo se odločili zaradi lažje izvedbe načrtovanih kemijskih modifikacij.



Slika 10. Načrtovani modifikaciji substituenta na mestu 2 spojine **IIa**.

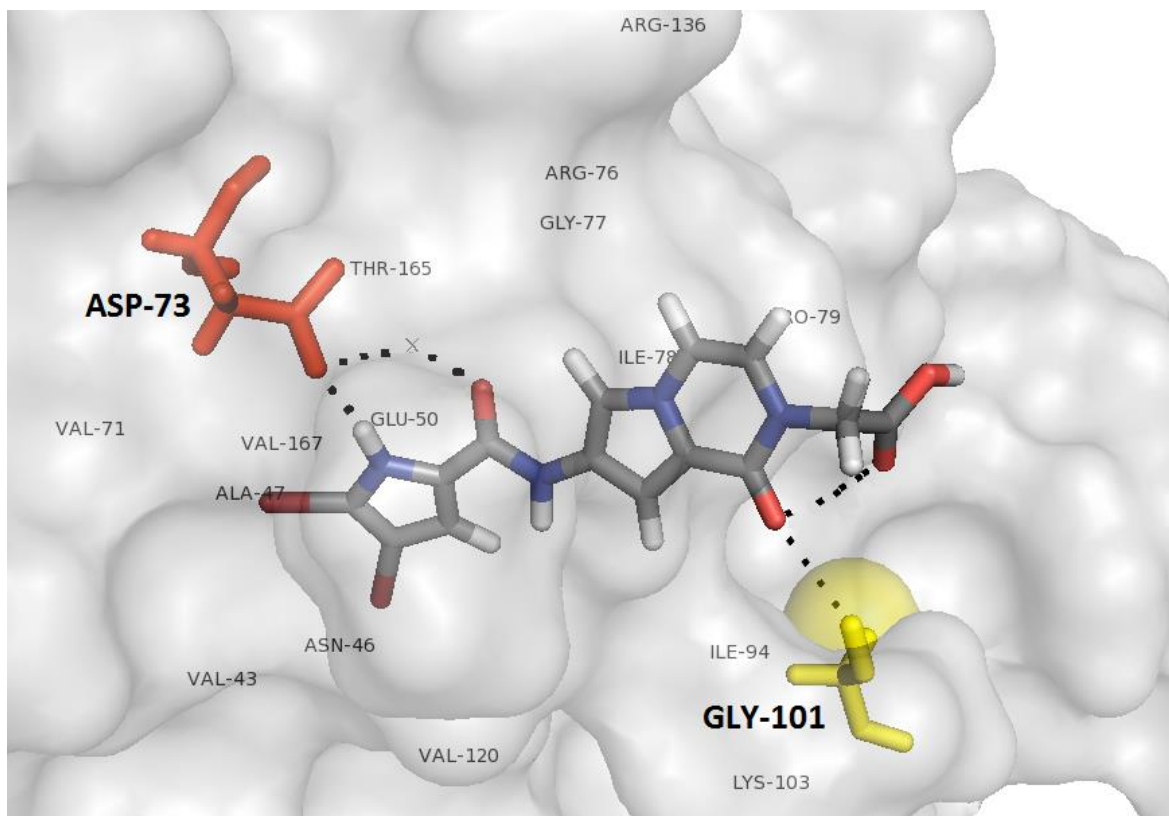
Poleg omenjene modifikacije bomo na istem delu molekule poskusili uvesti tudi rigidizacijo preko tvorbe bicikličnega obroča. Rigidizacija naj bi molekulo stabilizirala v energetsko ugodni konformaciji in na ta način izboljšala ocenjeno vezavno energijo. Sintetizirali bomo poskusili različne bicikle in oceniti strukturo, ki je najbolj ugodna za vezavo (slika 11). Z biciklom bi lahko tvorili hidrofobne interakcije s hidrofobnim žepom, ki ga sestavljajo Pro79, Ile78 ter Ile94 ter π -kation interakcije z Arg76.



Slika 11. Načrtovani biciklični sistemi.

Z namenom ohranitve kisle funkcionalne skupine, ki omogoča interakcije z Arg136 smo s sidranjem v vezavno mesto giraze B ocenili energijo vezave različno substituiranih derivatov bicikličnih obročev. Sintetizirali bomo biciklične spojine s substituenti, ki so izkazali najbolj ugodno ocenjeno energijo vezave (slika 12).

Sintetiziranim spojinam bodo z biološkimi testiranjmi na *E. coli* giraze B določili zaviralno aktivnost.



Slika 12. Računalniško sidranje načrtovane spojine (spojina **29**) v vezavno mesto znanega inhibitorja GyrB (spojina **I**).

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

V okviru izdelave magistrske naloge smo uporabljene kemikalije kupili pri proizvajalcih Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck in Fluka. Kemikalije smo uporabljali brez nadaljnega čiščenja. Brezvodni CH_2Cl_2 in THF smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi, brezvodni DMF pa smo predhodno pripravili in vzdrževali nad molekularnimi siti.

3.2. Metode

Brezvodno atmosfero smo ustvarili s pomočjo prepihanja z argonom ali z uporabo cevke, napolnjene s kalcijevim kloridom. Reakcije, pri katerih je bilo potrebno segretje v mikrovalovnem reaktorju, smo izvedli v instrumentu CEM Discover. Reakcijske zmesi, ki so vsebovale vodo smo posušili pod znižanim tlakom s pomočjo spiranja s toluenom. Toluenu z vodo tvori azeotropno zmes, ki ima vrelišče pri atmosferskem tlaku pri $84\text{ }^\circ\text{C}$. Vsebnost vode v omenjeni azeotropni zmesi je 13,5 masnih % (29). Za kvantitativno odstranitev vode je bilo potrebno zmes s toluenom sprati vsaj trikrat. Produkta smo po izolaciji sušili s

pomočjo membranske vakuumske črpalke Vacuubrand MZ2C ter hkratnega segrevanja pri 37 °C v vsebniku Büchi Glass Oven B-580.

Potek reakcij smo spremljali z analitičnim TLC. Uporabili smo aluminijaste plošče s silikagelom 60 F₂₅₄ (0,25 mm), ki jih proizvaja Merck. Za detekcijo smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in 365 nm) ter orositvene reagente ninhidrin, bromkrezol zeleno in KMnO₄. Kolonsko kromatografijo smo izvajali s pomočjo silikagela 60 (premer delcev: 0,04 – 0,063 nm), ki smo ga pridobili od proizvajalca Merck. Reverznofazno kolonsko kromatografijo smo izvajali s pomočjo instrumenta Biotage Isolera™ Prime z UV detektorjem (detekcija pri 254 nm). Uporabili smo kolono Biotage® SNAP Ultra C18 (12 g, premer delcev: 25µm). HPLC analize smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100 z UV-Vis detektorjem G1365B (detekcija pri 220 nm in 254 nm), termostatom G1316A in samovzorčevalnikom G1313A. Uporabili smo kolono Agilent EclipsePlus C18 (150 mm x 4,6 mm), pretok 1,0 mL/min in volumen injiciranja 5 µL. Glede na kemijsko naravo spojine smo uporabili dve različni mobilni fazi:

- mobilna faza 1: 30% CH₃CN v TFA (0,1% v H₂O) do 100% CH₃CN v 15 min, nato 5 min pri 100% CH₃CN, post time 6 min do 30% CH₃CN v TFA (0,1% v H₂O);
- mobilna faza 2: 5% CH₃CN v fosfatnem pufru (20mM v H₂O, pH=7.2) do 70% CH₃CN v fosfatnem pufru v 15 min, nato 5 min pri 70% CH₃CN v fosfatnem pufru, post time 6 min 5% CH₃CN v fosfatnem pufru.

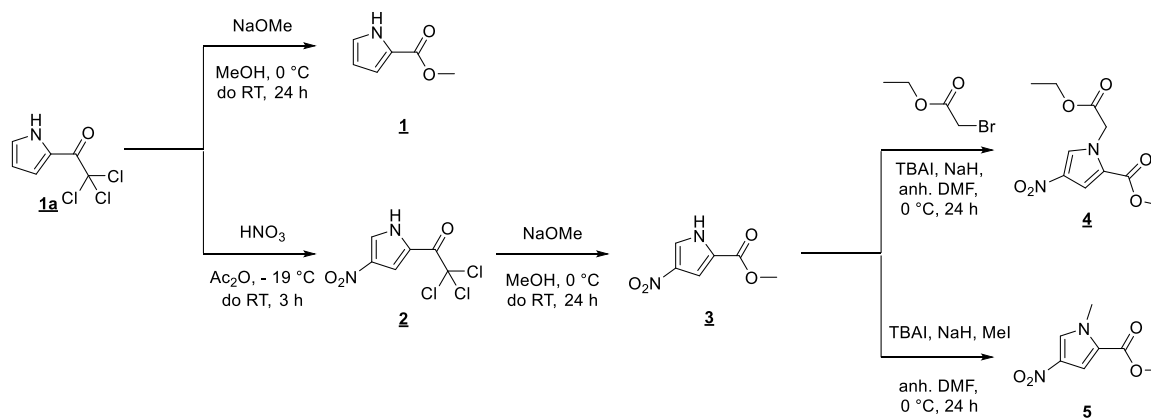
¹H in ¹³C NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker AVANCE III 400 pri 400 MHz v devteriranih topilih CDCl₃ ter DMSO-*d*₆ s tetrametilsilanom kot internim standardom. Dobljene spektre smo obdelali z računalniškim programom NMRNotebook 2.80 proizvajalca NMRtec S.A.S. Za izvedbo IR analiz smo uporabili spektrometer Thermo Nicolet Nexus FT-IR z ATR tehniko. Masne spektre so posneli na Inštitutu Jožef Stefan na masnem spektrometru VG Analytical Autospec Q ali masnem spektrometru Watters Micromass Q-TOF Premier. Tališča smo sintetiziranim spojinam določili na mikroskopu Cambridge instruments z grelno ploščo Reichert in niso korigirana.

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 15.1 proizvajalca CambridgeSoft. Za sidranje spojin v ATP vezavno mesto *E. coli* giraze B smo uporabili program FRED programskega paketa OpenEye. Za vizualizacijo vezave spojin v ATP vezavno mesto pa smo uporabili program PyMol 1.3. proizvajalca Schrodinger, LLC.

Zaviralno aktivnost sintetiziranih spojin na girazo B so na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ovrednotili z *E. coli* Microplate Assay Kit podjetja Inspiralis (26). Prva testiranja so opravili pri koncentraciji potencialnega zaviralca 100 μ M in 10 μ M. Spojinam, ki so pri omenjenih koncentracijah izkazovale aktivnost so nato določili IC₅₀ (27).

4. Eksperimentalni del

4.1. Sinteza derivatov pirola



4.1.1. Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1H-pirol-2-il)etan-1-ona (2)

Spojini **1a** (14,41 g, 67,85 mmol) dodamo Ac₂O (80 mL). Pripravimo ledeno kopel z dodatkom soli in metanola ter ohladimo reakcijsko zmes do – 19 °C. Reakcijo izvajamo v brezvodni atmosferi s pomočjo uporabe klorkalcijeve cevke. S pomočjo kapalnika postopoma dodajamo 65 % HNO₃ (8,0 mL) in mešamo dve uri, nato pa še dodatno uro pri sobni temperaturi. Dodamo led ter s filtracijo odstranimo 7,85 g izpadle oborine v obliki belih kristalov, ki predstavlja želeni produkt. Matičnico nato spiramo z dietil etrom (5x50 mL) in ekstrahiramo združene organske faze z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x50 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (2x50 mL). Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju uparimo dietil eter pod znižanim tlakom. Dodamo CHCl₃ (95 mL) ter EtOH (5 mL) in ohlajamo v zamrzovalniku čez noč. Kristalizacija ni bila uspešna, zato uparimo topilo ter čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂). Izoliramo še 1,573 g belih kristalov. Produkt predstavljata predhodno izpadla oborina (7,85 g) ter beli kristali izolirani s kolonsko kromatografijo (1,573 g) (celokupni izkoristek: 54 %). Tališče: 154 – 168 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.74 (dd, *J* = 2,3 Hz, 1,5 Hz, 1H, pirol-CH-3), 8.43 (d, *J* = 3,5 Hz, 1,5 Hz, 1H, pirol-CH-5), 13.71 (dd, *J* = 3,5 Hz, 2,3 Hz, 1H, pirol-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (30).

4.1.2. Tipični postopek za sintezo metilnih estrov

4.1.2.1. Sinteza metil 1*H*-pirol-2-karboksilata (**1**)

Spojino **1a** (500 mg, 2,35 mmol) raztopimo v MeOH (20 mL) ter bučko preprihomo z argonom. Raztopino ohladimo na ledeni kopeli in dodamo Na (81 mg, 3,53 mmol, 1,5 ekv.). Mešamo tri ure na ledeni kopeli, nato pa pri sobni temperaturi čez noč. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in raztopimo zaostanek v nekaj mL MeOH. Dodamo nekaj kristalov ledu in s filtracijo odstranimo izpadlo oborino. Matičnici dodamo 10% citronske kisline (10 mL) in filtriramo oborino, ki dodatno izpade. S tem pridobljeno matičnico ekstrahiramo z EtOAc (2x25 mL) ter sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju uparimo EtOAc pod znižanim tlakom in izoliramo 276 mg črno-rjavih kristalov (84 %). Razpad > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.29-6.31 (m, 1H, pirol-CH-4), 6.93-6.95 (m, 1H, pirol-CH-5), 6.98-6.99 (m, 1H, pirol-CH-3), 9.10 (s, 1H, pirol-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (31).

4.1.2.2. Sinteza metil 4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata (**3**)

Spojino **3** sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov opisanem pod točko 4.1.2. iz spojine **2** (500 mg, 1,94 mmol). Izoliramo 300 mg rjavih kristalov (91 %). Razpad > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 3H, CH₃), 7.28 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, pirol-CH-3), 8.08 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, pirol-CH-5) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (32).

4.1.3. Sinteza metil 1-(2-etoksi-2-oksoetil)-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata (**4**)

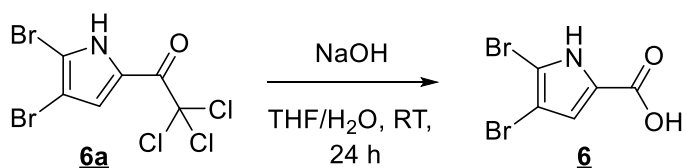
Spojino **3** (880 mg, 5,17 mmol) ter TBAI (166 mg, 0,52 mmol, 0,1 ekv.) dodamo v bučko, ki jo predhodno preprihomo z argonom. Raztopimo ju v brezvodnem DMF (25 mL) ter reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli. Dodamo NaH (155 mg, 6,46 mmol, 1,25 ekv.) in mešamo pol ure. Po dodatku etil 2-bromoacetata (686 µL, 6,20 mmol, 1,2 ekv.) čez noč mešamo na ledeni kopeli. DMF uparimo pod znižanim tlakom in čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : eter = 10 : 1, nato n-heksan : EtOAc = 6 : 1 do n-heksan : EtOAc = 1 : 1). Izoliramo 548 mg belih kristalov (41 %). Tališče: 74 – 82 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.30 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.27 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H, OCH₂), 5.07 (s, 2H, CH₂), 7.46 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.64 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-5) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.11, 51.36, 52.08, 62.26, 112.86, 122.77, 127.81, 135.96, 160.63, 167.16 ppm. IR (ATR): ν 3131, 3004, 2963, 1742, 1715, 1510, 1494, 1317, 1271, 1220, 1203, 1116, 748 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 241.1 (100),

257.1 ([MH]⁺). HRMS za C₁₀H₁₃N₂O₆: izračunan, 257.0774; ugotovljen, 257.0769. HPLC: mobilna faza 1; retencijski čas: 8,4 min (99,1 % pri 220 nm, 99,1 % pri 254 nm).

4.1.4. Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata (**5**)

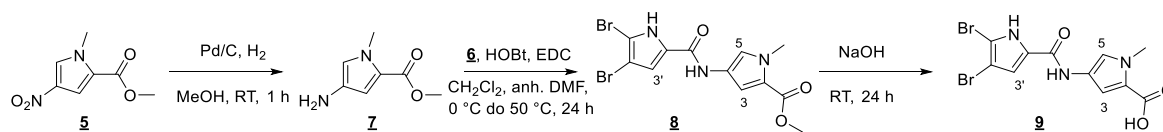
Spojino **3** (760 mg, 4,47 mmol) ter TBAI (144 mg, 0,45 mmol, 0,1 ekv.) dodamo v bučko, ki jo predhodno prepriamo z argonom. Raztopimo ju v brezvodnem DMF (20 mL) ter reakcijsko zmes ohladimo na ledeni kopeli. Dodamo NaH (134 mg, 5,59 mmol, 1,25 ekv.) in mešamo pol ure. Po dodatku MeI (557 µL, 8,94 mmol, 2 ekv.) čez noč mešamo na ledeni kopeli. DMF uparimo pod znižanim tlakom in dodamo nekaj mL MeOH ter nekaj kosov ledu. S filtracijo odstranimo izpadlo oborino, vodo in MeOH pa uparimo pod znižanim tlakom s pomočjo sočasnega uparivanja s toluenom. Oborino čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : eter = 10 : 1, nato n-heksan : EtOAc = 6 : 1 do n-heksan : EtOAc = 1 : 1). Izoliramo 500 mg belih kristalov (61 %). Tališče: 88 – 106 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.87 (s, 3H, OCH₃), 4.00 (s, 3H, CH₃), 7.41 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.62 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-5) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (32).

4.1.5. Sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**6**)



Spojino **6a** (1,00 g, 2,70 mmol) raztopimo v mešanici THF (30 mL) ter destilirane vode (30 mL), dodamo NaOH (540 mg, 13,5 mmol, 5 ekv.) in mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Nato dodamo destilirano vodo (50 mL) in speremo z EtOAc (2x50 mL). Vodno fazo nakisamo s koncentrirano HCl do pH = 1 in spojino ekstrahiramo z EtOAc (3x50 mL). Združene organske faze speremo z nasičeno vodno raztopino NaCl (1x30 mL) in jih sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju raztopino uparimo do suhega pod znižanim tlakom in izoliramo 710 mg črnih kristalov (98 %). Tališče: >300 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.83 (s, 1H, pirol-CH), 12.83 (bs, 1H, pirol-NH ali COOH) ppm. IR (ATR): ν 3434, 3173, 3128, 2983, 2511, 1636, 1555, 1453, 1426, 1363, 1308, 1246, 1211, 972, 906, 832, 756 cm⁻¹. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (33).

4.2. Sinteza derivatov metilpirola



4.2.1. Sinteza metil 4-amino-1-metil-1H-pirol-2-karboksilata (7)

Spojino **5** (230 mg, 1,25 mmol) raztopimo v MeOH (40 mL), reakcijsko zmes prepihujemo z argonom ter dodamo Pd/C (46 mg, 20 masnih %). Nastalo suspenzijo nato eno uro prepihujemo s H₂ pri sobni temperaturi. S filtracijo odstranimo paladij ter uparimo MeOH pod znižanim tlakom. Izoliramo 184 mg rjavega viskoznega olja (96 %). Ker je spojina na zraku neobstoja, jo takoj brez vmesnega čiščenja uporabimo v naslednjem koraku.

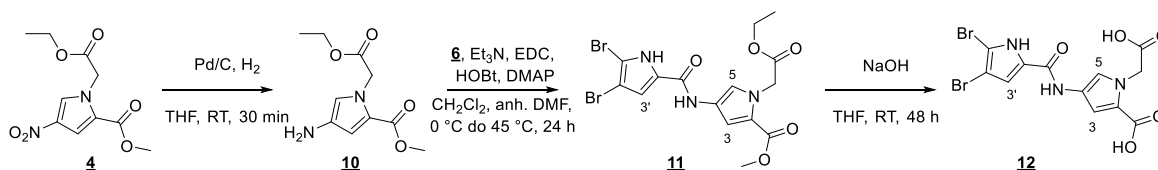
4.2.2. Sinteza metil 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksilata (8)

Spojino **7** (184 mg, 1,19 mmol), spojino **6** (385 mg, 1,43 mmol, 1,2 ekv.) ter HOBt (36 mg, 0,238 mmol, 0,2 ekv.) suspendiramo v CH₂Cl₂ (10 mL). Bučko prepriamo z argonom in ohladimo na ledeni kopeli ter dodamo EDC (222 mg, 1,43 mmol, 1,2 ekv.) med mešanjem. Po eni uri dodamo brezvodni DMF (5 mL) in raztopino segrevamo na oljni kopeli pri 50 °C čez noč. DMF nato uparimo pod znižanim tlakom ter raztopimo v MeOH (20 mL) in dodamo nekaj ledu. Nastalo oborino izoliramo s filtracijo in sušimo pod znižanim tlakom s pomočjo sočasnega uparivanja s toluenom. Izoliramo 165 mg rdeče oborine, ki predstavlja želeni produkt. Spremljanje s TLC je pokazalo, da je v matičnici ostalo nekaj produkta, zato smo pod znižanim tlakom uparili MeOH ter zaostalo maso s pomočjo ultrazvoka suspendirali v 10 mL CH₂Cl₂. Suspenzijo smo z gorilno pištolo ohranjali pri temperaturi refluksa nekaj minut ter jo nato ohladili na sobno temperaturo. Po 30 min ohlajanja v zamrzovalniku smo izpadlo oborino odstranili s filtracijo ter posušili na vakuumski črpalki. Izolirali smo še 37 mg rdečih kristalov (celokupni izkoristek: 43 %). Tališče: 205-217 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, NCH₃), 6.87 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.07 (s, 1H, pirol-CH-3'), 7.41 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, pirol-CH-5), 9.99 (s, 1H, amid-NH), 12.84 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.31, 51.07, 98.04, 105.33, 108.21, 112.93, 118.87, 120.72, 122.28, 127.90, 156.07, 160.74 ppm. IR (ATR): ν 3362, 3122, 2952, 1688, 1646, 1572, 1444, 1406, 1265, 1236, 1221, 1097, 811, 743 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 401.9 ([M-H]⁻, 100). HRMS za C₁₂H₁₀N₃O₃ Br₂: izračunan, 401.9089; ugotovljen, 401.9078. HPLC: mobilna faza 1; retencijski čas: 9,5 min (100,0 % pri 220 nm, 96,3 % pri 254 nm).

4.2.3. Sinteza 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1H-pirol-2-karboksilne kisline (**9**)

Spojino **8** (0,18 g, 0,44 mmol) suspendiramo v 1 M NaOH (2,2 mL, 2,20 mmol, 5,0 ekv.) in mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Reakcijsko zmes nakisamo do pH=2 s koncentrirano HCl, zmes ohladimo v zamrzovalniku in s filtriranjem izoliramo 140 mg rjavih kristalov (81 %). Tališče: 173 – 190 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.84 (s, 3H, NCH₃), 6.83 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.07 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, pirol-CH-3'), 7.37 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, pirol-CH-5), 9.96 (s, 1H, amid-NH), 12.26 (bs, 1H, COOH), 12.83 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.22, 97.99, 105.17, 108.21, 112.85, 119.82, 120.19, 121.96, 127.93, 155.97, 161.85 ppm. IR (ATR): ν 3132, 1686, 1624, 1589, 1459, 1414, 1287, 1216, 1192, 1144, 973, 781, 741 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 343.9 (100), 387.9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₁H₈N₃O₃Br₂: izračunan, 387.8932; ugotovljen, 387.8922. HPLC: mobilna faza 1; retencijski čas: 7,4 min (100,0 % pri 220 nm, 99,1 % pri 254 nm).

4.3. Sinteza 1-(karboksimetil)-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1H-pirol-2-karboksilne kisline (**12**)



4.3.1. Sinteza metil 4-amino-1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1H-pirol-2-karboksilata (**10**)

Spojino **4** (30 mg, 0,12 mmol) raztopimo v THF (10 mL) in preprihemo reakcijsko zmes z argonom. Dodamo konico spatule Pd/C ter preprihujemo s H₂ pol ure. Paladij odstranimo s filtracijo ter uparimo THF pod nižanim tlakom. Ker je spojina na zraku neobstoja, smo jo brez vmesnega čiščenja takoj uporabili v naslednjem koraku.

4.3.2. Sinteza metil 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-(2-etoksi-2-oksoetil)-1H-pirol-2-karboksilata (**11**)

Spojino **10** (0,10 g, 0,46 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (5 mL). V drugi bučki raztopimo spojino **6** (124 mg, 0,46 mmol, 1 ekv.) in Et₃N (192 μL, 1,38 mmol, 3 ekv.) v CH₂Cl₂ (5 mL) ter preprihamo z argonom. Na ledeni kopeli dodamo EDC (93 mg, 0,60 mmol, 1,3 ekv.), HOBt (12 mg, 0,09 mmol, 0,2 ekv.) in DMAP (11 mg, 0,09 mmol, 0,2 ekv.) ter mešamo eno uro. Nato dodamo predhodno pripravljeno raztopino spojine **10** v brezvodnem DMF in mešamo tri ure pri sobni temperaturi, nato pa pri 45 °C čez noč. Topilo uparimo pod

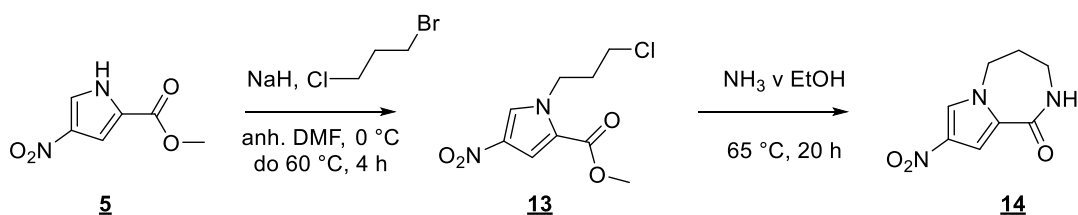
znižanim tlakom, dodamo EtOAc (25 mL) in spiramo z 10 % citrsko kislino (2x20 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x20 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1x20 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju uparimo do suhega pod znižanim tlakom. Dodamo nekaj mL CH₂Cl₂ ter petroletra in ohlajamo v zamrzovalniku čez noč. Izoliramo 68 mg svetlo rjavih kristalov (31 %). Tališče: 220 – 235 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 4.14 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂), 5.11 (s, 2H, CH₂), 6.95 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.05 (s, 1H, pirol-CH-3'), 7.52 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-5), 10.04 (s, 1H, amid-NH), 12.82 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.08, 50.03, 51.11, 60.69, 97.71, 105.84, 108.64, 113.00, 118.77, 120.74, 122.59, 128.17, 156.38, 160.61, 168.79 ppm. IR (ATR): ν 3386, 3189, 2962, 1691, 1638, 1567, 1413, 1231, 1202, 1096, 747 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 473.9 ([M-H]⁻, 100). HRMS za C₁₅H₁₄N₃O₅Br₂: izračunan, 473.9300; ugotovljen, 473.9297. HPLC: mobilna faza 1; retencijski čas: 10,1 min (100,0 % pri 220 nm, 97,7 % pri 254 nm).

4.3.3. Sinteza 1-(karboksimetil)-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**12**)

Spojino **11** (0,16 g, 0,33 mmol) raztopimo v THF (5 mL). Dodamo 1 M NaOH (1,650 mL, 1,65 mmol, 5 ekv.) ter mešamo pri sobni temperaturi 48 ur. Reakcijsko zmes ekstrahiramo z EtOAc (2x20 mL) in nato vodno fazo nakisamo do pH = 2 z 1 M HCl. Izpade oborina, ki jo odstranimo s filtracijo. Matičnico skoncentriramo pod znižanim tlakom ter segrejemo do temperature refluxa z grelno pištolo. Ko nastane bistra raztopina, jo 10 min ohlajamo v hladilniku in izoliramo izpadle kristale s filtracijo ter jih združimo s kristali pridobljenimi s prvim filtriranjem (9 mg). Matičnico ekstrahiramo z EtOAc (4x20 mL). Združene organske faze sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ in jih po filtriranju uparimo pod znižanim tlakom. Produkt čistimo še z reverznofazno kromatografijo (mobilna faza: 5 % CH₃CN v H₂O/ 0,1 % TFA do CH₃CN). Izoliramo 50 mg rjavih kristalov (celokupni izkoristek: 41 %). Pregled spektrov ¹H in ¹³C NMR pokaže prisotnost dodatnih signalov, zato sklepamo, da med čiščenjem z reverznofazno kromatografijo pride do hidrolize amidne vezi. Razpad > 300 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.97 (s, 2H, CH₂), 6.82 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.04 (s, 1H, pirol-CH-3'), 7.39 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, pirol-CH-5), 9.95 (s, 1H, amid-NH), 12.28 (bs, 1H, pirol-NH), 12.80 (bs, 2H, 2xCOOH) ppm. IR (ATR): ν 3131, 1675, 1561, 1453, 1403, 1265, 1224, 819, 745 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 343.9 (100), 431.9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₂H₈N₃O₅Br₂: izračunan, 431.8831; ugotovljen, 431.8833. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 7,2 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

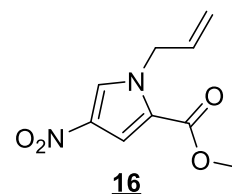
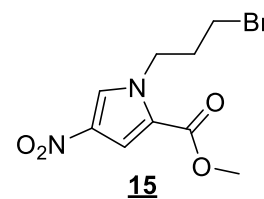
4.4. Sinteza obročnega sistema: 8-nitro-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirol[1,2-a][1,4]diazepin-1-on (**14**)

4.4.1. Prva sintezna pot



4.4.1.1. Sinteza metil 1-(3-kloropropil)-4-nitro-1H-pirol-2-karboksilata (**13**)

Spojino **5** (0,10 g, 0,59 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (5 mL) v bučki, ki jo predhodno preprihomo z argonom. Raztopino ohladimo na ledeni kopeli in dodamo 60% suspenzijo NaH v parafinskem olju (22 mg, 0,89 mmol, 1,5 ekv.) ter mešamo 30 min. Dodamo 1-bromo-3-kloropropan (70 μ L, 0,71 mmol, 1,2 ekv.) ter mešamo v argonovi atmosferi pri 60 °C 3,5 ur. Po tem času uparimo DMF pod znižanim tlakom, dodamo dietil eter (20 mL) in spiramo z vodo (2x20 mL) ter 10 % citrsko kislino (2x20 mL). Organsko frakcijo sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju uparimo do suhega pod znižanim tlakom. V drugi paraleli smo reakcijo po dodatku 1-bromo-3-kloropropana pustili mešati v argonovi atmosferi na ledeni kopeli čez noč, saj je spremljanje s TLC pokazalo, da reakcija poteka tudi pri 0 °C. Po zgoraj opisani ekstrakciji, smo dobljena produkta poskusili ločiti tudi s kristalizacijo v CH₂Cl₂, ki ni bila uspešna. Surovo zmes smo čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 3 : 1). Pregled spektrov ¹H NMR izoliranega rumenega viskoznega olja nam pokaže prisotnost dveh nečistot, spojin **15** in **16**. Spojino smo brez nadaljnega čiščenja takoj uporabili v naslednjem koraku.

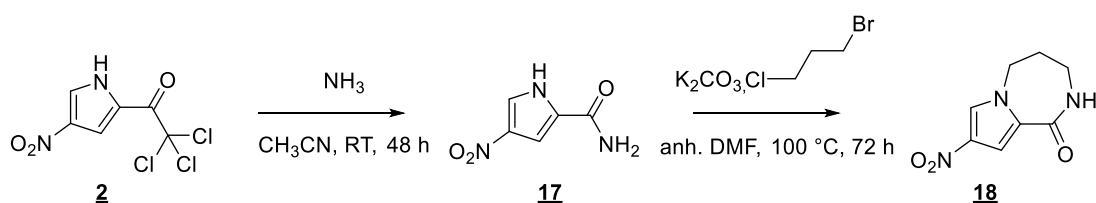


4.4.1.2. Sinteza 8-nitro-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirol[1,2-a][1,4]diazepin-1-ona (**14**)

Spojino **13** s prisotnima nečistotama **15** in **16** (30 mg, 0,12 mmol) raztopimo v nasičeni raztopini NH₃ v EtOH, ki jo pripravimo z uvajanjem NH₃ v EtOH (8 mL). Mešamo pri 65 °C 20 ur. Spremljanje s TLC je pokazalo, da reakcija ni potekla, zato jo segrejemo v mikrovalovnem reaktorju (60 min, 120 °C, 40 W) in nato čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ do CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1). Izoliramo 5 mg rumenega viskoznega

olja (21 %). Reakcijo smo poskusili optimizirati z dodatkom konice spatule Na₂Bu kot katalizatorja. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.05 (quin, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂-4), 3.12 (q, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂-3), 4.26 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CH₂-5), 7.05 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, pirol-CH-9), 8.13-8.15 (m, 2H, pirol-CH-7 in amid-NH) ppm. IR (ATR): ν 3135, 2955, 1712, 1505, 1314, 1249, 1193, 1104, 1083, 750 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 196.1 ([MH]⁺, 100). HRMS za C₈H₁₀N₃O₃: izračunan, 196.0722; ugotovljen, 196.0727. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 8,0 min (78,5 % pri 220 nm, 80,6 % pri 254 nm).

4.4.2. Druga sintezna pot



4.4.2.1. Sinteza 4-nitro-1H-pirol-2-karboksamida (**17**)

Spojino **2** (500 mg, 1,94 mmol) raztopimo v CH₃CN (50 mL), dodamo nasičeno raztopino NH₃ (20 mL) in mešamo pri sobni temperaturi 48 ur. Uparimo CH₃CN in vodo pod znižanim tlakom ter posušimo s pomočjo sočasnega uparivanja s toluenom. Izoliramo 298 mg rjavih kristalov (99%). Razpad > 300 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.43 (bs, 1H, amid-NH_a), 7.46 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.91 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, pirol-CH-5), 7.94 (bs, 1H, amid-NH_b), 12.67 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 105.72, 122.59, 126.99, 136.26, 160.89 ppm. IR (ATR): ν 3469, 3420, 3139, 1478, 1355, 1268, 812, 750, 693 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 154.0 ([M-H]⁻, 100). HRMS za C₅H₄N₃O₃: izračunan, 154.0253; ugotovljen, 154.0256. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 6,5 min (97,3 % pri 220 nm, 97,2 % pri 254 nm).

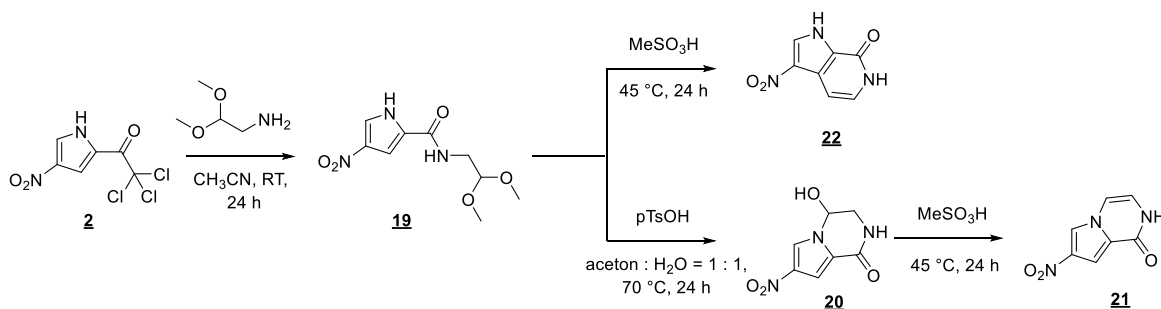
4.4.2.2. Sinteza 8-nitro-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirol[1,2-a][1,4]diazepin-1-ona (**18**)

Spojino **17** (1,00 g, 6,45 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (167 mL) po predhodnem preprihovanju bučke z argonom. Nato dodamo K₂CO₃ (1,77 g, 12,9 mmol, 2 ekv.) in 1-bromo-3-kloropropan (765 μL, 7,74 mmol, 1,2 ekv.) ter mešamo pri 100 °C 48 ur. Spremljanje s TLC pokaže, da reakcija poteka, a je v zmesi še vedno prisotna izhodna spojina, zato dodamo K₂CO₃ (446 mg, 3,23 mmol, 0,5 ekv.) ter 1-bromo-3-kloropropan (319 μL, 3,23 mmol, 0,5 ekv.) in mešamo pri 100 °C čez noč. Uparimo do suhega pod znižanim tlakom ter dodamo EtOAc (100 mL) in spiramo z 10% citrsko kislino (3x50 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1x50 mL). Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju

uparimo pod znižanim tlakom. Čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 3\%$ Et_3N do $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 40 : 1 + 3\%$ Et_3N). Izoliramo 94 mg oranžnega viskoznega olja (7 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.06 (quin, $J = 6,5$ Hz, 2H, CH_2-4), 3.15 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H, CH_2-3), 4.29 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, CH_2-5), 7.08 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, pirol-CH-9), 8.16-8.18 (m, 2H, pirol-CH-7 in amid-NH) ppm. Zaradi prisotnosti velikega števila nečistot nadaljnjih analiz nismo izvajali.

4.5. Sinteza derivatov 7-nitropirololo[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (**21**)

4.5.1. Sinteza obročnega sistema: 7-nitropirololo[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (**21**)



4.5.1.1. Sinteza *N*-(2, 2-dimetoksietil)-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksamida (**19**)

Spojino **2** (2,10 g, 8,16 mmol) ter 2, 2-dimetoksietan-1-amin (1,8 mL, 16,31 mmol, 2 ekv.) zmešamo v CH_3CN (35 mL) in mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Raztopino skoncentriramo pod znižanim tlakom ter ohlajamo v zamrzovalniku čez noč. S filtriranjem izoliramo 1,555 g izpadle oborine v obliki sivih kristalov (78 %). Tališče: 171 – 176 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 3.72 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 3.32-3.35 (m, 2H, CH_2 in H_2O v $\text{DMSO}-d_6$), 4.44 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CH), 7.47 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, pirol-CH-3), 7.90 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, pirol-CH-5), 8.52 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, amid-NH), 12.51 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 40.46, 53.18, 101.83, 105.42, 122.59, 126.65, 136.28, 159.38 ppm. IR (ATR): ν 3422, 3161, 3139, 3114, 2951, 2846, 1328, 1310, 1128, 1067, 967, 844, 806, 746 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 242.1$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100). HRMS za $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan, 242.0777; ugotovljen, 242.0775. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 9,5 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

4.5.1.2. Sinteza 4-hidroksi-7-nitro-3,4-dihidropirololo[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (**20**)

Spojino **19** (1,02 g, 4,19 mmol) in pTsOH (362 mg, 2,10 mmol, 0,5 ekv.) raztopimo v acetone : voda = 1 : 1 (70 mL) v argonovi atmosferi ter mešamo pri 70 °C čez noč. Poskus čiščenja z dodatkom EtOAc (150 mL) ter ekstrakcijo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2x60 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (2x60 mL) se je izkazal za neuspešnega, saj ostane

produkt v vodni fazi. Vodno fazo zato uparimo pod znižanim tlakom in k zmesi dodamo $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 7 : 1$ (15 mL) ter mešamo eno uro. Izpade oborina, ki predstavlja NaHCO_3 , produkt pa se nahaja v matičnici, ki jo uparimo pod znižanim tlakom. Dodamo nekaj mL MeOH ter s pomočjo grelne pištole vzdržujemo zmes pri temperaturi refluxa približno 5 min. Suspenzijo ohlajamo v zamrzovalniku čez noč in s filtriranjem izoliramo 0,778 g izpadlih rjavih kristalov. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in zaostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$ do $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$). Izoliramo še 10 mg rjavih kristalov (celokupni izkoristek: 94 %). Tališče: 174 – 190 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.41 (dd, $J = 13,6$ Hz, 4,0 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 3.67 (ddd, $J = 13,6$ Hz, 3,2 Hz, 2,0 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 5.75 (dd, $J = 4,0$ Hz, 3,2 Hz, 1H, CH), 7.12 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, pirol-CH-8), 7.35 (bs, 1H, OH), 8.11 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, pirol-CH-6), 8.14 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, amid-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 45.67, 75.12, 106.48, 122.26, 124.26, 136.13, 157.64 ppm. IR (ATR): ν 3273, 3143, 1649, 1508, 1376, 1337, 1305, 1253, 1096, 816, 746 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 198.1$ ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS za $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4$: izračunan, 198.0515; ugotovljen, 198.0514. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 6,2 min (96,7 % pri 220 nm, 95,5 % pri 254 nm).

4.5.1.3. Sinteza 7-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (21)

K spojini 20 (300 mg, 1,52 mmol) pod argonom dodamo MeSO_3H (10 mL) ter mešamo pri 45 °C čez noč. Dodamo vodo (30 mL) ter ekstrahiramo z EtOAc (8x100 mL). Združene organske faze uparimo do suhega pod znižanim tlakom ter izoliramo 249 mg rumenih kristalov. V vodni fazi opazimo izpadanje rumenih kristalov, ki jih odstranimo s filtracijo (20 mg). Celokupni izkoristek reakcije je tako 269 mg rumenih kristalov (98 %). Razpad > 300 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6.92 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, CH-4), 7.41 (dd, $J = 5,7$ Hz, 0,6 Hz, 1H, CH-3), 7.45 (dd, $J = 1,7$ Hz, 0,6 Hz, 1H, pirol-CH-8), 8.52 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, pirol-CH-6), 11.02 (s, 1H, amid-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 104.12, 107.17, 118.04, 118.18, 124.25, 137.28, 155.44 ppm. IR (ATR): ν 3212, 3148, 3107, 2907, 1682, 1510, 1496, 1369, 1354, 1315, 1300, 1210, 1192, 1121, 745, 736 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 180.0$ ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS za $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_3\text{O}_3$: izračunan, 180.0409; ugotovljen, 180.0404. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 8,4 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

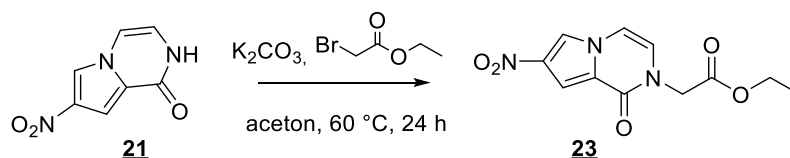
4.5.1.4. Sinteza 3-nitro-1,6-dihidro-7*H*-pirololo[2,3-*c*]piridin-7-ona (22)

Spojino 19 (50 mg, 0,21 mmol) raztopimo v MeSO_3H (2 mL) ter mešamo v argonovi atmosferi pri 45 °C čez noč. Nato dodamo EtOAc (20 mL) ter spiramo z 1 M raztopino NaOH (2x20 mL). Organsko fazo uparimo do suhega pod znižanim tlakom in surovo zmes

čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). Izoliramo 5 mg rumenih kristalov (13 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.94 (dd, *J* = 6,9 Hz, 1,3 Hz, 1H, CH-4), 7.27 (dd, *J* = 6,9 Hz, 6,0 Hz, 1H, CH-5), 8.46 (s, 1H, pirol-CH), 11.58-11.59 (m, 1H, amid-NH), 13.49 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): *m/z* = 118.1 (100), 180.0 ([MH]⁺). HRMS za C₇H₆N₃O₃: izračunan, 180.0409; ugotovljen, 180.0406. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 8,4 min (94,0 % pri 220 nm, 85,6 % pri 254 nm).

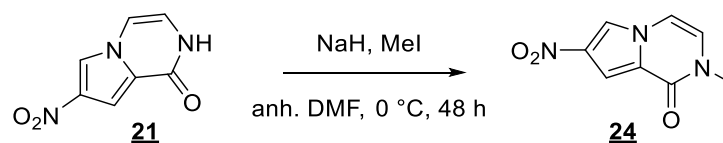
4.5.2. Sinteza gradnikov končnih spojin

4.5.2.1. Sinteza etil 2-(7-nitro-1-oksopirolo[1,2-*a*]pirazin-2(1*H*)-il)acetata (**23**)



Spojino **21** (200 mg, 1,12 mmol), etil 2-bromoacetat (136 μL, 1,23 mmol, 1,1 ekv.) ter K₂CO₃ (170 mg, 1,23 mmol, 1,1 ekv.) zmešamo v acetonu (65 mL) ter preprihomo z argonom. Mešamo pri 60 °C čez noč, uparimo topilo pod znižanim tlakom in dobljeno surovo zmes čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: EtOAc : n-heksan = 2 : 1). Izoliramo 148 mg rumenih kristalov (50 %). Tališče: 151 – 160 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃), 4.26 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂), 6.56 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, CH-4), 6.98 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, CH-3), 7.63 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, pirol-CH-8), 7.85 (d, *J* = 1,6 Hz, pirol-CH-6) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.07, 48.22, 61.19, 104.89, 107.51, 118.42, 122.45, 123.27, 137.75, 154.70, 168.07 ppm. IR (ATR): ν 3146, 3004, 1744, 1644, 1379, 1364, 1304, 1203, 1183, 746, 730, 634 cm⁻¹. HPLC: mobilna faza 1; retencijski čas: 5,8 min (99,4 % pri 220 nm, 98,8 % pri 254 nm).

4.5.2.2. Sinteza 2-metil-7-nitropirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**24**)

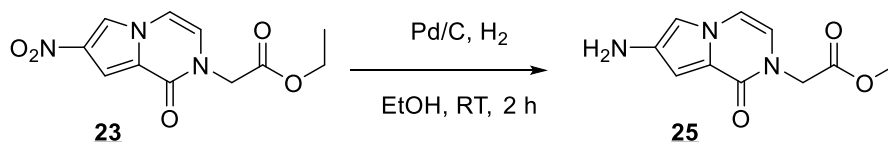


Spojino **21** (312 mg, 1,74 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (50 mL) ter preprihomo z argonom. Ohladimo na ledeni kopeli in dodamo 60% suspenzijo NaH v parafinskem olju (53 mg, 2,18 mmol, 1,25 ekv.) ter mešamo pol ure. Nato dodamo MeI (217 μL, 3,48 mmol, 2 ekv.) in mešamo še 48 ur ter uparimo DMF pod znižanim tlakom. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ do CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1) izoliramo 109 mg rumenih kristalov (109 mg, 32 %). Tališče: 218 – 228 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 3.57 (s, 3H, CH₃), 7.10 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, CH-4), 7.39 (dd, $J = 1,7$ Hz, 0,6 Hz, 1H, pirol-CH-8), 7.42 (dd, $J = 5,9$ Hz, 0,6 Hz, 1H, CH-3), 8.43 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, pirol-CH-6) ppm. IR (ATR): ν 3308, 3132, 3109, 1632, 1376, 1307, 1101, 1033, 972, 835, 810, 735, 635 cm⁻¹. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 9,6 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

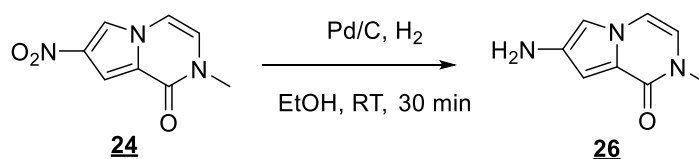
4.5.3. Tipični postopek katalitskega hidrogeniranja

4.5.3.1. Sinteza etil 2-(7-amino-1-okspirolo[1,2-*a*]pirazin-2(1*H*)-il)acetata (**25**)



Spojino **23** (72 mg, 0,27 mmol) raztopimo v EtOH (40 mL) ter prepihujemo z argonom. Dodamo konico spatule Pd/C ter prepihujemo s H₂. Reakcijo spremljamo s TLC in po 2 h odstranimo paladij s filtracijo ter uparimo THF pod znižanim tlakom. Surovi produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). Izoliramo 55 mg rjavih kristalov (86 %). Tališče: 72 – 95 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃), 3.04 (bs, 2H, NH₂), 4.22 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH₂), 4.56 (s, 2H, CH₂), 6.27 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, CH-4), 6.62 (dd, $J = 1,7$ Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-3), 6.67 (d, $J = 1,7$ Hz, pirol-CH-8), 6.82 (dd, $J = 5,9$ Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-6) ppm. IR (ATR): ν 3399, 3337, 3098, 2995, 1732, 1668, 1606, 1569, 1456, 1392, 1192, 752, 726, 633 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 236.1$ ([MH]⁺, 100). HRMS za C₁₁H₁₄N₃O₃: izračunan, 236.1035; ugotovljen, 236.1031. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 7,9 min (86,1 % pri 220 nm, 72,7 % pri 254 nm).

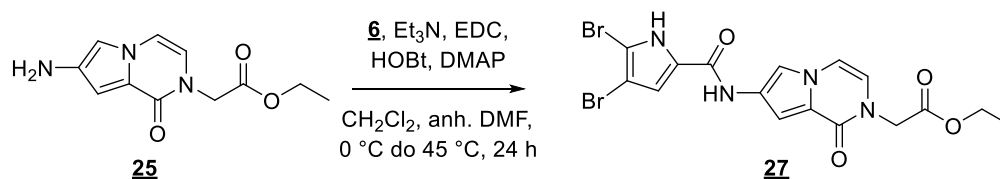
4.5.3.2. Sinteza 7-amino-2-metilpirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**26**)



Spojino **26** sintetiziramo po tipičnem postopku katalitskega hidrogeniranja iz spojine **24** (55 mg, 0,28 mmol). Po 30 min izoliramo 40 mg rjavo-rumenega viskoznega olja (87 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.30 (s, 3H, CH₃), 4.37 (bs, 2H, NH₂), 6.24 (dd, $J = 1,7$ Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-8), 6.64 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, CH-4), 6.73 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, pirol-CH-6), 7.18 (dd, $J = 5,8$ Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-3) ppm. IR (ATR): ν 3334, 1595, 1561, 1412, 1389, 747, 634 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 164.1$ ([MH]⁺, 100). HRMS za C₈H₁₀N₃O: izračunan, 164.0824; ugotovljen, 164.0828. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 5,8 min (77,3 % pri 220 nm, 58,8 % pri 254 nm).

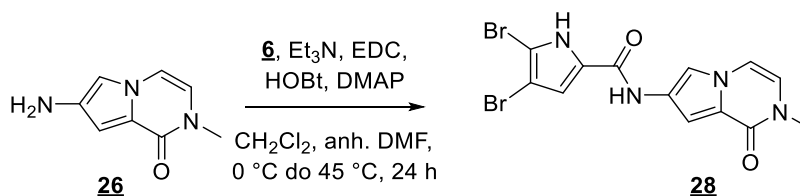
4.5.4. Tipični postopek tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta

4.5.4.1. Sinteza etil 2-(7-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-oksopirolo[1,2-*a*]pirazin-2(1*H*)-il)acetata (**27**)



Spojino **25** (40 mg, 0,17 mmol) raztopimo v mešanici CH₂Cl₂ (5 mL) ter brezvodnega DMF (5 mL). V drugi bučki raztopimo spojino **6** (46 mg, 0,17 mmol, 1 ekv.) in Et₃N (71 μL, 0,51 mmol, 3 ekv.) v CH₂Cl₂ (15 mL). Dobljeno zmes preprihomo z argonom in ohladimo na ledeni kopeli. Nato dodamo EDC (34 mg, 0,22 mmol, 1,3 ekv.), HOBT (5 mg, 0,03 mmol, 0,2 ekv.) in DMAP (4 mg, 0,03 mmol, 1,3 ekv.) ter mešamo eno uro. K reakcijski zmesi dodamo predhodno pripravljeno raztopino spojine **25** v CH₂Cl₂ in brezvodnem DMF ter mešamo pri 45 °C čez noč. Topilo odstranimo pod znižanim tlakom in očistimo surovo zmes s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ do CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1). Izoliramo 5 mg rjavih kristalov (6 %). Tališče: > 300 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 4.15 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H, OCH₂), 4.62 (s, 2H, CH₂), 6.84 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, CH-3), 6.91 (dd, *J* = 1,7 Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-6), 7.13 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, pirol-CH-8), 7.46 (dd, *J* = 5,9 Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-4), 7.85 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, pirol-CH-3'), 10.27 (s, 1H, amid-NH), 12.91 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.05, 48.02, 60.95, 98.13, 100.34, 105.69, 107.92, 109.76, 113.24, 118.35, 120.86, 126.48, 127.69, 156.24, 168.45, 196.89 ppm. IR (ATR): ν 3186, 3123, 2963, 2384, 1729, 1671, 1614, 1561, 1456, 1441, 1415, 1393, 1374, 1222, 1156, 745, 723 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 482.9 ([M-H]⁻, 100). HRMS za C₁₆H₁₃N₄O₄Br₂: izračunan, 482.9304; ugotovljen, 482.9300. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 14,4 min (82,9 % pri 220 nm, 79,9 % pri 254 nm).

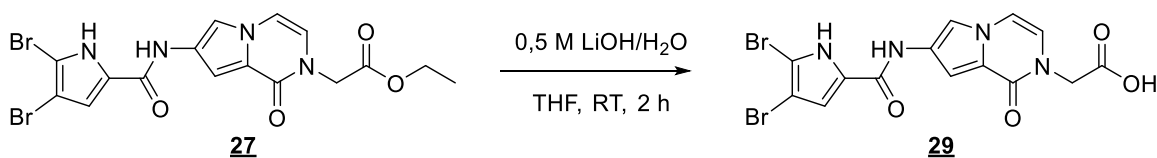
4.5.4.2. Sinteza 4,5-dibromo-*N*-(2-metil-1-okso-1,2-dihidropirolo[1,2-*a*]pirazin-7-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida (**28**)



Spojino **28** sintetiziramo po tipičnem postopku tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta opisanem pod točko 4.5.4. iz spojine **26** (30 mg, 0,18 mmol). Izoliramo 7 mg rjavih

kristalov (9 %). Tališče: > 300 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.35 (s, 3H, CH₃), 6.82 (d, J = 5,8 Hz, 1H, CH-3), 6.88 (dd, J = 1,7 Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-6), 7.13 (s, 1H, pirol-CH-3'), 7.43 (dd, J = 5,8 Hz, 0,5 Hz, CH-4), 7.81 (d, J = 1,7 Hz, pirol-CH-8), 10.25 (s, 1H, amid-NH), 12.90 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 34.32, 98.08, 99.66, 107.76, 109.11, 113.21, 118.71, 121.38, 126.34, 127.77, 131.15, 146.74, 154.84 ppm. IR (ATR): ν 3192, 2960, 1624, 1560, 1460, 1412, 1280, 1229, 1193, 751, 721, 638 cm^{-1} . MS (ESI): m/z = 264.9 (100), 410.9 ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za C₁₃H₉N₄O₂Br₂: izračunan, 410.9092; ugotovljen, 410.9092. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 13,3 min (83,8 % pri 220 nm, 77,2 % pri 254 nm).

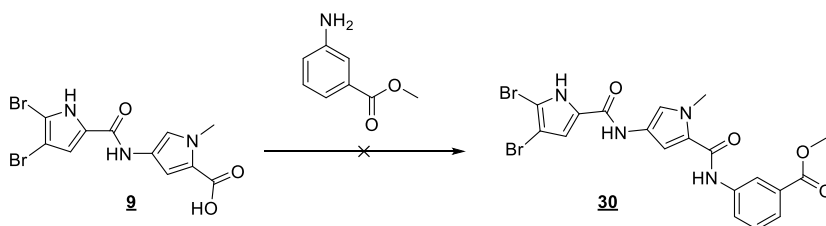
4.5.4. Sinteza 2-(7-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-1-okspirolo[1,2-*a*]pirazin-2(1H)-il)ocetne kisline (**29**)



Spojino **27** (106 mg, 0,220 mmol) raztopimo v 0,5 M vodni raztopini LiOH (2,5 mL) ter THF (2,5 mL) in mešamo na sobni temperaturi dve uri. Uparimo THF ter čistimo z reverznofazno kromatografijo (mobilna faza: 5 % CH₃CN v H₂O/ 0,1 % TFA do CH₃CN). Izoliramo 13 mg rjavih kristalov (13 %). Pregled spektrov ^1H in ^{13}C NMR pokaže prisotnost dodatnih signalov, zato sklepamo, da med čiščenjem z reverznofazno kromatografijo pride do hidrolize amidne vezi. Tališče: > 300 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 4.53 (s, 2H, CH₂), 6.83 (dd, J = 6,0 Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-4), 6.92 (dd, J = 1,6 Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-6), 7.14 (s, 1H, pirol-CH-3'), 7.44 (d, J = 6,0 Hz, 1H, CH-4), 7.85 (d, J = 1,6 Hz, 1H, pirol-CH-8), 10.29 (s, 1H, amid-NH), 12.90 (bs, pirol-NH) ppm. IR (ATR): ν 3118, 2969, 2535, 1700, 1618, 1577, 1455, 1416, 1377, 1235, 1177, 1152, 759, 718, 632 cm^{-1} . MS (ESI): m/z = 454.9 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100). HRMS za C₁₄H₉N₄O₄Br₂: izračunan, 454.8991; ugotovljen, 454.9002. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 7,1 min (90,9 % pri 220 nm, 96,0 % pri 254 nm).

4.6. Poskus sinteze skrajšanih derivatov spojine **9**

4.6.1. Poskus sinteze metil 3-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoata (**30**)



Spojino **30** smo sprva poskušali sintetizirati s pomočjo uporabe sklopitvenega reagenta. Spojino **9** in metil 3-aminobenzoat smo raztopili v ustreznem topilu ter bučko prepihali z argonom. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli ter dodali sklopitveni reagent. Po enournem mešanju smo dodali bazo ter dodatno topilo, če je bilo to potrebno. Sledilo je segrevanje reakcijske zmesi.

Preglednica I. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **30**.

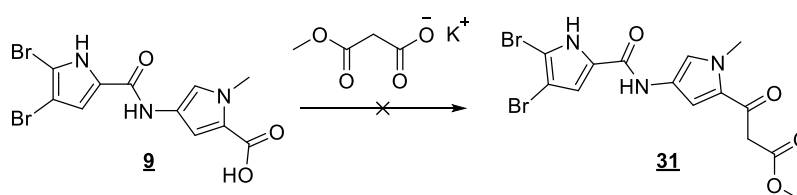
Reagent	Topilo	Sklopitveni reagent	Baza	Dodatno topilo	Temperatura in čas reakcije
0,8 ekv.	Brezvodni DMF	TBTU (1,0 ekv.)	/	/	50 °C, čez noč
1,1 ekv.	CH ₂ Cl ₂	TBTU (1,2 ekv.)	Et ₃ N (4,5 ekv.)	Brezvodni DMF	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 50 °C, 1 W 10 min, 80 °C, 1 W 60 min, 130 °C, 1 W

V obeh primerih smo želeni produkt poskusili izolirati z uparovanjem DMF pod znižanim tlakom ter dodatkom MeOH. Suspenziji smo dodali nekaj kosov ledu ter s filtriranjem odstranili izpadlo oborino. V drugem reakcijskem poskusu smo nato matičnico nakisali do pH = 2 s koncentrirano HCl in ekstrahirali z EtOAc. Zbrane organske faze smo ekstrahirali z nasičeno raztopino NaCl ter sušili nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji smo organsko fazo uparili pod znižanim tlakom in očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 1 : 1). Z opisanimi pogoji nismo sintetizirali želenega produkta.

Reakcijo smo nato poskusili izvesti z uporabo kislinskega klorida spojine **9**. Le-tega smo pripravili tako, da smo spojino **9** raztopili v brezvodnem THF ter dodali 1 kapljico brezvodnega DMF. Zmes smo ohladimo na ledeni kopeli ter dodali SOCl₂ (1,5 ekv.) in

mešali eno uro. V drugi bučki smo metil 3-aminobenzoat (1,1 ekv.) raztopili v THF. Dodali smo Et₃N (1 ekv.) ter DMAP (0,1 ekv.) in ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo predhodno pripravljene kislini klorid spojine **9**. Reakcijsko zmes smo mešali in pustili, da se segreje na sobno temperaturo čez noč. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom ter reakcijsko zmes raztopili v EtOAc. Izpadlo oborino smo odstranili s filtriranjem. Spremljanje s TLC je pokazalo, da se domnevni produkt zadržuje v matičnici, zato smo jo uparili ter čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 1 : 1). Z opisanimi pogoji nismo sintetizirali želenega produkta.

4.6.2. Poskus sinteze metil 3-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-1-metil-1*H*-pirol-2-il)-3-oksopropanoata (**31**)

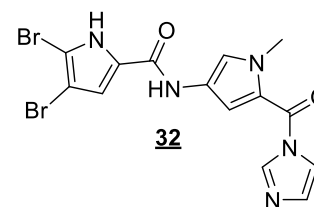


Spojino **9** smo raztopili v ustreznem topilu ter bučko prepihali z argonom. Dodali smo CDI ter pri sobni temperaturi mešali eno uro. Nato smo dodali MgCl₂ (0,97 ekv.), kalijev(I) 3-metoksi-3-oksopropanoat (1,5 ekv.) ter po potrebi brezvodni DMF. Mešali smo pri sobni temperaturi čez noč.

Preglednica II. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **31**.

Topilo	CDI	Brezvodni DMF
Brezvodni THF	1,27 ekv.	/
Brezvodni DMF	1,27 ekv.	/
THF	1,5 ekv.	3 mL

V vseh primerih smo izolacijo poskusili izvesti preko dodatka EtOAc. V zadnjih dveh primerih so izpadli kristali, ki smo jih odstranili s filtracijo. Matičnico smo spirali z 1 M HCl ter nasičeno raztopino NaCl in jo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju smo organsko fazo uparili pod znižanim tlakom.



S postopkoma pri katerih je bil uporabljen brezvodni DMF smo sintetizirali 4,5- dibromo-*N*-(5-(2, 3-dihidro-1*H*-imidazol-1-karbonil)-1-metil-1*H*-pirol-3-il)-1*H*-pirol-2-karboksamid (**32**), aktivirani intermediat, ki nastane med spojino **9** ter CDI.

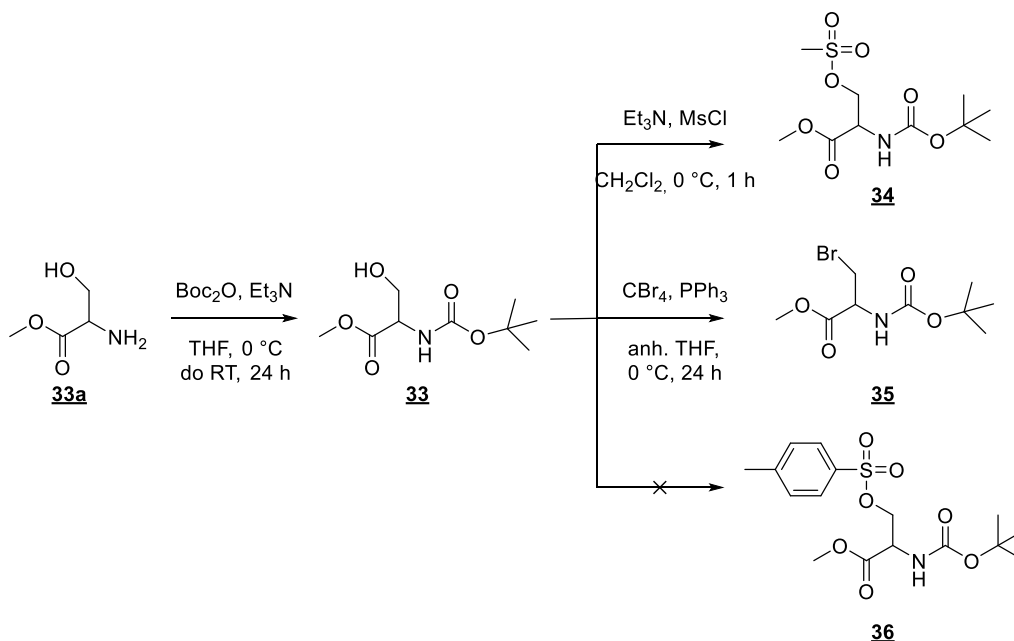
Spojino **31** smo nato poskusili sintetizirati iz spojine **32**. Kalijev(I) 3-metoksi-3-oksopropanoat (10 ekv.) ter $MgCl_2$ (10 ekv.) smo raztopili v mešanici brezvodnega THF ter brezvodnega DMF. Zmes smo segreli v mikrovalovnem reaktorju (10 min, 90 °C, 1 W). Po dodatku kapljice Et_3N ter spojine **32** (0,1 ekv.) smo raztopino ponovno segreli v reaktorju (15 min, 90 °C, 1 W). Kljub ponovnemu segretju (60 min, 100 °C, 1 W) smo v reakcijski zmesi zaznali le spojino **32**.

Spojino **31** smo nato poskusili sintetizirati preko tvorbe kislinskega klorida spojine **9** ter hkratnim aktiviranjem 3-metoksi-3-oksopropanoata. Kislinski klorid smo sintetizirali po postopku opisanem pod točko 4.6.1. Hkrati smo v drugi bučki pripravili magnezijevo sol 3-metoksi-3-oksopropanoata, tako da smo zmešali 3-metoksi-3-oksopropanoat (5 ekv.) in $MgCl_2$ (5 ekv.) ter ju raztopili v brezvodnem THF in segrevali pri 65 °C 3 ure. Predhodno pripravljenemu kislinskemu kloridu spojine **9** smo po kapljicah dodajali magnezijevo sol 3-metoksi-3-oksopropanoata. Dodali smo nekaj kapljic Et_3N ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi v argonovi atmosferi dve uri. Zmes smo nato segreli v mikrovalovnem reaktorju (60 min, 70 °C, 44 W). Uparili smo THF pod znižanim tlakom ter izolacijo izvedli po zgoraj opisanem postopku ekstrakcije. Z opisanim postopkom nam ni uspelo pripraviti želenega produkta. Reakcijo smo poskusili izvesti tudi tako, da smo kislinski klorid spojine **9** kapljali v magnezijevo sol 3-metoksi-3-oksopropanoata ter mešali pri sobni temperaturi čez noč. Uparili smo THF pod znižanim tlakom ter izolacijo izvedli z zgoraj opisanim postopkom ekstrakcij. Čistili smo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 1 : 1, nato n-heksan: EtOAc : očetna kislina = 1 : 1 : 0,01).

Spojino **31** smo nazadnje poskusili izolirati še z uporabo spojine **32** ter magnezijeve soli 3-metoksi-3-oksopropanoata. Spojino **32** smo raztopili v brezvodnem DMF ter magnezijevo sol kapljali v raztopino med mešanjem v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo nato mešali pri sobni temperaturi čez noč. Z nobenim od opisanih postopkov nismo sintetizirali želenega produkta.

4.7. Poskus ciklizacije preko uvedbe metilnega estra serina

4.7.1. Sinteza derivatov metilnega estra serina



4.7.1.1. Sinteza metil (2-(terc-butoksi)-2-oksoetil) serinata (33)

Spojino **33a** (1,779 g, 14,93 mmol), Boc_2O (3,584 g, 16,42 mmol, 1,1 ekv.) ter Et_3N (2,7 mL, 19,4 mmol, 1,3 ekv.) raztopimo v THF (50 mL). Reakcijsko zmes mešamo na ledeni kopeli 30 min, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Dodamo EtOAc (45 mL) in ekstrahiramo z 10 % citrsko kislino (2x50 mL). Sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 ter po filtriranju organsko fazo uparimo pod znižanim tlakom. Dobimo 3,273 g oranžnega viskoznega olja (100%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.48 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$), 2.10 (bs, 1H, OH), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.92-4.01 (m, 2H, CH_2), 4.42 (bs, 1H, CH), 5.45 (bs, 1H, karbamat-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (34).

4.7.1.2. Sinteza metil N-(2-(terc-butoksi)-2-oksoetil)-O-(metilsulfonyl)serinata (34)

Komercialno pridobljeni čisti D-enantiomer spojine **33** (2,00 g, 9,12 mmol) raztopimo v CH_2Cl_2 (60 mL) ter dodamo Et_3N (1,4 mL, 10,03 mmol, 1,1 ekv.). Raztopino preprihamo z argonom, ohladimo na ledeni kopeli in dodajamo po delih MsCl (776 μL , 10,03 mmol, 1,1 ekv.) ter mešamo eno uro. Med mešanjem dodamo vodo (50 mL) ter ločimo nastali fazi. Vodno fazo spiramo z CH_2Cl_2 (2x30 mL). Združene organske faze speremo z nasičeno raztopino NaCl (1x30 mL) in sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 ter po filtriranju organsko fazo uparimo pod znižanim tlakom. Dobimo 2,061 g brezbarvnega viskoznega olja (76 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.43 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$), 3.01 (s, 3H, SO_2CH_3), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.48 (dd, $J = 10,2$ Hz, 3,3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-a}$), 4.55-4.60 (m, 2H, CH in $\text{CH}_2\text{-b}$), 5.48 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, karbamat-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (35).

4.7.1.3. Sinteza metil 3-bromo-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanoata (35)

Komercialno pridobljeni čisti D-enantiomer spojine **33** (2,00 g, 9,12 mmol) raztopimo v brezvodnem THF (80 mL) po predhodnem prepihanju bučke z argonom. Hkrati pripravimo raztopino CBr_4 (4,537 g, 13,68 mmol, 1,5 ekv.) in PPh_3 (3,588 g, 13,68 mmol, 1,5 ekv.) v brezvodnem THF (80 mL). Vanjo na ledeni kopeli kapljamo predhodno pripravljeno raztopino spojine **33** in mešamo čez noč. S filtracijo odstranimo $\text{PPh}_3=\text{O}$ in reakcijsko zmes uparimo do suhega pod znižanim tlakom. Surovi produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 4 : 1 do n-heksan : EtOAc = 1 : 1) in izoliramo 1,385 g oranžnega viskozne olja (54 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.49 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$), 3.74 (dd, $J = 10,6$ Hz, 3,5 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-a}$) 3.83-3.86 (m, 4H, OCH_3 in $\text{CH}_2\text{-b}$), 4.77-4.80 (m, 1H, CH), 5.43 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, karbamat-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (36) (37).

4.7.1.4. Poskus sinteze metil *N*-(2-(*tert*-butoksi)-2-oksoetil)-*O*-tozilserinata (36)

Spojino **33** smo raztopili v ustreznem topilu. Bučko smo prepihali z argonom, po potrebi dodali bazo in ohladili na ledeni kopeli. Po delih smo dodali TsCl (1,1 ekv.) ter po potrebi katalizator ter bazo in mešali.

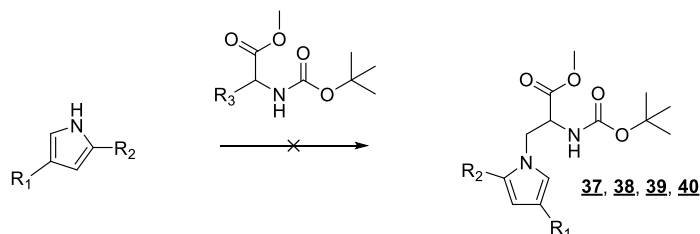
Preglednica III. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **36**.

Spojina 33	Topilo	Baza	Katalizator	Čas mešanja
Racemna zmes	Piridin	/	/	Čez noč
Racemna zmes	CH_2Cl_2	Et_3N (1 ekv.)	/	Čez noč
Racemna zmes	CH_2Cl_2	Et_3N (1 ekv.)	DMAP (0,05 ekv.)	2 uri
Komercialno pridobljeni čisti D-enantiomer	Brezvodni CH_2Cl_2	Et_3N (1 ekv.)	DMAP (0,05 ekv.)	2 uri

V prvih dveh primerih smo uparili topilo pod znižanim tlakom ter dodali EtOAc. Raztopino smo spirali z 1 M HCl ter nasičeno raztopino NaCl. Sušili smo nad brezvodnim Na_2SO_4 ter po filtriranju organsko fazo uparili pod znižanim tlakom. V tretji in četrti paraleli smo v reakcijsko zmes med mešanjem dodali destilirano vodo ter ločili nastali fazi. Vodno fazo

smo spirali s CH_2Cl_2 in ekstrahirali združene organske faze z nasičeno raztopino NaCl ter sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 . Po filtriranju smo organske faze uparili pod znižanim tlakom. Z nobenim od opisanih postopkov nismo izolirali želenega produkta.

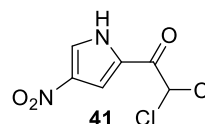
4.7.2. Poskus uvedbe metilnega estra serina na pirolni dušik



4.7.2.1. Tipični postopek poskusa sinteze z Mitsunobujevimi pogoji

Ustrezen izhodni derivat pirola (1 ekv.), spojino **33** (1,5 ekv.) in PPh_3 (1,5 ekv.) raztopimo v brezvodnem THF in ohladimo do $-15\text{ }^\circ\text{C}$. Pod argonom dodajamo po kapljicah DIAD (1,3 ekv.) ter mešamo pri $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 48 ur. Dodamo petroleter in reakcijsko zmes s pomočjo gorilne pištole vzdržujemo pri temperaturi refluxa eno minuto. Prelijemo še vročo raztopino in v bučki opazimo zaostalo viskozno snov, ki predstavlja $\text{PPh}_3=\text{O}$. Spremljanje s TLC je pokazalo, da opisani postopek čiščenja ni bil ustrezen, zato v reakcijsko zmes dodamo EtOAc. Produkt najprej čistimo z ekstrakcijo z nasičeno raztopino NaCl, nato pa uporabimo kolonsko kromatografijo z ustrezno mobilno fazo. V nobenem primeru ne izoliramo želenega produkta.

V primeru uporabe spojine **2** kot izhodnega pirola smo izolirali 2, 2-dikloro-1-(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (**41**). Reakcijo smo zato



poskusili izvesti tudi tako, da smo v prvi bučki raztopili PPh_3 v brezvodnem THF pri $-15\text{ }^\circ\text{C}$ v argonovi atmosferi. Raztopini smo po kapljicah dodajali DIAD dokler se le-ta ob dodatku ni razbarvala. Tako pripravljene betain smo takoj začeli kapljati v zmes spojine **41** ter spojine **33** v brezvodnem THF pri $-15\text{ }^\circ\text{C}$ ter tako pridobljeno reakcijsko zmes mešali 48 ur pri $-15\text{ }^\circ\text{C}$. Produkt smo najprej poskusili izolirati z dodatkom EtOAc in sledečim spiranjem z nasičeno raztopino NaCl. Surovo zmes smo čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 4 : 1). Tudi z opisano modifikacijo postopka nam ni uspelo pripraviti željenega produkta.

4.7.2.2. Poskus sinteze z uporabo aktiviranega derivata metilnega estra serina (**34**)

Dve bučki preprihomo z argonom in ohladimo na ledeni kopeli. V prvi spojino **34** raztopimo v brezvodnem DMF. V drugo bučko dodamo NaH (1,25 ekv.) ter brezvodni DMF. Nato dodamo spojino **3** (1 ekv.) ter na ledeni kopeli v argonovi atmosferi mešamo 30 min.

Dodamo raztopino spojine **34** v brezvodnem DMF s počasnim kapljanjem ter mešamo na ledeni kopeli čez noč. Reakcijsko zmes spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ ter nasičeno raztopino NaCl. Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter organsko fazo uparimo do suhega pod znižanim tlakom. Z opisanim postopkom ne sintetiziramo želenega produkta.

4.7.2.3. Poskus sinteze z uporabo bromiranega derivata metilnega estra serina (**35**)

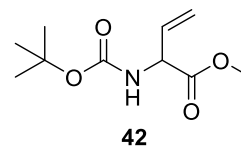
Ustrezni izhodni pirol, bazo in katalizator faznega prenosa zmešamo v ustreznem topilu v bučki predhodno preprihani z argonom. Reakcijsko zmes ohranjamo na želeni temperaturi ter dodamo spojino **35** (1,1 ekv.). Reakcijski pogoji v posamezni paraleli so opisani v spodnji razpredelnici.

Preglednica IV. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **35**.

Baza	Topilo	Temperatura pred dodatkom spojine 35	Katalizator faznega prenosa	Temperatura in čas reakcije
KOtBu (1 ekv.)	Brezvodni THF	0 °C	Bu ₄ NBr (0,1 ekv.)	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
KOtBu (1 ekv.)	Brezvodni DHF	0 °C	Bu ₄ NBr (0,1 ekv.)	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
K ₂ CO ₃ (2 ekv.)	Brezvodni DMF	0 °C	Bu ₄ NBr (0,1 ekv.)	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
K ₂ CO ₃ (1 ekv.)	Aceton	Refluks, spojino 35 dodajamo postopoma	/	Mešanje pri temperaturi refluksa čez noč
NaH (1,5 ekv.), dodamo po ohladitvi na 0 °C	Brezvodni DMF	0 °C, spojino 35 dodajamo postopoma	/	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
K ₂ CO ₃ (1 ekv.)	CH ₃ CN	Sobna temperatura	/	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 80 °C, 1 W 10 min, 100 °C, 1 W 10 min, 130 °C, 1 W

K ₂ CO ₃ (1 ekv.)	CH ₃ CN, brezvodni DMF	Sobna temperatura	Bu ₄ NBr (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 1 h, 140 °C, 1 W
K ₂ CO ₃ (1 ekv.)	THF	Sobna temperatura	/	Mikrovalovni reaktor: 15 min, 100 °C, 50 W

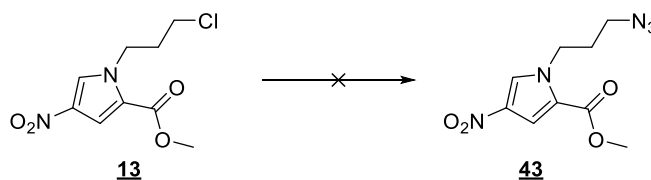
V vseh primerih spremljanje reakcije s TLC pokaže nastajanje metil 2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)but-3-enoata (**42**).



V primeru segrevanja reakcijske zmesi v mikrovalovnem reaktorju spremljanje s TLC pokaže nastajanje nove neznane spojine. Dodamo

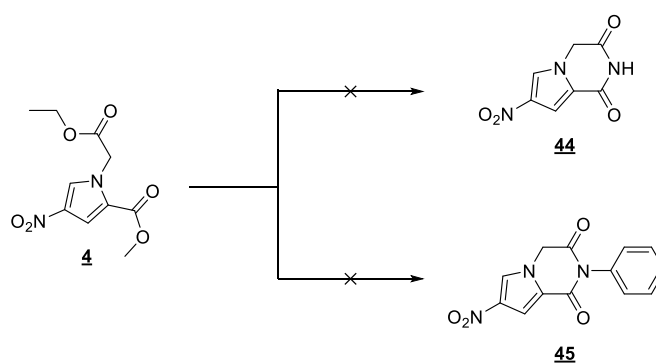
EtOAc ter ekstrahiramo z 10 % citrsko kislino. Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Tudi v tem primeru ne izoliramo želenega produkta.

4.8. Poskus sinteze metil 1-(3-azidopropil)-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata



Spojino **13** s prisotnima primesema **15** in **16** raztopimo v brezvodnem DMF, dodamo NaN₃ (3 ekv.) ter mešamo pri 60 °C 48 ur. Spremljanje s TLC je pokazalo, da reakcija ne poteka uspešno, zato dodamo še NaI (0,1 ekv.). Kljub dodatku katalizatorja reakcija ne poteka uspešno.

4.9. Poskus sinteze derivatov 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1,3(2*H*,4*H*)-diona (**44**)



4.9.1. Poskus sinteze 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1,3(2*H*,4*H*)-diona (**44**)

Spojino **4** in vir NH₃ raztopimo v ustreznem topilu. V reakcijsko zmes po potrebi dodamo bazo/reagent.

Preglednica V. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **4**.

Vir NH ₃	topilo	Baza/reagent	Temperatura in čas mešanja
25 % raztopina NH ₃	EtOH	/	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH	/	/	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH	/	/	Mikrovalovni reaktor: 15 min, 130 °C, 10 W 15 min, 150 °C, 10 W
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH	/	KO ^t Bu (1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 15 min, 120 °C, 10 W
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH	/	KCN (0,1 ekv.)	Mešanje pri 51 °C čez noč
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH, dodamo eno uro po dodatku MgCl ₂	THF	MgCl ₂ (0,5 ekv.)	Mešanje pri sobni temperaturi čez noč, nato pri 50 °C čez noč in na koncu pri 80 °C čez noč
NH ₄ OAc (1,1 ekv.)	EtOH	KCN (0,1 ekv.)	Mešanje pod refluxom 48 ur
NH ₄ OAc (1,1 ekv.)	EtOH	KCN (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 150 °C, 5 W
Nasičena raztopina NH ₃ v EtOH, kapljamo pod refluksom	EtOH	KCN (0,1 ekv.)	Mešanje pod refluxom čez noč

V primerih uporabe EtOH kot topila smo opazili tvorbo etilnega estra spojine **4**. Spojine smo poskusili izolirati z dodatkom EtOAc ter ekstrakcijo z 1 M HCl ter nasičeno raztopino NaCl. Po sušenju nad brezvodnim Na₂SO₄ ter filtraciji smo organske faze uparili pod znižanim tlakom. V primeru uporabe KCN smo po poteku reakcije v reakcijski zmesi opazili oborino, ki smo jo odstranili s filtracijo, matičnico pa sprali z 1 M HCl, 1 M NaOH ter nasičeno raztopino NaCl. Po sušenju nad brezvodnim Na₂SO₄ ter filtraciji smo organske faze uparili pod znižanim tlakom. V nobenem od primerov nismo izolirali zelene spojine.

4.9.2. Poskus sinteze 7-nitro-2-fenilpirolo[1,2-a]-pirazin-1,3(2H,4H)-diona (**45**)

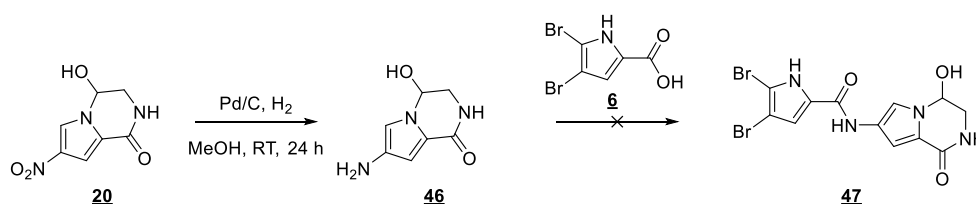
Spojino **4**, anilin ter ustrezne reagente mešamo v izbranem topilu.

Preglednica VI. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **45**.

Anilin	Topilo	Reagenti	Temperatura in čas mešanja
1,1 ekv.	toluen	pTsOH (0,1 ekv.)	90 °C, 48 ur
1 ekv.	toluen	pTsOH (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 130 °C, 150 W
1,1 ekv.	Toluen	pTsOH (0,1 ekv.), HOAc/NaOAc (100 µL/100 mg)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 130 °C, 5 W
1 ekv.	/	HOAc/NaOAc (100 µL/100 mg)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 150 °C, 5 W
1 ekv.	EtOH	KCN (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 150 °C, 5 W
1 ekv.	EtOH	FeCl ₃ (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 150 °C, 5 W
1 ekv.	EtOH	Cu(OAcAc) ₂ (0,1 ekv.)	Mikrovalovni reaktor: 10 min, 150 °C, 5 W
1 ekv.	/	HOAc/NaOAc (100 µL/100 mg)	Mikrovalovni reaktor: 60 min, 150 °C, 5 W

Najprej smo s filtracijo odstranili opaženo oborino, ki je predstavljala pTsOH. Spojino smo poskusili izolirati z dodatkom EtOAc ter spiranjem z destilirano vodo, 1 M HCl, 1 M NaOH ter nasičeno raztopino NaCl. Sušili smo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju organsko fazo uparili pod znižanim tlakom. V nobenem od opisanih primerov nismo uspeli izolirati zelenega produkta.

4.10. Poskus sinteze derivatov 4-hidroksi-7-nitro-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona (**20**)



4.10.1. Sinteza 7-amino-4-hidroksi-3,4-dihidropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**46**)

Spojino **20** (81 mg, 0,41 mmol) smo raztopili v MeOH (10 mL) ter prepihali z argonom. Dodali smo konico spatule Pd/C ter prepihovali s H₂ čez noč. S filtracijo odstranimo paladij ter uparimo do suhega pod znižanim tlakom in izoliramo 55 mg črno-rjavega viskoznega olja (80 %). Ker je spojina na zraku neobstoja, jo takoj brez predhodnega čiščenja uporabimo v naslednjem koraku.

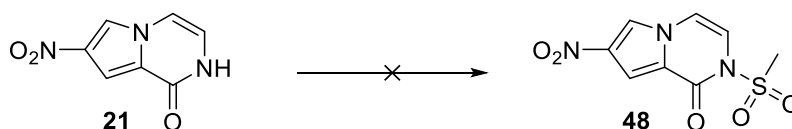
4.10.2. Poskus sinteze 4,5-dibromo-*N*-(4-hidroksi-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-7-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida (**47**)

Spojino **46** smo raztopili v brezvodnem DMF. V drugi bučki smo raztopili spojino **6** (1 ekv.) v CH₂Cl₂ ter prepihali z argonom. Dodali smo Et₃N (3 ekv.) in ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo EDC (1,3 ekv.), HOBt (0,2 ekv.) in DMAP (0,2 ekv.) ter mešali eno uro. Dodali smo predhodno pripravljeno raztopino spojine **46** v brezvodnem DMF in mešali tri ure pri sobni temperaturi, nato pa pri 45 °C čez noč. DMF smo uparili pod znižanim tlakom in čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH = 40 : 1 + 3 % Et₃N). Nismo izolirali želenega produkta.

4.11. Poskus sinteze nadaljnjih derivatov 7-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**21**)

4.11.1. Poskus sinteze metansulfonilnega derivata

4.11.1.1. Poskus sinteze 2-(metilsulfonil)-7-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**48**)



Spojino **21** smo raztopili v ustreznem topilu ter prepihali z argonom. Reakcijsko zmes smo po potrebi ohladili na ledeni kopeli ter dodali metansulfonilklorid in dodatne reagente.

Preglednica VII. Reakcijski pogoji poskusa sinteze spojine **48**.

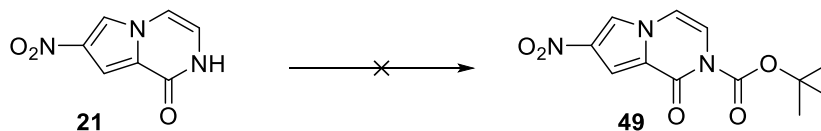
Topilo	Ledena kopel	Metansulfonilklorid	Reagenti	Temperatura in čas mešanja
Piridin	Da	1,2 ekv.	/	0 °C, čez noč
Piridin	Ne	3 ekv.	/	Mikrovalovni reaktor: 15 min, 140 °C, 50 W

CH ₂ Cl ₂ , DMF	Ne	1,2 ekv.	DMAP (0,2 ekv.), Et ₃ N (1 ekv.)	Sobna temperatura, 48 ur
--	----	----------	---	--------------------------

Uparili smo topilo pod znižanim tlakom ter dodali CH₂Cl₂. Ekstrahirali smo z 1 M HCl, a v nobenem primeru nismo izolirali želenega produkta.

4.11.2. Poskus sinteze derivata brez substituenta na amidnem dušiku

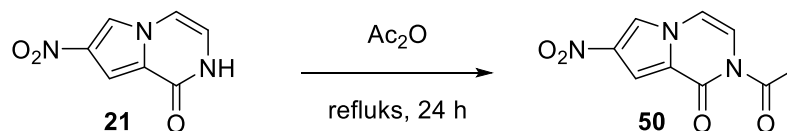
4.11.2.1. Poskus zaščite amidnega dušika z Boc zaščitno skupino (49)



Spojino **21** suspendiramo v CH₂Cl₂ ter dodamo Et₃N (1 ekv.). Preprihano z argonom in dodamo DMAP (0,2 ekv.) ter Boc₂O (1,2 ekv.). Reakcijsko zmes mešamo pri sobni temperaturi 48 ur. Spremljanje s TLC pokaže, da reakcija ni potekla popolnoma, zato dodamo Et₃N (1 ekv.), DMAP (0,2 ekv.) ter Boc₂O (1,2 ekv.) ter mešamo še 24 ur pri enakih pogojih. Čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1 do CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1) in izoliramo rumene kristale, ki predstavljajo izhodno spojino.

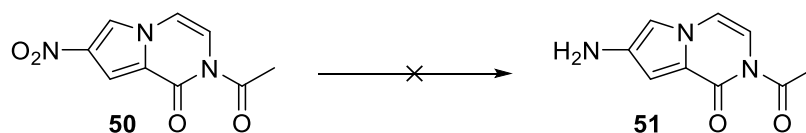
4.11.3. Poskus sinteze acetalnega derivata

4.11.3.1. Sinteza 2-acetil-7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (50)



Spojino **21** (214 mg, 1,20 mmol) raztopimo v Ac₂O (10 mL) po predhodnem preprihovanju bučke z argonom in mešamo pri temperaturi refluxa čez noč. Uparimo Ac₂O ter dodamo EtOAc (30 mL) ter speremo nastalo raztopino z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2x20 mL). Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtraciji organsko fazo uparimo pod znižanim tlakom. Izoliramo 54 mg rjavih kristalov (20 %). Tališče: 145 – 162 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.70 (s, 3H, COCH₃), 7.42 (dd, *J* = 6,6 Hz, 0,6 Hz, 1H, CH-4), 7.59 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, CH-3), 7.63 (dd, *J* = 1,8 Hz, 0,6 Hz, 1H, pirol-CH-8), 8.51 (d, *J* = 1,8 Hz, pirol-CH- 6) ppm. IR (ATR): ν 3126, 3114, 1718, 1697, 1665, 1499, 1361, 1308, 1286, 1243, 1205, 1111, 780, 768, 748, 633 cm⁻¹. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 8,4 min (100,0 % pri 220 nm, 97,8 % pri 254 nm).

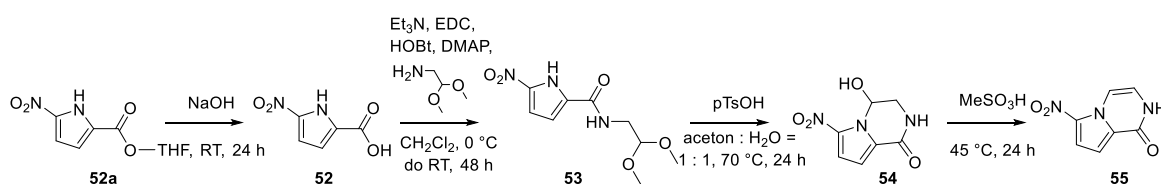
4.11.3.2. Poskus sinteze 2-acetil-7-aminopirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**51**)



Spojino **51** smo poskusili sintetizirati iz spojine **50** po tipičnem postopku za katalitsko hidrogeniranje, opisanem pod točko 4.5.3. Reakcija je potekla po 4 h, izvedli pa smo jo tudi z uporabo THF kot topila. Redukcija nitro skupine poteka uspešno, a hkrati prihaja do preacetiliranja na novo nastalo aminske skupino.

4.12. Poskus sinteze derivatov 6-nitropirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona

4.12.1. Sinteza obročnega sistema: 6-nitropirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**55**)



4.12.1.1. Sinteza 5-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**52**)

Spojino **52a** (850 mg, 5,00 mmol) raztopimo v THF (20 mL) ter dodamo 1 M NaOH (25 mL). Mešamo pri sobni temperaturi čez noč, uparimo THF in vodo pod znižanim tlakom ter nakisamo do pH = 1 z 1 M HCl. Ker ne opazimo oborine, kislo vodno fazo ekstrahiramo z EtOAc (2x50 mL). Združene organske frakcije sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju uparimo pod znižanim tlakom. Izoliramo 780 mg rumeno-rjavih kristalov (100 %). Tališče: 116 – 124 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.85 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, pirol-CH-4), 7.15 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, pirol-CH-3), 13.69 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. IR (ATR): ν 3625, 3501, 3379, 3216, 3136, 2767, 2574, 1699, 1383, 1283, 1242, 1131, 1048, 812, 764, 743 cm⁻¹. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki, ki jih najdemo v literaturi (38).

4.12.1.2. Sinteza *N*-(2,2-dimetoksietil)-5-nitro-1*H*-pirol-2-karboksamida (**53**)

Spojino **52** (720 mg, 4,61 mmol) in Et₃N (1,9 mL, 13,83 mmol, 3 ekv.) raztopimo v CH₂Cl₂ (60 mL) ter preprihomo bučko z argonom. Na ledeni kopeli dodamo EDC (1150 mg, 6,00 mmol, 1,3 ekv.), HOBt (125 mg, 0,92 mmol, 0,2 ekv.) ter DMAP (112 mg, 0,92 mmol, 0,2 ekv.) in mešamo 30 min. Dodamo 2,2-dimetoksietan-1-amin (522 μL, 4,61 mmol, 1 ekv.) ter mešamo dodatnih 30 min in še pri sobni temperaturi 48 ur. Uparimo CH₂Cl₂ ter čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: n-heksan : EtOAc = 1 : 1 do EtOAc). Izoliramo 801 mg rjavih kristalov (71 %). Tališče: 110 – 117 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.45

(s, 6H, 2xOCH₃), 3.63 (dd, $J = 5,7$ Hz, 5,0 Hz, 2H, CH₂), 4.48 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, CH), 6.31 (t, $J = 5,7$ Hz, amid-NH), 6.58 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, pirol-CH-4), 7.08 Hz, (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, pirol-CH-3), 10.65 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40.60, 53.37, 101.87, 110.97, 112.53, 130.60, 138.56, 158.74 ppm. IR (ATR): ν 3326, 3122, 2994, 2960, 2938, 2844, 1661, 1510, 1450, 1370, 1329, 1291, 1248, 1133, 1091, 1073, 1052, 1040, 1022, 980, 811, 729 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 242.1$ ([M-H]⁻, 100). HRMS za C₉H₁₂N₃O₅: izračunan, 242.0777; ugotovljen, 242.0770. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 7,4 min (98,7 % pri 220 nm, 98,9 % pri 254 nm).

4.12.1.3. Sinteza 4-hidroksi-6-nitro-3,4-dihidropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-ona (**54**)

Spojino **53** (767 mg, 3,15 mmol) raztopimo v mešanici aceton : voda = 1 : 1 (80 mL), dodamo pTsOH (272 mg, 1,58 mmol, 0,5 ekv.) ter mešamo pri 70 °C čez noč. Uparimo pod znižanim tlakom in dodamo nekaj mL MeOH. S filtriranjem izoliramo 220 mg izpadlih svetlo rjavih kristalov (35 %). Tališče: 158 – 177 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.47 (ddd, $J = 13,9$ Hz, 5,2 Hz, 1,7 Hz, 1H, CH₂-H_a), 3.78 (dd, $J = 13,9$ Hz, 2,8 Hz, 1H, CH₂-H_b), 6.47 (ddd, $J = 5,2$ Hz, 2,8 Hz, 1,7 Hz, 1H, CH), 6.81 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, pirol-CH-7), 7.18 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, amid-NH), 7.32 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, pirol-CH-8), 8.29 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, OH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 45.80, 73.64, 111.37, 114.00, 128.87, 136.16, 157.34 ppm. IR (ATR): ν 3253, 3124, 2884, 1657, 1510, 1436, 1306, 1241, 1164, 1095, 808, 755, 731, 690 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 198.1$ ([MH]⁺, 100). HRMS za C₇H₈N₃O₄: izračunan, 198.0515; ugotovljen, 198.0520. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 6,3 min (99,8 % pri 220 nm, 91,3 % pri 254 nm).

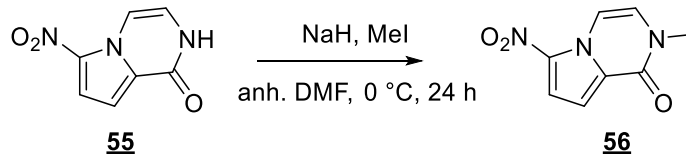
4.12.1.4. Sinteza 6-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-ona (**55**)

Spojino **54** (200 mg, 1,01 mmol) raztopimo v MeSO₃H (10 mL) in pod argonom mešamo pri 45 °C čez noč. Po tem dodamo vodo (30 mL) in ekstrahiramo z EtOAc (8x100 mL). Sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄ ter po filtriranju organsko fazo uparimo pod znižanim tlakom in izoliramo 171 mg rumeno-rjavih kristalov (94 %). Tališče: 142 – 225 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.04 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, CH-4), 7.07 (dd, $J = 4,7$ Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-7), 7.59 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, pirol-CH-8), 8.13 (dd, $J = 5,9$ Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-3) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 106.28, 109.18, 114.68, 119.03, 128.14, 133.63, 154.77 ppm. IR (ATR): ν 3129, 3017, 2809, 1644, 1310, 1197, 1129, 1023, 805, 749, 736 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 180.0$ ([MH]⁺, 100). HRMS za C₇H₆N₃O₃: izračunan, 180.0409;

ugotovljen, 180.0406. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 8,9 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

4.12.2. Sinteza gradnikov končnih spojin

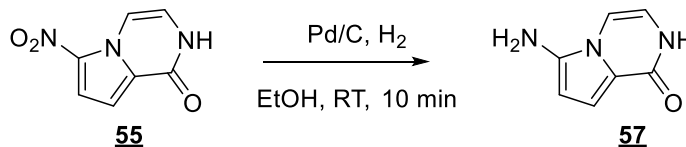
4.12.2.1. Sinteza 2-metil-6-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**56**)



Spojino **55** (300 mg, 1,67 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (70 mL) ter bučko preprihamo z argonom. Ohladimo na ledeni kopeli in dodamo 60% suspenzijo NaH v parafinskem olju (50 mg, 2,09 mmol, 1,25 ekv.) ter mešamo pol ure. Dodamo MeI (208 μL , 3,34 mmol, 2 ekv.) in mešamo čez noč. Uparimo DMF pod znižanim tlakom ter čistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). Izoliramo 134 mg temno rumenih kristalov (42 %). Tališče: 167 – 184 $^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.56 (s, 3H, CH_3), 6.73 (d, J = 6,3 Hz, 1H, CH-4), 7.15 (dd, J = 4,8 Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-7), 7.50 (d, J = 4,8 Hz, 1H, pirol-CH-8), 8.30 (dd, J = 6,3 Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-3) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 35.78, 107.08, 110.03, 115.33, 122.33, 127.86, 134.00, 155.18 ppm. IR (ATR): ν 3174, 3129, 1660, 1452, 1329, 1293, 1261, 1166, 1057, 1021, 798, 735, 633 cm^{-1} . MS (ESI): m/z = 194.1 ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS za $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan, 194.0566; ugotovljen, 194.0561. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 10,0 min (100,0 % pri 220 nm, 100,0 % pri 254 nm).

4.12.3. Katalitsko hidrogeniranje gradnikov končnih spojin

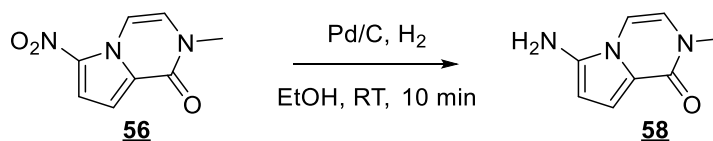
4.12.3.1. Sinteza 6-aminopirol[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**57**)



Spojino **57** smo sintetizirali iz spojine **55** (18 mg, 0,10 mmol) po tipičnem postopku za katalitsko hidrogeniranje, opisanem pod točko 4.5.3. Reakcija je potekla po 10 min, izolirali pa smo 12 mg rjavih kristalov (80 %). Tališče: 200 – 225 $^\circ\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 5.41 (bs, 2H, NH_2), 5.61 (d, J = 4,0 Hz, pirol-CH-7), 6.43 (t, J = 5,8 Hz, 1H, CH-3), 6.68 (d, J = 4,0 Hz, pirol-CH-8), 6.96 (d, J = 5,8 Hz, CH-4), 9.83 (d, J = 5,8 Hz, 1H, amid-NH) ppm. IR (ATR): ν 3149, 3307, 3111, 3006, 2870, 1610, 1548, 1514, 1422, 1371, 1336, 781, 726, 623 cm^{-1} . MS (ESI): m/z = 150.1 ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS za $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}$: izračunan,

150.0667; ugotovljen, 150.0665. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 3,6 min (95,8 % pri 220 nm, 96,0 % pri 254 nm).

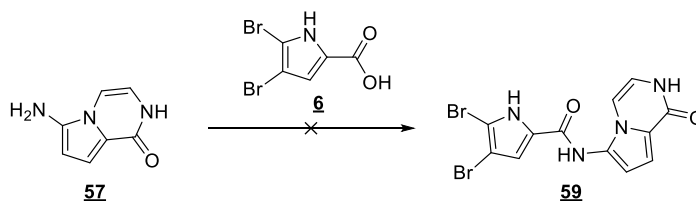
4.12.3.2. Sinteza 6-amino-2-metilpirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (**58**)



Spojino **58** smo sintetizirali iz spojine **56** (112 mg, 0,580 mmol) po tipičnem postopku za katalitsko hidrogeniranje, opisanem pod točko 4.5.3. Reakcija je potekla po 10 min, izolirali pa smo 87 mg rjavega viskoznega olja (95 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.26 (s, 3H, CH₃), 5.40 (bs, 2H, NH₂), 5.60 (dd, *J* = 4,0 Hz, 0,5 Hz, 1H, pirol-CH-7), 6.65 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, CH-4), 6.67 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, pirol-CH-8), 7.02 (dd, *J* = 5,8 Hz, 0,5 Hz, 1H, CH-3) ppm. IR (ATR): ν 3400, 2935, 1637, 1594, 1552, 1451, 1405, 1362, 736 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 164.1 ([MH]⁺, 100). HRMS za C₈H₁₀N₃O: izračunan, 164.0824; ugotovljen, 164.0820. HPLC: mobilna faza 2; retencijski čas: 5,6 min (98,6 % pri 220 nm, 97,1 % pri 254 nm).

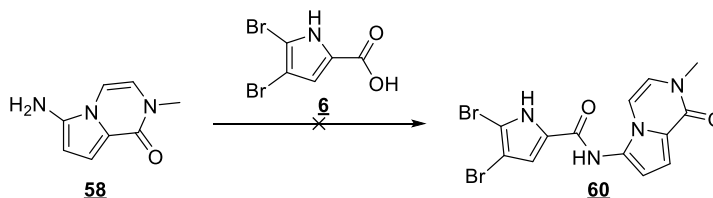
4.12.4. Poskus tvorbe amida s spojino **6** z uporabo sklopitvenih reagentov

4.12.4.1. Poskus sinteze 4,5-dibromo-*N*-(1-okso-1,2-dihidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida (**59**)



Spojino **59** smo poskusili sintetizirati iz spojine **57** po tipičnem postopku tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta opisanem pod točko 4.5.4. Nismo izolirali zelenega produkta.

4.12.4.2. Poskus sinteze 4,5-dibromo-*N*-(2-metil-1-okso-1,2-dihidropirololo[1,2-*a*]pirazin-6-il)-1*H*-pirol-2-karboksamida (**60**)



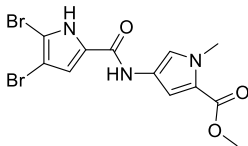
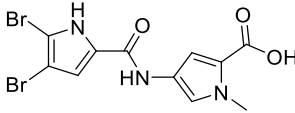
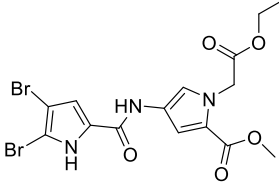
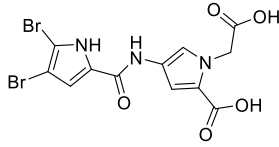
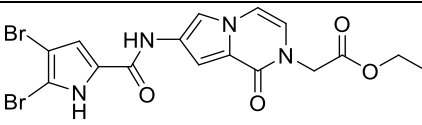
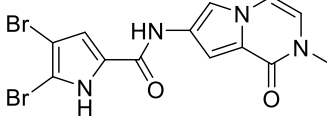
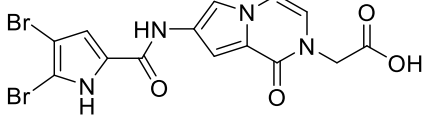
Spojino **60** smo poskusili sintetizirati iz spojine **58** po tipičnem postopku tvorbe amida s pomočjo sklopitvenega reagenta opisanem pod točko 4.5.4. Nismo izolirali želenega produkta.

5. Rezultati in razprava

5.1. Rezultati bioloških testiranj

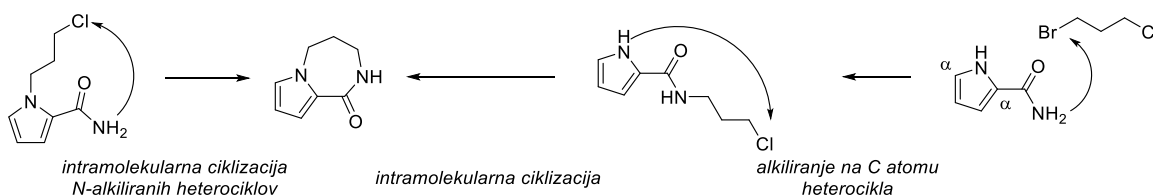
V razpredelnici so zbrani rezultati bioloških testiranj na girazi B *E. Coli*, ki so bili dostopni do objave magistrske naloge.

Preglednica VIII. Rezultati bioloških testiranj.

Oznaka	Struktura	<i>E. Coli</i> Giraza B
<u>8</u>		NEAKTIVNA
<u>9</u>		IC ₅₀ ~ 150 μM
<u>11</u>		NEAKTIVNA
<u>12</u>		NEAKTIVNA
<u>27</u>		NEAKTIVNA
<u>28</u>		NEAKTIVNA
<u>29</u>		NEAKTIVNA

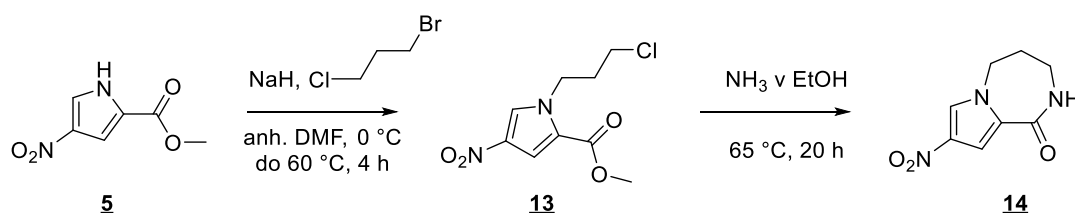
5.2. Razprava sinteznih postopkov

5.2.1. Sinteza pirolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1-ona



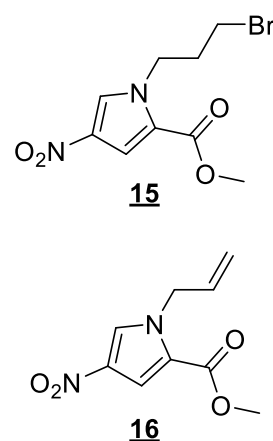
Slika 13. Shematska ponazoritev znanih metod sinteze bicikličnih heterociklov.

Dve izmed znanih metod sinteze bicikličnih heterociklov sta intramolekularna ciklizacija *N*-alkiliranih heterociklov ter tandemski proces pri katerem pride do alkiliranja na α C atomu heterocikla in sledeče intramolekularne ciklizacije (slika 13). Metode vključujejo katalizo z različnimi spojinami, nekatere pa tudi z bazo povzročeno deprotoniranje kislega pirolnega dušika, ki mu sledi alkiliranje z ustreznim alkil halidom. *N*-alkiliranje s primarnimi alkil halidi je uspešno, uporaba sekundarnih pa vodi v nizke izkoristke, saj zaradi reaktivnosti v bazičnih pogojih hitro podležejo eliminaciji (39). Pirolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1-on smo sintetizirali z uporabo dielektrofila 1-bromo-3-kloropropana.



Slika 14. Sinteza pirolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1-ona; prva sintezna strategija.

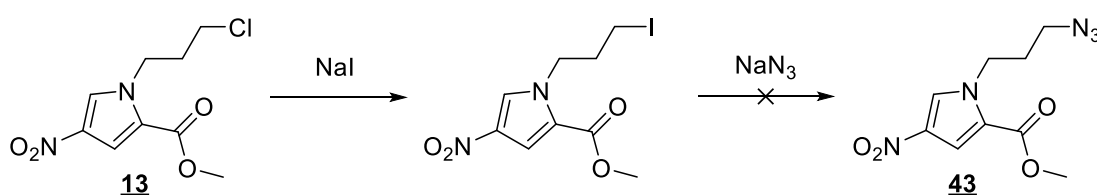
Pri prvi sintezni strategiji smo se osredotočili na vezavo dielektrofila na pirolni dušik in sledečo intramolekularno ciklizacijo. Poslužili smo se modificiranega literarnega postopka (40) (slika 14). Z močno bazo (NaH) smo odcepili kisli proton pirolnemu dušiku in s tem povečali njegov nukleofilni značaj. Po segretju smo opazili nastajanje neželenih stranskih produktov **15** in **16**, ki sta posledica obojestranske reaktivnosti uporabljenega dielektrofila (slika 15). Stranske reakcije smo poskusili upočasniti z izvedbo reakcije pri sobni temperaturi, kar se ni izkazalo za uspešno. Želeni produkt, spojino **14**, smo zato



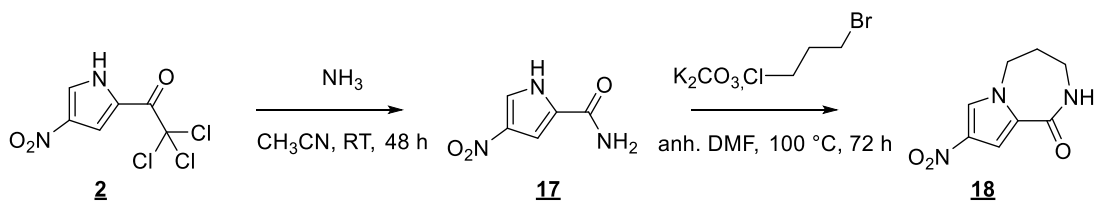
Slika 15. stranska produkta **15** in **16**.

poskusili izolirati s kolonsko kromatografijo, vendar smo izolirali mešanico omenjenih produktov. Ker imata tudi stranska produkta aktivirano alkilno verigo, smo mešanico

produktov uporabili za intramolekularno ciklizacijo. Za razliko od literaturnih podatkov, je ciklizacija potekla že pred dodatkom močne baze (40). Pri reakciji najprej pride do nukleofilnega napada NH_3 na aktivirano alkilno verigo. Pri tem nastane amin, ki nukleofilno napade elektrofilni ester. Izkoristek reakcije smo poskusili izboljšati z dodatkom močne baze (NatBu). Ker se izkoristek ni povišal, smo ciklizacijo poskusili izvesti še preko azidnega derivata alkilne verige. Le-tega smo poskusili sintetizirati z dodatkom NaN_3 ter NaI. NaN_3 deluje kot donor azidne skupine, NaI pa dodamo kot katalizator, saj tvori jodidni derivat alkilne verige, ki je reaktivnejši od kloridnega in zato hitreje reagira z NaN_3 (41) (slika 16). Sinteza azidnega derivata ni bila uspešna. Zaradi nizkih izkoristkov in velike količine stranskih produktov, smo prvo sintezno strategijo opustili.



Slika 16. Poskus sinteze azidnega derivata spojine **13**.



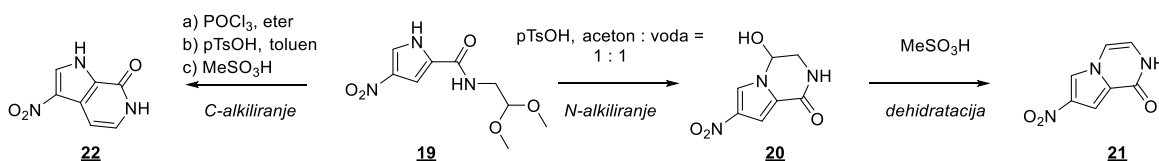
Slika 17. Sinteza pirolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1-ona; druga sintezna strategija.

Pri drugi sintezni strategiji smo želeni produkt sintetizirali preko uvedbe amida na α mesto pirola (slika 17). Sledila je aktivacija pirola z dodatkom baze in nato dodatek dielektrofila v reakcijsko zmes. Uporaba NaH (2 ekv.) ali NaOMe (2 ekv.) kot baze ni vodila v nastanek želenega cikla, zato smo uporabili K_2CO_3 . Vzpostavitev ravnotežja med deprotoniranim in protoniranim pirolom se je izkazala za ključno za uspešen potek reakcije. Uspešno smo sintetizirali želeni produkt, vendar je bil, kljub dodatku večjih količin baze ter dielektrofila, izkoristek reakcije zelo nizek, zato smo opustili tudi drugo sintezno strategijo.

5.2.2. Sinteza 7-nitropirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona

Prva stopnja sinteze vključuje tvorbo amida z reakcijo med nukleofilnim aminom ter elektrofilnim aktiviranim derivatom karboksilne kisline. Ker kislino aktiviramo v obliki triklorometilketona reakcija poteče brez uporabe sklopitvenega reagenta za tvorbo amidne vezi. Uporabljeni amin nukleofilno napade elektrofilni triklorometilketon. Izkoristek

reakcije smo poskusili povečati z dodatkom večje količine amina (3 ekv.), a se ta ni signifikantno zvišal.



Slika 18. Pričakovani produkti pri uporabi različnih anorganskih kislin kot reagentov.

V drugi stopnji sinteze smo intramolekularno tvorili želeni obroč. Reakcija je potekla med elektrofilnim aldehidom, ki je bil zaščiten v obliki acetala ter nukleofilnim pirolom. Ker je pirolni obroč ambidentni nukleofil, je odvisno od uporabljenih pogojev poteklo *N*- oziroma *C*-alkiliranje. Acetalna zaščita je labilna v kislem, zato smo kot reagent v reakciji uporabili različne kisline, ki povzročijo hidrolizo acetala (42). Za uporabljene kisline smo se odločili po pregledu literarnih podatkov, ki so nakazovali tudi različne pričakovane produkte glede na uporabljen reagent (43) (44) (45) (slika 18).

Preglednica IX. Reakcijski pogoji pri uporabi različnih kislin kot reagentov za hidrolizo acetala.

Reagent	Topilo	Temperatura in čas mešanja	Pričakovan produkt
POCl ₃ (1,8 ekv.)	Eter	0 °C, 6 dni	<i>C</i> -alkiliranje (spojina 22)
pTsOH (0,5 ekv.)	Aceton : voda = 1 : 1	70 °C, čez noč	<i>N</i> -alkiliranje (spojina 20)
pTsOH (0,1 ekv.)	Toluen	70 °C, čez noč	<i>C</i> -alkiliranje (spojina 22)
MeSO ₃ H	/	45 °C, 4 dni	<i>C</i> -alkiliranje (spojina 22)

Uporaba POCl₃, ki v reakciji sodeluje kot prekurzor fosforne kisline, je povzročila nastanek velike količine stranskih produktov. Želenega produkta nam ni uspelo izolirati. V primeru uporabe pTsOH v mešanici acetona in vode je nastal želeni produkt (spojina **20**). Uporaba toluena kot topila je vodila v nastanek spojine **21**, torej je poteklo *N*-alkiliranje in je nastal izomer pričakovanega *C*-alkiliranega produkta. V primeru uporabe MeSO₃H, ki je služila hkrati kot reagent in topilo, pa je poteklo *C*-alkiliranje in sintetizirali smo spojino **22**. Po računalniškem sidranju v ATP vezavno mesto giraze B sta se spojini **20** in **22** izkazali kot

podobno perspektivni. Odločili smo se za nadaljnjo optimizacijo spojine **20**, saj je bila sinteza te spojine enostavnejša in smo pri njej dosegli boljše izkoristke.

Tekom tretje stopnje sinteze je potekla hidroliza spojine **20** do spojine **21**. Izvedli smo jo po znanem literaturnem postopku z MeSO_3H , ki je v reakciji služila kot reagent in topilo (44). V nasprotju z zgoraj opisano vlogo MeSO_3H pri C-alkiliranju je v tem primeru kislina sodelovala pri dehidraciji OH skupine in tvorbi dvojne vezi v obročnem sistemu. Zamenjava MeSO_3H s TFA ni vodila do zelenega produkta. Čiščenje s kolonsko kromatografijo ni bilo uspešno, saj je produkt slabo topen v pogosto uporabljenih topilih, kot so MeOH, EtOAc, THF, CH_3CN , CH_2Cl_2 in aceton. Zaradi slabe topnosti je prihajalo do obarjanja produkta na koloni in s tem velikih izgub. Spojino **21** smo zato čistili z dodatkom vode ter ekstrakcijo z EtOAc. Poskus spiranja z 1 M NaOH s katerim smo želeli odstraniti MeSO_3H iz zmesi je bil neuspešen, saj smo v bazično vodno fazo ekstrahirali tudi produkt.

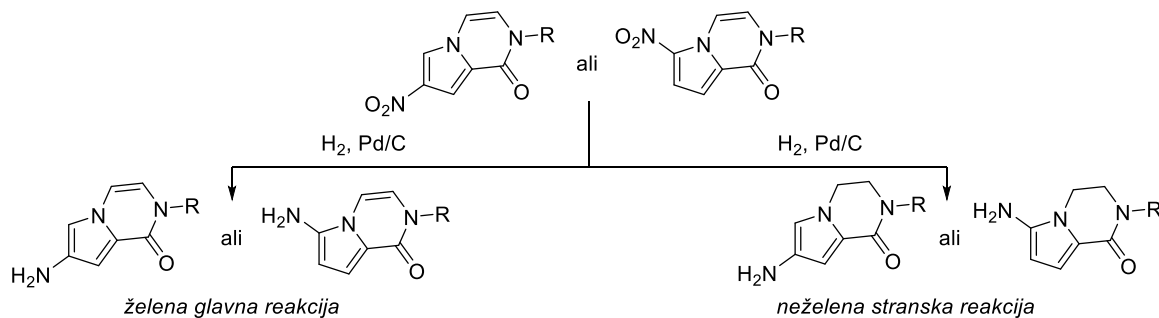
5.2.3. Sinteza gradnikov končnih spojin

Z računalniškim sidranjem potencialnih molekul v ATP vezavno mesto giraze B smo pridobili podatke o potencialni vezavi različnih derivatov 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona. Odločili smo se za sintezo derivatov, ki so izkazali dobro vezavo v ATP vezavno mesto. Uspešno smo sintetizirali derivat očetne kisline (spojina **23**) v obliki etilnega estra ter metilni derivat (spojina **24**). Amidni dušik 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona ima kislo naravo, zato povečamo njegovo nukleofilnost z dodatkom baze. Aktivirani amid nato reagira z elektrofilom, ki ga predstavlja bromirani derivat očetne kisline. Spojino **23** smo sintetizirali z uporabo K_2CO_3 kot baze (46). Znani so tudi postopki z uporabo močnejših baz, kot je NaH, a smo se odločili za uporabo šibkejše baze zaradi potencialne hidrolize amidne vezi v močno bazičnih pogojih (47). Spojino **24** pa smo sintetizirali z uporabo NaH kot baze ter MeI kot elektrofila.

Acetilirani derivat (spojina **50**) smo sintetizirali z uporabo močnega elektrofila, Ac_2O , zato ni bil potreben dodatek baze za aktivacijo amidnega dušika. Nizek izkoristek sinteze je posledica uporabe nečistega izhodnega produkta, za sintezo pa predvidevamo, da poteka kvantitativno. Nadalje smo poskusili sintetizirati še metansulfonilni derivat (spojina **48**) ter derivat s prosto amidno skupino. Spojino **48** smo poskusili sintetizirati z različnimi postopki. MsCl je močen elektrofil, zato smo reakcijo poskusili izvesti v piridinu. Piridin je v reakciji predstavljal topilo, katalizator ter šibko bazo, ki delno aktivira kisli amidni dušik. Reakcija kljub segrevanju ni potekla, zato smo zamenjali topilo in s tem preprečili morebitno slabo topnost ter dodali katalizator (pomožni nukleofil DMAP) in bazo (Et_3N). Ker reakcija kljub

temu ni potekla, smo sintezno pot opustili. Derivat s prosto amidno skupino smo poskusili sintetizirati preko zaščite amida z Boc zaščitno skupino (spojina **49**). Po čiščenju produkta s kolonsko kromatografijo smo izolirali izhodno spojino, zato sklepamo, da med čiščenjem prihaja do cepitve Boc skupine potencialno nastalega želenega produkta.

5.2.4. Katalitsko hidrogeniranje

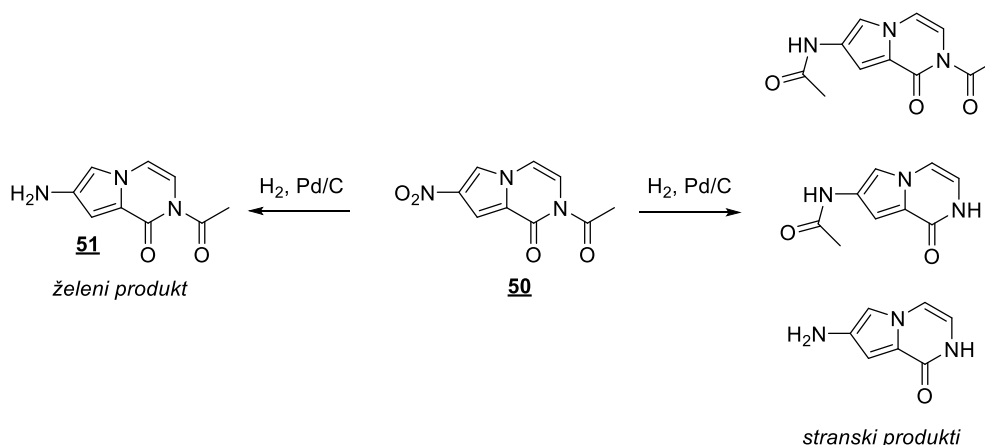


Slika 19. Katalitsko hidrogeniranje.

Katalitskega hidrogeniranja smo se poslužili za redukcijo nitro skupin do aminov. Časovni potek posameznih reakcij smo spremljali s TLC, saj v primeru derivatov iz serij 6-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona ter 7-nitropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-ona poteka tudi neželena redukcija dvojne vezi na mestu α amida (slika 19). Redukcija nitro skupine poteka hitreje kot stranska reakcija, zato je bila pravočasna prekinitvev reakcij ključna. Kot topilo smo v reakcijah uporabili MeOH, EtOH ter THF, odvisno od topnosti izhodnih produktov. Menjava EtOH kot topila s THF je povečala obseg nastajanja neželenega stranskega produkta pri omenjenih serijah. Pregled spektrov ^1H NMR produktov je pokazal, da je kljub spremljanju prišlo do nastajanja neželenih stranskih produktov, ki se jih s postopki nismo znebili. V primeru spojine **58** smo izolirali čisti želeni produkt.

Preglednica X. Opažena razmerja med glavnim in stranskim produktom po katalitskem hidrogeniranju.

Glavni produkt	Razmerje med glavnim in stranskim produktom
Spojina 23	1,00 : 0,02
Spojina 24	1,00 : 0,13
Spojina 57	1,00 : 0,14



Slika 20. Katalitsko hidrogeniranje acetiliranega derivata (spojina **50**).

V primeru acetiliranega derivata 7-nitropirolo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (spojina **50**) je med katalitskim hidrogeniranjem hkrati prihajalo do redukcije nitro skupine in preacetiliranja na nastali amin (slika 20). Do tega prihaja zaradi nestabilnosti elektron akceptorskih skupin na amidnem dušiku. Opažanje pojasni tudi neuspešno sintezo metansulfonilnega derivata ter uvedbo Boc zaščitne skupine, ki sta prav tako elektron-akceptorski. V obeh primerih verjetno pride do nastanka želenega produkta, ki pa zaradi nestabilnosti med postopki izolacije razpade. Sintezo derivatov z elektron-akceptorsko skupino na amidnem dušiku smo zato opustili.

Sintetizirani amini so bili nestabilni na zraku, zato smo jih po izolaciji uporabili takoj v naslednjih stopnjah sinteze. Strukturo izoliranih produktov smo potrdili z ¹H NMR, nadaljnjih postopkov analiz pa nismo izvajali. Nestabilnost aromatskih aminov potrjujejo tudi literaturni viri (48).

5.2.5. Tvorba amida

5.2.5.1. Sklopitveni reagenti za tvorbo amida

5.2.5.1.1. Sinteza končnih spojin

Za tvorbo amidnih vezi smo uporabili postopek z uporabo sklopitvenih reagentov, ki sta ga predhodno razvili in optimizirali Eva Jerič in Kristina Nemeč. Optimizacija postopka je opisana v njunih magistrskih nalogah (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana 2014/2015).

Sklopitveni reagenti tvorijo reaktivne intermedie s karboksilnimi kislinami in s tem povečajo njihovo elektrofilnost (49) (50). Kisline je potrebno aktivirati, saj tvorba amidne vezi z aminom ni spontana, ker zanjo nujna eliminacija vode poteče pri visokih temperaturah (51). Pri izdelavi magistrske naloge smo kot sklopitveni reagent uporabili

EDC, vodotopni karbodiimid. Tudi njegov sečninski stranski produkt je vodotopen, zato se ju lahko znebimo z ekstrakcijo v vodo (49) (50). Aktivacijo karboksilne kisline z EDC izvedemo na ledeni kopeli, saj poteka eksotermno. Aktivirani intermediat ima strukturo *O*-acilsečnine in bi pri višjih temperaturah lahko podlegel hidrolizi. Prišlo bi lahko tudi do premestitve intermediata v *N*-acilsečninski stranski produkt ter hidrolize EDC (52) (53). Aktivacija poteka hitreje v nepolarnih topilih, zato jo izvedemo v CH₂Cl₂. Amidna vez pa se hitreje tvori v polarnih topilih, zato dodamo DMF ob dodatku amina (54). Intermediat, ki nastane med karboksilno kislino in EDC je netopen v CH₂Cl₂, kar prepreči reakcijo s pirolno NH skupino izhodne karboksilne kisline. DMF dodamo tudi zato, da omenjeni intermediat raztopimo in s tem omogočimo reakcijo z NH₂ skupino, ki je močnejše nukleofilna od pirolne NH skupine. Dodatek polarnega topila zmanjša hitrost aktivacije kisline in s tem poveča obseg premestitve v *N*-acilsečnino. Kot katalizatorja, ki zmanjšata obseg racemizacije ter stranskih reakcij, uporabimo pomožna nukleofila HOBt ter DMAP (55). Dodatek HOBt povzroči nastanek aktiviranega OBt estra z *O*-acilsečnino, ki nato hitreje reagira z aminom preko stabilizacije z vodikovo vezjo, ima pa za posledico tudi dodatne stranske produkte (51) (53). Dodali smo še bazo (Et₃N), ki je deprotonirala karboksilno kislino in na ta način katalizirala reakcijo. S sterično ovirano bazo tudi deprotoniramo karboksilno kislino in na ta način povečamo njeno elektrofilnost. To pospeši potek aktivacije v polarnih topilih, ki jo sicer upočasnjujejo (53). Reakcije smo izvedli v argonovi atmosferi, saj v zraku prisotna voda lahko hidrolizira *O*-acilsečnino. Izkoristki reakcij so nizki, ker so bili uporabljeni amini šibko nukleofilni, kar je posledica elektronskih vplivov substituentov. Možen razlog za nizke izkoristke so tudi morebitne sterične ovire amina ter prisotnost kompetitivnih nukleofilov v molekulah reaktantov.

Kljub modificiranjem se uporabljeni postopek ni izkazal za uspešnega pri derivatih 6-nitro serije ter 4-hidroksi-7-nitro-3,4-dihidropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-onu (spojina **47**). Predvidevamo, da je pri derivatih 6-nitro serije to posledica večje sterične oviranostiaminske skupine na mestu **6**. Pri obeh neuspešnih sklopitvah so možen razlog za neuspeh tudi elektronski vplivi substituentov na nukleofilnost aromatskega amina. V primeru spojine **47** je možna spremljajoča težava prisotnost OH, ki predstavlja kompetitivni nukleofil v reakciji. Sintetizirali smo tudi derivat 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-ona s prosto amidno skupino, izkoristek sinteze pa je bil še nižji od ostalih, zato smo sintezo opustili. Predvidevamo, da je nizek izkoristek posledica stranske reakcije z nukleofilnim amidnim dušikom.

5.2.5.1.2. Poskus sinteze skrajšanih derivatov spojine (9)

Z namenom boljše vezave v ATP vezavno mesto giraze B smo poskusili sintetizirati skrajšane derivate spojine **9**. Spojino **9** smo poskusili skrajšati z uvedbo metil 3-aminobenzoata na karboksilno skupino na α mestu pirolnega dušika z uporabo sklopitvenega reagenta za tvorbo amidne vezi, TBTU. Uporabili smo različna topila, s čimer smo dokazali, da neuspeh sinteze ni posledica uporabljenih topil ali težav s topnostjo. Reakcijo smo dodatno poskusili optimizirati z dodatkom baze ter segrevanjem. Ker reakcija kljub uporabljenim modifikacijam ni potekla, smo sintezno strategijo opustili.

5.2.5.2. Drugi pristopi za sintezo amidne vezi

Zaradi neuspeha sinteze z uporabo sklopitvenih reagentov, smo skrajšane derivate spojine **9** poskusili sintetizirati še preko kislinskega klorida, ki predstavlja aktivirano obliko karboksilne kisline. Kislinski klorid smo sintetizirali po znanem postopku z SOCl_2 (41). Zamenjava topila s toluenom med tvorbo kislinskega klorida ni rezultirala v nastanku klorida. Ker reakcija še vedno ni uspešno potekala, smo spojino **30** poskusili sintetizirati z dodatkom katalizatorja (pomožni nukleofil DMAP). Ker se tudi omenjeni pristop ni izkazal za uspešnega, smo to sintezno pot opustili.

5.2.6. Poskus sinteze derivatov 6-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-ona

Na način kot je zgoraj opisana sinteza derivatov 7-nitropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-ona smo poskusili pripraviti še serijo derivatov z nitro skupino na mestu 6. Postopka sinteze osnovnega cikla se razlikujeta le v načinu uvedbe zaščitene aldehida na pirolni dušik. V primeru 7-nitro derivatov smo le-tega uvedli na trikloro derivat pirola, v primeru 6-nitro derivatov pa smo tvorbo amidne vezi izvedli preko sklopitvenega reagenta za tvorbo amidne vezi. Sinteza derivatov z enakimi substitucijami na amidnem dušiku ter katalitsko hidrogeniranje le-teh sta se izkazala za uspešna. Dobljene derivate smo poskusili povezati s spojino **6** preko amidne vezi. Tudi tokrat smo uporabili postopek opisan pri sintezi derivatov 7-nitro serije, ki pa se je izkazal za neuspešnega. Predvideni razlogi za neuspešnost zadnje stopnje sinteze so opisani pod točko 5.2.5.1.1.

5.2.7. Hidroliza estra

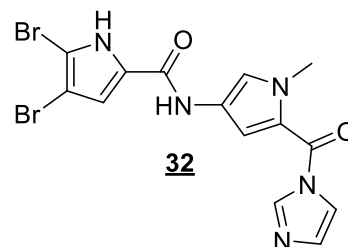
Hidrolize estrov se običajno izvajajo v mešanicah vode ter organskega topila, ki se meša z vodo. Primeri tovrstnih topil so MeOH, EtOH, THF ter dioksan. Dodatek organskega topila je nujen za raztapljanje estrov, vodna raztopina pa omogoči raztapljanje uporabljenih hidroksidov. Običajno se uporabi velik prebitek hidroksida, ki ima lahko različno koncentracijo (56) (57). Tekom izdelave magistrske naloge smo hidrolizirali estre spojin **8**,

11 ter **27**. Kot hidroksid smo uporabili NaOH ali LiOH. LiOH smo kot šibko bazo uporabili pri hidrolizi spojine **27** do spojine **29** zaradi možnosti hidrolize v preostalem delu molekule. Izkoristek opisane reakcije je nizek, ker smo uporabili nečisto spojino **27**. Uporaba NaOH kot močne baze pri hidrolizi estrov spojin **9** in **11** ni povzročila hidrolize preostalega dela molekule, zato sklepamo, da amidna vez, ki povezuje oba pirola v molekuli ni občutljiva na bazične pogoje.

Med čiščenjem spojin **12** in **29** z reverznofazno kolonsko kromatografijo smo opazili delno hidrolizo produkta. Sklepamo, da prisotnost TFA v uporabljeni mobilni fazi povzroči hidrolizo amidne vezi, ki povezuje oba amidna obroča.

5.2.8. Poskus sinteze spojine **31**

Z namenom boljše vezave v ATP vezavno mesto giraze B smo poskusili sintetizirati skrajšane derivate spojine **9**. Spojino **31** smo poskusili sintetizirati po literaturnem postopku (58). Dodali smo CDI kot sklopitveni reagent, ki poveča elektrofilnost karboksilne kisline. To nato napade sol karboksilne kisline, ki v reakciji nastopa kot nukleofil in nastane β -keto ester. Sol karboksilne kisline ter $MgCl_2$ smo

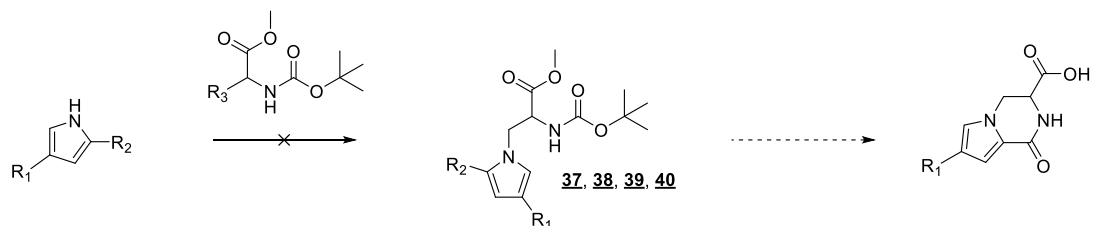


Slika 21. Stranski produkt **32**.

dodali po predhodni aktivaciji kisline zaradi možnosti neželene tvorbe soli z delom neaktivirane karboksilne kisline. Uporaba CDI je vodila v nastanek aktiviranega intermediata (spojina **32**) (slika 21). Kot topilo smo uporabili tudi brezvodni DMF ter tako zagotovili ustrezno topnost reaktantov. Produkt smo poskusili sintetizirati še z dodatkom baze ter segrevanjem spojine **32**.

Ker se je zgornji pristop izkazal za neuspešnega, smo spojino **31** poskusili sintetizirati z uporabo kislinskega klorida spojine **9** ter predhodno aktivacijo 3-metoksi-3-oksopropanoata. Slednjega smo aktivirali tako, da smo ga pretvorili v magnezijevo sol, kar je *in situ* z dodatkom $MgCl_2$ potekalo tudi pri ostalih poskusih sinteze. Kljub dodatnim modifikacijam nismo izolirali želenega produkta, zato smo sintezno pot opustili.

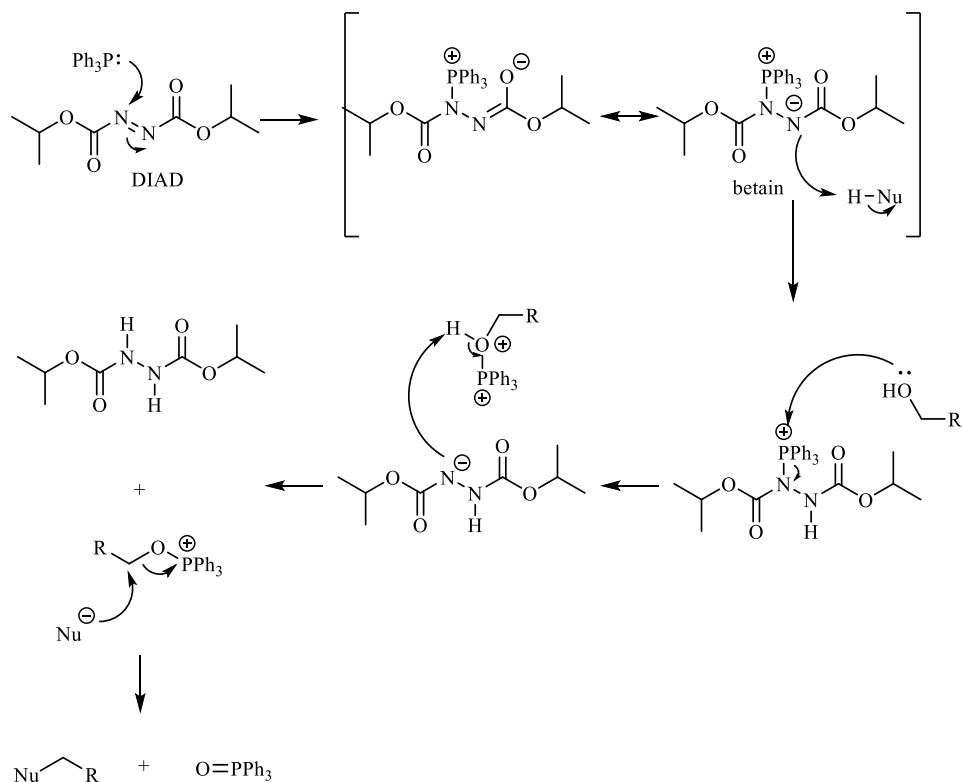
5.2.9. Poskus ciklizacije preko uvedbe metilnega estra serina



Slika 22. Željena ciklizacija preko uvedbe metilnega estra serina na pirolni dušik.

Biciklični heterocikel smo poskusili sintetizirati tudi preko uvedbe zaščitene metilnega estra serina na pirolni dušik in kasnejše ciklizacije (slika 22). Najprej smo pripravili zaščiteno obliko metilnega estra serina preko uvedbe Boc zaščitne skupine na aminsko skupino. Omenjeno zaščitno skupino smo uvedli na klasičen način z uporabo baze (Et_3N) in Boc_2O v ustreznem topilu (57).

5.2.9.1. Poskus sinteze z Mitsunobujevimi pogoji



Slika 23. Splošni mehanizem sinteze z Mitsunobujevimi pogoji.

Mitsunobujevi pogoji opisujejo substitucijo primarnega ali sekundarnega alkohola z nukleofili, ki jo posreduje redoks kombinacija trialkil- ali triarilfosfina in dialkil azadikarbosilata (59) (slika 23). Literaturni podatki kažejo, da so tovrstni pogoji ustrezni za alkiliranje dušikovih heterociklov s primarnimi alkoholi. Heterociklični dušiki s $\text{pK}_a < 11$ so dovolj močni nukleofili za potek reakcije, sterično ovirani sekundarni alkoholi pa so slabši

substrati od primarnih. Reakcije potekajo pri sobni temperaturi, znižanje temperature pa zmanjša obseg racemizacije. *N*-alkiliranje pirolov s primarnim alkoholom je uspešno v prisotnosti elektron-akceptorskih skupin, katerih vpliv je opazen v znižanju pK_a (39). Tekom izdelave magistrske naloge smo spojino **33**, ki je primarni alkohol poskusili vezati na pirolni dušik. Kot izhodni pirol smo uporabili spojine **1**, **2** in **3**. Na pK_a vrednosti izhodnih pirolov smo poskusili vplivati z menjavo substituentov na obroču. pK_a vrednosti, napovedane z Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 so $15,16 \pm 0,50$ za spojino **1**, $12,12 \pm 0,50$ za spojino **2** ter $11,15 \pm 0,50$ za spojino **3**. Pri uporabi spojine **2** smo opazili nastajanje stranskega produkta **41** in tudi zato elektron-akceptorsko skupino zamenjali z estrom. Poznano je *N*-alkiliranje imidazola ($pK_a = 14,5$) z uporabo prebitnih količin reagentov $n\text{-Bu}_3\text{P}$ in TMAD (59). Omenjena kombinacija reagentov rezultira v višjih izkoristkih pri uporabi sterično oviranih alkoholov, zato bi se jo v prihodnje splačalo preizkusiti (60). Pri pirolih poročajo o uspešnem alkiliranju z uporabo klasičnih pogojev (59). Poznano je tudi uspešno *N*-alkiliranje pirola, ki ima na α mestu ester (61). Po pregledu omenjenih literaturnih podatkov smo se odločili za uporabo višjih ekvivalentov Ph_3P in DIAD, saj so imeli naši pirolji kljub uvedbi elektron-akceptorskih skupin na α mestu visoke pK_a . Reakcijo smo poskusili izvesti tudi z uporabo komercialno pridobljenega čistega D-enantiomera spojine **33**. Pogoje smo nadalje poskusili optimizirati s predhodno tvorbo betaina med PPh_3 in DIAD, reakcija pa kljub omenjenim modifikacijam v nobenem od primerov ni bila uspešna (62) (slika 23). Predvidevamo, da je razlog za neuspeh previsok pK_a izhodnih pirolov, zato ta sintezna pot ni primerna za doseg želene ciklizacije.

5.2.9.2. Poskus sinteze z uporabo aktiviranih derivatov metilnega estra serina

Pirol je klasičen ambidentni nukleofil, saj alkiliranje lahko poteče na dušiku ali katerem od ogljikov (63). *N*-alkiliranje pirola favorizirajo aprotična topila, veliki protiioni ter močni elektrofil. Reakcija poteka v dveh korakih, najprej poteče aktivacija pirolnega dušika s prisotno bazo, nato pa dodamo elektrofil. Z uporabo katalizatorja faznega prenosa običajno dobimo višje izkoristke reakcij, saj le-te potekajo na medfazi. Izbira katalizatorja ne vpliva bistveno na izkoristek ter N/C selektivnost. Za doseg zadovoljivih izkoristkov potrebujemo močne baze, ki pa ne smejo imeti previsoke energije kristalne rešetke, zato LiOtBu ni ustrezen (63). Med izdelavo magistrske naloge smo sintezo spojin **37-40** poskusili doseči z uporabo KOtBu , K_2CO_3 ali NaH , reakcije pa smo poskusili izvesti tudi brez dodatka katalizatorja. Večji protiioni, dobro izstopajoče skupine, kot so brom, mezilklorid ter tozilklorid in povišana temperatura favorizirajo *N*-alkiliranje (63) (64). Uspešno smo

sintetizirali metansulfonilni (spojina **34**) ter bromirani (spojina **35**) derivat, poskus sinteze tozilsulfonilnega (spojina **36**) derivata pa je bil neuspešen. Pri sintezah oziroma poskusu sinteze smo se poslužili literaturnih postopkov (35) (65) (66). Ker sinteza tozilsulfonilnega derivata ni bila uspešna, smo jo neuspešno poskusili modificirati. Za uspešno sintezo spojin **34** in **35** je bilo potrebno uporabiti komercialno pridobljeno optično čisto spojino **33**. V vseh primerih poskusa *N*-alkiliranja se je le-to izkazalo za neuspešno, nastajal je le stranski produkt **42**, zato smo sintezno pot opustili. Možna razloga za neuspeh sta sterična oviranost sodelujočih funkcionalnih skupin ter nizka nukleofilnost pirolnega dušika. Nastanek stranskega produkta **42** pa je posledica reaktivnosti dobre izstopajoče skupine, ki se pri pogojih reakcije odcepi.

5.2.10. Poskus sinteze derivatov 7-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1,3(2*H*,4*H*)-diona (44**)**

Pri poskusu sinteze derivatov spojine **44** gre za poskus sinteze imida. V reakciji estra nastopata kot elektrofila, uporabljen amin pa kot nukleofil. Znan je literaturni postopek priprave imida z reakcijo med dvema estroma ter NH₃ v MeOH ob močnem segrevanju (67). Zaradi ustrezne topnosti smo kot topilo uporabili EtOH, a postopek ni bil uspešen. Spojino **44** smo poskusili sintetizirati tudi z uporabo nasičene raztopine NH₃ v EtOH ter NH₄OAc kot vira NH₃. Znana je uspešna uporaba kisle katalize (npr. NH₄Cl), cianidnih ionov v alkoholih raztopinah ter močnih baz (kot je KOtBu) v reakcijah aminolize estrov (68). Reakcijo smo zato poskusili izvesti z uporabo KOtBu, KCN oziroma MgCl₂ kot katalizatorja ob segrevanju. V primeru uporabe EtOH kot topila je prihajalo le do preestrenja metilnega estra spojine **4** do etilnega estra.

Spojino **45** smo poskusili sintetizirati z anilinom kot nukleofilnim aromatskim aminom. Znana sta literaturna postopka z uporabo pTsOH v toluenu ter HOAc/NaOAc v EtOH (69) (70). Ker se omenjena postopka nista izkazala za uspešna, smo poskusili še z drugimi katalizatorji. Uporabili smo KCN ter FeCl₃ iz istih razlogov kot pri poskusu sinteze spojine **44** ter Cu(OAcAc)₂, ki je znan katalizator številnih različnih sintez (71). Kljub segrevanju nam ni uspelo izolirati zelenega produkta, zato smo sintezno strategijo opustili.

5.3. Razprava rezultatov bioloških testiranj

Uspešno sintetizirane biciklične spojine so se pri bioloških testiranjih na girazi B *E. Coli* izkazale za neaktivne. Kljub uvedbi zelene ciklizacije in posledični rigidizaciji molekule niso izkazale zaviralne aktivnosti na girazi B. Predhodno pripravljene spojine na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so izkazovale zaviralno aktivnost, kar pomeni, da uvedba ciklizacije ne vpliva ugodno na zaviralno aktivnost na girazi B.

Šibko aktivnost je izkazala le spojina **9**, ki je skrajšan metilirani derivat spojine vodnice (spojina **IIa**). Spojina **9** ima IC₅₀ signifikantno višji od spojine vodnice, kar potrjuje potrebo po optimizaciji substituentov na mestu 2 spojine **IIa** za doseg boljše vezave v ATP vezavno mesto giraze B.

6. Sklep

Nobena od sintetiziranih bicikličnih molekul v obliki 7-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-ona (spojina **20**) ni izkazala zaviralne aktivnosti na girazo B. S tem smo ovrgli hipotezo o izboljšanju zaviralne aktivnosti s tovrstno rigidizacijo molekule. Zaviralno aktivnost je izkazala le spojina **9**.

Kljub neaktivnosti sintetiziranih bicikličnih spojin, bi se bicikli z drugačno strukturo lahko izkazali za aktivne. Od želenih biciklov nam je uspelo sintetizirati še 8-nitro-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-pirolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-1-on (spojini **14** in **18**), 3-nitro-1,6-dihidro-7*H*-pirolo[2,3-*c*]-piridin-7-on (spojina **22**) ter 6-nitropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2*H*)-on (spojina **55**). Sintezi pirolodiazepinskega ter pirolopiridinskega obroča bi bilo potrebno optimizirati za doseg večjih izkoristkov in manjšega obsega stranskih reakcij. Po pregledu rezultatov sidranja v ATP vezavno mesto giraze B bi lahko na obroč uvedli potencialno ugodne substituentne in preverili vpliv tovrstnih ciklizacij. Sinteza ostalih načrtovanih biciklov se ni izkazala za uspešno.

Prav tako nismo uspešno izvedli modifikacij substituenta na mestu 2 spojine **IIa**, zato hipoteze o dosegu boljše zaviralne aktivnosti z izboljšano vezavo v ATP vezavno mesto nismo uspeli potrditi.

Kljub neaktivnosti sintetiziranih molekul, postavljenih hipotez o rigidizaciji ter optimizaciji substituentov ne moremo ovreči. Potrebno bi bilo izvesti sintezo drugačnih bicikličnih sistemov ter spojin z drugačnimi substituenti in oceniti njihovo zaviralno aktivnost na girazi B. Rezultati magistrske naloge tako predstavljajo pomembne podatke za poskuse nadaljnje optimizacije pirolamidnega razreda spojin s potencialnim zaviralnim delovanjem na girazo B. Smiselno bi bilo tudi razrešiti kristalno strukturo vezave predstavnika pirolamidnega razreda v ATP vezavno mesto giraze B. S tovrstno informacijo bi strukturo spojin lažje optimizirali za doseg zaviralnega učinka na girazo B.

7. Literatura

1. Singh SB. *Bioorg Med Chem Lett*. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. 24, 2014, str. 3683-3689.
2. Coates ARM, Halls G, Hu Y. *Br J Pharmacol*. Novel classes of antibiotics or more of the same. 163, 2011, str. 184-194.
3. Lambert PA. *Adv Drug Deliv Rev*. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. 57, 2005, str. 1471-1485.
4. Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe DB, Ntale M. *Health. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance*. 6, 2014, str. 410-425.
5. Wright GD. *Chem Biol*. Antibiotics: a new hope. 19, 2012, str. 3-10.
6. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. *Nat Rev Microbiol*. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. 8, 2010, str. 423-435.
7. Tomašić T, Peterlin Mašič L. *Curr Top Med Chem*. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. 4, 2014, str. 130-151.
8. Bush K, Pucci MJ. *Biochem Pharmacol*. New antimicrobial agents on the horizon. 82, 2011, str. 1528-1539.
9. Aminov RI. *Front Microbiol*. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. 1, 2010, str. 1-7.
10. Levy SB, Marshall B. *Nature Medicine Supplement*. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. 10, 2004, str. 122-129.
11. Wright GD. *Curr Opin Chem Biol*. Mechanisms of resistance to antibiotics. 7, 2003, str. 563-569.
12. Alanis AJ. *Arch Med Res*. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era. 36, 2005, str. 697-705.
13. Kumar A, Schweizer HP. *Adv Drug Deliver Rev*. Bacterial resistance to antibiotic: active efflux and reduced uptake. 57, 2005, str. 1486-1513.
14. Conly JM, Johnston BL. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. 16, str. 159-160.

15. Deweese JE, Osheroff MA, Osheroff N. *Biochem Mol Biol Education*. DNA topology and topoisomerases. 37, 2009, str. 2-10.
16. Champoux JJ. *Annu Rev Biochem*. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. 70, 2001, str. 369-413.
17. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. *Chem Biol*. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. 17, 2010, str. 421-433.
18. Wang JC. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. 3, 2002, str. 430-440.
19. Mayer C, Janin YL. *Chem Rev*. Non-quinolone inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases: a feat of biosterism. 114, 2014, str. 2313-2342.
20. Bradbury BJ, Pucci MJ. *Curr Opin Pharmacol*. Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. 8, 2008, str. 574-581.
21. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre M. *Biochimie*. Origin and evolution of DNA topoisomerases. 89, 2007, str. 427-446.
22. Collin F, Karkare S, Maxwell A. *Appl Microbiol Biotechnol*. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. 92, 2011, str. 479-497.
23. Bisacchi GS, Manchester JJ. *Infect Dis*. A New-Class Antibacterial – Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort Toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. 1, 2015, str. 4-41.
24. Dutta R, Inouye M. *Trends Biochem Sci*. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. 1, 2000, str. 24-28.
25. Azam MA, Thathan J, Jubie S. *Bioorg Chem*. Dual targeting DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE) inhibitors: a review. 62, 2015, str. 41-63.
26. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T. *J Med Chem*. Structure-based discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. 55, 2012, str. 6413-6426.
27. Brvar M, Renko M, Perdih A, Solmajer T, Turk D. RCSB PDB. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4DUH>. [Elektronski] [Navedeno: 2. 6 2016.]
28. Eakin AE, et al. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. 56, 2012, str. 1240-1246.

29. Chauvel A, Lefebvre G. *Petrochemical processes, technical and economic characteristics*, 2. izdaja. Pariz : Éditions Technip, 1986.
30. Rucker VC, Foister S, Melander C, Dervan PB. *J Am Chem Soc.* Sequence specific fluorescence detection of double strand DNA. 125, 2003, str. 1195-1202.
31. Wischang D, Hartung J. *Tetrahedron.* Parameters for bromination of pyrroles in bromoperoxidase-catalyzed oxidations. 67, 2011, str. 4048-4054.
32. Hotzel C, Marotto A, Pindur U. *Eur J Med Chem.* Design, synthesis, DNA-binding and cytotoxicity evaluation of new potential combilexines. 37, 2002, str. 367-378.
33. Richards JJ, Ballard TE, Huigens RW, Melander C. *Chem Bio Chem.* Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. 9, 2008, str. 1267-1279.
34. Myers MC, Wang J, Iera JA, Bang J, Hara T, Saito S, Zambetti GP, Appella DH. *J Am Chem Soc.* A new family of small molecules to probe the reactivation of mutant p53. 127, 2005, str. 6152-6153.
35. Shetty D, Jeong JM, Ju CH, Kim YJ, Lee J, Lee Y, Lee DS, Chung J, Lee MC. *Bioorg Med Chem.* Synthesis and evaluation of macrocyclic amino acid derivatives for tumor imaging by gallium-68 positron emission tomography. 18, 2010, str. 7338-7347.
36. Kolodyazhnyi OI, Kolodyazhnaya OO. *Russ J Gen Chem.* Synthesis of enantiomerically pure phosphonic analog of natural aspartic acid. 80, 2010, str. 2519-2520.
37. Tao F, Luo Y, Huang Q, Liu Y, Li B, Zhang G. *Amino Acids.* Facile syntheses of L-b-haloalanine derivatives from L-cysteine or L-cystine. 37, 2009, str. 603-607.
38. Schmuck C, Dudaczek J. *Tetrahedron Lett.* New guanidinium based carboxylate receptors derived from 5-amino-pyrrole-2-carboxylate: synthesis and first binding studies. 46, 2005, str. 7101-7105.
39. Laha JK, Cuny GD. *J Org Chem.* Synthesis of fused imidazoles, pyrroles, and indoles with a defined stereocenter α to nitrogen utilizing Mitsunobu alkylation followed by palladium-catalyzed cyclization. 76, 2011, str. 8477-8482.
40. Micheli F, Di Fabio R, Giacometti A, et al. *Bioorg Med Chem Lett.* Synthesis and pharmacological characterisation of 5-phenyl-2-[2-(1-piperidinylcarbonyl)phenyl]-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazol-1-ones: a new class of neuropeptide S antagonists. 20, 2010, str. 7308-7311.

41. Smith MB, March J. *March's Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms, and Structure*, šesta izdaja. New York : John Wiley & Sons, 2007.
42. Greene TW, Wuts PGM. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition. New York : John Wiley & Sons, Inc , 1999.
43. Dumas DJ. *J Org Chem*. Total synthesis of peramine. 53, 1988, str. 4650-4653.
44. Barrios Sosa AC, Yakushijin K, Horne DA. *Tetrahedron Lett*. Controlling cyclizations of 2-pyrrolicarboxamidoacetals. Facile solvation of b-amido aldehydes and revised structure of synthetic homolongamide. 41, 2000, str. 4295-4299.
45. Nechayev MA, Gorobets NY, Borisov AV, Kovalenko SM, Tolmachev AA. *Mol Divers*. The synthesis of low molecular weight pyrrolo[2,3-c]pyridine-7-one scaffold. 16, 2012, str. 749-757.
46. Wierzbicki M, Kirsch G, Nicole D. *Sulfur*. Preparation and reactivity of 2-thiopheneacetamides. 4, 1985, str. 25-30.
47. Zhang J, Fu J, Su X, Wang X, Song S, Shi M. *Chem Asian J*. Synthesis of various saturated and unsaturated N-heterocyclic carbene precursors by triflic anhydride mediated intramolecular cyclization. 8, 2013, str. 552-555.
48. Al-Said NH. *Molbank*. 2-(4-(2-Chloroacetamido)-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamido)ethyl acetate. 1, 2014, str. M819.
49. *Bachem*. http://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/Coupling_Reagents.pdf. [Elektronski] [Navedeno: 20. 6 2016.]
50. *AAPPTec*, Complete Peptide Product Source. <http://www.aapptec.com/coupling-reagents-i-414.html>. [Elektronski] [Navedeno: 20. 6 2016.]
51. Valeur E, Bradley M. *Chem Soc Rev*. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. 38, 2009, str. 606-631.
52. Wang C, Yan, Q, Liu, H, Zhou X, Xiao S. *Langmuir*. Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions. 27, 2011, str. 12058-12068.
53. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. *J Saudi Chem Soc*. Recent development in peptide coupling reagents. 16, 2012, str. 97-116.
54. Carpino LA, El-Faham A. *Tetrahedron*. The diisopropylcarbodiimide/1-Hydroxy-7-azabenzotriazole system: segment coupling and stepwise peptide assembly. 55, 1999, str. 6813-6830.

55. Pearson AJ, Roush WR. Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups. Chichester : John Wiley & Sons, 1999.
56. Theodorou V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V. Tetrahedron Lett. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. 48, 2007, str. 8230-8233.
57. Hughes AB. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.4 – Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis, Volume 4, 1. izdaja . Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2011.
58. Qin J, Rao A, Chen X, et al. ACS Med Chem Lett. Discovery of a potent nicotinic acid receptor agonist for the treatment of dyslipidemia. 32, 2011, str. 171-176.
59. Swamy KC, Kumar NNB, Balaraman E, Kumar KVPP. Chem Rev. Mitsunobu and related reactions: advances and applications. 109, 2009, str. 2551-2651.
60. Herr RJ. Albany Molecular Research. <https://www.erowid.org/archive/rhodium/pdf/current.mitsunobu.chemistry.tour.pdf>. [Elektronski] [Navedeno: 20. 6 2016.]
61. Sindac JA, Yestrepky BD, Barraza SJ, Bolduc KL, Blakely PK, Keep RF, Irani DN, Miller DJ, Larsen SD. J Med Chem. Novel inhibitors of neurotropic alphavirus replication that improve host survival in a mouse model of acute viral encephalitis. 55, 2012, str. 3535-3545.
62. Grochowski E, Hilton BD, Kupper RJ, Michejda CJ. J Am Chem Soc. Mechanism of the triphenylphosphine and diethyl azodicarboxylate induced dehydration reactions (Mitsunobu reaction). The central role of pentavalent phosphorus intermediates. 104, 1982, str. 6876-6877.
63. Díez-Barra E, de la Hoz A, Loupy A, Sánchez-Migallón A. J Heterocyclic Chem. Selective alkylation of pyrrole by phase transfer catalysis in the absence of solvent. 31, 1994, str. 1715-1717.
64. Wang N, Teo K, Anderson HJ. Can J Chem. Pyrrole chemistry. XVII. Alkylation of the pyrrolyl ambident anion. 55, 1977, str. 4112-4116.
65. Jackson RFW, Perez-Gonzalez M. Organic Syntheses. Synthesis of N-(tert-butoxycarbonyl)- β -iodoalanine methyl ester: a useful building block in the synthesis of nonnatural α -amino acids via palladium catalyzed cross coupling reactions. 81, 2005, str. 77-88.

66. Battenberg OA, Nodwell MB, Sieber SA. *J Org Chem*. Evaluation of α -Pyrones and Pyrimidones as Photoaffinity Probes for Affinity-Based Protein Profiling. 76, 2011, str. 6075-6087.
67. Tsuda T, Fujishima K, Ueda H. *Agric Biol Chem*. Synthesis of pyrazinedicarboximides from diaminomaleonitrile. 45, 1981, str. 2129-2130.
68. Högberg T, Ström P, Ebner M, Råmsby S. *J Org Chem*. Cyanide as an efficient and mild catalyst in the aminolysis of esters. 52, 1987, str. 2033-2036.
69. Xue C, Sun R, Annab R, Abadi D, Jin S. *Tetrahedron Lett*. Perylene monoanhydride diester: a versatile intermediate for the synthesis of unsymmetrically substituted perylene tetracarboxylic derivatives. 50, 2009, str. 853-856.
70. El-Betany AMM, McKeown NB. *Tetrahedron Lett*. The synthesis and fluorescence properties of macromolecular components based on 1,8-naphthalimide derivatives and dimers. 53, 2012, str. 808-810.
71. Burtoloso ACB. *Synlett*. Copper(II) acetylacetonate: an inexpensive multifunctional catalyst. 18, 2005, str. 2859-2860.
72. Maxwell A, Burton NP in O'Hagan N. *Nucleic Acid Research*. High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. 34, 2006, str. 104.