

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLAŽ VRANIČAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BLAŽ VRANIČAR

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV 4-(PIROL-2-KARBOKSAMIDO)CIKLOHEKSANA KOT POTENCIALNIH ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF DERIVATES OF 4-(PYRROL-2-CARBOXAMIDO) CYCLOHEXANE AS POTENTIAL INHIBITORS OF DNA GYRASE B**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljal na Fakultetu za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom dr. Marka Jukiča, mag. farm. Analize NMR in IR so opravili na Fakulteti za farmacijo, analize MS in HRMS pa so opravili na Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm in dr. Marku Jukiču, mag. farm. za strokovno vodenje, vsestransko pomoč in nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela ter pisanju diplomske naloge. Zahvalil bi se tudi svoji družini in najbližnjim za vso podporo, ki so mi jo izkazali tekom študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom dr. Marka Jukiča, mag. farm.

Blaž Vraničar

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm

# KAZALO VSEBINE

1. POVZETEK.....	VI
2. ABSTRACT .....	VII
3. SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
4. UVOD.....	1
4.1 Dosedanje protibakterijske učinkovine.....	1
4.2 Bakterijska rezistenca .....	2
4.3 Topoizomeraze .....	2
4.4 DNA giraza.....	3
4.5 ATP vezavno mesto na podenoti DNA giraza B .....	5
4.6 Topoizomeraza 4 .....	6
4.7 Načrtovanje potencialnih zaviralcev DNA giraze B.....	6
4.8 Že poznane skupine zaviralcev DNA giraze B .....	7
4.8.1 Aminokumarini.....	7
4.8.2 Ciklotialidin in analogi .....	9
4.8.3 Bitiazoli.....	10
4.8.4 Pirolamidi .....	11
4.8.5 Tetrahidrobenzotiazoli .....	12
4.8.6 Azaindoli.....	13
4.8.7 Pirazolpiridoni .....	14
4.8.8 Povzetek zgodovine zaviralcev DNA giraze B .....	15
5. NAČRT DELA .....	16
5.1. Sinteza derivatov s <i>trans</i> -cikloheksanskim fragmentom .....	19
5.2. Sinteza derivatov s <i>cis</i> -cikloheksanskim fragmentom.....	20
5.3. Sinteza derivatov s <i>trans</i> -cikloheksanskim fragmentom in metilenskim mostom .....	21
5.4. Uvedba metilnih estrov kot zaščitnih skupin na glicin in $\beta$ -alanin .....	22
6. MATERIALI IN METODE.....	22
7. EKSPERIMENTALNI DEL.....	25

7.1.	Sinteza metil beta-alaninijevaega klorida .....	25
7.2.	Sinteza metil glicinijevega klorida .....	26
7.3.	Sinteza <i>trans</i> -4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorida.....	27
7.4.	Sinteza <i>cis</i> -4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorid .....	28
7.5.	Sinteza metil <i>trans</i> -4-(4,5.dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata ....	29
7.6.	Sinteza metil <i>cis</i> -4-(4,5.dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata .....	30
7.7.	Sinteza <i>trans</i> -4-(4,5.dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline... <td>31</td>	31
7.8.	Sinteza <i>cis</i> -4-(4,5.dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline.....	32
7.9.	Sinteza metil 3-( <i>trans</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata.....	33
7.10.	Sinteza metil 3-( <i>trans</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicinata	35
7.11.	Sinteza metil 3-( <i>cis</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata.....	36
7.12.	Sinteza metil 3-( <i>cis</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicinata	38
7.13.	Sinteza <i>trans</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanojske kisline .....	39
7.14.	Sinteza <i>trans</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina.	41
7.15.	Sinteza <i>cis</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanojske kisline .....	42
7.16.	Sinteza <i>cis</i> -4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina....	43
7.17.	Sinteza <i>trans</i> -4-(metoksikarbonil)cikloheksil)metilaminijevega klorida .....	45
7.18.	Sinteza metil <i>trans</i> -4-((4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilata.....	46
7.19.	Sinteza <i>trans</i> -4-((4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilne kisline	47
7.20.	Sinteza metil 3-( <i>trans</i> -4-((4,5-dobromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido) propanoata.....	48
7.21.	Sinteza metil 3-( <i>trans</i> -4-((4,5-dobromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicinata .....	50
7.22.	Sinteza 3-( <i>trans</i> -4-((4,5-dobromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido) propanojske kisline .....	51

7.23. Sinteza 3-( <i>trans</i> -4-((4,5-dobromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicina.....	53
8. Rezultati.....	55
9. Razprava .....	56
9.1. Razprava k uvedbi metilne zaščitne skupine na karboksilni kislini.....	56
9.2. Razprava k tvorbi amida z TBTU in NMM.....	57
9.3. Razprava k odstranitvi metilnega estra kot zaščitne skupine s karbokslino kisline .....	59
9.4. Razprava k biološkem testiranju na encimu <i>E.coli</i> DNA giraza.....	59
9.5. Razprava k rezultatom biološkega vrednotenja .....	61
10. SKLEP .....	64
11. VIRI IN LITERATURA.....	65

## KAZALO SLIK

Slika 1: Različne konformacije DNA Giraze (prirejeno po 10) .....	4
Slika 2: Poenostavljen mehanizem delovanja, modra barva predstavlja GyrA, rumena pa GyrB (prirejeno po 13) .....	5
Slika 3: Interakcije ATP v vezavnem mestu DNA giraze B <i>E.coli</i> (prirejeno po 14) .....	6
Slika 4: Aminokumarinska zaviralca novobiocin (1) in klorobiocin (2) ter njune ključne interakcije z vezavnim mestom DNA giraze B <i>E. coli</i> .....	8
Slika 5: Ciklotialidin v aktivnem mestu DNA giraze B <i>E. coli</i> .....	9
Slika 6: Analoga ciklotialidina s ključnimi interakcijami v aktivnem mestu DNA giraze B <i>E. coli</i> ....	10
Slika 7: Predstavnik bitiazolov v aktivnem mestu DNA giraze B <i>E. coli</i> in IC <sub>50</sub> vrednostjo 1,1 μM ...	10
Slika 8: Predstavnik skupine pirolamidov v aktivnem mestu DNA giraze B <i>S.Aureus</i> in IC <sub>50</sub> vrednostjo 4 nM.....	11
Slika 9: Predstavnik 4,5,6,7-Tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazolov v aktivnem mestu DNA giraze B <i>E. coli</i> z IC <sub>50</sub> vrednostjo 49 nM .....	12
Slika 10: Predstavniki azaindolov v aktivnem mestu DNA giraze B <i>S.aureus</i> z IC <sub>50</sub> vrednostmi med in 262 nM.....	13
Slika 11: Njabolj potenten predstavnik pirazolpiridonov .....	14
Slika 12: Pregled zgodovine GyrB inhibitorjev (prirejeno po 22).....	15
Slika 13: Načrt dela .....	18
Slika 14: Sinteza <i>trans</i> -cikloheksanov.....	19
Slika 15: Sinteza <i>cis</i> -cikloheksanov .....	20
Slika 16: Sinteza <i>trans</i> -cikloheksanov z metilenskim mostom .....	21
Slika 17: Metiliranje AK .....	22
Slika 18: Mehanizem nastanka kislinskega klorida (31) .....	56
Slika 19: Mehanizem nastanka estra (31) .....	57
Slika 20: TBTU (A) in NMM (B) (32).....	57
Slika 21: Mehanizem nastanka amida (32, 33).....	58
Slika 22: Mehanizem bazične hidrolize estra (31).....	59
Slika 23: Predvidene interakcije spojine 29, označene kot zelene črtkane črte .....	61
Slika 24: Predvidene interakcije spojine 39, označene kot zelene črtkane črte .....	62
Slika 25: Spojina 29 .....	62
Slika 26: Spojina 28 .....	63
Slika 27: Spojina 39 .....	63
Slika 28: Spojina 25.....	63
Slika 29: Spojina 31 .....	64

## KAZALO TABEL

Tabela I: Topoizomeraze in njihovi mehanizmi delovanja v celici (12, 13) .....	3
Tabela II: Rezultati biološkega testiranja .....	55

## 1. POVZETEK

Široka uporaba protibakterijskih učinkovin ter pojav bakterijske rezistence sta ključna razloga za naraščajoč trend v farmacevtsko-kemijskih raziskavah na tem področju. DNA giraza je ena od bolj uveljavljenih in validiranih tarč. Spada med topoizomeraze tipa II in je odgovorna za sproščanje verige DNA med samo replikacijo. Sestavljena je iz dveh podenot DNA giraze A, ki je odgovorna za cepitev in združitev verige in dveh podenot DNA giraze B, ki je odgovorna z vezavo in hidrolizo ATP, kar je vir proste energije za spremembe konformacijskih stanj encima. Trenutno najdemo v klinični praksi le zaviralce DNA giraze A, in sicer kinolone. V klinični praksi se je kot zaviralec DNA giraze B uporabljaj novobiocin, vendar so ga umaknili s tržišča zaradi toksičnih učinkov. Z metodami kot je rentgenska kristalografija so podrobnejše raziskali samo vezavno mesto DNA giraze iz bakterije *E.coli*. S proučevanjem kristalne strukture novobiocina v kompleksu z DNA girazo B so identificirali ključne interakcije molekule z zavircem. Raziskovalci so na podlagi teh odkritij pripravili številne zaviralce z IC<sub>50</sub> v nizkem nanomolarnem območju, najuspešnejši med njimi pa so prešli v prvo fazo kliničnih testiranj.

V raziskavi smo načrtovali spojine, ki tvorijo podobne interakcije v vezavnem mestu kot zaviralec DNA giraze B klorobiocin. Spojina tvori ključne vodikove vezi z Asp73, Arg136, ohraneno molekulo vode in hidrofobne interakcije z Val43, Ala47, Val71, Val120 in Val167. Serijo spojin smo načrtovali s pomočjo molekulskega sidranja v aktivno mesto DNA giraze B. Za centralni fragment smo uporabili *para*-substituiran cikloheksan, na katerega smo na 4-amino skupino pripeli dibromopirolni fragment, na mesto 1 pa smo pripeli različne ustrezno zaščitene aminokisline. Sintetizirali in testirali smo 12 spojin. Uspeli smo pripraviti spojino z ustrezno konformacijo centralnega distančnika, ki terminalna fragmenta postavi v ugodno pozicijo za vzpostavitev ključnih vodikovih vezi z Asp73 in ohraneno molekulo vode, ionskih vezi z Arg136 ter hidrofobne interakcije z Val43, Ala47, Val71, Val120 in Val167. Pri biološkem vrednotenju na izoliranem encimu DNA giraza iz bakterije *E.coli* je spojina dosegla vrednost IC<sub>50</sub> v nizkem mikromolekularnem območju. Izbrana spojina bi lahko predstavljala spojino vodnico za nadaljnjo optimizacijo.

Ključne besede: bakterija, rezistenca, *E.coli*, DNA giraza B, zaviralec.

## 2. ABSTRACT

Wide use of antibacterial substances and emerging bacterial resistance are key reasons for increasing trends in pharmaceutical-chemical researches on this area. DNA gyrase is one of the most established and validated targets. It falls under topoisomerasis type II group and is responsible for relaxation of DNA before replication cycle. It consists out of two DNA gyrase A subunits and two DNA gyrase B subunits. DNA gyrase A is responsible for cleavage and reunion of the DNA chain while DNA gyrase B is responsible for binding and hydrolysis of ATP, which is a source of free energy for conformational enzyme changes. In clinical practice at the present time, we find a group of DNA gyrase A inhibitors quinolones. DNA gyrase B inhibitor novobiocin used to be in clinical practise, but it was later withdrawn because of its toxic affects. Methods like X-ray crystallography allowes us to explore DNA gyrase B ATP binding site from *E.coli*. With detailed research of novobiocin binding to subunit the key interacions were identified. Based on these findings researchers managed to synthesize many potent inhibitors with IC<sub>50</sub> values in low nanomolar area. The most potent inhibitos have already reached the first stage of clinical trials.

In our research DNA gyrase B inhibitor clorobiocin was used as the lead substance. It forms hydrogen bonds with Asp73, Arg136 and conserved water molecule, and hidrofobic interactions with Val43, Ala47, Val71, Val120 and Val167. Our substances were designed with molecular docking method. We used *para*-substituted cyclohexan as central fragment. We substituted N-4 with dibromopyrrol and C-1 with different protected amino acids. We synthesized and tested 12 compounds. We managed to prepare the compound with optimal conformation of central cyclohexane fragment, witch presumably set the two terminal fragments to optimal spatial arrangement for forming hydrogen bonds with Asp73 and conserved water molecule, ionic bonds with Arg136 and also hydrophobic bonds with Val43, Ala47, Val71, Val120 in Val167. Substance reached IC<sub>50</sub> value in low micromolar area in biological evaluation on DNA gyrase from *E.coli*. Our substance could be used as lead compound for future optimization.

Key words: bacteria, resistance, *E.coli*, DNA gyrase B, inhibitor.

### 3. SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozindifosfat
ADPNP	5'-adenilil-3-imidodifosfat
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozintrifosfat
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ekv.	ekvivalent
EtOAc	etilacetat
G+	po gramu pozitivne bakterije
G-	po gramu negativne bakterije
Glu	glutaminska kislina
GyrA	DNA Giraza A
GyrB	DNA Giraza B
His	histidine
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
kDa	kilodalton
MeOH	metanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
Mr	relativna molekulska masa
MRSA	na meticilin rezistentna bakterija <i>S.aureus</i>
MM	molska masa
MS	masna sprekrometrija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetna resonanca
Rf	retencijski faktor
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil uronijev tetrafluoroborat
TF pufer	tripleks formirajoči pufer

TFO	tripleks formirajoči oligonukleotidi
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
Topo 1	topoizomeraza tipa 1
Topo 2	topoizomeraza tipa 2
Topo 4	topoizomeraza tipa 4
Tt	temperatura tališča
UV	ultra-vijolično
Val	valin
$\nu$	valovno število ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\delta$	kemijski premik (ppm)
$\eta$	izkoristek
$\lambda$	valovna dolžina

## 4. UVOD

Pojav rezistentnih bakterijskih sevov je postal velik javnozdravstveni problem. Antibiotiki so postali manj učinkoviti, kar je pripeljalo do obsežnega razvoja novih protibakterijskih učinkovin (1). V odsotnosti novih vrst učinkovitih antibiotikov, se pojavlja bakterijska rezistenca in širitev rezistentnih patogenov. Posledica tega je večja pojavnost bakterijsko povzročenih kroničnih vnetij in težko ozdravljivih bolezni, saj so patogeni rezistentni na mnoge protibakterijske učinkovine (2).

Poznamo 2 veliki skupini bakterij, in sicer po Gramu pozitivne (G+) in negativne (G-) bakterije. G- so kompleksnejše, saj imajo dvojno membrano s periplazemskim prostorom in tankim slojem peptidoglikana. G+ bakterije imajo debelejšo peptidoglikansko plast in eno membrano, ki varuje citoplazmo. Oba tipa bakterij posedujeta še efluksne črpalke, obrambne encime in kompleksne mreže orgljikohidratov na površini. Tako bakterijska stena otežuje penetracijo antibiotikov v bakterijo in njihovo delovanje na ustreznih terapevtskih tarčah (3).

### 4.1 Dosedanje protibakterijske učinkovine

Obdobje med 1940 in 1970 imenujemo tudi zlata doba odkritja antibiotikov. V tem obdobju so odkrili ali izumili pomembne skupine protibakterijskih učinkovin kot so npr.  $\beta$ -laktami, fluorokinoloni in makroloidi. Nova odkritja zdravil za zdravljenje bakterijskih infekcij so postala pomembna vsakdanja praksa v medicini. To je vodilo do izboljšanja zdravstvenega stanja populacije in tudi podaljšanja predvidene življenske dobe (4). Po letu 1970 se je razvoj protibakterijskih učinkovin upočasnil, temu pa je sledilo povečano število rezistentnih bakterij. Posledično je farmacevtska industrija usmerila svojo pozornost na razvoj novih sintetičnih protibakterijskih učinkovin z metodami genomike, rešetanjem visoke zmogljivosti, kombinatorne kemije in racionalnega načrtovanja novih učinkovin. Učinkovine pridobljene po načrtovanju iz teh metod so dosegale dobre rezultate v študijah *in vitro*, vendar nobena substanca ni doseгла zadovoljivih rezultatov pri testiranju proti bakterijskim celicam. Izkazalo se je, da je zahtevno načrtovati spojino, ki bi uspešno prehajala v bakterijsko celico, še posebno pri G- bakterijah. Kljub vsem težavam pa ostaja razvoj protibakterijskih učinkovin pomembno področje v farmaciji (2).

## 4.2 Bakterijska rezistenca

Bakterijska rezistenca je sposobnost mikroorganizma, da izniči učinek enega ali več protimikrobnih učinkovin, na katere je bil predhodno občutljiv (5). Bakterija pridobi genski zapis najpogosteje s konjugacijo (medcelični prenos preko plazmida), pri čemer se plazmidi z rezistenčnimi geni integrirajo v bakterijsko DNA (6). Novo pridobljen genski zapis tako celici omogoča sintezo novih celičnih struktur, ki so sposobni bakterijo zavarovati pred učinki antibiotikov, kot so tvorba bakterijskega biofilma, spremembe v celični steni in membrani, spremembe v delovanju efluksnih črpalk ter kemijske spremembe znotrajceličnih struktur (5).

Enega večjih javnozdravstvenih problemov povzroča na  $\beta$ -laktamski antibiotik meticilin rezistentna bakterija *S.aureus* (MRSA) (1). Te rezistentne bakterije imajo sposobnost proizvajati encime  $\beta$ -laktamaze, izražajo pa tudi nekoliko drugačne tarčne proteine za  $\beta$ -laktame, ki z vezavo v aktivno mesto njihovega delovanja ne zavrejo (7).

Eden izmed pristopov boja proti rezistenci je iskanje novih spojin v naravnem okolju. Naravni produkti nam ponujajo ogromen in raznolik nabor spojin s protimikrobnim delovanjem. Približno 50% učinkovin na tržišču je naravnega izvora, pri protibakterijskih učinkovinah pa naj bi ta številka dosegala 66% (8). Kemijska optimizacija nekaterih spojin iz naravnega okolja omogoča izboljšavo farmakokinetičnih lastnosti, protimikrobnega delovanja in zmanjša pojavnost toksičnih učinkov (9).

Ena izmed dobro klinično validiranih tarč je encim DNA giraza, ki spada v skupino topoizomeraz. Zaviralci tega encima se uporabljajo pri terapiji proti bakterijskim okužbam, vendar pa se pojavlja vedno več primerov bakterijske rezistence proti glavnim predstavnikom v klinični praksi – flourokinolonom. Strategija boja proti rezistenci je v tem primeru poiskati nova vezavna mesta na že uveljavljenem encimu (10).

## 4.3 Topoizomeraze

Encimi topoizomeraze so prisotni v vseh celicah in so ključni za njihovo preživetje. Evkariotska topoizomeraza je homodimer, medtem ko je prokarionska heterodimer, sestavljen iz štirih podenot, med katerimi sta po dve in dve enaki (11). Delijo se na dva tipa, in sicer topoizomeraze tipa 1 (Topo 1) in topoizomeraze tipa 2 (Topo 2).

**Tabela I: Topoizomeraze in njihovi mehanizmi delovanja v celici (12, 13)**

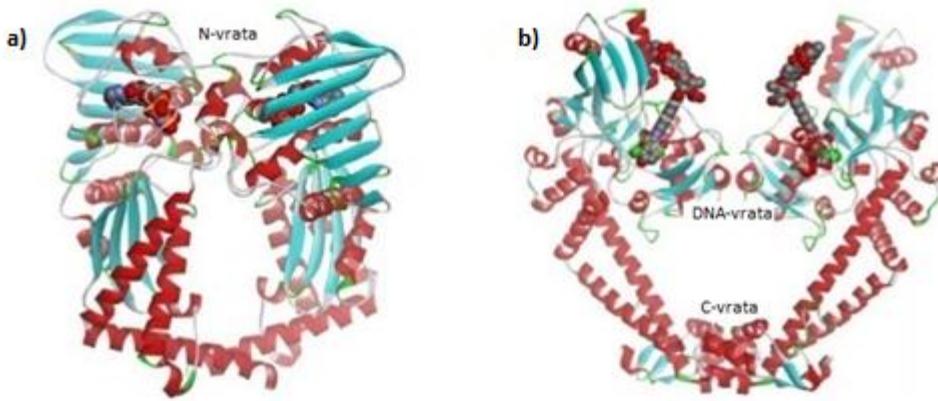
ENCIMI	MEHANIZEM DELOVANJA
Topoizomeraze tipa 1	Katalizirajo cepitve ene DNA verige v dupleksu in omogočajo prehod druge verige skozi razcepljeno odprtino
Topoizomeraze tipa 2	Katalizirajo cepitev DNA dupleksa in omogočajo prehod vijačnice skozi razcepljeno odprtino

Vsaka celica mora posedovati celična orodja iz družine Topo 2, ki so vključeni v nadzor različnih topoloških stanj DNA (14). Njihove glavne naloge so relaksiranje navojev DNA pred podvajanjem, raztegovanje verige med traskripcijo ter odcep hčerinske DNA od matične po podvajanju. Za svoje delovanje potrebujejo encimi energijo, ki jo pridobijo s hidrolizo ATP. Te reakcije so ključne za proces prepisa DNA in delitve celic, zato se brez teh encimov celice ne morejo deliti (13).

#### 4.4 DNA giraza

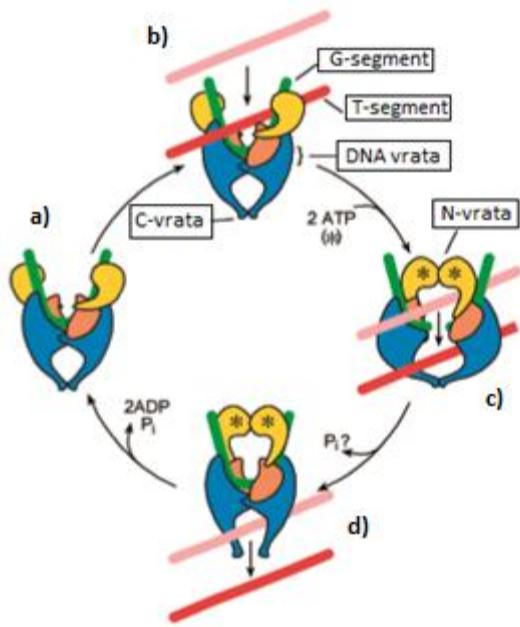
DNA giraza je encim prisoten v vseh bakterijah in je ključen za njihovo preživetje (15). Gre za topoizomerazo tipa 2, ki je sestavljena iz dveh podenot DNA giraze A (GyrA) in dveh podenot DNA giraze B (GyrB) ter tako tvori tetramer A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. Podenoti GyrA sta zadolženi za razcep in ponovno združitev DNA, medtem ko sta podenoti GyrB nosilca vezavnega mesta za ATP, kjer poteka hidroliza ATP. S tem pridobi encim energijo za normalno delovanje katalitičnega cikla (11). Encim sodeluje pri celičnih mehanizmih popravljanja napak ter prepisovanja, podvajanja in rekombinacije DNA (15). Glavne funkcije encima v celici so sproščanje navojev v verigi DNA pred podvojevanjem in tako priprava na podvojevanje, popravljanje napačno zavitih odcepov verige ter kot edini predstavnik topoizomeraz tipa 2 uvajanje negativnih supernavojev v samo DNA verigo (13). Prva eksperimentalno določena kristalna struktura GyrB je bil 43 kDa velik N-terminalni del DNA giraze B iz bakterije *E.coli* imenovan tudi GyrB43. Struktura kompleksa proteina z ADPNP (analog ATPja, ki je zaradi večje stabilnosti v vodnem okolju primernejši za analitiko) je bila določena z metodo rentgenske kristalografije (14). Domena je sestavljena iz dveh poddomen, N-terminalnega dela z 220 aminoksilinskimi ostanki in C-terminalnega dela z 170 ostanki. Do sedaj sta bila

raziskana dva konformacijska stanja. ATP konformacija (Slika 1a), opazovana ob vezavi ADPNP in relaksirana konformacija, ki jo encim zavzame ob vezavi zaviralca (Slika 1b) (16). Struktura, ki ju z različnimi konformacijskimi stanji tvorita obe GyrB podenoti, se imenuje N-vrata (Slika 1a). Ostali dve ključni strukturi pa sta tako imenovani DNA-vrata in struktura C-vrata, ki ju tvorita obe GyrA podenoti (Slika 1b) (11).



Slika 1: Različne konformacije DNA Giraze (prirejeno po 10)

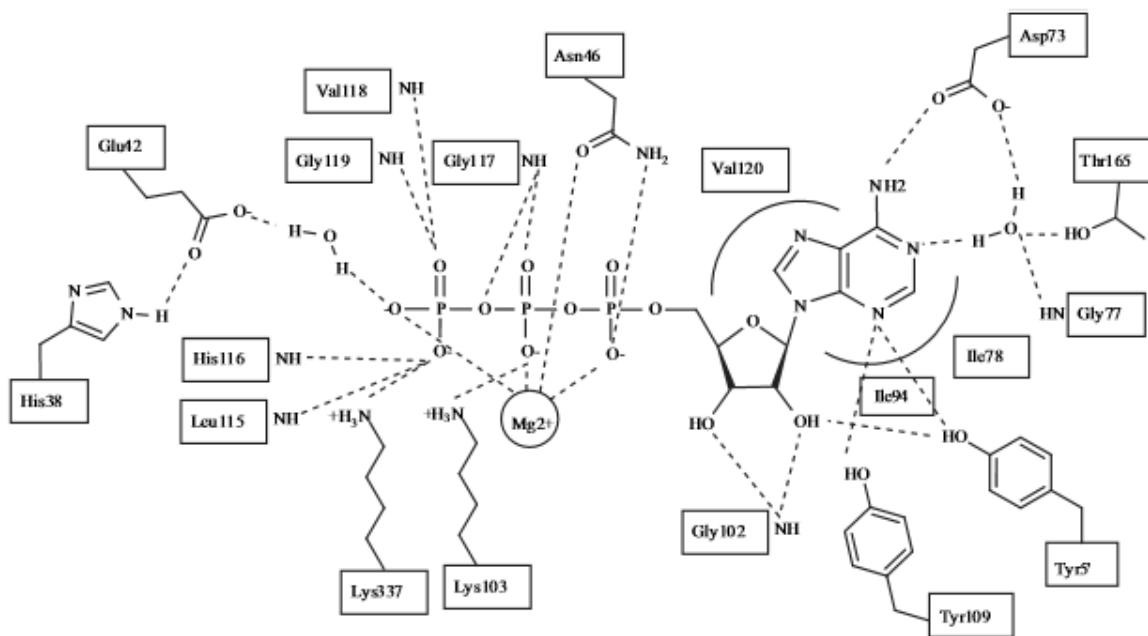
Mehanizem delovanja encima je bil raziskan z obširnimi biokemičnimi študijami (13). V enem ciklu encim spreminja svojo konformacijo in tvori različne prostorske strukture, ki omogočajo potisk odseka dvojne vijačnice skozi drugega (16). Mehanistično cikel relaksacije DNA verige poteče tako, da se najprej na encim veže prva veriga DNA, imenovana G-segment (ang. gate) (Slika 2a). G-segmentu sledi vezava druge verige, imenovane T-segment (ang. transport), ki vstopi med obe GyrB podenoti (Slika 2b) (13). V katalitičnem jedru encima se nahaja TOPRIM domena, kjer poteka sama cepitev verige (16). Temu sledi vezava ATP na GyrB podenoti, ki povzroči zaprtje N-vrat in odprtje DNK vrat. Ob hidrolizi ATP konformacijska sprememba encima zapre T-segment in ga potisne skozi DNA vrata ter razprt G-segment druge DNA vijačnice (Slika 2c). T-segment tako zapusti encim skozi C-vrata, oba prekinjena dela G-sementa pa se znova povežeta (Slika 2d). V zadnji fazi hidrolizirana molekuli ADP zapustita vezavni mest, kar znova odpre N-vrata, G-segment pa zapusti encim. Encim je tako pripravljen na novi katalitični cikel (13).



Slika 2: Poenostavljen mehanizem delovanja, modra barva predstavlja GyrA, rumena pa GyrB (prijejeno po 13)

## 4.5 ATP vezavno mesto na podenoti DNA giraza B

Vezavno mesto se nahaja med aminokislinskimi ostanki 2 in 222 in vsebuje 8 beta ploskev in 5 alfa zavojev (14). Nad vezavnim mestom se nahaja zanka sestavljena iz aminokislinskih ostankov 98-118, ki ob vezavi ATP ali ADPNP tvori zaprto, ob vezavi zaviralca pa odprto konformacijo (17). S študijami je bilo ugotovljeno, da zamenjava His38, Glu42, Asn46, Glu50, Asp73, Arg76, Gly77, Ile78 in Thr165 z alaninom vodi v zmanjšano oz. tudi v nulto ATPazno aktivnost. Glu42 stabiliziran s His38 predstavlja katalitično mesto encima, ostali aminokislinski ostanki pa tvorijo ključne interakcije z ATP ter kompleksirajo  $Mg^{2+}$  kovinski ion. V aktivnem mestu se tudi nahajajo ključne molekule vode, ki tvorijo vodikove vezi z določenimi aminokislinskimi ostanki in substratom. Najpomembnejša med njimi tvori sistem vodikovih vezi z Asp73, Gly77 in Thr165 (Slika 3). Ta sistem tvori interakcijo z adeninskim obročom ATPja in z zaviralci GyrB (14).



Slika 3: Interakcije ATP v vezavnem mestu DNA giraze B *E.coli* (prirejeno po 14)

## 4.6 Topoizomeraza 4

Topoizomeraza 4 (Topo 4) je encim iz skupine topoizomeraz tipa 2 (13). Je encim soroden DNA Girazi, sestavljen iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE ter tako tvori tetramer C<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, pri čemer je ParC homologen GyrA, ParE pa homologen GyrB. Čeprav sta encima med sabo podobna, odpravljata drugačne funkcije v celici. Oba sta zadolžena za nadzor topološkega stanja DNA, pri čemer je giraza zadolžena v procesih iniciacije podvajanja in podaljševanja DNA, medtem ko je Topo 4 zadolžena za relaksiranje supernavojev DNA in odcep hčerinske DNA od matične. Določena je bila tudi kristalna 43kDa velikega *N*-terminalnega dela Topo 4 ParE iz bakterije *E.coli*. Superpozicija ParE in GyrB je pokazala, da sta vezavni mesti za ATP skoraj identični (14).

## 4.7 Načrtovanje potencialnih zaviralcev DNA giraze B

Zelo pogosta uporabljena skupina protibakterijskih učinkovin so fluorokinoloni s tipičnima predstavnikoma ciprofloksacinom in moksifloksacinom. Gre za edino skupino zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze 4, ki se uporablja v klinični praksi. Vežejo se na vezavno mesto na GyrA/ParC in preprečujejo replikacijo DNA, povzročajo poškodbe na DNA in motijo sintezo proteinov (11). Zaviralcev GyrB/ParE trenutno na trgu ni prisotnih (14).

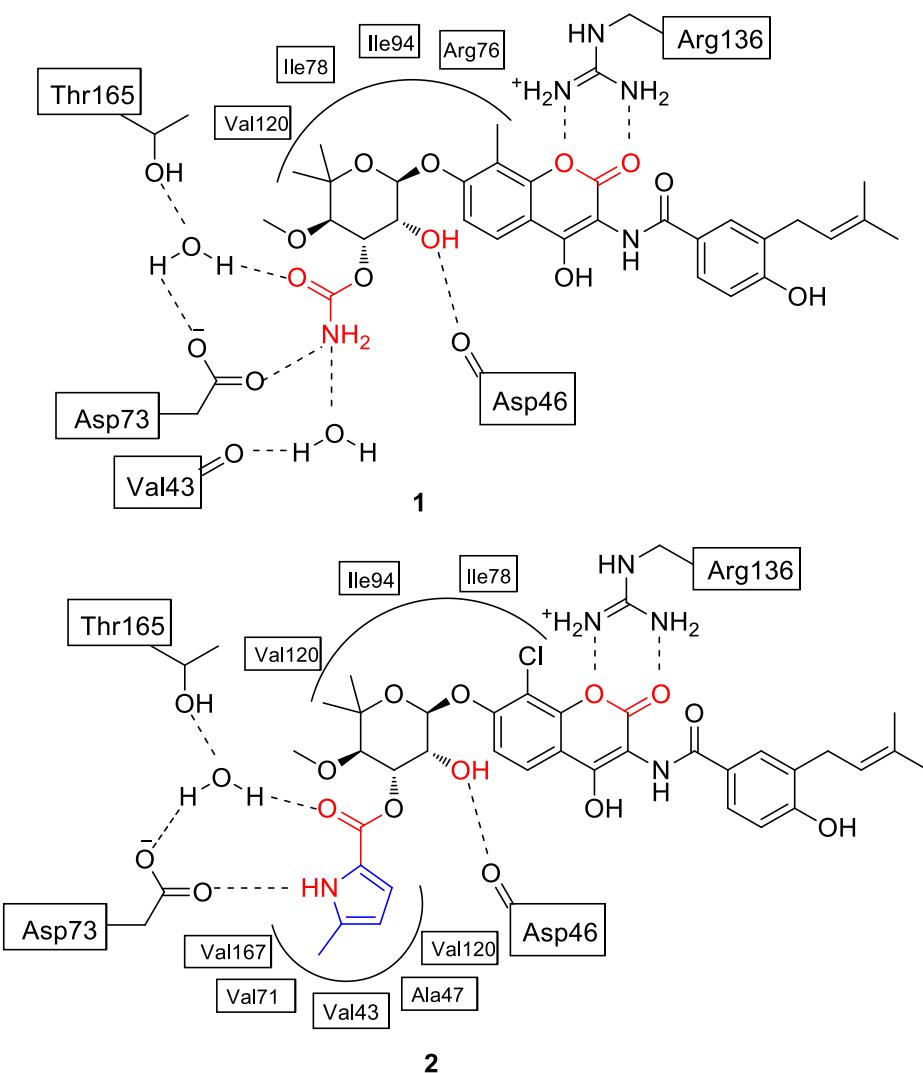
Vezavnih mest za ATP je v organizmu veliko, zato je ključnega pomena razviti ATP-kompetitivni zaviralec, ki se veže le v vezavno mesto na encimih bakterijskih celic (18). Kljub težavam pri uporabi ATP vezavnih mest za načrtovanje novih učinkovin pa napredek v tehničnih in znanstvenih panogah omogoča podrobnejši vpogled v raziskovane tarče. Nove raziskave na GyrB so tako vodile do iskanja novih spojin vodnic z metodami viskozmogljivega ter virtualnega rešetanja (19). Uporabili pa so tudi že načrtovanje na osnovi fragmentov in z uporabo farmakofornih elementov že znanih naravnih spojin pripravili številne knjižnice novih sintetičnih in polsintetičnih spojin (20). Potencialni zaviralc morajo imeti tudi visoko afiniteto do samega vezavnega mesta, saj morajo uspešno tekmovati z molekulami ATP v bakterijski celici, katerih koncentracija je dokaj visoka (1-10mM) (18).

Velika homologija med GyrB in ParE omogoča razvoj zaviralcev, ki bi delovali na obe tarči hkrati (14). Ta lastnost je zaželena, saj je zaradi večjega števila vezavnih mest možnost pojava rezistence na zaviralec manjša. GyrB in ParE posedujeta veliko homologijo med patogenimi bakterijami, kar daje potencial za sintezo novih protibakterijskih učinkovin s širokim spektrom delovanja (21).

## 4.8 Že poznane skupine zaviralcev DNA giraze B

### 4.8.1 Aminokumarini

Aminokumarini so naravni antibiotiki izolirani iz različnih vrst bakterij *Streptomyces*. Najbolj poznana predstavnika sta novobiocin (Slika 4 spojina 1) in klorobiocin (Slika 4 spojina 2) (14). Spojina 1 se veže na 24 kDa velik N-terminalni fragment GyrB iz bakterije *E.coli*. Gre za zaviralec, ki se delno veže v vezavno mesto za ATP (22). Koncentracija, pri kateri je 50 % delovanja encima zavrtega ( $IC_{50}$ ) znaša 3 nM za spojino 1 (23). Obe spojini 1 in 2 imata podobno strukturo, ki se razlikuje le v prisotnosti metilpirolnega obroča pri spojini 2 in substituciji na mestu 7 na kumarinskem obroču. Spojini tvorita ključne vodikove vezi z Asn46, Asp73, Arg136 in ohranjeno molekulo vode, ki tvori interakcije z Asp73 in Thr165 (Slika 4, spojini 1 in 2, rdeča barva). Spojina 2 ima 20 krat višjo afiniteto do DNA giraze.

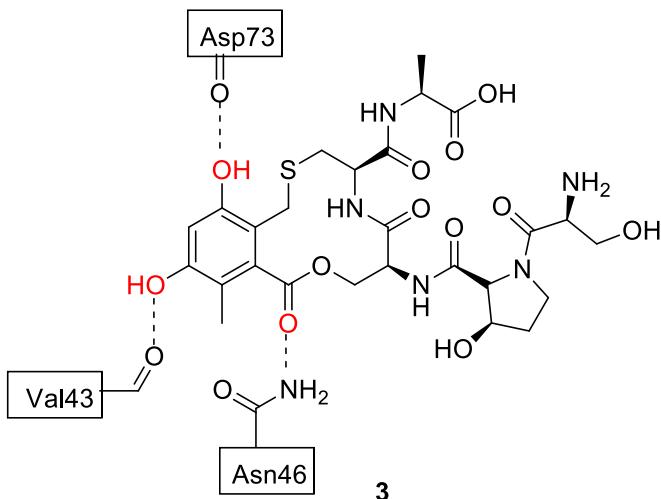


**Slika 4: Aminokumarinska zaviralca novobiocin (1) in klorobiocin (2) ter njune ključne interakcije z vezavnim mestom DNA giraze B *E. coli***

Terminalni metilpirolni fragment, ki tvori vodikovo vez z Asp73, se veže v hidrofobni žepek in interagira z aminokislinksimi ostanki Val43, Ala47, Val71, Val120 in Val167 (Slika 4, spojina 2, modra barva) (24). Visoka afiniteta je predvsem posledica energijsko ugodne vezave v vezavno mesto (14). Oba antibiotika imata izjemno nizek Kd (Spojina 1 = 28nM, Spojina 2 = 1,2nM) in se poleg GyrB vežeta tudi v vezavno mesto ParE. Zaradi odličnega protibakterijskega delovanja napram G+ bakterijam so spojino 1 uporabljali za zdravljenje okužb z bakterijo MRSA, vendar so ga morali umakniti s tržišča zaradi toksičnosti (11). Kljub umiku iz tržišča pa obe spojini 1 in 2 predstavljata dobro izhodišče za nadaljno načrtovanje novih serij protibakterijskih učinkovin (20).

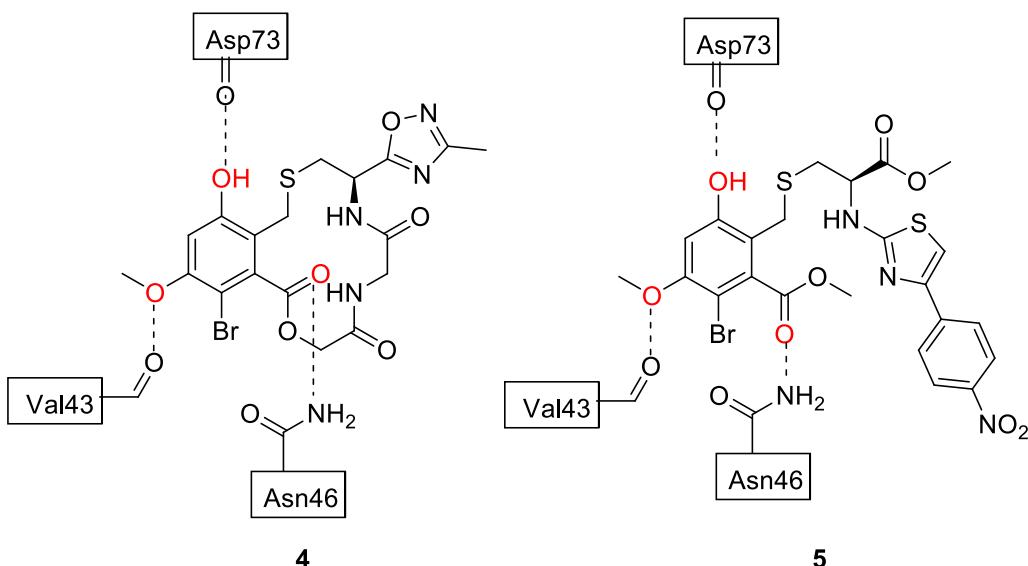
## 4.8.2 Ciklotialidin in analogi

Ciklotialidin (Slika 5, spojina 3) je naravni zaviralec GyrB, prav tako izoliran iz vrst *Streptomyces* (14).



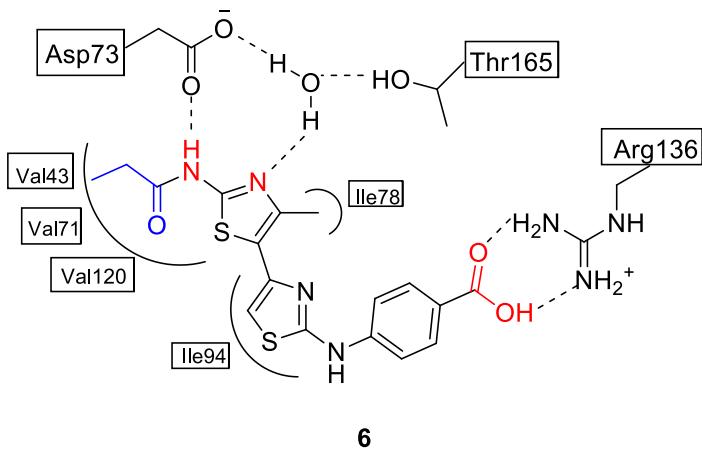
Slika 5: Ciklotialidin v aktivnem mestu DNA giraze B *E. coli*

Vsebuje 12-členski laktonski obroč iz pentapeptidne verige, sklenjene z resorcinolnim obročem. Kljub selektivnosti napram evkariontskim topoizomerazam, podobno kot novobiocin, imajo predstavniki ciklotialidinov slabo protibakterijsko delovanje. Vzrok verjetno najdemo v nižji permeabilnosti preko celične membrane (25). Spojine se prav tako vežejo na 43 kDa velik N-terminalni fragment GyrB iz baketrije *E.coli* (14). Za vezavo v aktivno mesto je ključen resorcinol, ki tvori vodikove vezi z aminokislinskima ostankoma Asp73 in Val 43 ter laktomska skupina, ki tvori vodikovo vez z Asn46 (Slika 5, rdeča barva) (23). Pri raziskavah analognih spojin so zamenjave resorcinola s fenilnim fragmentom in razširitve laktoskega obroča vodile v izboljšano delovanje proti *S.aureus* (Slika 6, spojina 4) (18). Razvili pa so tudi analoge s prekinjenim laktoskim obročem (secociklotialidine) (Slika 6, spojina 5). Zaradi boljše permeabilnosti je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) spojine 5 proti *S.Aureus* znašala 1 µg/mL, kar je 128 krat manj kot pri spojini 3. V testiranju spojin 4 in 5 pri infekciji morskih organizmov s *S.aureus* pa je bila uspešnost manjša kot pri že uporabljenih antibiotikih zaradi visoke afinitete do plazemskih proteinov in hitrega metabolizma na OH skupini resorcinolnega fragmenta (14).

Slika 6: Analoga ciklotialidina s ključnimi interakcijami v aktivnem mestu DNA giraze B *E. coli*

#### 4.8.3 Bitiazoli

4,5'-Bitiazoli (Slika 7) so spojine, ki so bile načrtovane s pomočjo virtualnega rešetanja.

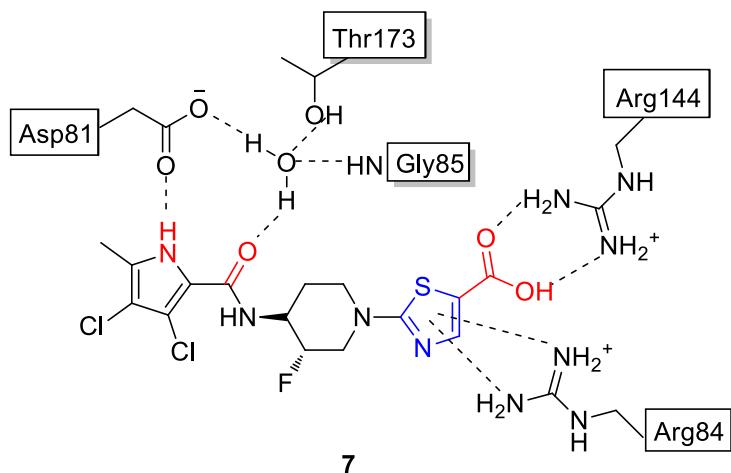
Slika 7: Predstavnik bitiazolov v aktivnem mestu DNA giraze B *E. coli* in  $IC_{50}$  vrednostjo  $1,1 \mu M$ 

Spojine so bile načrtovne s preučevanjem ključnih interakcij med že prisotnimi zaviraci DNA giraze in 24 kDa velikim N-terminalnim fragmentom GyrB iz bakterije *E.coli*. Tako so identificirali najpogosteje prisotne interakcije, kot so vodikove vezi z Asp73, Arg136 in ohranjeno molekulo vode, ki tvori interakcije z Asp73 in Thr165 (Slika 7, rdeča barva). Poleg vodikovih vezi so bile pomembne tudi 3 regije hidrofobnih interakcij, med katerimi je bil

ključen hidrofobni žep z Val43, Val71 in Val120 (Slika 7, modra barva). Najmočnejši zaviralec (Slika 7, spojina **6**) je izkazoval  $IC_{50}$   $1,1\mu M$ . Kljub vrednosti  $IC_{50}$  v nizkem mikromolarnem območju je spojina **6** na protibakterijskem testiranju bakterijskih celicah *S.aureus* kazala le šibko protibakterijsko učinkovitost. S knjižnico so dokazali potencialno uspešnost načrtovanja zaviralcev z metodo virtualnega rešetanja, saj so se rezultati teoretičnega načrtovanja in encimskega testiranja dobro ujemali (24).

#### 4.8.4 Pirolamidi

Pirolamidi (Slika 8) so bili načrtovani s pomočjo virtualnega rešetanja in preučevanjem kristalne strukture GyrB *S.aureus*.



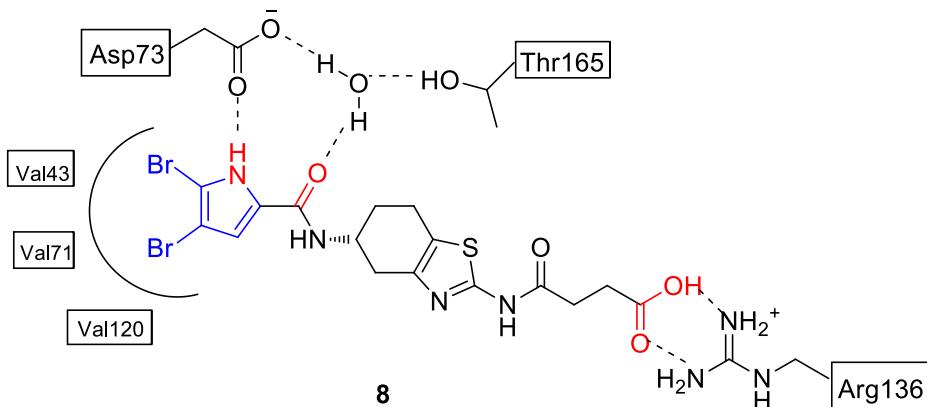
**Slika 8:** Predstavnik skupine pirolamidov v aktivnem mestu DNA giraze B *S.Aureus* in  $IC_{50}$  vrednostjo 4 nM

Odkrili so odlično spojino vodnico, ki je izkazovala  $IC_{50}$  vrednost 20 nM na encimu GyrB seva *S.aureus* (26). Ključne interakcije spojine vodnice so vodikove vezi z Asp81, Arg144 in ohranjeno molekulo vode, ki tvori interakcije z Gly85 in Thr173 (Slika 8, rdeča barva) ter  $\pi$ -kation interakcije aromatskega obroča z Arg84 (Slika 8, modra barva). Te interakcije so analogne že opisanim interakcijam z vezavnim mestom GyrB v bakterije *E.coli*. Z optimizacijo so pripravili spojino z  $IC_{50}$  4nM (Slika 8, spojina **7**). Gre za evtomer, ki je bil veliko aktivnejši od ostalih geometrijskih izomerov. Izboljšali so tudi MIC 8 krat proti *S.pneumoniae* ( $0,06 \mu g/ml$ ). Spojina **7** je delovala tudi *in vivo* na modelu okužene miši z bakterijo *S.pneumoniae* z vrednostmi 80 mg/kg z ED<sub>50</sub> 54 mg/kg telesne mase (27).

#### 4.8.5 Tetrahidrobenzotiazoli

4,5,6,7-Tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazole (Slika 9) so načrtovali z uporabo naravnih spojin vodnic klatrodina, himendina in oroidina. Ti alkaloidi iz morskih spužv so izkazovali protibakterijsko delovanje in strukturno podobnost z nedavno sintetiziranimi pirolamidi zaviralci GyrB. Z uporabo virtualnega rešetanja analogov morskih alkaloidov in biološkega testiranja so identificirali spojino zadetek z delovanjem na GyrB iz bakterije *E.coli*. Spojina je izkazovala IC<sub>50</sub> vrednost 12µM. S farmacevtsko-kemijskim načrtovanjem so raziskovalci uspeli pripraviti spojino **8** z vrednostjo IC<sub>50</sub> v nanomolarnem območju (49nM; Slika 9, spojina **8**). Glavne interakcije spojine **8** z vezavni mestom so vodikove vezi z aminoksilinskimi ostanki Asp73, Arg136, ohranjeno molekulo vode (Slika 9, rdeča barva), ter vezava v hidrofobni žep z Val43, Val71 in Val120 (Slika 9, modra barva) (28).

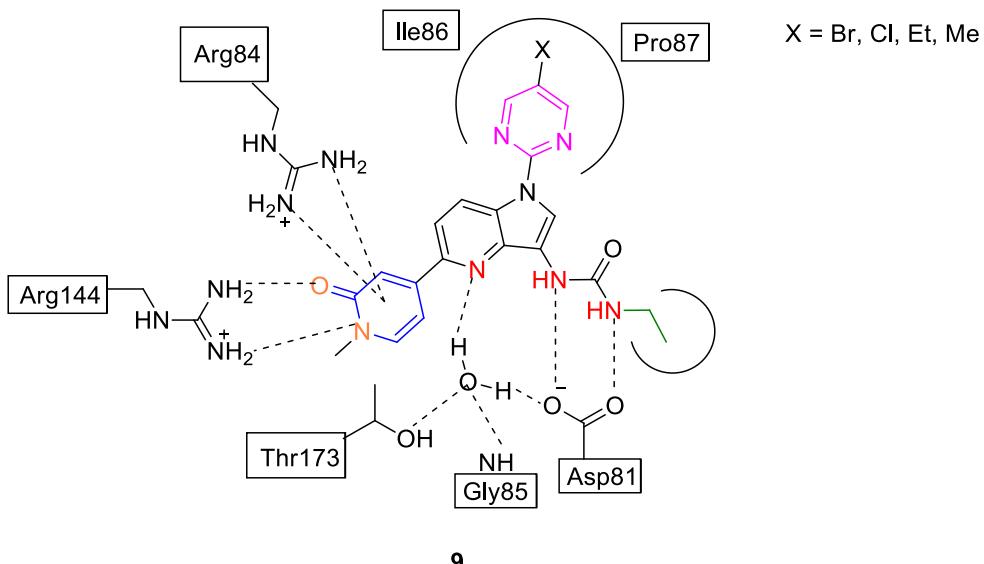
Zaviranje izoliranega encima je bilo uspešno, kljub temu pa spojina **8** in njeni analogi niso izkazovali protimikrobnega delovanja *in vitro*. Razlogi za takšna opažanja tičijo v samih lastnostih spojin. Raziskovalci so namreč pokazali, da imajo spojine slabo permeabilnost skozi celično membrano, poleg tega pa so še substrati za efluksne črpalke tolC bakterije *E.coli* (28).



Slika 9: Predstavnik 4,5,6,7-Tetrahidrobenzo[1,2-d]tiazolov v aktivnem mestu DNA giraze B *E. coli* z IC<sub>50</sub> vrednostjo 49 nM

#### 4.8.6 Azaindoli

Azaindoli (Slika 10, spojina **9**) so bili načrtovani z racionalnim načrtovanjem iz že znanih zaviralcev GyrB z fragmentom etiluree in obsežnimi SAR študijami.

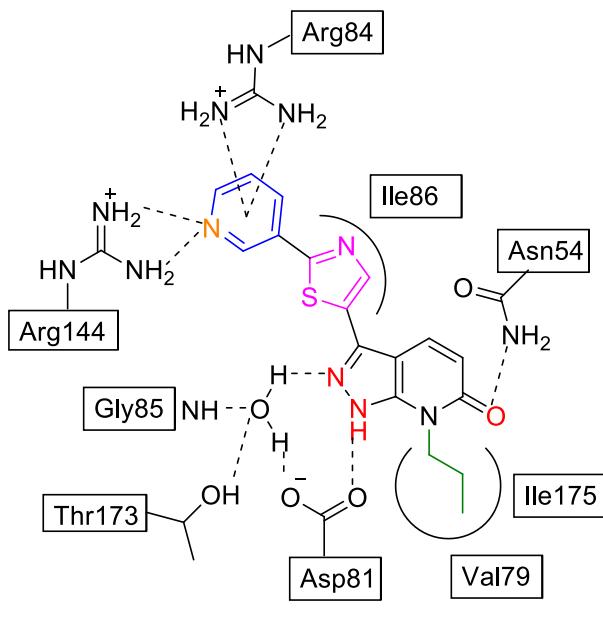


**Slika 10: Predstavniki azaindolov v aktivnem mestu DNA giraze B *S.aureus* z  $IC_{50}$  vrednostmi med 13 in 262 nM**

Načrtovani so na podlagi centralnega 4-azaindolnega fragmenta z substitucijami na N-1, C-3 in C-6. Na mestu C-3 so se na podlagi predhodnih študij odločili za sečninski fragment. Oba dušika uree in indolni dušik na mestu 4 tvorijo skupaj vodikove vezi z Asp81 in ohranjeno molekulo vode, ki tvori interakcije z Asp81, Gly85 in Thr173 (Slika 10, rdeča barva). Etilna skupina se veže v manjši hidrofobni žep (Slika 10, zelena barva). 2-pirimidilni fragment pa v večji hidrofobni žep z amikokislinskima ostankoma Ile86 in Pro87 (Slika 10, vijolična barva). V primeru para substitucije pirimidila s Cl, Br, Me ali Et so 2-8 krat izboljšali protimikrobnno delovanje, najverjetneje zaradi izboljšane penetracije skozi membrane. Na mesto C-6 se je kot najbolj primeren izkazal *N*-metilpiridon, ki tvori vodikove vezi z Arg144 (Slika 10, oranžna barva) in  $\pi$ -kation interakcije z Arg84 (Slika 10, modra barva). S farmacevtsko-kemijskimi metodami so raziskovalci pripravili serijo spojin **9** z  $IC_{50}$  vrednostmi med 13 in 262 nM (Slika 10, spojine **9**). Na bioloških testiranjih so substance dosegale dobre MIC proti *MRSA* (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), *MRSA* z rezistenco na ciprofloksacin (*MRSA Cipro<sup>R</sup>*) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in *S.pneumoniae* (0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (29).

#### 4.8.7 Pirazolpiridoni

Pirazolpiridini (Slika 11) so načrtovali na osnovi fragmentov.

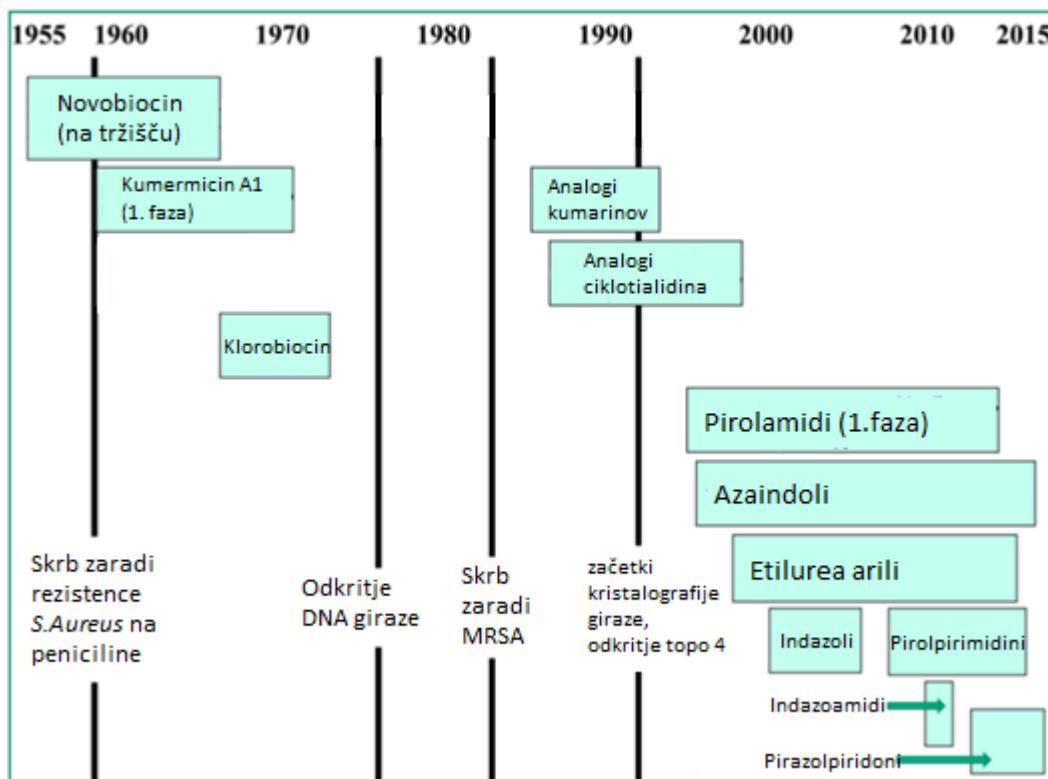


**Slika 11: Njabolj potenten predstavnik pirazolpiridonov**

Pirazolpiridonski fragment tvori vodikove vezi z Asp81, Asn54 in ohranjeno molekulo vode, ki tvori interakcije z Asp81, Gly85 in Thr173 (Slika 11, rdeča barva). V obsežnih SAR študijah so na mestu C-3 identificirali ključen distančnik 2-(3-piridil)tiazol, ki omogoča vodikovo vez z Arg144 (Slika 11, oranžna barva) in  $\pi$ -kation interakcije z Arg84 (Slika 11, modra barva). Na mestu N-7 so pripeli propilni fragment, ki se je izkazal kot najugodnejši za vezavo v hidrofobni žep (Slika 11, zelena barva). Odsotnost substitucije na ostalih mestih centralnega fragmenta omogoča ugodno prostorsko postavitev tiazola in hidrofobne interakcije z Ile86 (Slika 11, vijolična barva). S farmacevtsko-kemijskimi metodami so raziskovalci pripravili spojino **10** z  $IC_{50}$  6 nM na GyrB *S.aureus* in 183 nM na ParE *S.aureus* (Slika 11, spojina **10**). Na biološkem testiranju je spojina **10** dosegla dobre MIC proti *MRSA* (0,06 µg/ml), *MRSA Cipro<sup>R</sup>* (0,06 µg/ml) in *S.pneumoniae* (0,25 µg/ml). Enaka MIC proti cipro občutljivim in rezistentnim bakterijam je dokaz, da se spojina veže na različno vezavno mesto od kinolonov (30).

#### 4.8.8 Povzetek zgodovine zaviralcev DNA giraze B

Kljub umiku spojin iz klinike ostaja tarča zanimiva in raziskave so v zadnjih letih vodile do številnih razredov novih zaviralcev DNA giraze B (Slika 12). Rezultati mnogih razredov v in vitro testih so zelo obetavni, najuspešnejše spojine pa so že prešle v 1. fazo kliničnih testiranj (22).



Slika 12: Pregled zgodovine GyrB inhibitorjev (prirejeno po 22)

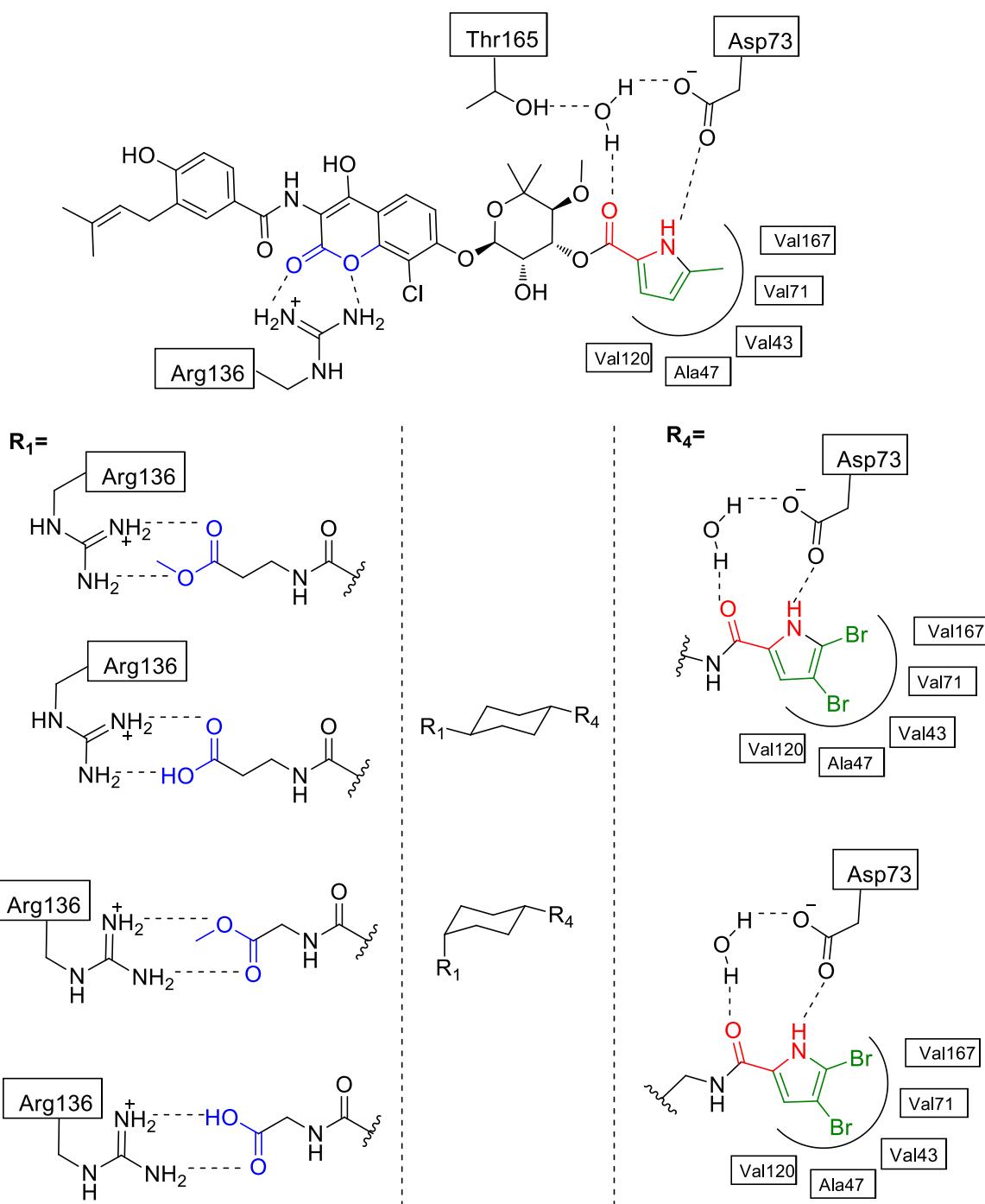
## 5. NAČRT DELA

Na Fakulteti za Farmacijo, Univerze v Ljubljani se v okviru evropskega projekta MAREX že nekaj časa ukvarjajo z načrtovanjem in sintezo novih potencialnih zaviralcev DNA giraze B. Pri izvedbi magistrske naloge smo uporabljali klorobiocin kot spojino vodnico. Preučili smo ključne interakcije med klorobiocinom in vezavnim mestom DNA giraze B iz bakterije *E.coli* ter predvideli, da mora zaviralec tvoriti ključne interakcije z Asp73, ohraneno molekulo vode in Arg136, ter van der Waalsove (vdV) vezi z Val43, Val71 in Val120 (Slika 13). Sama sinteza mora omogočati konvergenčni in hiter dostop do večjega števila analogov, ki bi nam lahko omogočili vpogled v strurne zahteve za delovanje na preučevani tarči. Prav tako je zaželjeno, da so reagenti za izvedbo sinteze dobavljeni in cenovno ugodni.

V literaturi je prisotnih veliko že sintetiziranih in biološko ovrednotenih zviralcev GyrB z dobrim protibakterijskim delovanjem. Na osnovi teh spojin in dobrega poznavanja vezavnega mesta bomo poskušali načrtovati novo serijo zaviralcev DNA Giraze B s *para*-substituiranim cikloheksanskim skeletom (Slika 13). Omenjeni centralni skelet nam bo omogočil ugodno razdaljo za uvedbo fragmentov, ki tvorijo zgoraj omenjene interakcije in omogočil ugodno vzpostavitev konformacije, ki zagotovi vzpostavitev ključnih interakcij z vezavnim mestom. Nanj bomo na 4-amino mestu pripeli dibromopirolni fragment, ki je odgovoren za vzpostavitev vodikovih vezi z Asp73 in ohraneno molekulo vode v vezavnem mestu (Slika 13, rdeča barva) ter vdW vezi z Val43, Val71 in Val120 (Slika 13, zelena barva). Nato bomo na cikloheksanskem karboksilatu tvorili amidno vez z ustrezno zaščitenim glicinom in  $\beta$ -alaninom (Slika 17 – uvedba zaščitne skupine na aminokisline). Z omenjenimi strurnimi modifikacijami bomo preučevali vpliv same dolžine molekule (glicin,  $\beta$ -alanin, metilenski most) na delovanje pripravljenih spojin na izoliranem encimu in poskušali določiti idealno razdaljo za dosego delovanja na encimu. Nazadnje bo sledila hidroliza estrske vezi. Tako ester kot tudi karboksilat lahko tvorita ključne interakcije (in sicer vodikove in ionske vezi z Arg136; Slika 13, modra barva) na drugi strani načrtovanih molekul in tako omogočita vzpostavitev vseh v literaturi omenjenih ključnih kontaktov z aktivnim mestom. Preučili bomo ali prisotnost metilne skupine vpliva na vzpostavitev vezi z Arg136. Pri načrtovanju bomo pozorni na geometrijsko izomerijo centralnega distančinka, saj bomo izvedli sinteze s

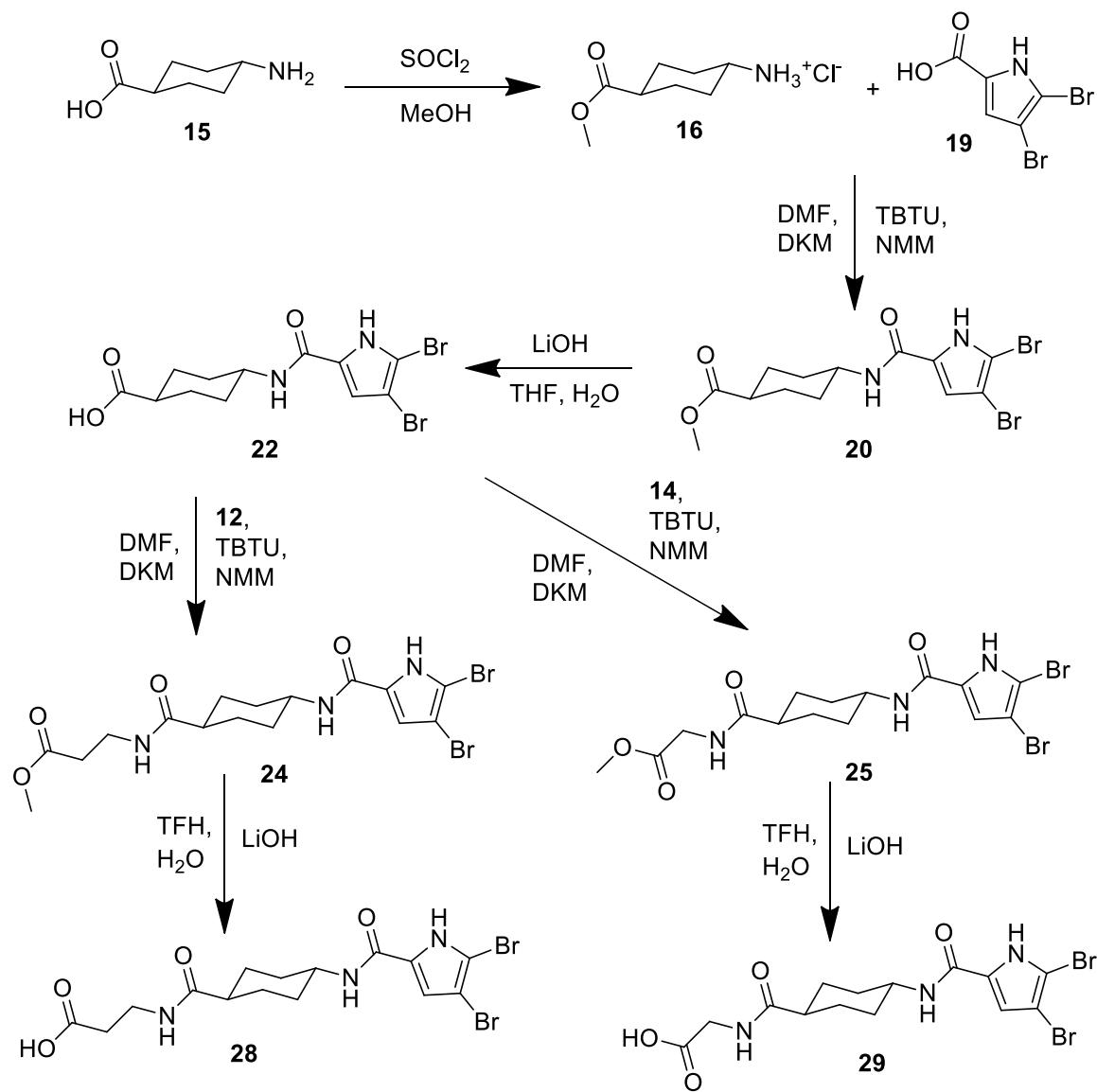
*trans-* (Slika 14) in *cis-* (Slika 15) cikloheksanskim fragmentom. Preučili bomo, kateri geometrijski izomer omogoča boljšo vzpostavitev ključnih vezi v aktivnem mestu izoliranega encima. Na koncu bomo izvedli še sintezo, kjer bomo osrednjemu *trans*-cikloheksanskemu fragmentu dodali še metilenski most na mesto 4 (Slika 16). Preučevali bomo, katera izmed obih pozicij cikloheksanskega fragmenta omogoča ugodnejšo tvorbo ključnih vezi in v kateri poziciji tvori cikloheksanski fragment močnejše hidrofobne interakcije. Z načrtovano serijo spojin bomo poskušali najti spojino, ki bi lahko z ustrezno konformacijo centralnega distančnika postavile terminalna fragmenta v najugodnejšo pozicijo za vzpostavitev vodikovih vezi z Asp73 in ohranljeno molekulo vode na enem terminalnem koncu ter Arg136 na drugem terminalnem koncu. Preučili bomo, ali ustrezno substituiran centralni distančnik lahko zagotovi energijsko ugodno konformacijo za vzpostavitev ustreznih terminalnih interakcij z vezavnim mestom in ali lahko z njim opazimo tudi nastanek dodatnih hidrofobnih interakcij ter ali izbran centralni skelet mogoča nadaljnjo optimizacijo.

Opravili bomo tudi biološko vrednotenje sintetiziranih spojin na izoliranem encimu DNA giraze B iz bakterije *E.coli*.



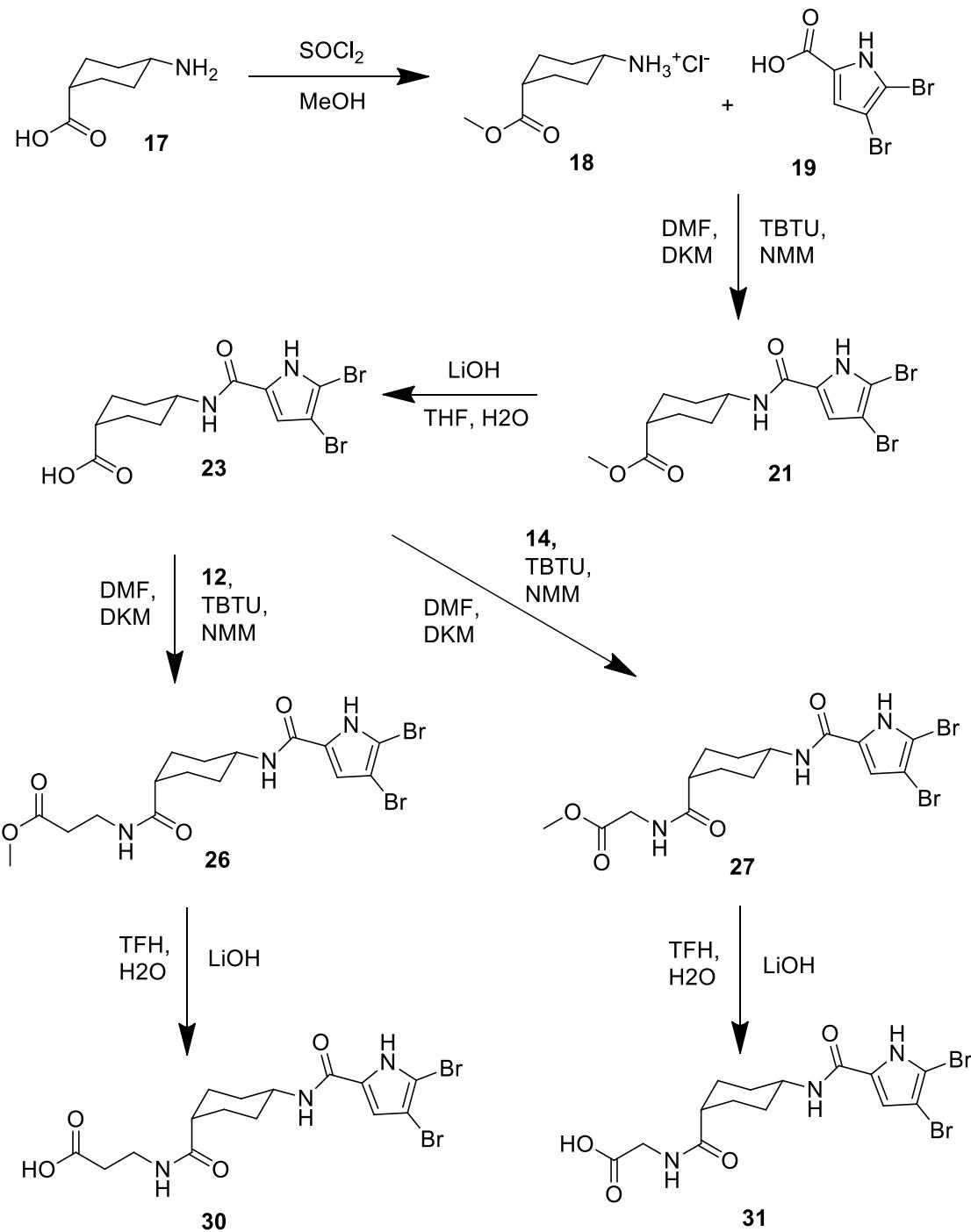
Slika 13: Načrt dela

## 5.1. Sinteza derivatov s *trans*-cikloheksanskim fragmentom



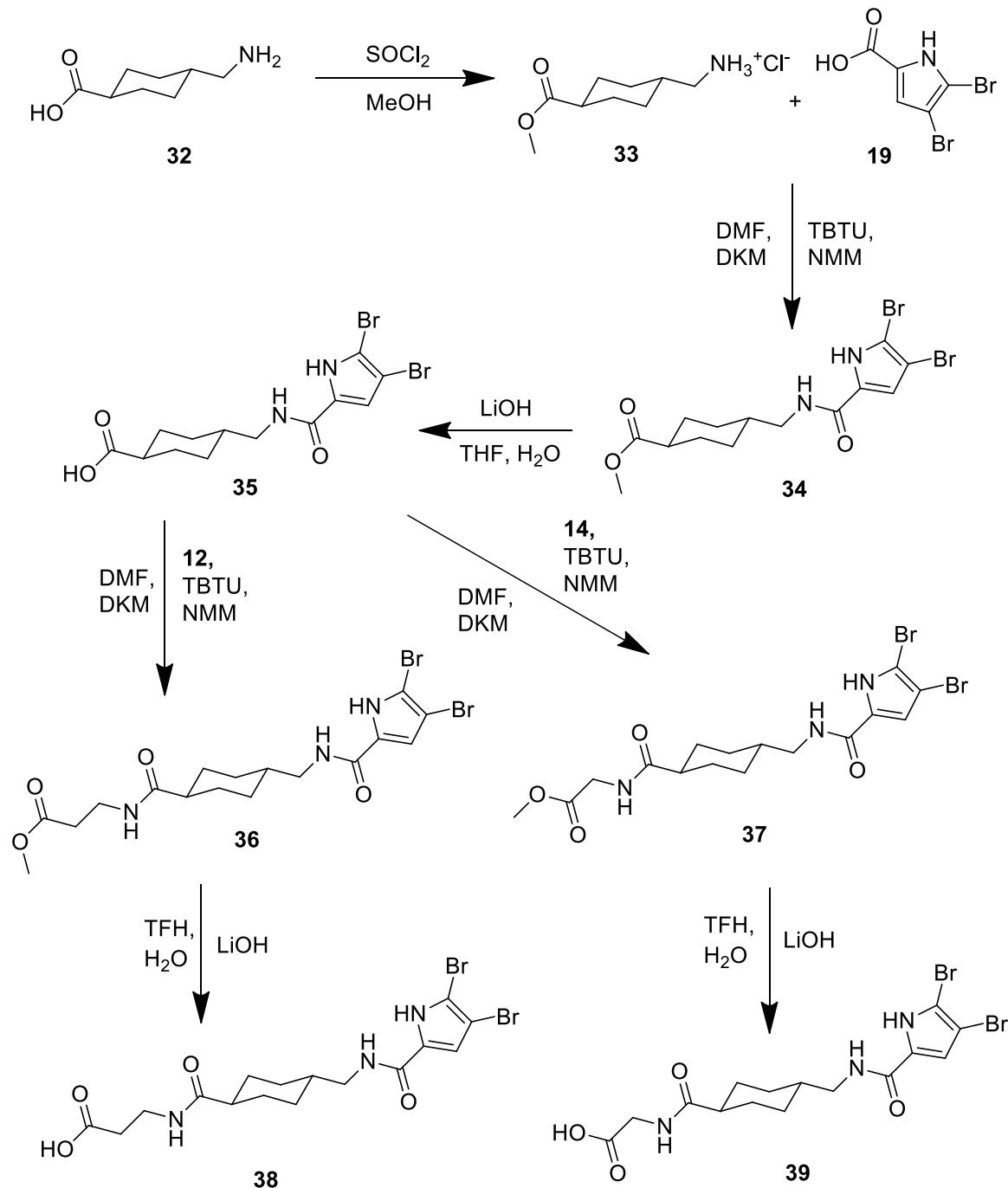
Slika 14: Sinteza *trans*-cikloheksanov

## 5.2. Sinteza derivatov s *cis*-cikloheksanskim fragmentom



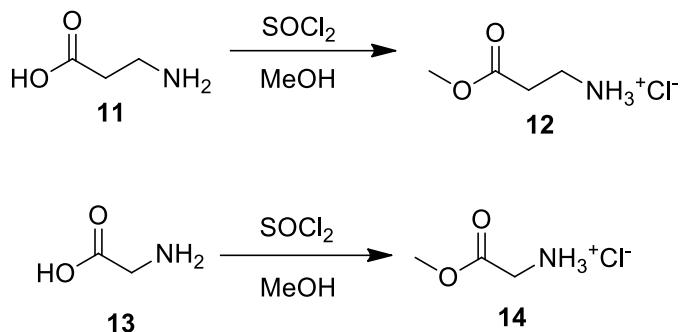
Slika 15: Sinteza *cis*-cikloheksanov

### 5.3. Sinteza derivatov s *trans*-cikloheksanskim fragmentom in metilenskim mostom



Slika 16: Sinteza *trans*-cikloheksanov z metilenskim mostom

## 5.4. Uvedba metilnih estrov kot zaščitnih skupin na glicin in $\beta$ -alanin



Slika 17: Metiliranje AK

## 6. MATERIALI IN METODE

### Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Sigma-Aldrich (ZDA), Merck (Nemčija), Acros Organics (ZDA) in Apollo Scientific (Velika Britanija), Carlo Erba Reagents (Francija): TBTU:  $\geq 97.0\%$  (N), Sigma-Aldrich, ZDA; NMM: purum,  $\geq 98.0\%$  (GC), Sigma-Aldrich, ZDA;  $\text{SOCl}_2$ : 97 %, Sigma-Aldrich, ZDA; LiOH: 98 %, Sigma-Aldrich, ZDA; Glicin: Merck, Nemčija; Beta-alanin: Acros organics, ZDA; *Cis*-4-aminocikloheksan-1-karboksilna kislina: Apollo Scientific, Velika Britanija; *Trans*-4-aminocikloheksan-1-karboksilna kislina: Apollo Scientific, Velika Britanija; *Trans*-4-(aminometil)cikloheksan-1-karboksilna kislina: Apollo Scientific, Velika Britanija; MeOH: 99,9 %, Carlo Erba reagents, Francija; THF: 99,8%, Merck, Nemčija; DKM: 99,8 %, Merck, Nemčija, 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina: sintetizirana na Fakulteti za farmacijo. Brezvodni DMF smo pripravili po standardnem postopku z destilacijo in ga hranili nad molekularnimi siti.

### Aparature

Uporabljali smo standardno laboratorijsko opremo: laboratorijsko tehnico (Mettler Toledo® PB403-S), električni grelnik z magnetnim mešalnikom (IKA® RCT basic), rotavapor

(Büchi® Rotavapor R-200) z grelno kadičko (Büchi® Heating Bath B-490), vakuumsko črpalko (Büchi Vac® V-500) s kontrolerjem (Büchi® Controller V-850), avtomatske pipete (Transferpette®), grelno pištolo (Braun® swing 1200), UV-lučko (Camag® UV-cabinet II), hibridno vakuumsko črpalko (Leybold) z vakuumskim merilcem (DVR 2), dewarjevo posodo (Agil 2).

### Tankoplastna kromatografija (TLC)

Spremljanje poteka reakcije, izbor ustrezne mobilne faze za čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo in izolacijo ustreznega produkta smo vršili s pomočjo TLC. Mobilno fazo so predstavljala različna topila in njihove kombinacije v različnih razmerjih in jih navajamo pri vsakem posameznem razvitem TLC. Stacionarno fazo so predstavljale plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 F254 z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo lis na kromatografski plošči smo uporabili UV svetilko valovnih dolžin  $\lambda = 254$  nm in  $\lambda = 366$  nm in orositveni reagent za amine (ninhidrin).

### Kolonska kromatografija

Za čiščenje oziroma ločevanje zmesi produktov po zaključeni sintezi smo uporabljali kolonsko »flash« kromatografijo. Glede na količino zmesi produktov smo izbrali ustrezeno velikost in premer steklene kolone. Kot mobilno fazo smo izbrali ustrezeno topilo oz. mešanice le teh v ustreznih razmerjih, kot stacionarno fazo pa silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 0,063 mm. Pretok mobilnih faz smo pospešili z uvajanjem zračnega nadtlaka.

### Nuklearna magnetna resonanca (NMR)

Spektre so posneli na spektrometu Bruker Avance III 400 pri 400 MHz ( $^1\text{H}$  NMR) in 100 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR) z magnetom Bruker Ultrashield™ 400 PLUS (Bruker Corporation, Billerica, MA, ZDA) pri 298 °K na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Interni standard je bil tetrametilsilan. Vzorce smo raztopljalji v devteriranih topilih: dimetilsulfoksid (DMSO-d6) in kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ).

## Masna spektrometrija (MR)

Spektre so posneli na spektrometru Q-TOF Premier z ESI metodo ionizacije na Institutu Jožef Štefan v Ljubljani.

## Infrardeča spektroskopija (IR)

Spektre smo posneli na spektrofotometru Nicolet Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

## Določanje temperature tališč

Spojinam smo temperaturo tališča določali s talilnim mikroskopom Leica z ogrevalno mizico. Temperature tališč niso korigirane.

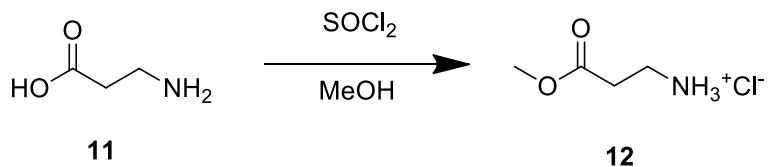
## Programska oprema

S pomočjo programa ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft smo risali strukturne formule spojin in reakcijske sheme. Program MestReNova proizvajalca Mestrelab Research nam je služil za obdelavo  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov sintetiziranih spojin.

Eksperimenti molekulskega sidranja so bili napravljeni s programsко opremo OpenEye Scientific Software; OEDocking 3.2.0.2, Fred 3.2.0.2 ter OMEGA2 2.5.1.4.

## 7. EKSPERIMENTALNI DEL

### 7.1. Sinteza metil beta-alaninijevaega klorida



#### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **11** (2 g, 22,45 mmol) smo raztopili v brezvodnem  $\text{MeOH}$  (50 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali  $\text{SOCl}_2$  (6,52 ml, 89,8 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Oborino smo suspendirali v 20 ml dietiletra in izpadle kristale odfiltrirali s presesavnanjem ter jih pod znižanim tlakom posušili do konstantne mase. Dobili smo 2,94 g (21,1 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **12**.

#### Analize metil beta-alaninijevaega klorida:

$\eta = 94,1\%$

$\text{Mr} = 139,58$

Elementna sestava:  $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2 \times \text{HCl}$

$T_t = 104^\circ\text{C}$

$R_f = 0,76$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN} = 1/1/3$ )

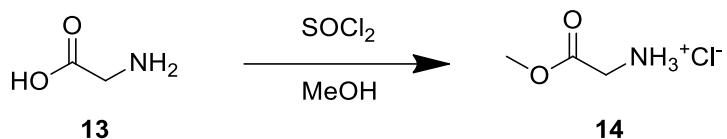
Izgled: Brezbarvni kristali

**$^1\text{H - NMR (400MHz, DMSO-d}_6$ :**  $\delta = 2,74$  (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$ );  $2,98$  (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COO}$ );  $3,62$  (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ );  $8,30$  (br s, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ) ppm

**$^{13}\text{C - NMR (75MHz, DMSO-d}_6$ :**  $\delta = 170,7; 51,7; 34,5; 31,2$  ppm

**IR (ATR):**  $\nu = 2940, 2679, 1736, 1597, 1569, 1523, 1473, 1445, 1424, 1391, 1343, 1205, 1155, 1115, 998, 959, 891, 797, 706, 589 \text{ cm}^{-1}$

## 7.2. Sinteza metil glicinijevega klorida



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **13** (1 g, 13,32 mmol) smo raztopili v brezvodnem MeOH (20 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali  $\text{SOCl}_2$  (3,87 ml, 53,28 mmol). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Oborino smo suspendirali v 10 ml dietiletra in izpadle kristale odfiltrirali s presesavnanjem ter jih pod znižanim tlakom posušili do konstantne mase. Dobili smo 1,56 g (12,4 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **14**.

### **Analize metil glicinijevega klorida:**

$$\eta = 93,2\%$$

Mr = 125,55

Elementna sestava: C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> x HCl

T<sub>t</sub> = 134-136 °C

R<sub>f</sub> = 0.68 (H<sub>2</sub>O/MeOH/CH<sub>3</sub>CN = 1/1/3)

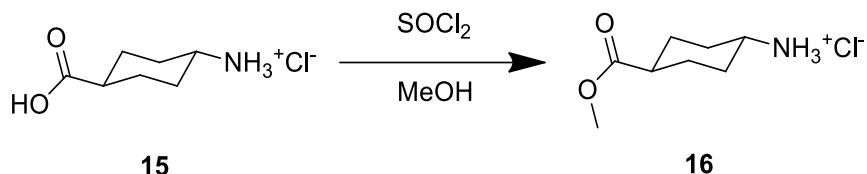
Izgled: Igličasti brezbaryvní kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 3,72 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 3,76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 8,65 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ppm

<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6): δ = 168,0; 52,4; 39,3 ppm

**IR (ATR):** v = 3012, 2880, 2686, 2634, 1743, 1624, 1583, 1557, 1496, 1459, 1437, 1423, 1400, 1244, 1140, 1096, 1058, 955, 899, 879, 677, 589 cm<sup>-1</sup>

### 7.3. Sinteza *trans*-4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorida



#### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi Spojino **15** (700 mg, 3,89 mmol) smo raztopili v brezvodnem MeOH (20 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali  $\text{SOCl}_2$  (1,13 ml, 15,56 mmol). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Oborino smo suspendirali v 10 ml dietiletra in izpadle kristale odfiltrirali s presesavnanjem ter jih pod znižanim tlakom posušili do konstantne mase. Dobili smo 717 g (3,70 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **16**.

#### Analize *trans*-4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorida:

$\eta = 95,0\%$

$\text{Mr} = 193,67$

Elementna sestava:  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2 \times \text{HCl}$

$T_t = 217\text{-}220\text{ }^\circ\text{C}$

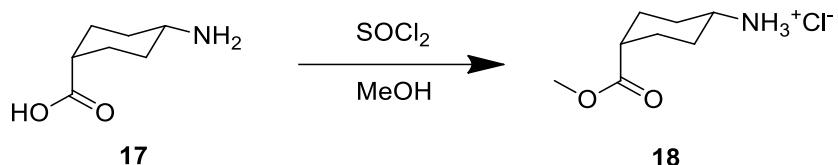
$R_f = 0,84$  ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN} = 1/1/3$ )

Izgled: Brezbarvni kristali

**$^1\text{H - NMR}$  (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,37$  (m, 2x2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-COO}$ );  $1,96$  (m, 2x2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NH}_3^+$ );  $2,26$  (m, 1H,  $\text{CH-COO}$ );  $2,95$  (m, 1H,  $\text{CH-NH}_3^+$ );  $3,59$  (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ );  $8,18$  (br s, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ) ppm

**$^{13}\text{C - NMR}$  (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 174,7; 51,4; 48,4; 40,9; 29,2; 26,5$  ppm

## 7.4. Sinteza *cis*-4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorid



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **17** (700 mg, 4,89 mmol) smo raztopili v brezvodnem MeOH (20 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali  $\text{SOCl}_2$  (1,42 ml, 19,56 mmol). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Oborino smo suspendirali v 10 ml dietiletra in izpadle kristale odfiltrirali s presesavnjanjem ter jih pod znižanim tlakom posušili do konstantne mase. Dobili smo 768 g (3,97 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **18**.

**Analize cis-4-(metoksikarbonil)cikloheksan-1-aminijevega klorida:**

$$\eta = 81,1\%$$

$M_r = 193.67$

Elementna sestava: C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> x HCl

T<sub>t</sub> ≡ 172-175 °C

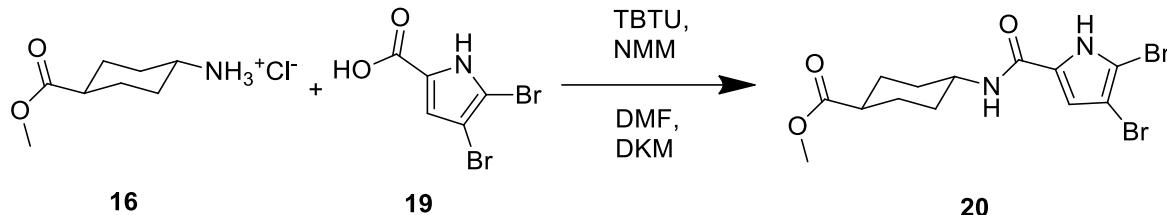
R<sub>f</sub> = 0.52 (H<sub>2</sub>O/AcOH/BuOH = 4/1/5)

### Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1,53 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 1,80 (q, *J* = 4,56Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NH<sub>3+</sub>); 1,96 (q, *J* = 3,9Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NH<sub>3+</sub><sup>+</sup>); 2,60(m, 1H, CH-COO); 3,06 (m, 1H, CH-NH<sub>3+</sub><sup>+</sup>); 3,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 8,17 (br s, 3H, NH<sub>3+</sub><sup>+</sup>) ppm

<sup>13</sup>C - NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 174.2; 51.5; 47.8; 38.0; 26.9; 24.1 ppm

## 7.5. Sinteza metil *trans*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata



### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **16** (650 mg, 3,36 mmol) smo raztopili v DMF (12 ml) in DKM (4 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (1,1 ml, 10 mmol, 3 ekv.) in TBTU (1,29g, 4 mmol, 1,2 ekv.). Po 20 minutah smo dodali spojino **19** (902 mg, 3,36 mmol) raztopljeno v DMF (3 ml), DKM (2 ml) in NMM (0,7 ml, 6,7 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 50 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v lij ločnik in jo spirali zaporedoma z 30 ml 10% raztopine citronske kisline, 2 x 30 ml 1M HCl, 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 40 ml nasičene raztopine NaCl. Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 900 mg (2,21mmol) svetlo rožnatih kristalov spojine **20**.

### Analize metil *trans*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata:

$\eta = 65,6\%$

Mr = 408,09

Elementna sestava: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Tt = 195-198 °C

Rf = 0,48 (EtOAc/heksan = 1/1)

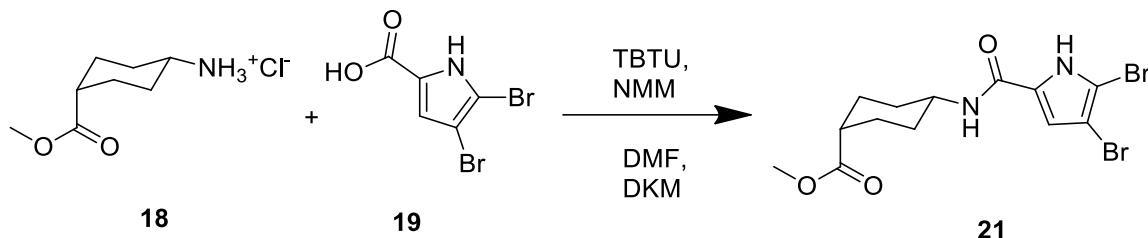
Izgled: Svetlo rožnati kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 1,30$  (q,  $J = 9,8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-COO}$ );  $1,42$  (q,  $J = 9,8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-COO}$ );  $1,87$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $1,95$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $2,28$

(m, 1H, CH-COO); 3,60 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 3,67 (m, 1H, CH-NHCO); 6,97 (s, 1H, NHCO); 7,87 (d, J=5,88Hz, 1H, Ar-H); 12,64 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 175,1; 158,0; 128,2; 112,6; 104,3; 97,7; 51,3; 47,1; 41,4; 31,2; 27,6 ppm

## 7.6. Sinteza metil *cis*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata



### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **18** (500 mg, 2,58 mmol) smo raztopili v DMF (10 ml) in DKM (5 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,85 ml, 7,74 mmol, 3.ekv) in TBTU (994 mg, 3,1mmol, 1,2 ekv). Po 5 minutah smo dodali spojino **19** (694 mg, 2,58 mmol) raztopljeno v DMF (5 ml), DKM (1 ml) in NMM (0,57ml, 5,18 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 50 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v lij ločnik in jo spirali zaporedoma z 30 ml 10% raztopine citronske kisline, 2 x 30 ml 1M HCl, 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 30 ml nasičene raztopine NaCl. Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 544 mg (1,33 mmol) svetlo rožnatih kristalov spojine **21**.

### Analize metil *cis*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilata:

$$\eta = 51,6\%$$

$$Mr = 408,09$$

Elementna sestava: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

$$Tt = 210 \text{ } ^\circ\text{C}$$

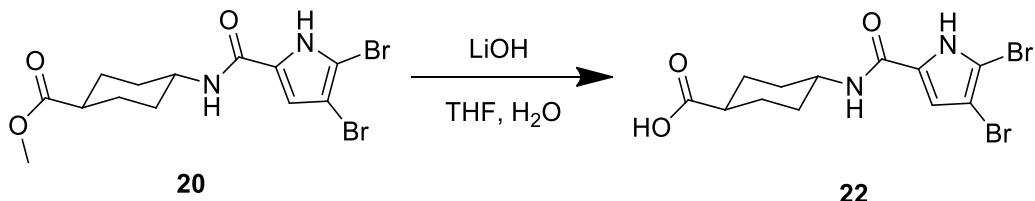
$$Rf = 0,50 \text{ (EtOAc/heksan = 1/1)}$$

Izgled: Svetlo rozasti igličasti krstali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 1,47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,62 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 1,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,58 (m, 1H, CH-COO); 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 3,82 (m, 1H, CH-NHCO); 7,01 (s, 1H, NHCO); 7,80 (d, J = 5,76Hz, 1H, Ar-H); 12,62 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 174,7; 158,0; 128,2; 112,2; 104,2; 97,7; 51,4; 46,0; 38,8; 28,9; 25,0 ppm

## 7.7. Sinteza *trans*-4-(4,5.dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline



### Postopek:

Spojino **20** (408 mg, 1 mmol) smo raztopili v THF (5 ml) in H<sub>2</sub>O (4 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (4 ml, 4 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperature in mešali 2,5 ure.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili 2 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 40 ml EtOAc. V vodni fazi je nastala emulzija, zato smo ekstakcijo z 40 ml EtOAc ponovili še 2x. Vse 3 organske faze smo združil pod znižanim tlakom odparili organsko topilo. Dobili smo 382 mg (0,97 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **22**.

### Analize *trans*-4-(4,5.dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline:

η = 97,0%

Mr = 394,06

Elementna sestava: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

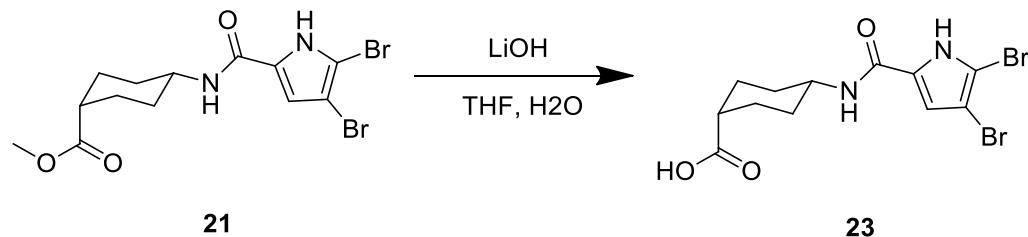
T<sub>t</sub> = 238-240 °CR<sub>f</sub> = 0,56 (EtOAc + 1% AcOH)

Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 1,34 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-COOH); 1,85 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,94 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,16 (m, 1H, CH-COOH); 3,65 (m, 1H, CH-NHCO); 6,96 (s, 1H, NHCO); 7,87 (d, J = 4,8Hz, 1H, Ar-H); 12,10 (br s, 1H, COOH); 12,64 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75Hz, DMSO-d6):** δ = 176,4; 157,9; 128,2; 112,6; 104,2; 97,7; 47,2; 41,7; 31,4; 27,7 ppm

## 7.8. Sinteza *cis*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline



### Postopek:

Spojino **21** (408 mg, 1 mmol) smo raztopili v THF (5 ml) in H<sub>2</sub>O (4 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (4 ml, 4 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperature in mešali 4 ure.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 4 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 3 x 40 ml EtOAc. Vse 3 organske faze smo združil in pod znižanim tlakom odparili vso organsko topilo. Dobili smo 388 mg (0,98 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **23**.

### Analize *cis*-4-(4,5.dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksil-1-karboksilne kisline:

η = 98,5%

$\text{Mr} = 394,06$ Elementna sestava:  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$  $T_t = 177\text{-}180\text{ }^\circ\text{C}$  $R_f = 0,62$  (EtOAc + 1% AcOH)

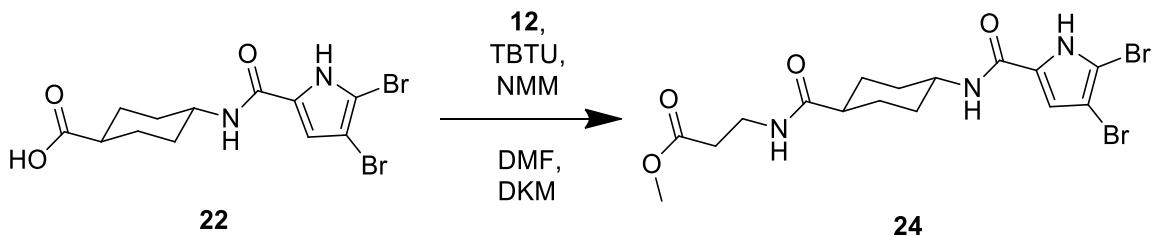
Izgled: Amorf

**$^1\text{H}$  – NMR (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,51$  (m, 2x2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-COOH}$ );  $1,62$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $1,97$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $2,46$  (t, 1H,  $\text{CH-COOH}$ );  $3,80$  (m, 1H,  $\text{CH-NHCO}$ );  $7,00$  (s, 1H,  $\text{NHCO}$ );  $7,80$  (d,  $J = 5,80$ , 1H, Ar-H);  $12,20$  (br s, 1H, COOH);  $12,61$  (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**$^{13}\text{C}$  – NMR (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 176,0; 158,0; 128,2; 112,8; 104,2; 97,7; 46,2; 38,7; 29,0; 25,1$  ppm

**IR (ATR):**  $\nu = 3366, 3230, 3129, 2924, 1709, 1567, 1529, 1450, 1420, 1392, 1373, 1345, 1329, 1310, 1287, 1241, 1205, 1141, 1114, 1093, 1070, 1042, 996, 978, 937, 919, 875, 828, 801, 765, 740, 706, 643, 620, 594, 571, 540 \text{ cm}^{-1}$

## 7.9. Sinteza metil 3-(*trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata



### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **22** (135 mg, 0,343 mmol) smo raztopili v DMF (4 ml) in DKM (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,19ml, 1,71 mmol, 5 ekv.) in TBTU (132mg, 0,49 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **12** (58 mg, 0,412 mmol, 1,2 ekv.) raztopljeno v DMF (1 ml) in DKM (1 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 20 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v lik ločnik in jo spirali zaporedoma z  $3 \times 10$  ml 10% raztopine citronske kisline,  $3 \times 10$  ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in 10 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na  $4^\circ\text{C}$  in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 85 mg (0,177 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **24**.

**Analiza metil 3-(*trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata:**

$\eta = 52,1\%$

$\text{Mr} = 479,16$

Elementna sestava:  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_4$

$T_t = 135\text{-}138^\circ\text{C}$

$R_f = 0,54$  (EtOAc/MeOH = 9/1)

Izgled: Amorf

**$^1\text{H - NMR}$  (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,25$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-CONH}$ );  $1,40$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-CONH}$ );  $1,73$  (q,  $J = 8,7\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $1,84$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $2,04$  (m, 1H,  $\text{CH-CONH}$ );  $2,44$  (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOMe}$ );  $3,25$  (q,  $J = 4,3\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $3,59$  (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ );  $3,63$  (m, 1H,  $\text{CH-NHCO}$ );  $6,94$  (s, 1H,  $\text{NHCO-Ar}$ );  $7,83$  (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $7,85$  (d,  $J = 2,7\text{Hz}$ , 1H, Ar-H);  $12,63$  (br s, 1H, Ar-NH) ppm

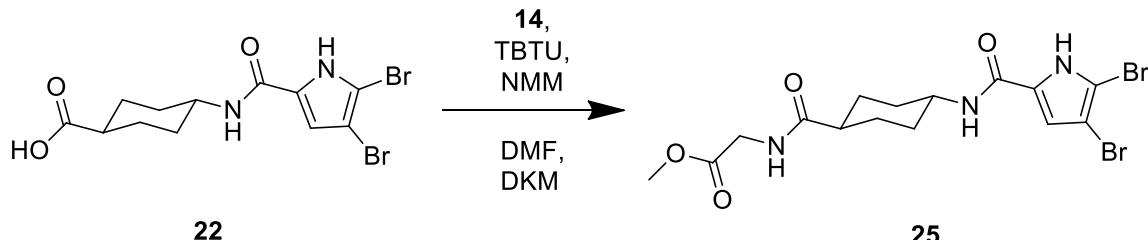
**$^{13}\text{C - NMR}$  (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 174,8; 171,7; 157,9; 128,3; 112,5; 104,3; 99,1; 51,3; 47,3; 43,0; 34,5; 33,7; 31,6; 28,2$  ppm

**MS (ESI):**  $m/z 478,0 (\text{M}-\text{H})^-$

**HRMS:** izračunano, 475,9826; izmerjeno, 475,9827

**IR (ATR):**  $\nu = 3259, 2932, 2861, 2357, 2339, 1719, 1654, 1625, 1560, 1522, 1433, 1395, 1353, 1296, 1264, 1229, 1205, 1171, 1066, 1031, 997, 974, 930, 905, 850, 818, 760, 688, 668, 616 \text{ cm}^{-1}$

## 7.10. Sinteza metil 3-(*trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicinata



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **22** (100 mg, 0,254 mmol) smo raztopili v DMF (4 ml) in DKM (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,140 ml, 1,27 mmol, 5 ekv.) in TBTU (101 mg, 0,305 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **14** (38 mg, 0,305 mmol, 1,2 ekv.), raztopljeno v DMF (1 ml) in DKM (1 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 20 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v ljubločnik in jo zaporedoma spirali z 3 x 10 ml 10% raztopino citronske kisline, 2 x 10ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in 15 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Dodali 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 61 mg (0,177 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **25**.

**Analiza metil 3-(*trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil)glicinata:**

$$\eta = 51,7\%$$

Mr = 465,14

Elementna sestava: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

T<sub>t</sub> = 120-122 °C

R<sub>f</sub> = 0,52 (EtOAc/MeOH = 9/1)

Izgled: Brezbarvni kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1,29 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,42 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,79 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,87 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,16 (m, 1H, CH-CONH); 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 3,68 (m, 1H, CH-NHCO); 3,82 (d, *J* = 4,4Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>-NHCO); 6,96 (s, 1H, NHCO-Ar); 7,86 (d, *J* = 6Hz, 1H, Ar-H); 8,22 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,63 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

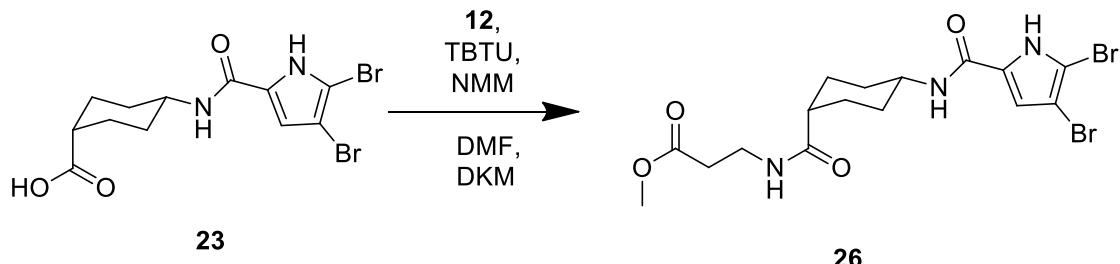
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 179,0; 171,9; 160,9; 129,0; 114,2; 105,8; 99,8; 52,6; 49,7; 45,2; 41,8; 32,8; 29,6 ppm

**MS (ESI):** m/z 461,9 (M-H)<sup>-</sup>

**HRMS:** izračunano, 461,9664; izmerjeno, 461,9661

**IR (ATR):**  $\nu = 3401, 3309, 3123, 2941, 2858, 1746, 1646, 1557, 1541, 1508, 1436, 1399, 1371, 1331, 1203, 1178, 974, 818, 771, 664, 611 \text{ cm}^{-1}$

## 7.11. Sinteza metil 3-(*cis*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **23** (120 mg, 0,305 mmol) smo raztopili v DMF (4 ml) in DKM (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,170 ml, 1,53mmol, 5 ekv.) in TBTU (118mg, 0,366mmol, 1,2 ekv.). Po 10 minutah smo dodali spojino **12** (51 mg, 0,366 mmol, 1,2 ekv.), raztopljeno v DMF (1 ml) in DKM (1 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 20 ml DKM. Organsko fazo smo preseli v lij ločnik in jo zaporedoma spirali z  $3 \times 10$  ml 10% raztopino citronske kisline,  $2 \times 10$  ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in 15 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Pod znižanim tlakom smo odparili vso topilo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo ( $\text{MF} = \text{EtOAc}$ ). Združili smo vse frakcije čiste spojine z  $R_f = 0,25$ . Pod znižanim tlakom smo odparili topilo,

ostanek suspendirali v 2 ml dietiletera in znova pod znižanjem tlaku odparili topilo. Dobili smo 120 mg (0,252 mmol) amorfne spojine **26**.

**Analiza metil 3-(*cis*-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanoata:**

$\eta = 82,6\%$

Mr = 479,16

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Tt = 135-138 °C

Rf = 0,56 (EtOAc/MeOH = 9/1)

Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,51$  (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,22 (d,  $J = 2,5$ Hz, 1H, CH-CONH); 2,46 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-COO); 3,28 (q,  $J = 4,4$ Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,59(s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3,86 (t, 1H, CH-NHCO); 7,06 (d,  $J = 0,8$ Hz, 1H, NHCO-Ar); 7,74 (d,  $J = 5,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,83 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,61 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

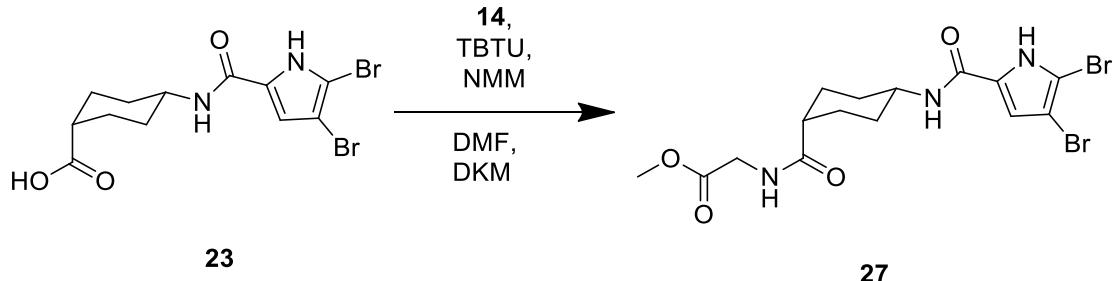
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 174,6; 171,8; 158,1; 128,2; 113,1; 104,1; 97,7; 51,3; 45,6; 40,3; 34,7; 33,7; 28,8; 25,1$  ppm

**MS (ESI) m/z 475,9 (M-H)<sup>-</sup>**

**HRMS:** izračunano, 475,9861; izmerjeno, 475,9831

**IR (ATR):**  $\nu = 3415, 3331, 3160, 3113, 2940, 2863, 1716, 1643, 1551, 1499, 1460, 1434, 1411, 1398, 1370, 1322, 1299, 1255, 1209, 1194, 1172, 1075, 1039, 1015, 994, 977, 928, 873, 844, 817, 779, 759, 641, 616, 548$  cm<sup>-1</sup>

## 7.12. Sinteza metil 3-(*cis*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicinata



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **23** (130 mg, 0,330 mmol) smo raztopili v DMF (4 ml) in DKM (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,220 ml, 1,98 mmol, 5 ekv.) in TBTU (127 mg, 0,396 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **14** (50 mg, 0,396 mmol, 1,2 ekv.) raztopljeno v DMF (1 ml) in DKM (1 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znžanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 15 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v ljubločnik in jo zaporedoma spirali z 3 x 10 ml 10% raztopino citronske kisline, 2 x 10 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in 15 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Pod znižanim tlakom smo odparili vso topilo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc). Združili smo vse frakcije čiste spojine z  $R_f = 0,28$ . Pod znižanim tlakom smo odparili topilo, ostanek suspendirali v 3 ml dietiletra in znova odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 100 mg (0,215 mmol) amorfne spojine **27**.

**Analiza metil 3-(*cis*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil)glicinata:**

$$\eta = 65,1\%$$

Mr = 465,14

Elementna sestava: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

T<sub>t</sub> = 96-99 °C

Rf = 0,40 (EtOAc)

Izgled: Brezbarvni kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 1,54 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,33 (m, 1H, CH-CONH); 3,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 3,81 (d, J = 4,4Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,86 (m, 1H, CH-NHCO); 7,05 (d, J = 2Hz, 1H, NHCO-Ar); 7,76 (d, J = 5,5Hz, 1H, Ar-H); 8,19 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,61 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

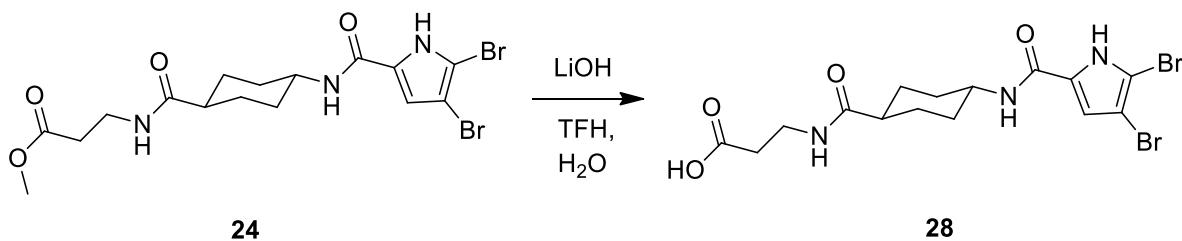
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 175,1; 170,6; 158,1; 128,2; 113,1; 104,1; 97,7; 51,6; 45,8; 40,5; 33,6; 28,8; 25,2 ppm

**MS (ESI)** m/z 461,9 (M-H)<sup>-</sup>

**HRMS:** izračunano, 461,9664; izmerjeno, 461,9662

**IR (ATR):** ν = 3302, 3122, 2936, 1740, 1621, 1558, 1514, 1414, 1369, 1335, 1298, 1206, 1181, 1116, 1038, 1006, 976, 936, 834, 759, 615 cm<sup>-1</sup>

### 7.13. Sinteza *trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanojske kisline



#### Postopek:

Spojino **24** (70 mg, 0,147 mmol) smo raztopili v THF (2,5 ml) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,5 9ml, 0,59 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri 0 °C.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 2 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v ljiljančnik in ekstrahirali z 15 ml EtOAc. V vodni fazi je nastala emulzija, zato smo ekstakcijo z 15 ml EtOAc ponovili še 2

krat. Vse 3 organske faze smo združil in pod znižanim tlakom odprarili vso topilo. Dobili smo 50 mg (0,108 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **28**.

**Analiza      *trans*-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid)  
propanojske kisline:**

$\eta = 73,6\%$

$Mr = 465,14$

Elementna sestava:  $C_{15}H_{19}Br_2N_3O_4$

$T_t = 108-110 \text{ } ^\circ\text{C}$

$R_f = 0,12$  (EtOAc/MeOH = 9/1)

Izgled: Amorf

**$^1\text{H - NMR (400MHz, DMSO-d}_6$ :**  $\delta = 1,27$  (q,  $J = 8,6\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-CONH}$ );  $1,41$  (q,  $J = 9,8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-CONH}$ );  $1,73$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $1,84$  (q, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $2,06$  (m, 1H,  $\text{CH}\text{-CONH}$ );  $2,36$  (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ );  $3,22$  (q,  $J = 4,4\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $3,63$  (m, 1H,  $\text{CH}\text{-NHCO}$ );  $6,95$  (s, 1H,  $\text{NHCO-Ar}$ );  $7,83$  (t, 1H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $7,89$  (d,  $J = 6,0\text{Hz}$ , 1H, Ar-H);  $12,29$  (br s, 1H, COOH);  $12,62$  (br s, 1H, Ar-NH) ppm

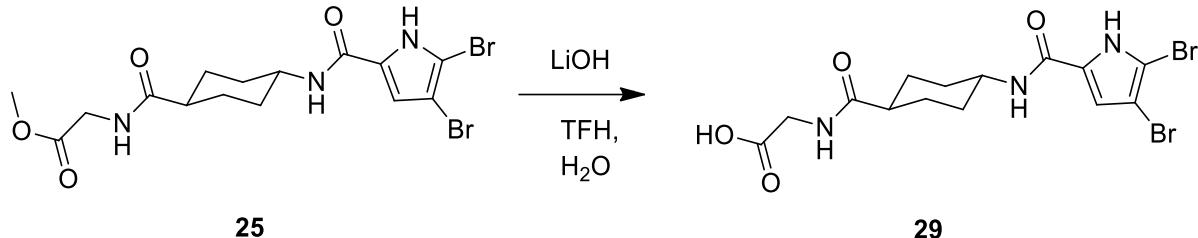
**$^{13}\text{C - NMR (75MHz, DMSO-d}_6$ :**  $\delta = 174,8; 172,9; 157,9; 128,3; 112,6; 104,2; 97,7; 47,3; 43,0; 34,6; 33,9; 31,6; 28,2$  ppm

**MS (ESI)** m/z 461,9 ( $M\text{-H}^-$ )

**HRMS:** izračunano, 461,9664; izmerjeno, 461,9661

**IR (ATR):**  $\nu = 3368, 3286, 3123, 2931, 1698, 1639, 1601, 1553, 1528, 1450, 1404, 1356, 1337, 1299, 1270, 1252, 1212, 1180, 1135, 1080, 1064, 997, 977, 932, 885, 844, 816, 775, 754, 717, 688, 615, 598, 571 \text{ cm}^{-1}$

## 7.14. Sinteza *trans*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina



Postopek:

Spojino **25** (56 mg, 0,120 mmol) smo raztopili v THF (2,5 ml) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,48 ml, 0,48 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro na 0 °C.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 2 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 15 ml EtOAc. V vodni fazi je nastala emulzija, zato smo ekstakcijo z 15 ml EtOAc ponovili še 3 krat. Organske faze smo združil in pod znižanim tlakom odparili vso topilo. Dobili smo 46 mg (0,102mmol) brezbarvnih kristalov spojine **29**.

**Analiza trans-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina:**

$$\eta = 85,0\%$$

Mr = 451,11

Elementna sestava: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

T<sub>t</sub> = 92-95 °C

Rf = 0,06 (EtOAc/MeOH = 9/1)

## Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 1,27 (q, *J* = 9,4Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,43 (q, *J* = 9,8Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,79 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,86 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,15 (m, 1H, CH-CONH); 3,65 (m, 1H, CH-NHCO); 3,72 (d, *J* = 4,4Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-

NHCO); 6,96 (s, 1H, NHCO-Ar); 7,86 (d,  $J=6,0\text{Hz}$ , 1H, Ar-H); 8,08 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,50 (br s, 1H, COOH); 12,64 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

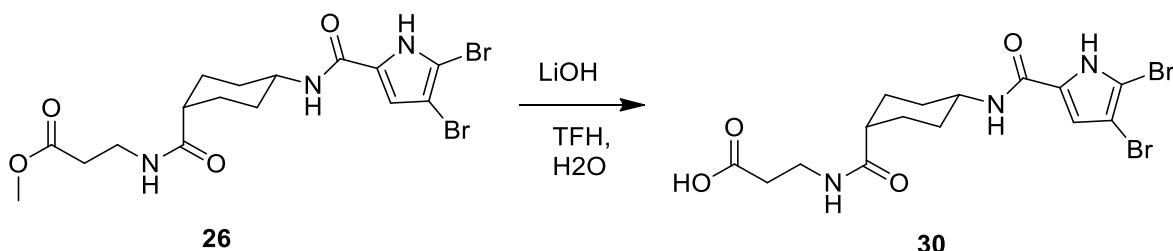
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 175,1; 171,4; 157,9; 128,3; 112,5; 104,3; 97,7; 47,3; 42,9; 40,4; 31,5; 28,2 ppm

MS (ESI): m/z 447.9 (M-H)<sup>-</sup>

**HRMS:** izračunano, 447.9508; izmerjeno, 447.9499

**IR (ATR):**  $\nu = 3289, 3177, 2939, 2854, 1731, 1649, 1588, 1548, 1532, 1439, 1413, 1393, 1340, 1306, 1254, 1231, 1205, 1148, 1132, 1084, 1046, 994, 976, 905, 876, 835, 812, 756, 671, 613, 544 \text{ cm}^{-1}$

**7.15. Sinteza *cis*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid) propanojske kisline**



## **Postopek:**

Spojino **26** (100 mg, 0,209 mmol) smo raztopili v THF (2,5 ml) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,835 ml, 0,835 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 90 minut na 0 °C.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 4 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2 x 15 ml EtOAc. Obe organski fazi smo združil in pod znižanim tlakom odparili vso topilo. Dobili smo 87 mg (0,187mmol) brezbarvnih kristalov spojine **30**.

**Analiza cis-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karboksamid propanojske kisline:**

$\eta = 89,5\%$  $M_r = 465,14$ Elementna sestava:  $C_{15}H_{19}Br_2N_3O_4$  $T_t = 112\text{--}114\text{ }^{\circ}\text{C}$  $R_f = 0,10$  (EtOAc)

Izgled: Amorf

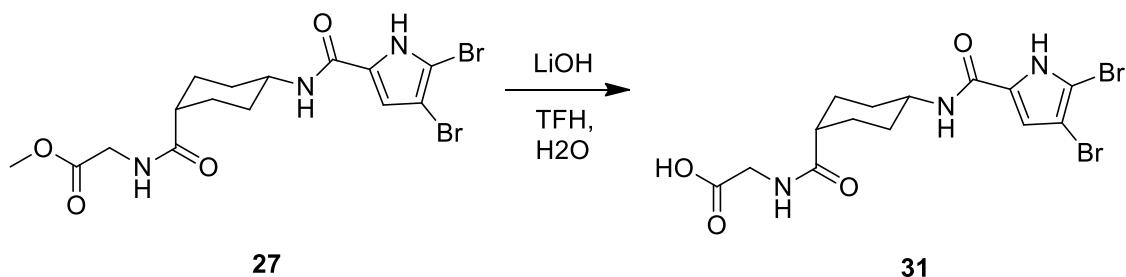
**$^1\text{H}$  – NMR (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 1,51$  (m, 2x2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-CONH}$ );  $1,68$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $1,84$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-NHCO}$ );  $2,23$  (m, 1H,  $\text{CH-CONH}$ );  $2,37$  (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ );  $3,24$  (q,  $J = 4,3\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $3,86$  (m, 1H,  $\text{CH-NHCO}$ );  $7,05$  (s, 1H,  $\text{NHCO-Ar}$ );  $7,74$  (d,  $J = 5,5\text{Hz}$ , 1H, Ar-H);  $7,79$  (t, 1H,  $\text{CH}_2\text{-NHCO}$ );  $12,22$  (br s, 1H,  $\text{COOH}$ );  $12,61$  (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**$^{13}\text{C}$  – NMR (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 174,5; 172,9; 158,1; 128,2; 113,1; 104,1; 97,7; 45,6; 40,3; 34,7; 33,9; 28,8; 25,1$  ppm

**MS (ESI)** m/z 462,0 ( $M\text{-H}$ )<sup>-</sup>**HRMS:** izračunano, 461,9677; izmerjeno, 461,9654

**IR (ATR):**  $\nu = 3566, 3354, 3130, 2953, 2864, 1714, 1604, 1579, 1557, 1539, 1454, 1421, 1401, 1366, 1342, 1333, 1310, 1299, 1281, 1261, 1249, 1218, 1203, 1147, 1115, 1074, 1053, 993, 973, 937, 909, 885, 819, 790, 763, 700, 666, 629, 611\text{ cm}^{-1}$

## 7.16. Sinteza *cis*-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina



27

31

**Postopek:**

Spojino **27** (78 mg, 0,168 mmol) smo raztopili v THF (2,5 ml) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,670 ml, 0,670 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 45 minut na 0 °C.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 4 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino do z 1M HCl pH 2, pri čemer so izpadli kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2 x 15 ml EtOAc. Obe organski fazi smo združil in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 70 mg (0,155mmol) brezbarvnih kristalov spojine **31**.

**Analiza *cis*-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)cikloheksan-1-karbonil) glicina:**

$\eta = 92,3\%$

Mr = 451,11

Elementna sestava: C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Tt = 121-123 °C

Rf = 0,08 (EtOAc)

Izgled: Brezbarvni kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 1,60 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 1,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 1,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-NHCO); 2,38 (m, 1H, CH-CONH); 3,79 (d, J = 4,4Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,92 (m, 1H, CH-NHCO); 7,11 (s, 1H, NHCO-Ar); 7,82 (d, J = 5,5Hz, 1H, Ar-H); 8,12 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,55 (br s, 1H, COOH); 12,67 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

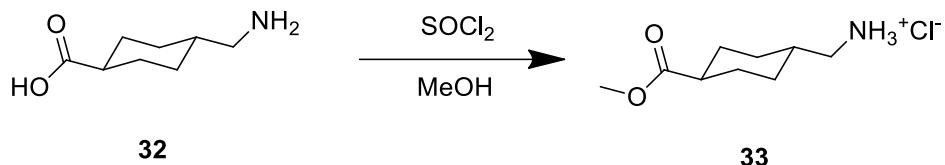
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 174,9; 171,5; 158,1; 128,2; 113,1; 104,1; 97,7; 45,7; 40,5; 40,1; 28,8; 25,1 ppm

**MS (ESI) m/z** 447,9 (M-H)<sup>-</sup>

**HRMS:** izračunano, 447,9508; izmerjeno, 447,9498

**IR (ATM):** ν = 3124, 2933, 2362, 1718, 1605, 1558, 1515, 1414, 1339, 1210, 1115, 1039, 1003, 975, 935, 825, 756, 678, 615, 540 cm<sup>-1</sup>

### **7.17. Sinteza *trans*-4-(metoksikarbonil)cikloheksilmetilaminijevega klorida**



## **Postopek:**

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **32** (1000 mg, 6,36 mmol) smo raztopili v brezvodnem metanolu (20 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali  $\text{SOCl}_2$  (1,85 ml, 25,44 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Oborino smo suspendirali v 10 ml dietiletra in izpadle kristale odfiltrirali s presesavnjanjem ter jih pod znižanim tlakom posušili do konstantne mase. Dobili smo 1,175 g (5,66 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **33**.

**Analiza (*trans*-4-(metoksikarbonil)cikloheksil)metilaminijevega klorida:**

$$\eta = 89,0\%$$

**Mr = 207,7**

Elementna sestava: C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> x HCl

T<sub>t</sub> = 135-138 °C

Rf = 0,60 (H<sub>2</sub>O/AcOH/BuOH = 4/1/5)

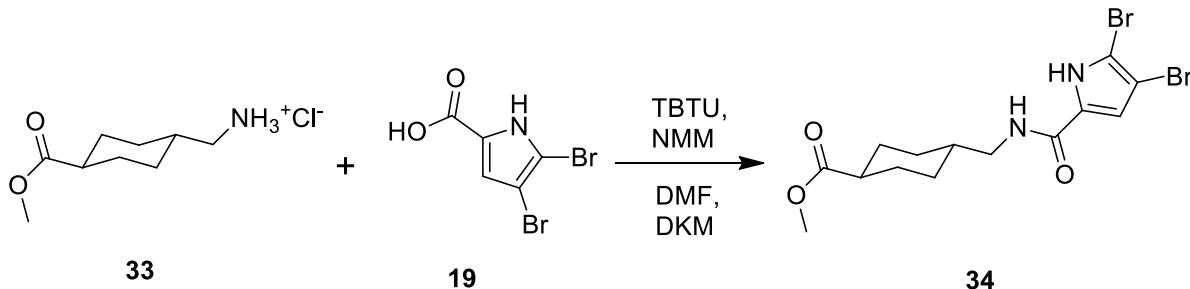
Izgled: Brezbarvni kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):** δ = 0,97 (q,  $J = 9,2\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 1,26 (q,  $J = 9,5\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 1,57 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 1,81 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 1,88 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 2,22 (m, 1H, CH-COO); 2,59 (d,  $J = 5,2\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 3,56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 8,23 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ppm

<sup>13</sup>C-NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 175.3; 51.3; 44.0; 41.8; 34.7; 28.7; 27.8 ppm

**IR (KBr):**  $\nu = 2939, 2895, 2860, 2778, 2687, 2638, 2601, 2559, 2010, 1722, 1613, 1533, 1522, 1437, 1372, 1335, 1301, 1270, 1253, 1227, 1200, 1172, 1152, 1112, 1080, 1065, 1044, 1011, 988, 966, 936, 916, 904, 897, 841, 792, 759, 718, 542 \text{ cm}^{-1}$

### 7.18. Sinteza metil *trans*-4-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilata



#### Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **33** (207,7 mg, 1mmol) smo raztopili v DMF (4ml) in DKM (1ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,33 ml, 3 mmol, 3 ekv.) in TBTU (330 mg, 1,2 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **19** (269 mg, 1 mmol) raztopljeno v DMF (1 ml), DKM (1 ml) in NMM (0,22 ml, 2 mmol, 2 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 15ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v ljiljan in jo zaporedoma spirali z 10 ml 10 % raztopine citronske kisline, 2 x 10 ml 1M HCl, 2 x 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 187mg (0,443 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **34**.

#### Analiza metil *trans*-4-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilata:

$$\eta = 44,3\%$$

$$\text{Mr} = 422,11$$

Elementna sestava: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>t</sub> = 158-160 °C

Rf = 0,70 (EtOAc)

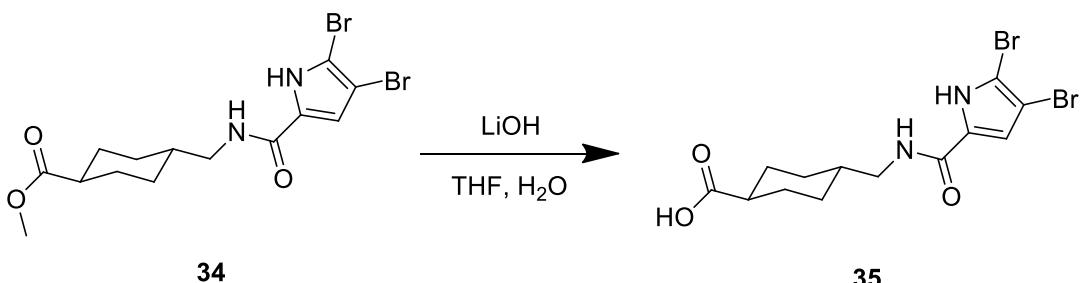
Izgled: Brezbarvni kristali

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,95 (q, *J* = 9,3Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,28 (q, *J* = 9,5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,44 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,74 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 1,90 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 2,25 (m, 1H, CH-COO); 3,05 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 6,93 (s, 1H, Ar-H); 8,07 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,64 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 175,4; 158,9; 128,2; 112,4; 104,3; 97,6; 51,2; 44,5; 42,2; 37,0; 29,3; 28,2 ppm

**IR (KBr):**  $\nu = 3395, 3131, 2943, 2922, 2848, 1719, 1626, 1561, 1504, 1472, 1451, 1432, 1417, 1397, 1371, 1352, 1324, 1273, 1232, 1205, 1189, 1170, 1148, 1130, 1068, 1040, 1015, 975, 960, 897, 839, 785, 762, 751, 707, 615, 565 \text{ cm}^{-1}$

## 7.19. Sinteza *trans*-4-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilne kisline



Postopek:

Spojino **34** (333 mg, 0,789 mmol) smo raztopili v THF (5 ml) in H<sub>2</sub>O (5 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (3,2 ml, 3,2 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperature in mešali 3 ure.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 4 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadali kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 3 x 40 ml EtOAc. Vse 3 organske faze smo združil in odparili vso topilo. Dobili smo 300 mg (0,739 mmol) brezbarnih kristalov spojine **35**.

**Analiza** *trans*-4-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksilne kisline:

$$\eta = 93,7\%$$

**Mr = 408,09**

Elementna sestava: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

T<sub>t</sub> = 202-205 °C

R<sub>f</sub> ≈ 0.52 (EtOAc)

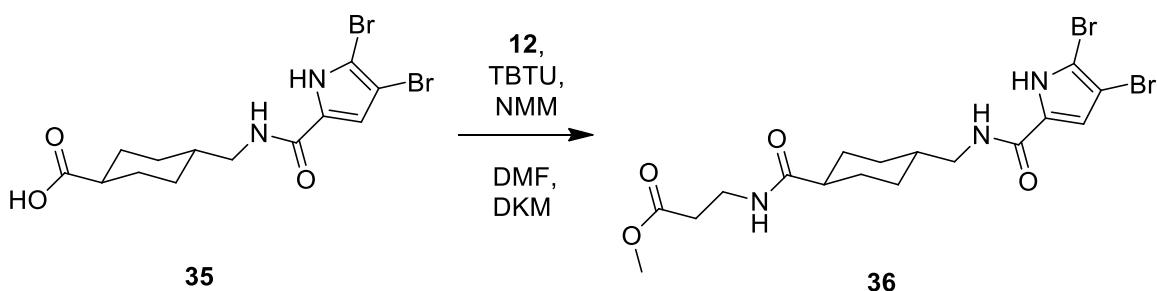
### Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,94 (q, *J* = 9,2Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,25 (q, *J* = 9,5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,43 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,74 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COOH); 1,95 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-COO); 2,13 (m, 1H, CH-COOH); 3,05 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 6,94 (s, 1H, Ar-H); 8,07 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,02 (br s, 1H, COOH); 12,62 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 176,7; 158,8; 128,2; 112,4; 104,3; 97,7; 44,5; 42,5; 37,1; 29,4; 28,2 ppm

**IR (KBr):**  $\nu = 3399, 3124, 2926, 2857, 1724, 1691, 1636, 1563, 1522, 1415, 1394, 1374, 1314, 1235, 1204, 1146, 1133, 1044, 975, 932, 919, 903, 836, 775, 749, 677, 633, 611, 578, 533 \text{ cm}^{-1}$

## 7.20. Sinteză metil 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido)propanoata



**Postopek:**

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **35** (110 mg, 0,271 mmol) smo raztopili v DMF (5 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,180 ml, 1,63 mmol, 5 ekv.) in TBTU (104 mg, 0,325 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **12** (45 mg, 0,325 mmol, 1,2 ekv.) raztopljeno v DKM (2 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 20 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v lij ločnik in jo spirali z 10 ml 10% raztopine citronske kisline. Izpadle kristale smo odfiltrirali s presesavanjem. Matičnico smo prenesli v lij ločnik in jo zaporedoma spirali z 10 ml 10% raztopine citronske kisline, 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in nato s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Dobili smo 117 mg (0,238 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **36**.

**Analiza metil 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido) propanoata:**

$\eta = 88,0\%$

Mr = 493,19

Elementna sestava: C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Tt = 198-202 °C

Rf = 0,38 (EtOAc)

Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 0,89$  (q,  $J = 9,2\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,28 (q,  $J = 9,5\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,43 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,71 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 2,01 (m, 1H, CH-CONH); 2,43 (t, 2H, COO-CH<sub>2</sub>); 3,04 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,23 (q,  $J = 4,3\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 6,94 (s, 1H, Ar-H); 7,81 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO); 8,11 (t, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,62 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

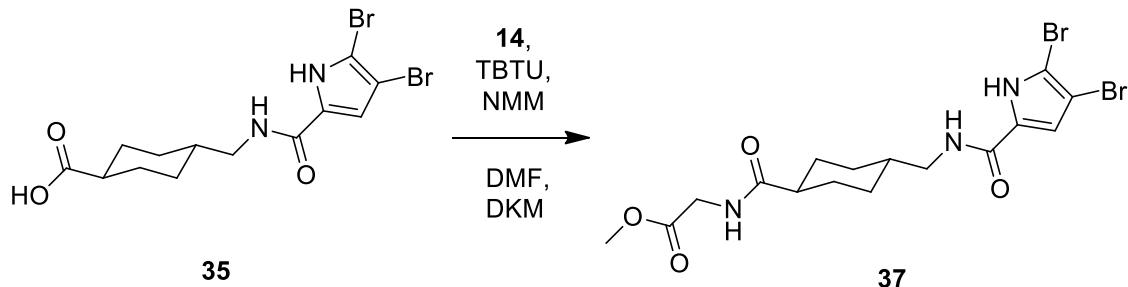
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 175,1; 171,8; 158,2; 112,5; 104,2; 97,7; 51,3; 44,6; 43,9; 37,1; 34,5; 33,7; 29,6; 28,7$  ppm

**MS (ESI) m/z 490,0 (M-H)<sup>-</sup>**

**HRMS:** izračunano, 489,9950; izmerjeno, 489,9987

**IR (ATR):**  $\nu = 3407, 3284, 3129, 2928, 2845, 1723, 1633, 1556, 1515, 1438, 1412, 1394, 1375, 1323, 1290, 1271, 1234, 1200, 1182, 1074, 1004, 974, 931, 904, 871, 832, 813, 774, 751, 693, 614, 567, 551 \text{ cm}^{-1}$

## 7.21. Sinteza metil 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicinata



Postopek:

Reakcijo smo izvajali v argonovi atmosferi. Spojino **35** (110 mg, 0,271 mmol) smo raztopili v DMF (5 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo dodali NMM (0,180 ml, 1,63 mmol, 5 ekv.) in TBTU (104 mg, 0,325 mmol, 1,2 ekv.). Po 15 minutah smo dodali spojino **14** (40 mg, 0,325 mmol, 1,2 ekv.) raztopljeno v DKM (2 ml). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 24 ur.

Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in preostanek raztopili v 20 ml DKM. Organsko fazo smo prenesli v lij ločnik in jo zaporedoma spirali z 2 x 10 ml 10% raztopine citronske kisline, 2 x 10 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in 10 ml nasičene raztopine NaCl. Dodali smo 10 ml EtOAc in pod znižanim tlakom odparili polovico topila. Vsebino smo ohladili na 4°C in s presesavanjem odfiltrirali izpadle kristale. Ostanek na filter papirju smo suspendirali v 5 ml DKM in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 73mg (0,152mmol) brezbarvnih kristalov spojine **37**.

**Analiza metil 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicinata:**

$$\eta = 56,2\%$$

$$\text{Mr} = 479.16$$

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

T<sub>t</sub> = 218-222 °C

R<sub>f</sub> ≈ 0.40 (EtOAc)

### Izgled: Amorf

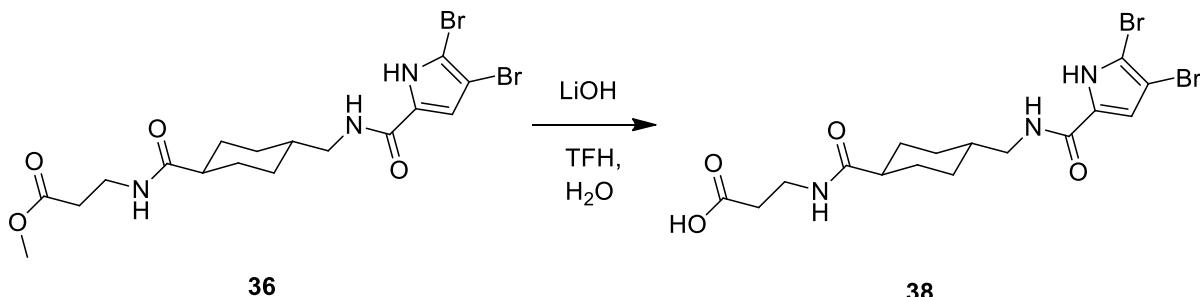
**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,92 (q, *J* = 8,3Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,29 (q, *J* = 8,1Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,44 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,75 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 2,11 (m, 1H, CH-CONH); 3,05 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 3,79 (d, *J* = 4,4Hz, 2H, COO-CH<sub>2</sub>-NHCO); 6,90 (s, 1H, Ar-H); 8,00 (br s, 1H, COO-CH<sub>2</sub>-NHCO); 8,16 (t, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,63 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**MS (ESI) m/z 476,0 (M-H)<sup>-</sup>**

**HRMS:** izračunano, 475.9821; izmerjeno, 475.9821

**IR (ATR):**  $\nu = 3324, 3146, 3114, 2926, 2852, 1747, 1638, 1615, 1547, 1519, 1434, 1367, 1323, 1208, 1187, 978, 937, 812, 774, 612 \text{ cm}^{-1}$

## 7.22. Sinteza 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido propanojske kisline



Postopek:

Spojino **36** (80 mg, 0,163 mmol) smo raztopili v THF (3,5 ml) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,65ml, 0,65 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperature in mešali 1 uro.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 2 ml demineralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadali kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2 x 15 ml EtOAc. Obe organski fazi smo združil in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 64mg (0,136mmol) brezbarvnih kristalov spojine **38**.

**Analiza            3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1H-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karboksamido) propanojske kisline:**

$\eta = 82,4\%$

Mr = 479,16

Elementna sestava: C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Tt = 126-129 °C

Rf = 0,08 (EtOAc)

Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 0,88$  (q,  $J = 9,6$ Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,29 (q,  $J = 9,5$ Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,43 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,71 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 2,01 (m, 1H, CH-CONH); 2,34 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH); 3,04 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,20 (q,  $J = 4,3$ Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO); 6,94 (s, 1H, Ar-H); 7,77 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHCO); 8,06 (t, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,18 (br s, 1H, COOH); 12,64 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

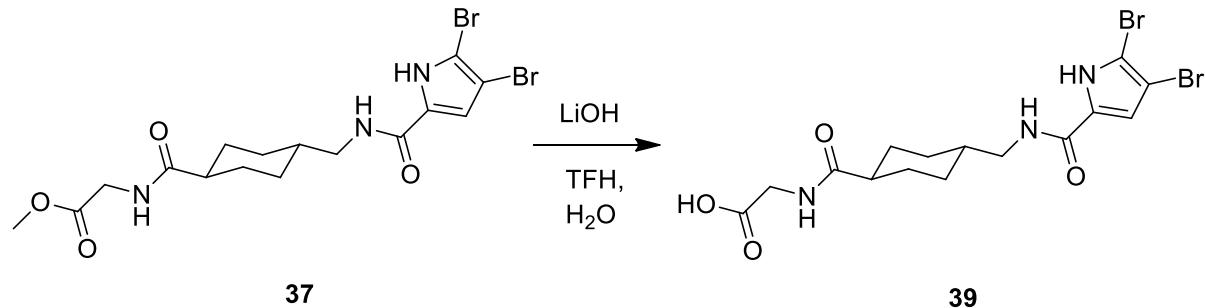
**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):**  $\delta = 175,1; 172,9; 158,8; 128,2; 112,4; 104,3; 97,7; 44,6; 43,8; 37,1; 34,6; 33,9; 29,6; 28,7$  ppm

**MS (ESI) m/z 476,0 (M-H)<sup>-</sup>**

**HRMS:** izračunano, 475,9821; izmerjeno, 475,9831

**IR (ATR):**  $\nu = 3312, 3160, 2932, 2853, 1746, 1702, 1612, 1557, 1523, 1484, 1414, 1388, 1322, 1274, 1237, 1204, 9777, 934, 812, 614$  cm<sup>-1</sup>

**7.23. Sinteza 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicina**



## **Postopek:**

Spojino **37** (50 mg, 0,104 mmol) smo raztopili v THF (2,5 mL) in H<sub>2</sub>O (1 ml). Ob mešanju na ledeni kopeli smo po kapljicah dodali 1M LiOH (0,520 ml, 0,520 mmol, 4 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali 60 minut na 0 °C.

Pod znižanim tlakom smo odparili organsko topilo. Ostanek smo raztopili v 2 ml deminiralizirane vode in ob mešanju na ledeni kopeli nakisali raztopino z 1M HCl do pH 2, pri čemer so izpadali kristali. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2 x 15 ml EtOAc. Obe organski fazi smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 45 mg (0,097 mmol) brezbarvnih kristalov spojine **39**.

**Analiza 3-(*trans*-4-((4,5-dobromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)metil)cikloheksan-1-karbonil) glicina:**

$$\eta = 92,8\%$$

Mr = 465,14

Elementna sestava: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

T<sub>t</sub> = 150-153 °C

Rf = 0,06 (EtOAc)

Izgled: Amorf

**<sup>1</sup>H – NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 0,92 (q, *J* = 9,4Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,30 (q, *J* = 7,7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,45 (m, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 1,75 (m, 2x2H, CH<sub>2</sub>-CH-CONH); 2,11 (m, 1H, CH-CONH); 3,06 (t, 2H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 3,70 (d, *J* =

4,4Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-NHCO); 6,95 (s, 1H, Ar-H); 8,04 (t, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-NHCO); 8,06 (t, 1H, CH-CH<sub>2</sub>-NHCO); 12,46 (br s, 1H, COOH); 12,65 (br s, 1H, Ar-NH) ppm

**<sup>13</sup>C – NMR (75MHz, DMSO-d6):** δ = 175,4; 171,4; 158,8; 128,2; 112,4; 104,3; 97,7; 44,6; 43,7; 40,4; 37,1; 29,6; 28,7 ppm

**IR (ATR):** ν = 3316, 3153, 2930, 2850, 2363, 1735, 1639, 1616, 1557, 1519, 1411, 1390, 1323, 1232, 1210, 977, 812, 765, 613 cm<sup>-1</sup>

## 8. Rezultati

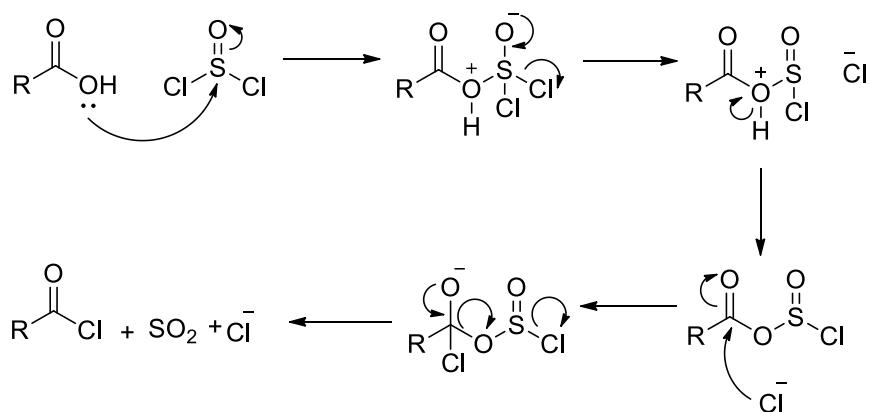
Tabela II: Rezultati biološkega testiranja

Oznaka spojine	Struktura	Rezidualna aktivnost 100 % - ni zaviranja 0% - popolno zaviranje	$IC_{50}$
<b>24</b>		RA (100 µM) = 75 % RA (10 µM) = 128 %	NEAKTIVNA
<b>28</b>		RA (100 µM) = 48 % RA (10 µM) = 79 %	$IC_{50} \approx 100 \mu M$
<b>25</b>		RA (100 µM) = 78 % RA (10 µM) = 94 %	NEAKTIVNA
<b>29</b>		RA (100 µM) = 14 % RA (10 µM) = 77 %	$IC_{50} = 15,1 \mu M$
<b>26</b>		RA (100 µM) = 78 % RA (10 µM) = 102 %	NEAKTIVNA
<b>30</b>		RA (100 µM) = 104 % RA (10 µM) = 107 %	NEAKTIVNA
<b>27</b>		RA (100 µM) = 87 % RA (10 µM) = 115 %	NEAKTIVNA
<b>31</b>		RA (100 µM) = 79 % RA (10 µM) = 97 %	NEAKTIVNA
<b>36</b>		RA (100 µM) = 82 % RA (10 µM) = 94 %	NEAKTIVNA
<b>38</b>		RA (100 µM) = 86 % RA (10 µM) = 93 %	NEAKTIVNA
<b>37</b>		RA (100 µM) = 116 % RA (10 µM) = 116 %	NEAKTIVNA
<b>39</b>		RA (100 µM) = 100 % RA (10 µM) = 90 %	NEAKTIVNA

## 9. Razprava

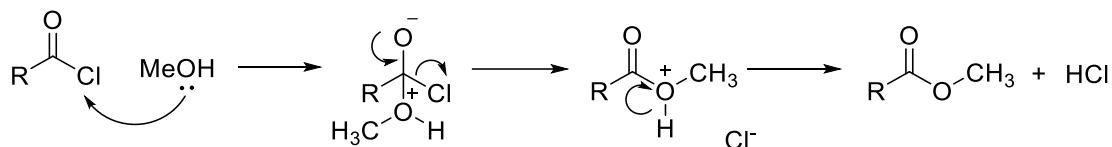
## **9.1. Razprava k uvedbi metilne zaščitne skupine na karboksilni kislini**

Pri reakciji smo uvajali metilno zaščitno skupino na karboksilno skupino različnih aminokislin. V nadalnjih reakcijah s sklopitvenim reagentom bi prisotnost nezaščitene karboksilne skupine povzročala nastanek stranksih produktov. Z zaščito smo dosegli, da bodo nadaljne reakcije potekale izključno na aminski skupini aminokisline. Gre za sistem dveh zaporednih reakcij adicija-eliminacija spojine z reagentoma  $\text{SOCl}_2$  in brezvodni MeOH, slednji pa služi tudi kot topilo. Najprej poteče nukleofilni napad karboksilne skupine na žveplov atom tionil klorida. Pri reakciji nastaja kloridni ion, ki napade karbonilno skupino novonastanega mešanega anhidridnega intermediata. Pri tem  $\text{SO}_2\text{Cl}$  kot dobro izstopajoča skupina izstopa iz reakcije, nastaja pa kislinski klorid (Slika 18).



Slika 18: Mehanizem nastanka kislinskega klorida (31)

V drugi stopnji prost elektronski par MeOH napade karbonilno skupino kislinskega klorida, pri čemer izstopi klor kot dobro izstopajoča skupina. Končni produkt celotnega postopka je metilni ester (Slika 19) (31).

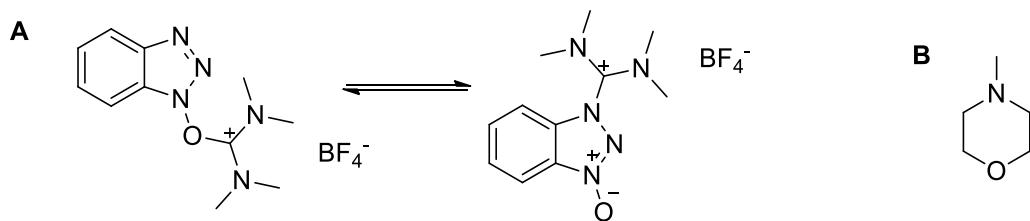


Slika 19: Mehanizem nastanka estra (31)

Reakcija s kislinskimi kloridi mora vedno potekati v brezvodnih pogojih, saj ob prisotnosti vode kislinski klorid hidrolizira do kisline že na sobni temperaturi.  $\text{SOCl}_2$  lahko v prisotnosti vode hidrolizira do žveplove kisline, zato ga shranjujemo v brezvodnih pogojih. Pri dodajanju tionil klorida v reakcijo se sprošča veliko energije, ki se pretvori v toploto. Pri delu moramo biti pozorni, saj se lahko zgodi razpad spojin, poleg tega pa lahko poteka kloriranje na drugih mestih. Da bi to preprečili, dodajamo na 3 sekunde po eno kapljico reagenta v reakcijsko zmes ob mešanju na ledeni kopeli. Upoštevati moramo tudi morebitno hidrolizo, zato z uporabo štirih ekvivalentov  $\text{SOCl}_2$  povečamo izkoristek reakcije. Končni produkt reakcije je metilni ester aminoksilne. Zaradi sproščanja  $\text{HCl}$  smo pri reakciji dobili aminsko skupino v obliki soli. Teoretično bi kislinski klorid lahko napadel aminsko skupino, pri čemer bi aminokislina polimerizirala. Do tega ne pride zaradi velikega prebitka  $\text{MeOH}$ , ki z veliko večjo verjetnostjo vstopa v reakcijo. Drugi razlog za to pa je sproščanje  $\text{HCl}$  pri reakciji, ki pretvarja močan nukleofil  $-\text{NH}_2$  v šibak nukleofil  $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$  (31).

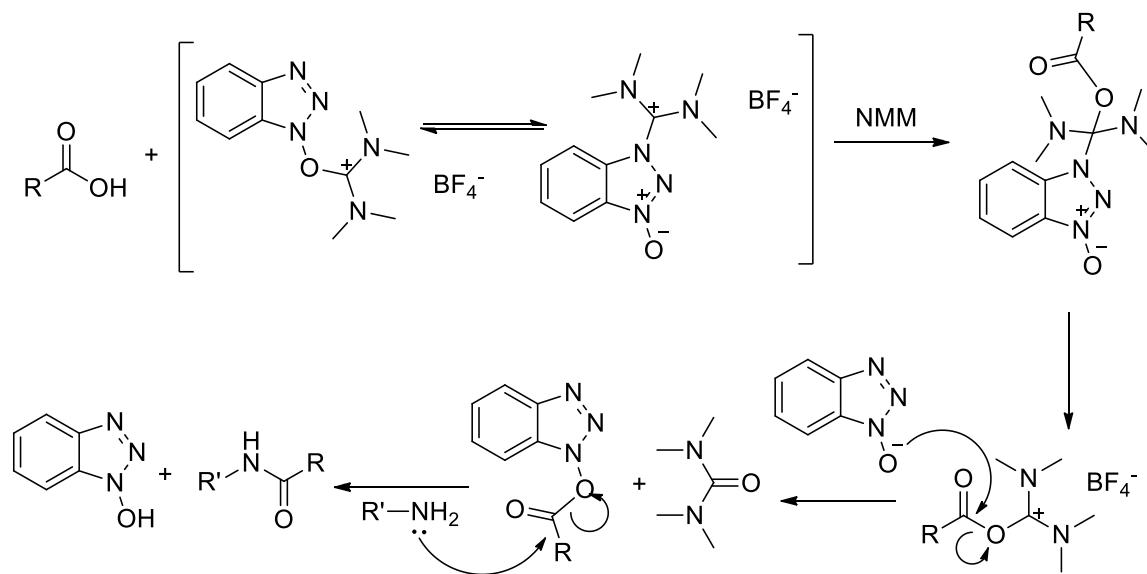
## 9.2. Razprava k tvorbi amida z TBTU in NMM

Pri reakciji smo tvorili amidno vez med aminsko in karboksilno skupino. Za izvedbo smo uporabili sklopitveni reagent  $N,N,N',N'$ -tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat (TBTU; Slika 20A) in organsko bazo *N*-metil morfolin (NMM; Slika 20B) (32).



Slika 20: TBTU (A) in NMM (B) (32)

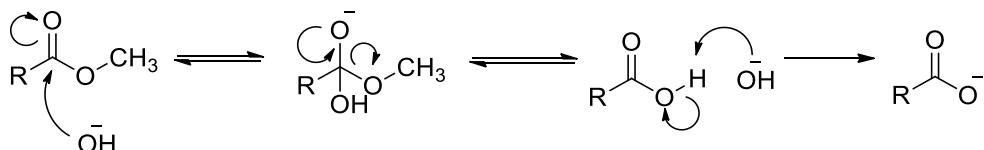
Celotna reakcija poteka po sistemu dveh zaporednih mehanizmih adicija-eliminacija. V prisotnosti vsaj enega ekvivalenta NMM poteče nukleofilni napad karboksilne skupine na reaktivnejši kompleks TBTU. Pri tem nastane intermediat med karboksilno skupino in uronijevim fragmentom, benzotriazol oksim pa izstopi iz reakcije. Sledi nukleofilni napad novonastalega benzotriazol oksima v karbonilni center intermediata, pri čemer izstopi tetrametil urea, končni produkt pa je nastanek aktivirane karbonilne skupine. V drugi stopnji poteče nukleofilni napad aminske skupine na novonastali elektofilni center, pri čemer nastaja končni produkt reakcije – amid (Slika 21) (33). V reakciji uporabimo 1,2 ekvivalenta TBTU, ki ga dodamo v medij ohlajen na 0°C. Z izvajanjem reakcije pri nižji temperaturi zagotovimo nižji potek reakcij, v katerih nastajajo stranski produkti. Vloga NMM v reakciji je tvorjenje in ohranjanje bazičnega okolja, ki omogoča nastanek uronijeve soli (32). Pri sklopitvenih reakcijah s čistimi optičnimi izomeri lahko prihaja do pojava racemizacije. Če izstopajoča skupina poveča kislost  $\alpha$ -vodika, lahko to privede do enolizacije ali nastanka oksazolona, kar omogoča izstop  $\alpha$ -vodika iz reakcije in nastanek racemata. TBTU je ustrezен reagent za supresijo racemizacije. Zaradi dobrih elektron akceptorskih značilnosti benzotriazolna komponenta stabilizira aktiviran kompleks in s tem zavre oba mehanizma racemizacije (33).



Slika 21: Mehanizem nastanka amida (32, 33)

### 9.3. Razprava k odstranitveni metilnega estra kot zaščitne skupine s karboksline kisline

Namen reakcije je odstranitev metilne zaščite in s tem uvedba proste karboksilne kisline. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne substirucije. Uporabljali smo zmes topil THF in demineralizirano vodo v razmerju 4/1. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli v močno alkalnih pogojih z 4 ekvivalenti 1M LiOH. Reakcija je reverzibilna, zato z uporabo 4ih ekvivalentov LiOH pomaknemo ravnotežje reakcije v smer produktov. Ob dodajanju LiOH se sprošča veliko energije, ki se pretvarja v toploto. Pri delu moramo biti pozorni, saj se lahko zgodi razpad spojin. Da bi to preprečili, dodajamo na 2 sekundi eno kapljico LiOH ob mešanju na ledeni kopeli. HO<sup>-</sup> je dovolj močna baza, da napade karbonilno skupino estra, pri čemer alkoksidni ion izstopa iz reakcije. Pri reakciji poteče še ionizacija karboksilne skupine. Pri tem nastajata litijeva sol in metanol (Slika 22) (31).



Slika 22: Mehanizem bazične hidrolize estra (31)

### 9.4. Razprava k biološkem testiranju na encimu *E.coli* DNA giraza

Namen testa je biološko ovrednotiti sintetizirane spojine. Dvanajstim spojinam smo testirali sposobnost zaviranja delovanja encima DNA giraza iz bakterije *E.coli* in opravili slepi poskus brez zaviralca (36).

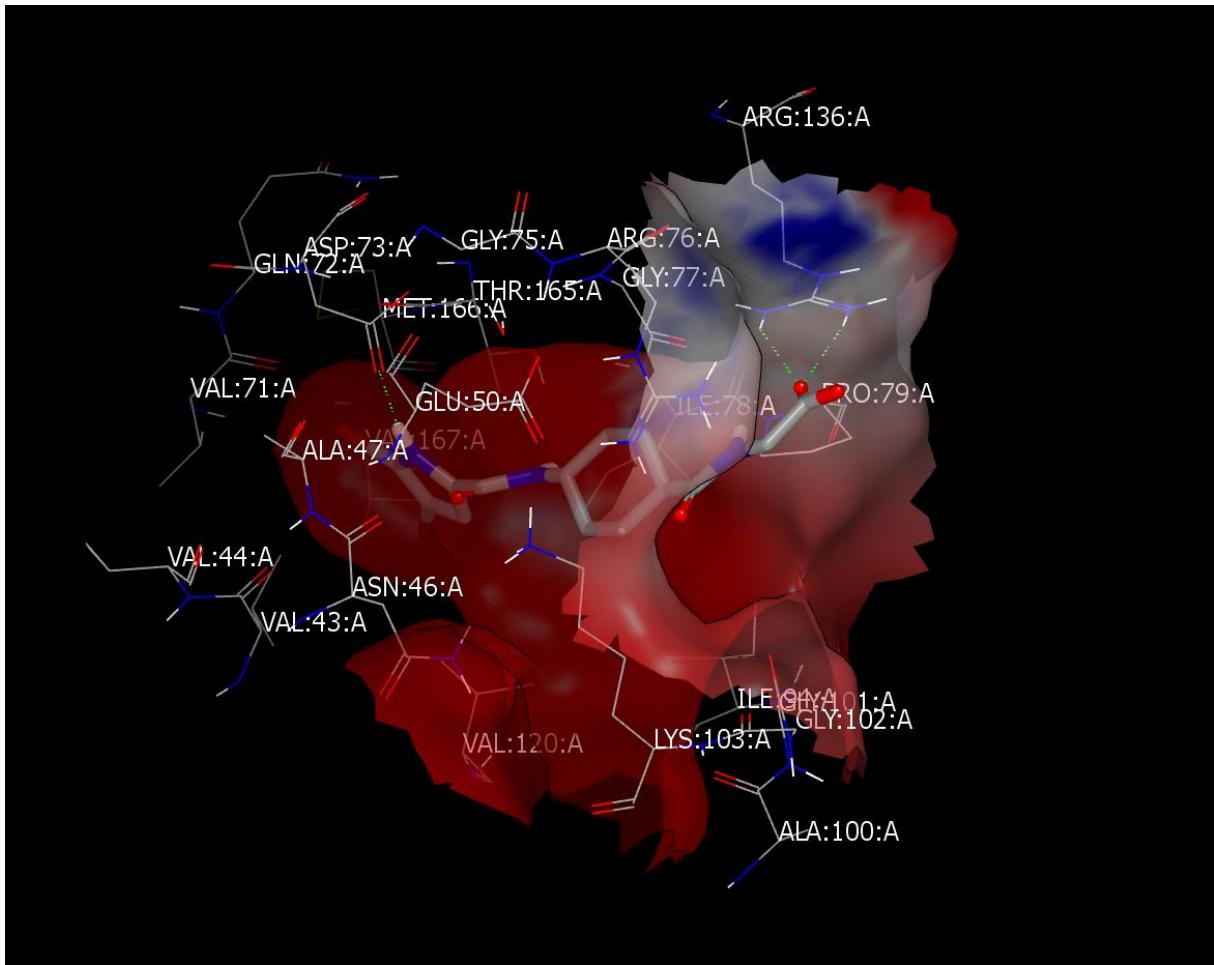
Mikrotitrsko ploščico prevlečeno s proteinom streptavidinom smo omočili z uporabo pufrske raztopine za spiranje (37). Dodali smo tripleks-formirajoče polipirimidinske oligonukleotide s kovalentno vezanim biotinom na 5' koncu (TFO1). Močne interakcije med biotinom in streptavidinom omogočajo imobilizacijo TFO1 v podlago (36). Nevezan TFO1 smo odstranili s spiranjem s pufersko raztopino. Dodali smo zaporedoma raztopino z 0,75 µg relaksirano obliko plazmida imenovanega pNO1, raztopino z določeno koncentracijo zaviralca in raztopino z 1,5 U DNA giraze iz bakterije *E.coli*. Inkubirali smo 30 minut pri temperaturi

37°C. Dodali smo tripleks-formirajoči pufer (TF pufer) in inkubirali še 30 minut pri sobni temperaturi (37). TF pufer ustavi supernavijanje plazmida in omogoča formacije tripleksov (36). Nevezan plazmid smo sprali s TF puferom in dodali fluorescentno barvilo SYBR Gold. Inkubirali smo še 20 minut in fluorimetrom odčitali fluorescenco pri  $\lambda$  495 nm in 537 nm (37).

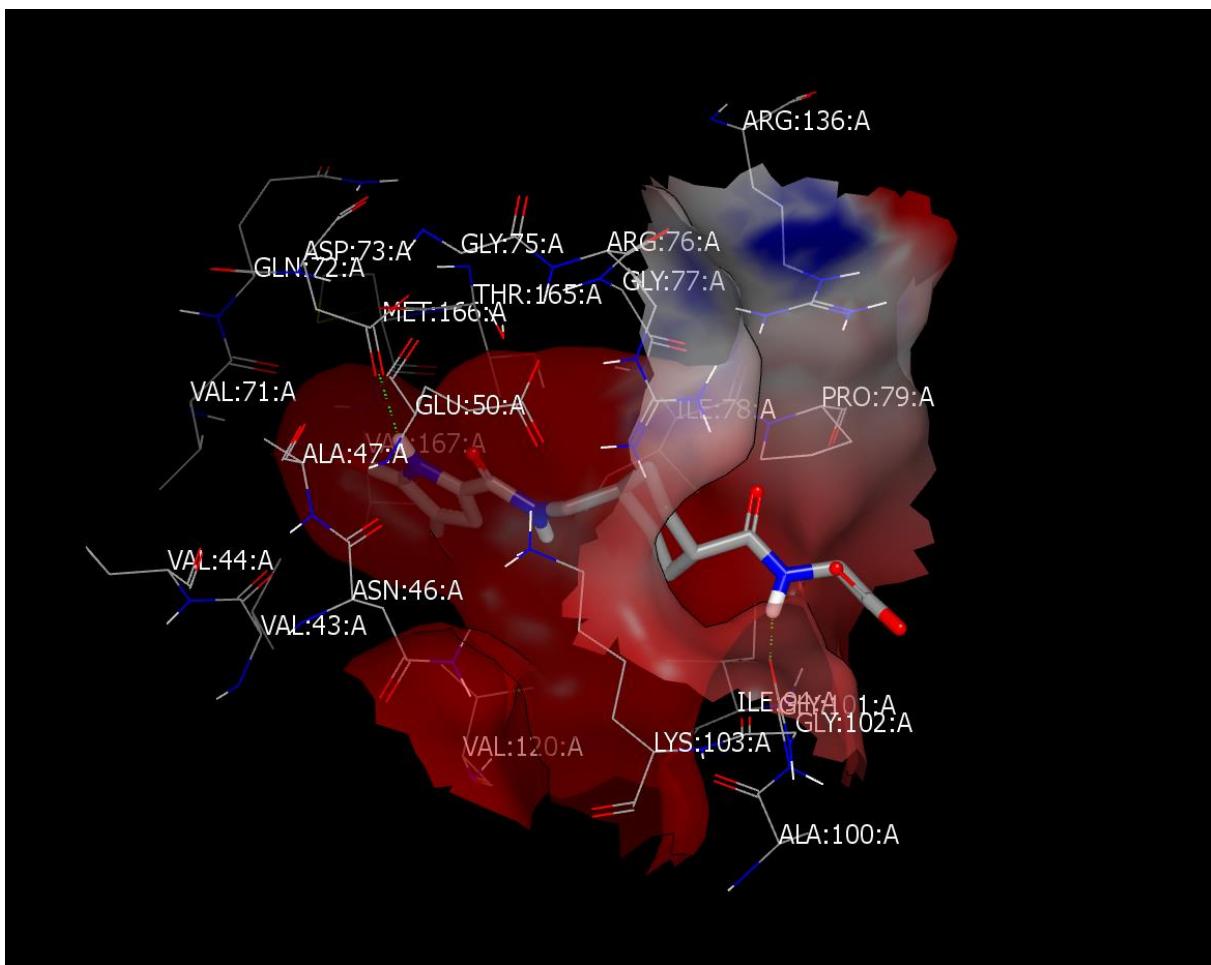
Pri testu izkoriščamo sposobnost supernavite DNA, in sicer tvorjenje tripleksov. Gre za strukturo alternativno dvojni vijačnici DNA. Pri tripleksu se nahaja tretja veriga v praznini med dvema sosednjima vijačnicama in tvori vodikove vezi z eno izmed vijačnic. Plazmid pNO1 je modifciran tako, da vsebuje 20 pb velik vključek, ki je sposoben tvoriti tripleks z eno TFO1. Tripleksi so pri pogojih testa stabilni, zato ostanejo ob spiranju s pufri vezani na podlago. SYBR Gold je fluorescenčno barvilo, ki se preferentno veže med bazima paroma supernavite DNA. V slepem poskusu dobimo vrednost, pri kateri je rezidualna aktivnost encima 100%, pri vrednosti fluorescence 0 pa je rezidualna aktivnost 0%. Z izmerjenimi vrednostmi fluorescenc dobimo podatke za rezidualno aktivnost pri različnih koncentracijah zaviralca in na podlagi tega izračunamo vrednost IC<sub>50</sub> (36).

## 9.5. Razprava k rezultatom biološkega vrednotenja

Z računalniškimi metodami smo izvedli molekulsko sidranje spojin **29** (Slika 23) in **39** (Slika 24) v aktivnem mestu encima DNA giraza B iz bakterije *E.coli*.



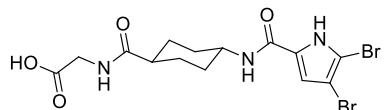
Slika 23: Predvidene interakcije spojine **29**, označene kot zelene črtkane črte



Slika 24: Predvidene interakcije spojine 39, označene kot zelene črtkane črte

Glede na rezultate sidranja sklepamo, da bo spojina **29** zasedla ugoden položaj v aktivnem mestu in tvorila vse pomembne interakcije. Za spojino **39** pričakujemo glede na rezultate višji IC<sub>50</sub>, saj opazimo odsotnost interakcije z Arg136 zaradi drugačnega položaja v aktivnem mestu.

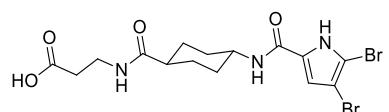
Pri biološkem vrednotenju spojin se je izkazalo, da je najmočnejša spojina **29** (Slika 25) z IC<sub>50</sub> 15,1 μM.



Slika 25: Spojina 29

Sklepamo, da spojina lahko tvori ustrezne interakcije z Asp73, Arg136, ohranjeno molekulo vode in hidrofobne interakcije z Val43, Val71 in Val120.

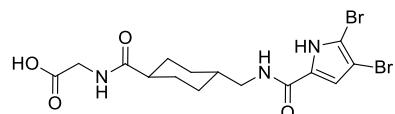
Spojina **28** (Slika 26) je za eno metilensko skupino podaljšan analog spojine **29**.



**Slika 26:** Spojina **28**

Vrednost IC<sub>50</sub> spojine **28** je 7-krat višja kot pri spojini **29** in znaša približno 100 µM. Zaradi večje razdalje med terminalnima deloma karboksilat spojine **28** verjetno ni sposoben tvoriti tako močnih ionskih interakcij z Arg136 kot spojina **29**.

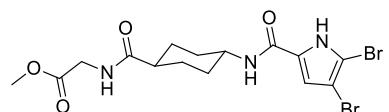
Spojina **39** (Slika 27) je analog spojine **29**, le da ima prisoten še metilenski most.



**Slika 27:** Spojina **39**

Izkazala se je za neaktivno, kar potrjuje rezultate molekulskega sidranja, saj neugodna lega cikloheksanskega fragmenta onemogoča tvorjenje ionskih vezi z Arg136 (Slika 24). Za vezavo so primernejše spojine brez prisotnega metilnega mosta.

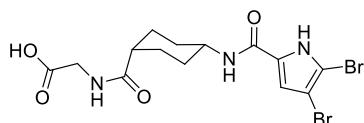
Spojina **25** (Slika 28) je metilni ester spojine **29**.



**Slika 28:** Spojina **25**

Izkazala se je za neaktivno, kljub temu da ester omogoča nastanek vodikovih vezi. Prisotnost metilnega estra onemogoča nastanek ključnih ionskih vezi z Arg136. Za vezavo v aktivno mesto je primernejša spojina brez metilnega estra, vendar pa bi lahko ta pripomogel k boljšem prehajanjem spojine v bakterijsko celico.

Spojina **31** (Slika 29; *cis*) je geometrijski izomer spojine **29** (*trans*).



**Slika 29:** Spojina 31

Obe substituciji spojine **29** sta v radialni legi glede na cikloheksanski obroč, kar omogoča ustrezeno lego terminalnih koncev molekule za tvorjenje vseh ključnih vezi. Pri spojini **31** obe substituciji nista v radialni legi glede na cikloheksanski obroč. Spojina **31** je neaktivna, saj verjetno aksialna lega ene izmed substitucij spremeni položaj karboksilne skupine v aktivnem mestu in onemogoči tvorbo ionskih interakcij z Arg136.

Rezultati se zrcalijo tudi v opažanjih pri podobnih spojinah pripravljenih na katedri za farmacevtsko kemijo, kjer je zamenjava dibromopirola z indolom doprinesla do upada jakosti vezave. Dibromopirolni fragment je najbolj ugoden za tvorjenje vseh želenih interakcij.

Rezultati biološkega vrednotenja se skladajo z rezultati molekulskega sidranja. Potrdili smo našo domnevo, da centralni distančnik in aminokislina spojine **29** omogočata najugodnejšo lego obeh terminalnih delov spojine za tvorjenje vseh ključnih interakcij v aktivnem mestu.

## 10. SKLEP

Sintetizirali in biološko vrednotili smo 12 spojin. Testiranje je potekalo na izoliranem encimu *E.coli* DNA giraze. Kot aktivni spojini sta se izkazali spojina **29** z IC<sub>50</sub> 15,1 μM in za eno metilensko skupino daljši analog spojina **28** z IC<sub>50</sub> približno 100 μM.

Spojina **29** ima “drug-like” lastnosti in bi lahko predstavljala spojino vodnico za nadaljnje raziskave. S substitucijami na cikloheksanskem obroču bi lahko vpostavili dodatno vodikovo vez z Asp46 in s tem izboljšali afiniteto oz. jakost delovanja. Alifatska karboksilna kislina ni idealen fragment za protibakterijske učinkovine, saj je pri fiziološkem pH v popolnoma ionizirani obliki in zato z difuzijo težko prehaja v bakterijsko celico. Z bioizosternimi

zamenjavami karboksilata s tetrazolom, hidroksioksazolom, oksadiazolonom, sulfonimidom, sulfonamidom ali tiolom bi lahko ohranili, a zmanjšali kislinske lastnosti in tako pozitivno vplivali na MIC. Arilne bioizosterne zamenjave bi lahko še dodatno izboljšale afiniteto, saj lahko tvorijo  $\pi$ -kation interakcije z Arg76. Za več informacij bi bilo potrebno narediti MIC teste spojine **29** in njenih analogov s predlaganimi bioizosternimi zamenjavami karboksilne skupine na bakteriji *E.coli*, saj bi tako ugotovili, ali ima knjižnica spojin potencial za uspešne protibakterijske učinkovine.

## 11. VIRI IN LITERATURA

1. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Fazly Bazzaz B.: Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis* 95 (2016) 32-42
2. Lewis K.: Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews, Drug Discovery*, volume 12, may 2013, 371-387
3. Tommasi R., Brown D., Walkup G., Manchester J., Miller A.: ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery, *Nature Reviews, Drug Discovery*, volume 14, august 2015, 529-542
4. Chopra I.: The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68: 496–505
5. Zhou G., Shi Q.-S., Huang X.-M., Xie X.-B.: The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 21711-21733
6. Alekshun M., Levy S.: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, March 23, 2007, 1037-1050
7. Fisher J., Meroueh S., Mobashery S.: Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chemical Reviews*, 2005, Vol. 105, No. 2, 395-424
8. Kingston D.: Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of natural products* 2011, 74, 496–511

9. Arenz S., Wilson D.: Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitros, Antibiotic Selectivity and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Molecular Cell* (2016), 1-12
10. Uria-Nickelsen M., Neckermann G., Sriram S., Andrewa B., Manchester J., Carcanague D., Stokes S., Hull K.: Novel topoisomerase inhibitors: microbiological characterisation and in vivo efficacy of pyrimidines. *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (2013) 363-371
11. Tomašić T. and Peterlin Mašič L.: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014, 14, 130-151
12. Collin F., Karkare S., Maxwell A.: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 92:479–497
13. Bates A., Berger J., Maxwell A.: The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 15 6327–6339
14. Oblak M., Kotnik M., Solmajer T.: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Current Medical Chemistry* 2007, 14, 2033-2047
15. Nakanishi A., Imajoh-Omhi., Hanaoka F.: Characterization of the Interaction between DNA Gyrase Inhibitor and DNA Gyrase of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 11, 8949-8954
16. Mayer C., Janin Y.: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chemical Reviews* 2014, 114, 2313–2342
17. Saiz-Urra L., Cabrera Perez M. A., Morales Helguera A., Froeyen M.: Combinig molecular docking and QSAR studies for modeling the antigyrase activity of cyclothialidine derivates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 2736-2747
18. Škedelj V., Tomašić T., Peterlin Mašič L., Zega A.: ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 54, 915-929

19. Garcia-Echeverria C., Traxler P., Evans D.: ATP Site-Directed Competitive and Irreversible Inhibitors of Protein Kinases
20. Basarab G., Manchester J., Bist S., Boriack-Sjodin A., Dangel B., Illingworth R., Sherer B., Sriram S., Uria-Nickelsen M., Eakin A.: Fragment-to-Hit-to-Lead Discovery of a Novel Pyridylurea Scaffold of ATP Competitive Dual Targeting Type II Topoisomerase Inhibiting Antibacterial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 8712–8735
21. Manchester J., Dussault D., Rose J., Boriack-Sjodin A., Uria-Nickelsen M., Ioannidis G., Bist S., Fleming P., Hull K.: Discovery of a novel azaindole class of antibacterial agents targeting ATPase domains of DNA gyrase and Topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012) 5150-5156.
22. Bisacchi G., Manchester J.: A New-Class Antibacterial • Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases* 2015, 1, 4–41
23. Oblak M., Grdadolnik Golič S., Kotnik M., Poterszman A., Atkinson A., Nierengarten H., Desqlancq D., Moras D., Solmajer T.: Piophysical characterization of an indolinone inhibitor in the ATP-binding site of DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (2006) 1206-1213
24. Brvar M., Perdih A., Renko M., Anderluh G., Turk D., Solmajer T.: Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012, 55, 6413-6426.
25. Brvar M., Perdih A., Hodnik V., Renko M., Anderluh G., Jerala R., Solmajer T.: In silico discovery and piophysical evaluation of novel 5-(2-hydroxybenzylidene) rhodamine inhibitors pf DNA gyrase B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (2012) 2572-2580
26. Eakin A., Green O., Hales N., Walkup G., Bist S., Singh A., Mullen G., Bryant J., Embrey K., Gao N., Breeze A., Timms D., Andrews B., Uria-Nickelsen M., Demeritt J., Loch III J., Hull K., Blodget A., Illingworth R., Prince B., Boriack-Sjodin A., Hauck S., MacPherson L., Ni H., Sherer B.: Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors:

- Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening to Identify Antibacterial Agnets. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy* 2012, 56, 1240-1246
27. Sherer B., Hull K., Green O., Basarab G., Hauck S., Hill P., Loch III N., Mullen G., Bist S., Bryant J., Boriack-Sjodin A., Read J., DeGrace N., Uria-Nikelsen M., Illingworth R., Eakin A.: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (2011) 7416-7420
28. Tomašić T., Katsamakas S., Hodnik Ž., Ilaš J., Brvar M., Solmajer T., Montalvao S., Tammela P., Banjanac M., Ergović G., Anderluh M., Peterlin Mašič L., Kikelj D.: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry*
29. Zhang J., Yang Q., Cross J., Romero J.A., Poutsiaka K., Epie F., Bevan D., Wang B., Zhang Y., Chavan A., Zhang X., Moy T., Daniel A., NguyenK., Chamberlain B., Carter N., Shotwell J., Silverman J., Metcalf C. III, Ryan D., Lippa B., Dolle R.: Discovery of Azaindole Ureas as a Novel Class of Bacterial Gyrase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58, 8503–8512
30. Cross J., Zhang j., Yang Q., Mesleh M., Romero J.A., Wang B., Bevan D., Poutsiaka K., Epie F., Moy T., Daniel A., Shotwell J., Chamberlain B., Carter N., Andersen O., Barker J., Ryan D., Metcalf C. III, Silverman J., Nguyen K., Lippa B., Dolle R.: Discovery of Pyrazolopyridones as a Novel Class of Gyrase B Inhibitors Using Structure Guided Design. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2016, 7, 374–378
31. P. M. Dewick: *Essentials of Organic Chemistry For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006.
32. Shi W., Zhang J., Zjou Q., Wng X., Qi X., Guo L., Ma W., Zhou J.: A Novel Synthesis of Carboxylic Acid Oxime Esters Catalyzed by 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 26, No. 21 (2014), 7125-7128.
33. Al-Warhi T., Al-Hazimi H., El-Faham A.: Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* (2012) 16, 97-116

34. Maxwell A., Burton N., O'Hagan N.: High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 15, e104
35. *E. coli Gyrase Microplate Assay Kit*. Patent held by Plant Biosciences Ltd., Norwich, Norfolk, UK (Patent No. GB0424953.8.)